

## **Analytische Methoden zur Charakterisierung von Nanomaterialien in Lebensmitteln**

Positionspapier der Arbeitsgruppe Nanomaterialien

Stand: Januar 2025

### **Abstract**

Die unterschiedlichen Methoden der Nanoanalytik werden vorgestellt und hinsichtlich der Möglichkeiten und Grenzen der Bestimmung der Partikelgrößenverteilung bzgl. der Kennzeichnungspflicht von technisch hergestellten Nanomaterialien in Lebensmitteln bewertet. Neben grundsätzlichen methodenspezifischen Limitierungen der Nanoanalytik wird die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung durch die Lebensmittelmatrix zusätzlich erheblich erschwert. Um dieses Problem zu umgehen, wird vorgeschlagen, die in Frage kommenden, reinen als Zusatzstoffe und Zutaten hinzugefügten, technisch hergestellten Nanomaterialien vor Einbringung in die Lebensmittelmatrix für die Bewertung der Kennzeichnungspflicht heranzuziehen.

### **1. Einleitung**

#### **1.1 Kennzeichnungspflicht von Nanomaterialien – was soll man messen**

In mehreren Verordnungen des Lebensmittelbereichs (übrigens auch im Kosmetikbereich), wie z. B. der Verbraucherinformationsverordnung, wird die Kennzeichnung von Nanomaterial in der Zutatenliste gefordert [1–3]. Zur Umsetzung und für die Qualitätskontrolle von der Industrie als auch zur Überprüfung der Einhaltung der Kennzeichnungspflicht durch die Überwachungsbehörden, müssen geeignete analytische Methoden verfügbar sein. Um der EU-Definitions-Empfehlung von Nanomaterialien [4, 5] gerecht zu werden, muss eine Charakterisierung von Nanomaterialien mindestens (i) die chemische Identität und (ii) die Größenbestimmung beinhalten. Außerdem ist die analytische Unterscheidung eines technisch hergestellten Nanomaterials von einem natürlichen Nanomaterial erforderlich.

Bisher existieren nur allgemeine Standardverfahren/Normverfahren der Nanoanalytik, die in erster Linie für Reinsubstanzen (Ausgangsmaterial, Rohstoff, Zutaten) entwickelt wurden. Es gibt bisher keine expliziten Normverfahren zur Bestimmung eines bestimmten Nanomaterials in einem Lebensmittel, was die Überwachung stark einschränkt. Der Analysengang für solche komplexen Proben beinhaltet i. d. R. eine Probenaufbereitung. Dabei muss sichergestellt werden, dass es nicht zu Artefakt-Bildungen während der Probearbeitung und der Messung kommt, die zu einer Veränderung der Partikelgrößenverteilung führen. Die EU-Definitionsempfehlung schließt auch die Primärpartikel (innere Struktur) von Aggregaten mit ein, wodurch ein Material ein Nanomaterial sein kann, auch wenn die äußere Dimension der Aggregate selbst evtl. nicht nanoskalig ist. Für diese Fragestellungen müssen analytische Methoden bereitstehen, die unter den beschriebenen Randbedingungen robust und sinnvollerweise möglichst kosteneffizient, vor allem hinsichtlich Analysenzeit, Geräteinsatz und Personalbedarf, angewendet werden können.

#### **1.2. Grundsätzliche Möglichkeiten und Grenzen der Analytik – was kann man messen**

Laut der EU-Definitionsempfehlung [5] und dem Entwurf zur Erweiterung der Novel-Food-Verordnung [6] ist ein Material ein Nanomaterial, wenn mindestens 50 % der Partikel einer chemischen Identität eine Größe  $< 100$  nm haben. Um eine vollständige Beschreibung einer Anzahlgrößenverteilung zu ermöglichen, ist es deshalb notwendig, den ganzen Größenbereich ab 1 nm bis in den  $\mu\text{m}$ -Bereich abzudecken. Bei vielen Methoden ist aber der untere

Größenbereich aus technischen bzw. methodischen Gründen gar nicht messbar. Kleine Partikel im Bereich weniger Nanometer können bisher nur mittels Elektronenmikroskopie zuverlässig detektiert werden, wobei sich damit Größen bis in den Mikrometerbereich schwerlich gleichzeitig messen lassen [7–10]. Als Grenze des zu messenden oberen Bereichs wird in der EU-Definitionsempfehlung die Grenze von 100  $\mu\text{m}$  genannt.

