

Microplastic@food: Entwicklung einer zuverlässigen analytischen Methode

für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Mikroplastik in Lebensmitteln

Autoren: Gabriele Eder¹, Martin G.J. Löder², Dieter Fischer³, Franziska Fischer³, Benedikt Hufnagl⁴, Christian Laforsch², Eva C. Vizsolyi², Michael Washuettl¹, Martina Zederbauer⁵, Tobias Voigt⁶

Einleitung

Mikroplastik (MP), das aus sehr kleinen Kunststofffragmenten besteht – hier Partikel von 1 mm bis 1 µm – ist eine große Eintragsquelle von Kunststoff in die Umwelt. Laut der europäischen Kreislaufwirtschaftsstrategie gelangen Schätzungen zufolge in der EU zwischen 75.000 und 300.000 Tonnen MP-Partikel jedes Jahr in die Umwelt [1]. Neuere Studien haben gezeigt, dass MP bis in die menschliche Nahrung gelangen kann [2]. Daher sind Forschungsaktivitäten notwendig, welche die zuverlässige Detektion von MP in Lebensmitteln ermöglichen, dabei helfen die Eintragsquellen und Transportwege von MP-Partikeln in Lebensmittel zu identifizieren und Gegenmaßnahmen zu erarbeiten. Dieses Ziel hat sich das österreichisch-deutsche Forschungsprojekt microplastic@food gesetzt.

Folgender Forschungsansatz wurde im Rahmen des Projektes gewählt: drei führende Forschungseinrichtungen im Bereich der MP-, Polymer- und Lebensmittelforschung (Universität Bayreuth (UBT) und Leibniz Institut für Polymerforschung Dresden (IPF) in Deutschland, Österreichisches Forschungsinstitut für Chemie und Technik (OFI) in Österreich) streben an, gemeinsam

analytische Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis von MP für die Lebensmittel- und Verpackungsindustrie zu entwickeln. Im Projekt werden innovative spektroskopische bildgebende Verfahren (Raman und FTIR Spektroskopie) und fortschrittliche computerbasierte Datenverarbeitungsmethoden verwendet und weiterentwickelt, die die Generierung validierter und zuverlässiger Daten (qualitativ und quantitativ) über MP-Kontamination in Lebensmitteln ermöglichen sollen. In Fallstudien werden MP-Eintragsquellen in den wichtigen Lebensmittelgruppen

- I. Wasser und gefilterte Getränke,
- II. lösliche Nahrungsmittel (z.B. Zucker oder Salz),
- III. Stückgut/Lebensmitteloberflächen (z.B. Käsestücke oder Wurstoberflächen) ermittelt.

Darüber hinaus werden Verpackungs- und Abfüllanlagen bezüglich ihrer Rolle als Eintragsquellen untersucht.

Anhand von standardisierten MP-Probenahmeprotokollen und klar definierten Arbeitsabläufen für die Aufbereitung der Proben und deren Analyse mit FTIR- und Raman-Mikrospektroskopie, sowie für die Datenauswertung und -aufbereitung, soll eine reproduzierbare und zuverlässige Bestimmung von MP in/an Lebensmitteln möglich gemacht werden. Außerdem werden allgemeine Anleitungen zur Probenahme und anschließender Prüfung des Einflusses von Verpackungs- und Abfüllsystemen auf den MP-Gehalt in Getränken und auf/in Lebensmitteln erarbeitet. Auf Basis dieser Daten werden die Eintragsquellen identifiziert und präventive Maßnahmen zur Vermeidung/Reduzierung

des MP-Eintrags in Nahrungsmitteln und Getränken entwickelt.

Probenvorbereitung

In Lebensmitteln werden hauptsächlich die kleinen MP-Partikel (< 500 µm) erwartet, die mit dem bloßen Auge nicht mehr sichtbar sind. Die Analyse dieser kleinen Partikel mittels spektroskopischen Methoden erfordert zur Probenvorbereitung zwingend eine Platzierung der Proben auf einem Substrat wie z.B. einer Filtermembran aus Aluminiumoxid oder Silizium. Vor diesem Hintergrund stellen die in der ersten Fallstudie adressierten Wässer und gefilterte Getränke einfach aufzubereitende Matrices dar, bei denen die Probenvorbereitung relativ einfach sein wird. Im Allgemeinen herrscht jedoch in vielen MP-Proben zumeist ein ungünstiges Target (MP) – Non Target (organische oder anorganische Partikel) Verhältnis vor, was häufig sowohl die Filtration als auch die nachfolgende spektroskopische Analyse einer unbehandelten Probe unmöglich macht. Aus diesem Grund stellt die Optimierung von Aufreinigungsmethoden für komplexe Matrices einen essentiellen Teil der Probenvorbereitung – und damit einen entscheidenden Schritt vor der eigentlichen Analyse der MP-Proben in microplastic@food – dar.

