



Raman-Mikrospektroskopie für die Bestimmung von Mikro- und Nanoplastik

Christian Schwaferts (christian.schwaferts@tum.de)

Abstract

Die Analytik von Nanoplastik stellt viele Messtechniken vor neue Herausforderungen. In diesem Artikel werden Forschungsarbeiten gezeigt, die die Raman-Mikrospektroskopie (RM) für Nanoplastikbestimmung nutzbar machen. Durch die Entwicklung einer Flusszelle, basierend auf dem Effekt der optischen Pinzette, ist es möglich, RM und Feldflussfraktionierung online zu koppeln, was eine Hochdurchsatzanalytik zugänglich macht. Zudem ermöglicht eine chemometrische Methode auf der Basis von Window-Sampling die belastbare Quantifizierung von Mikroplastik < 10 µm durch RM.

Einleitung

Plastikverschmutzung findet sich ubiquitär in allen Umweltkompartimenten, in die es über vielfältige Eintragspfade gelangt. Durch Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung oder mechanische Kräfte zerfällt dieses zu Mikroplastik (MP, 1 mm – 1 µm) oder Nanoplastik (1 nm – 1000 nm). Die Frage nach dem ökotoxikologischen Einfluss dieser Partikel ist ein aktuell stark beforschtes Thema, deren abschließende Bewertung nur durch die Entwicklung geeigneter analytischer Techniken erreichbar ist. Allerdings zeichnet sich ab, dass der Einfluss auf Organismen mit abnehmender Partikelgröße ansteigt, was die Notwendigkeit von Methodenentwicklung und Forschung insbesondere zu Nanoplastik unterstreicht [1].

Die Untersuchung von Nanoplastik ist ein sehr neues Feld, das sich in den letzten Jahren deutlich weiterentwickelt hat. Man ist hier von der Spekulation über die Existenz von Nanoplastik hin zu seinen ersten Belegen in der Umwelt gelangt [2]. Parallel dazu ist auch der Entwicklungsprozess angemessener analytischer Methoden angelaufen, so dass große Anstrengungen unternommen wurden, repräsentative Referenzmaterialien zu synthetisieren, Probenvorbereitungen zu erarbeiten und analytische Messtechniken zu validieren [1]. Letzteres umfasste die, in der MP-Analytik etablierten, spektroskopischen und thermogravimetrischen Methoden auf die Anwendung für Nanoplastik zu erweitern, sowie Techniken für die Untersuchung von synthetischen Nanopartikeln für umweltanalytische Fragestellungen nutzbar zu machen [3, 4].

Raman-Mikrospektroskopie–Einzelpartikel-vs. Bulkanalyse

Raman-Mikrospektroskopie (RM) kombiniert Mikroskopie mit der Raman-Spektroskopie, was ermöglicht, von MP und Nanoplastik eine morphologische und chemische Charakterisierung durchzuführen. Insbesondere die chemische Identifizierung ist wichtig für die Aussagekraft der Ergebnisse, da nur so Partikel zweifelsfrei von natürlichen unterschieden

werden können. Zudem ist es möglich, Partikel bis unter 1 µm zu untersuchen, da die Technik mit sichtbarem anstelle von infrarotem Licht arbeitet.

Somit wird für sämtliche Einzelpartikel ein sehr hoher Grad an Information gewonnen, was detaillierte Aufschlüsse über die untersuchten Systeme ermöglicht. Dies geschieht allerdings auf Kosten sehr langer Messzeiten, da besonders bei kleinen Partikeln eine große Anzahl untersucht werden muss. Hier bietet der Bulk-Ansatz, bei dem die chemische Identifizierung über eine große Gruppe von Partikeln durchgeführt wird, das Potenzial für höhere Geschwindigkeit. Dabei muss allerdings auf die mikroskopische Charakterisierung der Partikel verzichtet werden – die verlorenen Informationen zur Partikelgröße müssen also auf andere Weise gewonnen werden. Hier können Techniken zur physikalischen Charakterisierung von Nanopartikeln, die oft auf Laserstreuung basieren, zum Einsatz kommen [1].