Da in der EU-Definitionsempfehlung auch die inneren Strukturen von Aggregaten zu berücksichtigen sind („mindestens 1 Dimension unter 100 nm“), sind ein Großteil der verfügbaren, analytischen Methoden nur bedingt zur Überprüfung/Überwachung der Kennzeichnungspflicht geeignet, wenn diese nur die äußeren Dimensionen der Nanomaterialien bestimmen können. Dazu zählen alle Methoden, die auf der Brown'schen Molekularbewegung beruhen, wie die (Feldflussfraktionierung (FFF), die Dynamische Lichtstreuung (DLS), die Partikel-Tracking Analyse (PTA)) und die Massenspektrometrie. Diese Methoden dienen lediglich als Screening-Methoden (sphärischer Äquivalent-Durchmesser, falls unter 100 nm, dann sicher Nanomaterial, falls größer 100 nm keine Aussage möglich). Die inneren Strukturen lassen sich nur mit elektronenmikroskopischen Methoden erfassen [7–10].

Eine große Herausforderung stellt die gleichzeitige Bestimmung von Größe und chemischer Identität von Nanomaterialien dar sowie die Unterscheidung von natürlichen gegenüber technisch hergestellten Nanomaterialien [11].

Die Entwicklung analytischer Methoden wird zusätzlich durch den Mangel an geeigneten Standard- und zertifizierten Referenzmaterialien erschwert. Der Bedarf besteht nicht nur an Ausgangsmaterialien, sondern idealerweise sollten diese auch in den unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes zur Verfügung stehen und mehrere Größenbereiche abdecken. Im Rahmen der Lebensmittelüberwachung muss geprüft werden, ob der Kennzeichnungspflicht entsprochen wurde.

## 2. Charakterisierung von Nanomaterialien

Dieses Positionspapier gibt einen Überblick über die verschiedenen analytischen Methoden (siehe Tabelle 1) mit deren Anwendungsbereichen und Limitierungen. Wichtig ist z. B., dass je nach Methode unterschiedliche Partikeldurchmesser und Mittelwerte gemessen werden, die nur mit weiteren Annahmen in eine Anzahlverteilung umgerechnet werden können. So liefern elektronenmikroskopische Methoden (REM und TEM) als einzige direkt die in der EU-Definition geforderten geometrischen Dimensionen der inneren Strukturen („external dimensions of constituent particles within an aggregate“ [8]) eines Nanomaterials. Methoden, die auf der größenabhängigen Beweglichkeit (Diffusion) der Nanopartikel beruhen (z. B. DLS, PTA und FFF), liefern einen hydrodynamischen Durchmesser (genauer den Äquivalentdurchmesser einer Kugel). Dieser ist in der Regel größer als der geometrische Durchmesser, da am Partikel adsorbierte Moleküle in Form einer Solvathülle zum Durchmesser beitragen.

Prinzipiell lassen sich die Methoden in Einzelpartikel- und Ensembletechniken unterteilen. Mit einer Einzelpartikelmethode wie Elektronenmikroskopie, Einzelpartikel-ICP-MS (single particle-ICP-MS) oder PTA werden einzelne Partikel erfasst und aus einer hinreichend großen Anzahl einzelner Partikel wird dann eine Größenverteilung ermittelt.

Bei den Ensembletechniken wie z. B. der DLS wird in der Regel ein methodenabhängiger, mittlerer Partikeldurchmesser oder eine Größenverteilung einer sehr großen Anzahl (deutlich mehr als bei einer Einzelpartikelmethode) von Partikeln bestimmt, der unter gewissen Annahmen in eine Anzahlgrößenverteilung umgerechnet werden kann. Durch die getroffenen Annahmen werden zusätzliche Unsicherheiten bei der Anzahlgrößenverteilung erzeugt, die nur schwer quantifizierbar sind.

Keine der bisher etablierten Methoden ist in der Lage, den kompletten Größenbereich (1 nm bis mehrere  $\mu\text{m}$ ) zu erfassen und insbesondere im unteren Nanometerbereich sind die meisten Methoden limitiert. Zusätzlich stellt auch die Probenvorbereitung insbesondere bei Lebensmitteln eine große Herausforderung dar. Insgesamt besteht hier noch großer Forschungs- und Entwicklungsbedarf, bis validierte Methoden für die Routine-Überwachung der Kennzeichnungspflicht zu Verfügung stehen.