Hierbei sollte der ideale Aufreinigungsansatz das organische und anorganische Material effizient aus den Proben entfernen, die Filtration der aufgereinigten MP-Proben auf Filtern mit einer kleinen Porenweite (< 1 µm) ermöglichen, kostengünstig und wenig aufwändig sein, und gleichzeitig unterschiedliche Kunststoffarten nicht beeinträchtigen. Derzeit werden verschiedenste Aufreini-

Zugehörigkeiten:

¹ OFI – Österreichisches Forschungsinstitut für Chemie und Technik

² Universität Bayreuth, Lehrstuhl für Tierökologie I

³ Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e. V.

⁴ Purity GmbH

⁵ ecoplus – Niederösterreichs Wirtschaftsagentur GmbH

⁶ IVLV – Industrievereinigung für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e.V.

gungsmethoden basierend auf stark sauren oder alkalischen Lösungen, Oxidationsmitteln oder kombinierten Ansätzen verwendet. Leider können gerade bei den aggressiveren Ansätzen empfindlichere Kunststoffarten beim Aufschluss verloren gehen oder fragmentieren [3].

Microplastic@food hat sich zum Ziel gemacht das komplette Spektrum der vorhandenen Kunststoffe in den Proben verlustfrei zu ermitteln. Deshalb soll innerhalb des Projektes für die schwierigeren Matrices, wie lösliche Lebensmittel und Lebensmitteloberflächen von Wurst, Tofu oder Käse, ein kunststoffschonender und effektiver Ansatz zur Aufreinigung mittels eines kombinierten enzymatisch-oxidativen Ansatzes optimiert werden. Das Basisprotokoll dieses Ansatzes basiert auf einem modularen Aufbau mit unterschiedlichen Enzymen der sich als sehr effektiv erwiesen hat und der sich für verschiedene Probenmatrices optimieren lässt.

Nach der enzymatisch-oxidativen Aufreinigung können, wenn nötig, in einem letzten Reinigungsschritt anorganische Partikel – wie z. B. Sandkörner – durch Dichtentrennung mittels Zinkchlorid-Lösung hoher Dichte (ca. 1,8 g/cm³) von den MP-Proben abgetrennt werden. Die einzelnen Reinigungsschritte des enzymatisch-oxidativen Ansatzes bedürfen lediglich der Inkubation bei den jeweiligen pH- und Temperaturoptima der Enzyme und einer Filtration zwischen den einzelnen Enzymanwendungen. Der Einsatz von technischen Enzymen ist hierbei eine sehr kostengünstige Lösung. Obwohl der Zeitaufwand für die Aufreinigung insgesamt relativ hoch ist (10 – 14 Tage), beschränkt sich der eigentliche Arbeitsaufwand auf die Filtration und Spülung zwischen den Reinigungsschritten. Die Methode weist generell eine exzellente Reinigungsleistung auf, die sich hervorragend als Vorbehandlung für den Nachweis von auf Filtern konzentriertem MP mittels spektroskopischen Methoden eignet [3].

Analytische Methoden: Raman und FTIR-Mikroskopie

Mit Hilfe von Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) – und Raman-Spektroskopie können MP-Partikel eindeutig identifiziert werden. Hierbei liegt die untere Auflösungsgrenze bei der FTIR-Spektroskopie bei 10 µm, bei der Raman-Spektroskopie bei unterhalb von 1 µm. Beide Methoden erstellen von den zu

untersuchenden Partikeln ein Spektrum, das – einem Fingerabdruck ähnlich – für jede Kunststoffart charakteristisch ist und durch den Abgleich mit geeigneten Referenzspektren in spektralen Datenbanken identifiziert wird (Abb. 1a). Für die Messung werden alle Partikel einer Probe auf geeignete Substrate gebracht (z.B. Silizium [4] oder Aluminiumoxid), und mit einem Raman- oder FTIR-Mikroskop gemessen. Die Spektrenaufnahme kann als Mapping, Imaging oder als partikelbasierte Messung durchgeführt werden [5].