Automatisierte Partikelbestimmung

Zur Quantifizierung von Mikroplastikgehalten in untersuchten Systemen steht man meist vor dem Problem sehr großer Partikelzahlen, welches sich realistisch nur durch eine automatisierte Messung bewältigen lässt. Das etablierte Vorgehen solcher Algorithmen erstellt zunächst ein aus Einzelaufnahmen zusammengesetztes Mikroskopbild des Filterpapiers, welches sämtliche Partikel trägt. Eine Bilderkennung bestimmt sämtliche Partikel und speichert deren Koordinaten, an denen anschließend ein Raman-Spektrum aufgenommen wird [5, 6]. Besonders bei kleinen Partikeln ist die Anzahl der zu messenden Partikel sehr groß, weshalb es notwendig ist, ein Sub-sampling aus allen in der Probe verfügbaren Partikeln durchzuführen. Ein großer Vorteil dieser Automatisierung ist, dass alle Partikel erfasst werden, so dass eine Zufallsziehung durchgeführt werden kann. Dies verhindert einen räumlichen Probenahmebias. Für diesen Fall ist es möglich, basierend auf gewünschten Parametern für statistische Zuverlässigkeit (Konfidenzintervall und Fehlerwahrscheinlichkeit), die notwendige Anzahl an zu messenden Partikeln zu berechnen.

Für Partikel, die kleiner als ca. 10 µm sind, verhindern technische Hürden wie die Präzision typischer Mikroskopische oder der Bildzusammensetzung, dass dieser Algorithmus genutzt werden kann. Somit können nicht mehr alle Partikel der Probe erfasst und für RM angesteuert werden, denn der Fehler in der Positionsbestimmung ist in derselben Größenordnung wie die untersuchten Partikel. Somit steht die Zufallsziehung für die Partikelauswahl nicht zur Verfügung. Ein Ausweg hierfür ist das Window-Sampling, bei dem jeweils an

einer Stelle ein Mikroskopbild erzeugt und ausgewertet wird und die dortigen Partikel mit RM identifiziert werden, bevor der Mikroskopisch an die nächste Position fährt. Allerdings ist in diesem Fall die Gesamtanzahl der Partikel nicht bekannt, welche notwendig ist, um die Anzahl der zu messenden Partikel zu berechnen. Hier behilft man sich eines Bootstrap-Algorithmus', der die Standardabweichung simuliert, was die o.g. Parameter für statistische Zuverlässigkeit und somit jene notwendige Anzahl zugänglich macht [7].

In einer *in silico* Studie [7] wurden zwei Varianten des Window-Samplings verglichen: zufällige und systematische (sprich Raster-artige) Platzierung der Fenster. Zudem wurde der Einfluss der räumlichen Verteilung der Partikel berücksichtigt. Die Simulation demonstriert, dass systematische Fenster die Gefahr bergen, einen Bias einzuführen, wenn starke räumliche Ungleichheit vorliegt. Zufällige Fenster sind mit einer höheren Varianz belegt, sind aber dennoch zu bevorzugen, da der Bias des systematischen Window-Samplings für den durchgeführten Bootstrap problematisch ist, denn für diesen ist Repräsentativität eine Grundannahme. Weiterhin zeigt sich, dass die Vergrößerung der Fenster (bei gleicher abgedeckter Gesamtfläche) den Bias bzw. Varianz verstärkt. Die Fenstergröße sollte also so klein wie realistisch umsetzbar gehalten werden. Hier zeigt sich auch der Grenzfall mit kleinstmöglichen Fenstern: einzelne Partikel. Somit erreicht man das oben beschriebene Zufallsziehen.