### **3. Einzelpartikelmethoden**

#### **3.1. Elektronenmikroskopie (REM, TEM)**

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie können neben der äußeren Größe auch die Form von Nanomaterialien und die innere Struktur (die Größe der Primärpartikel in Aggregaten) ermittelt werden. Die untere Grenze ist abhängig vom Material (Materialkontrast, Ordnungszahl) und liegt beim REM etwa bei 2–3 nm, beim TEM etwa bei 1 nm [12]; unter realistischen Bedingungen liegen diese Werte eher bei 10 bis 20 nm. Bei hinreichend großen Nanomaterial-Strukturen kann zudem mittels EDX die Elementzusammensetzung (Elemente ab Bor aufwärts) bestimmt werden. Nachteil der Elektronenmikroskopie ist ein erheblicher Zeitaufwand, um eine hinreichend große Anzahl an Nanopartikeln zu vermessen und um eine repräsentative Größenverteilung zu erhalten. Außerdem kann die Analyse von Partikelgeometrien, die nur in einer Dimension im nanoskaligen Bereich sind, wie bspw. Plättchen, zu Fehlbefunden bzw. sehr hohem Analysenaufwand führen. Die Untersuchung findet in der Regel im Hochvakuum statt, so dass auch etwaige Veränderungen z. B. Verlust von Kristallwasser des Nanomaterials möglich sind. Des Weiteren erfordert die Probevorbereitung (Isolierung aus der Matrix, Auftragen auf geeigneten Probeträger, Verdunstung des Lösungsmittels) hohes experimentelles Geschick (Erfahrung, Vorsicht) des Laborpersonals um die Bildung von Artefakten (z. B. Bildung von Agglomeraten während des Trocknens) zu vermeiden, um eine quantitative Analytik zu gewährleisten. Bisher gibt es keine speziellen Norm- oder Standardverfahren zur Probevorbereitung von Lebensmitteln und Kosmetika für elektronenmikroskopische Untersuchungen.

#### **3.2. Einzelpartikel-ICP-MS (spICP-MS)**

Untersucht man stark verdünnte Suspensionen von Nanomaterialien bei sehr kurzen Integrationszeiten, so dass nur jeweils ein Nanopartikel pro Zeiteinheit detektiert wird, kann man aus der Signalhöhe die Masse des Nanopartikels bestimmen. Bei bekannter Dichte und unter Annahme kugelförmiger Partikel mit homogener Dichteverteilung darüber hinaus auch den Durchmesser. Dieses Verfahren ist für anorganische Nanopartikel geeignet (z.B.:  $\text{TiO}_2$ , Au, Ag, ZnO) und es existiert ein Norm-Verfahren [13].

Die Voraussetzung, um auch möglichst kleine Nanopartikel zu messen, ist ein geringes Hintergrundsignal der entsprechenden Ionen (Herausforderung für  $\text{SiO}_2$ , da Glas-Bauteile im ICP-MS). Abhängig von der Nachweisgrenze des jeweiligen Elements liegt der untere Größenbereich der Partikel zwischen 20 und 50 nm [11], daher ist es nicht möglich, den vollständigen Größenbereich abzudecken. Außerdem ist es mit dieser Methode nicht möglich die innere Struktur des Nanopartikels zu bestimmen.

Mögliche Fehlerquellen sind die Unsicherheiten bei der Bestimmung der Transporteffizienz und die Verifizierung der getroffenen Annahmen (Dichte und Form der Partikel).

#### **3.3. (Nano-)Partikel-Tracking-Analyse (NTA, PTA)**

Bei der PTA wird die Brown'sche Molekularbewegung von Nanopartikeln in Suspension über die Aufzeichnung ihres Streulichts ermittelt. Aus diesem Signal wird sowohl ihre Größenverteilung als auch Anzahlkonzentration bestimmt. Dabei wird ein Laserstrahl durch eine Probenkammer geleitet und das Streulicht der Partikel mit Hilfe eines Mikroskops und einer hochsensitiven Kamera (sCMOS) in Echtzeit aufgezeichnet. Über die Stokes-Einstein-Gleichung kann die Beweglichkeit der Partikel anschließend in eine Größeninformation (hydrodynamischer Durchmesser) übersetzt werden.