Beim Mapping wird die Substratoberfläche in kleinste Kacheln unterteilt und nacheinander pro Kachel ein Spektrum aufgenommen und identifiziert. Ähnlich dem Sehvorgang beim Betrachten eines Bildes, bei dem benachbarte Bildpunkte gleicher Farbe zu einem Objekt zusammengesetzt werden, kann eine Auswertesoftware benachbarte Kacheln mit dem gleichen Kunststoffspektrum zu einem Partikel zusammenfassen und Parameter wie die Partikelgröße und -form ermitteln.

Imaging ermöglicht eine detaillierte und unverfälschte Hochdurchsatzanalyse des gesamten MPs auf einem Probenfilter. Beim FTIR-Imaging können Focal Plane Array (FPA)-Detektoren oder Line-Array Detektoren eingesetzt werden. Diese können mit einer einzigen Messung gleichzeitig bis zu

mehrere tausend Spektren auf einer Teilfläche des Probenfilters aufnehmen. Durch die sukzessive Messung können ganze Probenfilter mittels FTIR-Bildgebung in vertretbarer Zeit analysiert und chemische Bilder der Probe erstellt werden [6].

Bei partikelbasierten Ansätzen wird zunächst ein optisches Bild der Probenpartikel auf dem Substrat erstellt. Per Software werden die Partikel darin erkannt und ihre Größe, Form und ggf. Farbe bestimmt. Die spektroskopische Messung erfolgt ausschließlich an den Koordinaten der Partikel (Abb. 1b).

Sowohl Imaging und Mapping als auch partikelbasierte Messungen werden im Projekt durchgeführt. Für die partikelbasierte Analyse steht zusätzlich zu kommerziellen Messprogrammen die Open Source Software GEPARD [7] zur Verfügung, die flexibel an die speziellen Anforderungen der MP-Detektion in Lebensmitteln angepasst werden kann.

Innovative Datenverarbeitungsmethoden

Der weithin etablierte Ansatz, Spektren über einen Abgleich mit Referenzdatenbanken zu identifizieren, bringt in Bezug auf die MP-Analytik gewisse Schwierigkeiten mit sich. In der Fachliteratur wird hier schon seit

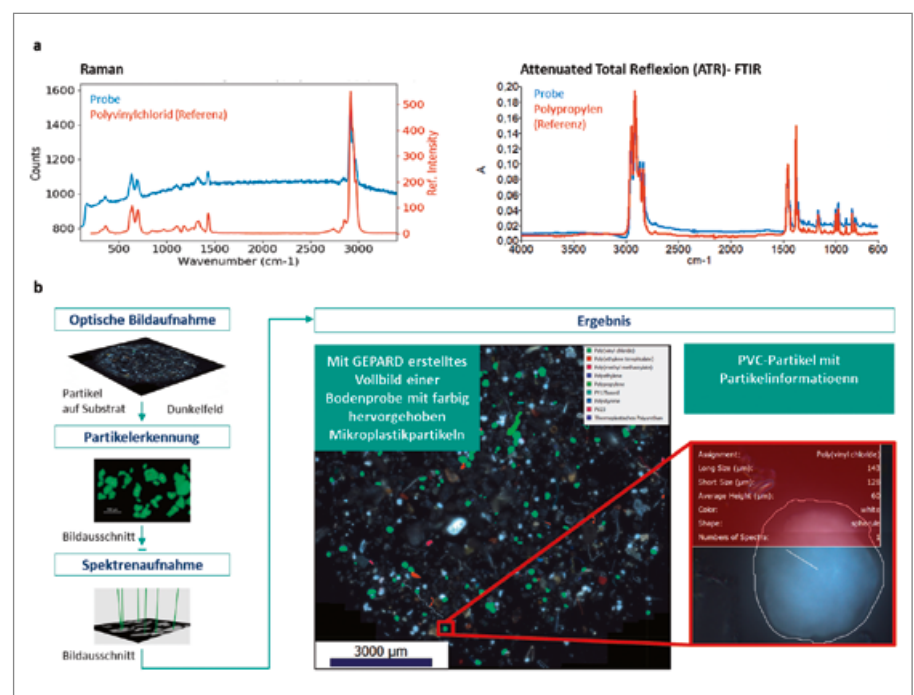


Abb. 1: Raman- und FTIR-Mikroskopie in der MP-Analytik. a) Raman- und FTIR- Spektren von zwei MP-Partikeln mit Referenzspektren aus Datenbanken. b) Arbeitsablauf für die partikelbasierte Analyse einer Bodenprobe auf MP mit der GEPARD-Software.