Diese Ergebnisse führten zum Entwurf eines *on-the-fly* Messalgorithmus, welcher anstelle einer Gesamtauswertung aller Daten nach Beenden der Messung inkrementweise MP-Gehalt und Bootstrap-Konfidenzintervall berechnet. Somit kann während der Messung bewertet werden, ob das gegenwärtige Ergebnis ein ausreichend kleines Konfidenzintervall (bei vorab definierter Fehlerwahrscheinlichkeit) erreicht hat. Ist das gewünschte Kriterium erfüllt, kann die Messung beendet werden. Dies ermöglicht eine optimale Messzeit, da nicht unnötig viele Messpunkte erzeugt werden, oder auch der Fall, zu weniger Messpunkte und folglich nicht aussagekräftiger Ergebnisse, vermieden wird. Abb.1 zeigt einen exemplarischen Verlauf einer solchen Messung. Hier ist das Ziel, ein Ergebnis mit einem relativen Fehler kleiner 10 % zu erhalten. Es wird mit einem Startinkrement von 100 Fenstern begonnen, deren Auswertung noch deutlich vom (in diesem Fall bekannten) wahren Wert abweicht und einen viel zu großen Fehler aufweist. Also wird das nächste Inkrement mit 50 Fenstern gemessen – das Ergebnis verbessert sich etwas. Diese Schleife wird so lange durchgeführt, bis der Fehler unter 10 % liegt. Die Messung kann beendet werden und alle grau gefärbten Messungen wurden eingespart.

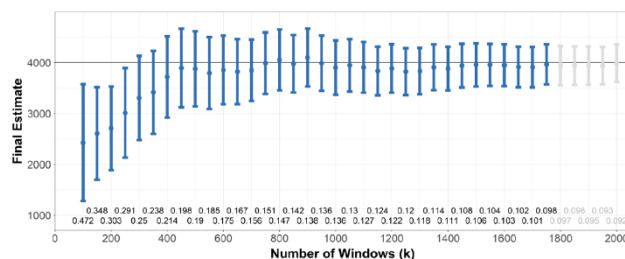


Abb. 1: Simulation einer Analyse mit dem *on-the-fly*-Algorithmus. Aufgetragen ist das Ergebnis der MP-Bestimmung gegen die Anzahl der gemessenen Fenster. Die kleinen Zahlen unter den Konfidenzintervallen geben den relativen Fehler an. Reproduziert aus [7], lizenziert unter CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

In jüngeren Arbeiten wurde der *on-the-fly* Algorithmus in die Messsoftware *TUM-ParticleTyper 2* integriert und validiert. Durch das Window-Sampling ermöglicht diese Software die automatisierte Messung von Partikeln bis zu 1 μm . Zudem wurde die Bilderkennung verbessert, so dass eine morphologische Differenzierung und Erkennung von Fasern ermöglicht wird. Weiterhin wurde ein Deagglomerations-Algorithmus hinzugefügt, der eine Unterbestimmung durch fälschlicherweise gruppierte Partikel verhindert [8].

Raman-Mikrospektroskopie und Feldflussfraktionierung

Die Bulkanalyse von MP und Nanoplastik setzt sich zusammen aus einer chemischen Identifizierung sowie einer Partikeltrennung und Größenbestimmung. Dies wurde in [9] durch die Online-Kopplung von RM und Feldflussfraktionierung (FFF-RM) erreicht. FFF ist eine Partikeltrenntechnik basierend auf einem Kraftfeld, das senkrecht zum laminaren Eluentenstrom wirkt. Da FFF ohne stationäre Phase arbeitet, ist ein weiterer Größenbereich möglich (ca. 1 nm – 20 μm). Ein gekoppelter Multi-Angle-Light-Scattering-Detektor (MALS) ermöglicht die Größenbestimmung.