Für eine zuverlässige Aufnahme von Einzelpartikel-Ereignissen ist das Arbeiten in stark verdünnten Suspensionen ( $10^7$ – $10^9$  Partikel pro ml) erforderlich. Der untere Größenbereich der PTA hängt zudem stark von den optischen Eigenschaften der zu untersuchenden Partikel ab. Während Partikel mit einem hohen Brechungsindex wie Gold-Nanopartikel schon ab 10 nm messbar sind, so ist dies für organische Nanopartikel mit niedrigem Brechungsindex erst ab etwa 30 nm möglich. Für die Anwendung der PTA existieren mehrere Normverfahren [14, 15].

## 4. Trennmethode

### 4.1. Feldflussfraktionierung (FFF)

Die FFF ist ein Trennverfahren für Partikel. Es wird zur Trennung von Proteinen, Polymeren, natürlichen Kolloiden und Nanomaterialien eingesetzt. Es existieren verschiedene Formen der FFF, die zwar nach dem gleichen Trennprinzip arbeiten, aber unterschiedliche Kräfte zur Trennung der Partikel nutzen. Die Trennung kann hydrodynamisch, mittels Gravitationskräften, mit thermischen Gradienten und elektrischen Feldern erfolgen. Das ermöglicht die Trennung nach Partikelgröße, effektiver Masse oder Partikelladung. Für Partikelgrößen wird eine Auflösung im nm-Bereich erreicht. Die FFF wird meist als Probenvorbereitungstechnik zur Erzeugung von Partikelfraktionen verwendet, die anschließend analysiert werden. FFF-Systeme sind deshalb mit verschiedenen Detektoren wie z. B. Lichtstredetektoren, UV/VIS und ICP-MS gekoppelt, es können aber auch Fraktionen für eine nachgeschaltete Offline-Analytik (z. B. REM, TEM) gesammelt werden. Neben der Größencharakterisierung, können je nach eingesetztem Detektor, die Partikelform, die Oberfläche ( $m^2/g$ ), die Partikeloberflächenladung und die Konzentration (Massenkonzentration) angenähert werden. Das macht die FFF zu einem leistungsstarken Werkzeug für die umfassende Charakterisierung von Partikelsuspensionen. Obwohl die FFF-Techniken ein hohes Potenzial für die umfassende Charakterisierung von Nanomaterialien in Lebensmittelproben haben, gibt es auch Herausforderungen, welche die routinemäßige Anwendung dieser Technik einschränken können. So kann in der Praxis die Trennung durch verschiedene Wechselwirkungen beeinflusst werden, welche eine umfassendere Methodenentwicklung notwendig machen kann. Außerdem ist die direkte Ermittlung einer Partikelgrößenverteilung basierend auf der Anzahl bisher nur in Kombination mit sp-ICPMS oder PTA-Analytik möglich. Zur Entwicklung von FFF-Methoden und Qualitätskontrollparametern, wurde 2018 ein ISO-Leitfaden zur FFF-Methodenentwicklung veröffentlicht [16].

### 4.2. Hydrodynamische Chromatographie (HDC) und Größenausschlusschromatographie (SEC)

Wie die FFF ist die HDC auch eine Trenntechnik für Partikelgrößen. Sie ähnelt der SEC, mit dem Unterschied, dass aufgrund der nicht-porösen Beschaffenheit der stationären Phase weniger Möglichkeiten für Wechselwirkungen mit der festen Phase vorhanden sind. Das Trennprinzip basiert auf den Strömungsprofilen in den „Kanälen“ der stationären Phase. Die HDC wird, wie auch die FFF, mit Detektoren gekoppelt, um z. B. die absolute Molmasse und die Größe von Partikeln oder polymeren Materialien zu bestimmen.

### 4.3. Scheibenzentrifuge (CLS, DCS)

Die Scheibenzentrifuge (engl. Centrifugal Liquid Sedimentation (CLS) oder auch Differential Centrifugal Sedimentation (DCS)) trennt Nanopartikel in Suspension nach ihrer Größe und Dichte. Hierzu nutzt man die unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten von Partikeln unterschiedlicher Größe und Dichte unter Einfluss eines Zentrifugalfelds, welches durch Rotation der Scheibe (bis zu 24.000 UPM) erzeugt wird, mit Zentrifugalkräften bis zu 30.000 g. Eine effektive Partikeltrennung setzt dabei die Verwendung eines Dichtegradienten in Eluenten, z. B. auf Basis von Saccharose, voraus.