längerem die Forderung nach robusteren Abgleich-Algorithmen und umfangreicheren Referenzdatenbanken gestellt. Das Problem ist hier jedoch, dass bei Datenbankabgleichen eine Trade-Off-Beziehung zwischen analytischer Qualität und Geschwindigkeit besteht. Speziell beim FTIR-Imaging kann so die Analyse eines typischen Messdatensatzes mehrere Stunden Rechenzeit beanspruchen. Versucht man die Analysequalität durch Erweiterung der Referenzdatenbank zu erhöhen, steigt damit auch die Rechenzeit. Des Weiteren bedingt die geringe Größe der MP-Partikel, sowie die unzähligen Störstoffe, dass sich die spektralen Informationen der Messung eines MP-Partikels teilweise mehr oder weniger stark von den Referenzspektren unterscheiden können. Eine hohe Robustheit des Datenanalyseverfahrens ist daher zwingend notwendig, um falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse gering zu halten und damit ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen.

Diesem Problem widmen sich die Forschungsinstitutionen gemeinsam mit dem Jungunternehmen Purity GmbH, um neue Datenanalysemethoden basierend auf Machine Learning zu entwickeln. Die Vorteile von Machine Learning für die MP-Analytik konnten bereits in der Anwendung auf Umweltproben gezeigt werden [8, 9]. Im Rahmen von microplastic@food soll dieser Ansatz nun für die Analyse von Lebensmitteln und Verpackungsmaterialien erweitert werden.

Erste Ergebnisse

In einem ersten Schritt wurde eine umfassende Sammlung von Lebensmittelverpackungsmaterialien zusammengestellt und mit potentiellen weiteren MP-Eintragsquellen wie Bekleidungsfasern und Kontaktmaterialien aus den Lebensmittel-Abfüllanlagen (wie z.B. Dichtstoffen, Förderbändern oder Bürstenmaterialien) ergänzt. Nach der Erstellung einer spektroskopischen Datenbank wurden aus jeder der häufigsten Materialklassen (PE, PP, PET, PA, PVC, PU, PS, ABS, PC, PMMA, PAN, PLA, PMDS, PVPP, PIB, EPDM, TPU, Cellulose) MP-Partikel durch Cryo-Vermahlung hergestellt. Dieser Schritt war die Grundlage für die darauffolgenden Messexperimente: wässrige Suspensionen dieser Referenzpartikel wurden auf Si-Filtern konzentriert und FTIR Transmissions-Images aufgenommen. Nach einem Parameteropti-

mierungsschritt (spektrale Auflösung, Scanzahl, Scangeschwindigkeit, Detektor-Pixelgröße) können die aus den FTIR-Images extrahierten Spektren der Referenzmaterialien für die Machine-Learning Datenauswertalgorithmen verwendet werden. Im nächsten Schritt werden nun Realproben einer quantitativen und qualitativen MP-Analyse unterzogen.

Ausblick

Ziel des Projektes ist es, abgestimmte Analyseverfahren für die Detektion und Identifizierung von MP in Getränken, löslichen Lebensmitteln und auf Oberflächen verpackter Lebensmittel zu entwickeln. Die harmonisierte Vorgangsweise bei Probenahme, Probenvorbereitung, spektroskopischer Messung und Datenanalyse ermöglicht eine gute Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse. Dies ist der erste Schritt für die Entwicklung einer standardisierten Methode zur MP-Erkennung. Mitglieder des Projektkonsortiums sind auch in Normungsgremien aktiv, wodurch eine Einführung der entwickelten Analyseverfahren den zuständigen Behörden vorgeschlagen werden kann. Darüber hinaus werden unter Anwendung der entwickelten Analyseverfahren unterschiedliche Lebensmittel-Produkte auf das mögliche Vorhandensein von MP-Partikeln untersucht (Polymertyp, Größe, Form und Menge). Potentielle Quellen des MP-Eintrags in Lebensmittelprodukten sollen identifiziert werden und, darauf aufbauend, Wege zur Optimierung der Abfüllung und Verpackung in Hinblick auf den MP-Eintrag erarbeitet werden.