Aufgrund seines Funktionsprinzips eignet sich RM gut zur Analytik wässriger Proben. Daher ist es auch vielversprechend, RM in einem wässrigen Eluentenstrom für die Umsetzung von FFF-RM einzusetzen. Hierzu galt es lediglich die inhärent geringe Sensitivität zu kompensieren. Dies wurde erreicht, in dem eine Flusszelle auf Basis der optischen Pinzette entworfen wurde. Abb. 2 zeigt das Funktionsprinzip. Partikel strömen in den Querschnitt des Raman-Lasers, in welchem sie zwei optische Kräfte erfahren. Strahlungsdruck beschleunigt sie entlang der Ausbreitungsrichtung des Lasers und drückt die Partikel auf den Boden der Flusszelle. Die optische Gradientenkraft wirkt in Richtung der höchsten Lichtintensität, also in Richtung des Fokuspunktes, und bewirkt ein Festhalten der Partikel entgegen den Scherkräften, die der Flüssigkeitsstrom ausübt. Es entsteht eine zweidimensionale optische Falle. Die so gehaltenen Partikel verweilen ausreichend lange im Fokuspunkt, so dass ein Ramansignal mit hoher Intensität erhalten wird.

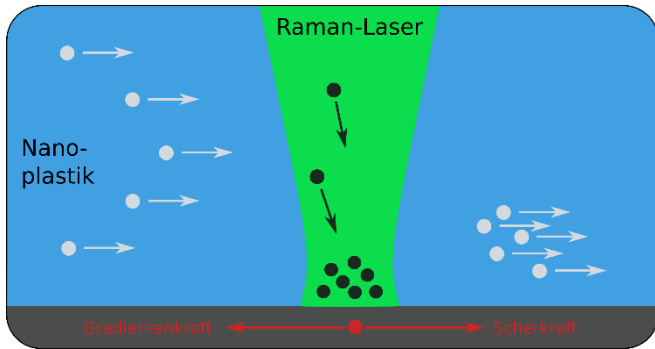


Abb. 2: Funktionsprinzip der Flusszelle zur Online-Kopplung von FFF und RM.

Mit dieser Flusszelle wurde ein FFF-UV-MALS-RM Multi-detektor-Setup aufgesetzt, das Nanoplastikpartikel chemisch und physikalisch identifizieren kann. Dieses wurde mittels Polystyrol, Poly(methylmethacrylat) und SiO₂ Partikeln verschiedener Größe (200 nm – 5 µm) validiert. Die FFF wurde zudem in zwei Varianten eingesetzt: Asymmetrischer-Fluss-FFF (AF4) und Zentrifugale FFF (CF3). AF4 trennt Partikel nach ihrer hydrodynamischen Mobilität, also insbesondere nach der Partikelgröße, wohingegen CF3 nach Größe aber auch Dichte trennen kann. Somit entsteht ein Fraktogramm mit hohem Informationsgehalt, in dem die separierten Partikel durch UV detektiert und gegebenenfalls quantifiziert werden. MALS gibt die zugehörigen Partikeldurchmesser an und RM bestätigt anhand charakteristischer Schwingungsbanden die chemische Identität [9].

Kürzlich erschienene Ergebnisse erweiterten die Anwendbarkeit von FFF-UV-MALS-RM für Nanoplastik in Gegenwart anorganischer Matrix (TiO₂, FeO_x) und für Partikel nicht-sphärischer Geometrie. Wobei es hier auch zu konstatieren gilt, dass Nanoplastik in komplexer Umweltmatrix noch eine große Herausforderung darstellt, für die es Lösungen (z.B. geeignete Probenaufbereitung und –aufkonzentrierung) zu entwickeln gilt [10].

Zusammenfassung und Ausblick

MP und Nanoplastik sind hochkomplexe Analyte, die eine spezialisierte Analytik für eine Vielzahl an Parametern, wie chemische Identität, Morphologie, Größenverteilung oder Oberflächenchemie, erfordern. Ihre Präsenz in vielen Umweltbereichen erzeugt zudem wissenschaftliche Fragestellungen, die verschiedenste Informationen erfordern. Somit ist es für eine erfolgreiche Analytik essentiell, auf ein weit gefächertes Toolkit zurückgreifen zu können.