Die Detektion in der Scheibenzentrifuge erfolgt in der Regel optisch mit Hilfe eines kurzwelligen Lasers. Die Partikelgrößenverteilung wird dabei aus der Zeit, die die Partikel zum Detektor benötigen (Stokes Gesetz) und der Abschwächung der Lichtintensität durch Absorption und Streuung (Mie-Theorie) berechnet. Die Annahme einer sphärischen Partikelform kann jedoch zu Fehlinterpretationen bei der Umrechnung in eine Partikelgröße führen [17].

## 5. „Mittelwert-Methoden“ Ensemble-Methoden

Die wichtigsten Ensemble-Methoden sind zwei verschiedene Verfahren der Lichtstreuung. Ein prinzipieller Nachteil der Lichtstremethoden ist allerdings, dass die größeren Partikel bei der Messung stärker gewichtet werden. Bei der Lichtstreuung z. B. ist die Signalintensität eines 100 nm Partikels um den Faktor 1 Million stärker als bei einem 10 nm Partikel. Aufgrund dieser Limitation ist insbesondere für stark polydisperse Proben ein vorgeschalteter Fraktionierungsschritt empfehlenswert.

### 5.1. Statische Lichtstreuung (SLS)

Mit Hilfe der SLS lässt sich neben der Molmasse von z. B. Polymeren und Proteinen auch die Größe von Nanopartikeln bestimmen. Insbesondere für die Charakterisierung von Nanopartikeln hat sich dabei die Mehrwinkellichtstreuung (engl. Multi-Angle Light Scattering (MALS)) durchgesetzt. Hierbei wird die winkelabhängige Streulichtverteilung einer mit Laserlicht bestrahlten suspendierten Probe gemessen. Aus dem erhaltenen Streulichtintensitätsmuster an den einzelnen beobachteten Winkeln kann über die Rayleigh-Gans-Debye- oder die Mie-Theorie anschließend der Trägheitsradius (engl. radius of gyration) der in der Probe enthaltenen Nanopartikel bestimmt werden.

MALS-Messungen können sowohl statisch (Batch-Modus mit Küvette) als auch dynamisch in Form eines Durchflussdetektors durchgeführt werden. Insbesondere für die Nanopartikel-Analytik hat sich dabei die Kopplung des MALS-Detektors an eine vorgeschaltete Fraktionierungstechnologie wie der SEC oder FFF durchgesetzt. Eine weitere Methode ist die Laser-Beugung [18].

### 5.2. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird die Diffusionsgeschwindigkeit (Brown'sche Molekularbewegung) von Nanopartikeln in Flüssigkeiten gemessen und daraus der hydrodynamische Durchmesser berechnet. Die Methode liefert zwei Parameter: den intensitätsgewichteten Z-Mittelwert und den Polydispersitätsindex (PDI) als Maß für die Breite der Größenverteilung. Eine Anzahlgrößenverteilung wird nicht direkt gemessen, kann aber unter gewissen Annahmen (z. B. kugelförmige Partikel) und Einschränkungen mit mathematischen Fitting-Verfahren berechnet werden. Allerdings ist dieses Verfahren mit großen Unsicherheiten behaftet, so dass es in der bisherigen Version einer ISO-Norm noch nicht aufgenommen wurde [19, 20].

Ein limitierender Faktor der DLS ist, dass in Gegenwart großer Partikel die kleineren quasi übersehen werden, d. h. die Methode eher für monodisperse Größenverteilungen geeignet ist. Abhilfe kann durch Vorschalten einer Fraktionierungsmethode (z.B. FFF) geschaffen werden.

## 6. Specific Surface Area Messung (BET) / Volume Specific Surface Area (VSSA)

Die Ermittlung der spezifischen Oberfläche von Materialien erfolgt durch eine Gasadsorptionsmessung anhand der sogenannten BET-Methode (benannt nach den Entwicklern der Methode: Brunauer, Emmett und Teller). Dabei wird ein inertes Prüfgas (meist Stickstoff) in eine gekühlte Probenkammer geleitet, bis sich ein Druckgleichgewicht einstellt. Die Gasmoleküle adsorbieren (Physisorption) dabei auf der Probenoberfläche zumeist in Monolagen, so dass über die verwendete Gasmenge auf die Probenoberfläche geschlossen werden kann (Einpunktmessung). Durch eine anschließende Verringerung des partialen Dampfdruckes kann eine Mehrpunktmessung erfolgen, die in der Regel eine höhere Genauigkeit aufweist.