Das Hauptergebnis dieses Projektes wird es sein, Unternehmen Klarheit über das Vorhandensein von MP in ihren Produkten zu geben. Dafür werden solide und zuverlässige Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von MP in wichtigen Lebensmittel-Gruppen entwickelt. In Zusammenarbeit von wissenschaftlichen Partnern und Unternehmern können darauf aufbauend wirtschaftlich sinnvolle Vermeidungsstrategien vorangetrieben werden. Durch die Umsetzung präventiver Maßnahmen erhalten Unternehmen die Möglichkeit, ihren Verbrauchern MP-freie Lebensmittel zu liefern. Diese Maßnahmen beziehen sich auf die Optimierung interner Prozesse, was bedeutet, dass die Implementierungskosten gering sein werden. Dies gibt Unternehmen einen „Entwicklungsvorsprung“ bei dem bereits heute stark diskutierten Thema MP, welches in den kommen-

den Jahren – wahrscheinlich auch durch zukünftige regulatorische und politische Maßnahmen – immer wichtiger werden wird.

Projektinformationen

Im angewandten Forschungsprojekt microplastic@food kooperieren über 50 Unternehmen der Verpackungs-, Lebensmittel- und Getränkeindustrie aus Österreich und Deutschland mit den namhaften Forschungseinrichtungen Österreichisches Forschungsinstitut für Chemie und Technik (OFI), Universität Bayreuth (UBT) und Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden (IPF). Die Förderschiene CORNET (COLlective REsearch NETWORKing) ist zugeschnitten auf kleine und mittlere Unternehmen (KMU). Gefördert wird das Projekt auf deutscher Seite durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages unter der Vorhabennummer 298 EBG und auf österreichischer Seite durch das Bundesministerium für Digitalisierung und Wirtschaftsstandort sowie das Bundesministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie, Mobilität, Innovation und Technologie unter der Fördernummer FFG 884483. Abgewickelt wird die Projektförderung von der deutschen AiF – Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. und der Österreichischen Forschungsförderungsgesellschaft (FFG). Die Koordinierung des Projekts microplastic@food erfolgt durch die Branchenverbände IVLV – Industrievereinigung für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e.V. und ecoplus – Niederösterreichische Wirtschaftsagentur GmbH.

Referenzen

1. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/de/ip_20_420
2. Bangalore Narayana, V. K., L. A. Löschel, H. K. Imhof, M. G. J. Löder and C. Laforsch (2021). "Analysis of microplastics of a broad size range in commercially important mussels by combining FTIR and Raman spectroscopy approaches." *Environmental Pollution* 269: 116147.
3. Löder, M. G. J., H. K. Imhof, M. Ladehoff, L. A. Löschel, C. Lorenz, S. Mintenig, S. Piehl, S. Primpke, I. Schrank, C. Laforsch and G. Gerds (2017). "Enzymatic Purification of Microplastics in Environmental Samples." *Environmental Science & Technology* 51(24): 14283-14292.

4. Käßler, A., F. Windrich, M. G. J. Löder, M. Malanin, D. Fischer, M. Labrenz, K.-J. Eichhorn and B. Voit (2015). "Identification of microplastics by FTIR and Raman microscopy: a novel silicon filter substrate opens the important spectral range below 1300 cm^{-1} for FTIR transmission measurements." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(22): 6791-6801.
5. Eder, G. C., L. Spoljaric-Lukacic and B. S. Chernev (2012). "Visualisation and characterisation of ageing induced changes of polymeric surfaces by spectroscopic imaging methods." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403(3): 683-695.
6. Löder, M. G. J., M. Kuczera, S. Mintenig, C. Lorenz and G. Gerdt (2015). "Focal plane array detector-based micro-Fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples." *Environmental Chemistry* 12(5): 563-581.
7. Brandt, J., L. Bittrich, F. Fischer, E. Kanaki, A. Tagg, R. Lenz, M. Labrenz, E. Brandes, D. Fischer and K.-J. Eichhorn (2020). "High-Throughput Analyses of Microplastic Samples Using Fourier Transform Infrared and Raman Spectrometry." *Applied Spectroscopy* 74(9): 1185-1197.
8. Hufnagl, B., D. Steiner, E. Renner, M. G. J. Löder, C. Laforsch and H. Lohninger (2019). "A methodology for the fast identification and monitoring of microplastics in environmental samples using random decision forest classifiers." *Analytical Methods* 11(17): 2277-2285.
9. Hufnagl, B., D. Steiner, E. Renner, M. G. J. Löder, C. Laforsch and H. Lohninger (2019). "A methodology for the fast identification and monitoring of microplastics in environmental samples using random decision forest classifiers." *Analytical Methods* 11(17): 2277-2285.