Die gezeigten Arbeiten haben dieses Toolkit auf dem Feld der RM weiterentwickelt, in dem mit dem Window-Sampling eine statistisch belastbarere, automatisierte Quantifizierung von sehr kleinem MP erarbeitet wurde. Es ermöglicht, dass der, wenn auch hohe, Messaufwand optimal genutzt wird. Für Untersuchungen, die einen hohen Durchsatz erfordern, steht nun zudem mit FFF-UV-MALS-RM ein Multidetektoransatz zur Verfügung. Für all die Fälle, in denen Details zur Morphologie

nicht gefordert werden, bietet auch dieser eine physikochemische Charakterisierung von Nanoplastik bei deutlich geringeren Messzeiten.

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes SubµTrack (Fördernummer: 02WPL1443A; <https://bmbf-plastik.de/de/verbundprojekt/subtrack>).

Literatur

- [1] Schwaferts, C. (2022). *Characterization and Identification of Micro-and Nanoplastic by Raman Microspectroscopy, Scanning Electron Microscopy, Field-Flow Fractionation and Chemometrics* (Doktorarbeit, Technische Universität München), <https://mediatum.ub.tum.de/?id=1616565>.
- [2] Ter Halle, A., Jeanneau, L., Martignac, M., Jardé, E., Pedrono, B., Brach, L., & Gigault, J. (2017). Nanoplastic in the North Atlantic subtropical gyre. *Environmental Science & Technology*, 51(23), 13689-13697.
- [3] Schwaferts, C., Niessner, R., Elsner, M., & Ivleva, N. P. (2019). Methods for the analysis of submicrometer-and nanoplastic particles in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 112, 52-65.
- [4] Ivleva, N. P. (2021). Chemical analysis of microplastics and nanoplastics: challenges, advanced methods, and perspectives. *Chemical Reviews*, 121(19), 11886-11936.
- [5] von der Esch, E., Kohles, A. J., Anger, P. M., Hoppe, R., Niessner, R., Elsner, M., & Ivleva, N. P. (2020). TUM-ParticleTyper: A detection and quantification tool for automated analysis of (Microplastic) particles and fibers. *PLoS one*, 15(6), e0234766.
- [6] Brandt, J., Bittrich, L., Fischer, F., Kanaki, E., Tagg, A., Lenz, R., ... & Eichhorn, K. J. (2020). High-throughput analyses of microplastic samples using Fourier transform infrared and Raman spectrometry. *Applied Spectroscopy*, 74(9), 1185-1197.
- [7] Schwaferts, C., Schwaferts, P., von der Esch, E., Elsner, M., & Ivleva, N. P. (2021). Which particles to select, and if yes, how many? Subsampling methods for Raman microspectroscopic analysis of very small microplastic. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 3625-3641.
- [8] Jacob, O., Ramírez-Piñero, A., Elsner, M., & Ivleva, N. P. (2023). TUM-ParticleTyper 2: automated quantitative analysis of (microplastic) particles and fibers down to 1µm by Raman microspectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-15.
- [9] Schwaferts, C., Sogne, V., Welz, R., Meier, F., Klein, T., Niessner, R., ... & Ivleva, N. P. (2020). Nanoplastic analysis by online coupling of Raman microscopy and field-flow fractionation enabled by optical tweezers. *Analytical Chemistry*, 92(8), 5813-5820.
- [10] Huber, M. J., Ivleva, N. P., Booth, A. M., Beer, I., Bianchi, I., Drexel, R., ... & Caputo, F. (2023). Physicochemical characterization and quantification of nanoplastics: applicability, limitations and complementarity of batch and fractionation methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-25.

Korrespondenzadresse

Dr. Christian Schwaferts
christian.schwaferts@tum.de