Durch diese Methode können speziell Pulver bzw. poröse Materialien ungeachtet ihrer Geometrie untersucht werden. Das Ergebnis wird meist in  $\text{m}^2/\text{g}$  angegeben. Die Methode ist in der Norm DIN ISO 9277 festgehalten.

Darüber hinaus kann durch Multiplikation der spezifischen Oberfläche mit der Dichte des Materials die sogenannte volumenspezifische Oberfläche (engl. volume specific surface area (VSSA)) errechnet werden, die zumeist in der Einheit  $\text{m}^2/\text{cm}^3$  angegeben wird.

In der neuen Definitionsempfehlung wird ein Material mit einer volumenspezifischen Oberfläche kleiner als  $6 \text{ m}^2/\text{cm}^3$  nicht als Nanomaterial betrachtet [5].

## 7. Einfluss der Matrix und Probenvorbereitung

Die größte Schwierigkeit beim Analysengang ist die Abtrennung der in der Regel nur in geringen Konzentrationen vorhandenen Nanomaterialien aus der Lebensmittelmatrix. Dazu kommen mechanische Verfahren wie die Filtration oder die Dichteseperation zum Einsatz. Wenn eine Trennung so nicht möglich ist, kann die Zerstörung der Matrix erforderlich sein. Dies kann durch chemische Verfahren, wie beispielsweise die Oxidation der Matrix, erfolgen. Welches Verfahren sich für die Extraktion der Nanomaterialien aus der Matrix eignet, muss Gegenstand der Methodenentwicklung sein. Hierzu existieren bereits einige systematische Ansätze, die eine Matrix- und Nanomaterialien abhängige Probenvorbereitung beschreiben. Dabei sind auch mögliche Veränderungen des Nanomaterials infolge der Probenvorbereitung zu kontrollieren und möglichst minimal zu halten. Bei der Validierung analytischer Methoden sind zudem die Selektivität, die Genauigkeit, der Größenbereich und das Detektionslimit wichtige Parameter für die Qualität der Methode. Weiterhin muss die Repräsentativität des Aliquoten für die gesamte Probe gewährleistet sein. Bisher sind allerdings nur wenige validierte Methoden für die Bestimmung von Nanomaterialien in Lebensmitteln in der Literatur beschrieben worden [21, 22]. Die Methodenentwicklung beschränkt sich meist auf homogene Matrices mit bekannten Materialien und vergleichsweise hohen Konzentrationen. In der Realität sind jedoch geringere Konzentrationen unbekannter Materialien in heterogenen Lebensmitteln zu erwarten und damit diese Methoden nicht direkt übertragbar.

Eine Lösung dieses analytischen Problems könnte folgendes Vorgehen sein:

Anstatt das Nanomaterial in der Lebensmittelmatrix zu untersuchen, könnte mit einem vereinfachten Ansatz nur die Analyse der Rohstoffe erfolgen. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass die Methoden zur Rohstoffcharakterisierung bereits verfügbar sind und zuverlässige Ergebnisse liefern. Es ist unwahrscheinlich, dass eine vorhandene Nanoskaligkeit im Lebensmittel verloren geht, da die inneren Strukturen erhalten bleiben, auch wenn es zum Beispiel zu Veränderungen der äußeren Größe des Nanomaterials durch Agglomeration käme. Der Lebensmittelhersteller müsste lediglich die Daten des Rohstoffherstellers bei der Bewertung einer etwaigen Kennzeichnung als Nanomaterial verwenden.

Falls es seitens des Gesetzgebers zwingend erforderlich ist, dass nur die Inhaltsstoffe im Lebensmittel hinsichtlich der Größenverteilung untersucht werden sollen, tritt das oben beschriebene Problem der Isolierung des Nanomaterials aus der Lebensmittelmatrix auf.

## 8. Schlussfolgerung

Die Detektion unbekannter Nanomaterialien in komplexen Matrices ist weiterhin eine große Herausforderung („Non Target Analytik“). Mit den Ensemble-Methoden können prinzipiell alle Partikel erfasst werden, worin aber auch ein Nachteil dieser Methoden liegt: In komplexen Matrices wie Lebensmitteln liegen in der Regel eine Vielzahl natürlicher Moleküle und Strukturen wie Proteine, Polysaccharide, Mizellen etc. vor, die ebenfalls im Nanometerbereich auftreten können, aber nicht zu den Nanomaterialien nach EU-Definitionsempfehlung zählen. Nur mit geeigneten, analytischen Methoden gelingt es, diese Partikel entsprechend zu charakterisieren, um zu entscheiden, ob es sich tatsächlich um kennzeichnungspflichtige Nanomaterialien handelt. Bisher ist es nur möglich, über Bildgebung wie Elektronenmikroskopie und durch Kopplung von Fraktionierungsmethoden mit ICP-MS anorganische Nanopartikel zu detektieren und zu identifizieren, bei organischen Komponenten ist es bisher nicht möglich.

Vom analytischen und regulatorischen Standpunkt betrachtet wäre es deutlich einfacher, die Nanomaterialien zu bestimmen, wenn die Zutaten und Zusatzstoffe vor der Zugabe zum Lebensmittel untersucht würden und auf Grund dieser Ergebnisse eine etwaige Kennzeichnung erfolgen würde. Sicherlich besteht die Möglichkeit, dass zugegebene Nanomaterialien sich im Lebensmittel verändern, z. B. durch Agglomeration. Doch auch dann handelt es sich entsprechend der EU-Definitionsempfehlung immer noch um Nanomaterialien.

**Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Nanoanalytik-Methoden**

Methode	Messgröße	Unterer Messbereich	Bestimmung innerer Strukturen möglich	Kommentar	Normverfahren
<b>Einzelpartikelmethoden</b>					
Rasterelektronenmikroskopie (REM, SEM)	Geometrische Dimensionen Innere und äußere Strukturen	10 bis 20 nm (abhängig vom Element)	Ja	Zusätzlich Elemente mit EDX	ISO 19749:2021 Nanotechnologies – Measurements of particle size and shape distributions by scanning electron microscopy
Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	Geometrische Dimensionen Innere und äußere Strukturen	1 nm	Ja	Zusätzlich Elemente mit EDX	ISO 21363:2020 Nanotechnologies – Measurements of particle size and shape distributions by transmission electron microscopy Deutsche Fassung: DIN EN ISO 21363:2022
Einzelpartikel-ICP-MS (spICP-MS)	Masse des Partikels bzw. eines Elements des Partikels (z. B. Titan bei TiO <sub>2</sub> )	20 bis 50 nm (abhängig vom Element [23])	Nein	Voraussetzung für Umwandlung Masse in Größe: Dichte bekannt, unter Annahme sphärischer Partikel	ISO/TS 19590:2017 Nanotechnologies – Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry Deutsche Fassung CEN ISO/TS 19590:2019
Nanopartikel Tracking Analyse (NTA, PTA)	Hydrodynamischer Durchmesser (sphärenäquivalenter Durchmesser nach Stokes-Einstein-Gleichung), Partikelanzahlkonzentration	10–30 nm (abhängig vom Brechungsindex des Nanomaterials)	Nein	10 <sup>7</sup> –10 <sup>9</sup> Partikel pro mL, Probenverdünnung notwendig	ISO 19430:2016 Particle size analysis – Particle tracking analysis (PTA) method ASTM E2834-12 Standard guide for measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by nanoparticle tracking analysis (NTA)
<b>Ensemble-Methoden</b>					

Dynamische Lichtstreuung (DLS)	Hydrodynamischer Durchmesser, sphärenäquivalenter Durchmesser), PDI	1 nm bei monodispersen Verteilungen	Nein	Screeningmethode, Norm beinhaltet nur Z-Average-, nicht Anzahl-Mittelwert	<a href="#">DIN ISO 22412:2018-09</a> Partikelgrößenanalyse - Dynamische Lichtstreuung (DLS) (ISO 22412:2017) ISO/TR 22814:2020(E) Good practice for dynamic light scattering (DLS) measurements
Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS)	Trägheitsradius (Radius of gyration)	8–10 nm (abhängig von Wellenlänge des Lasers)	Nein	Hauptsächlich als FFF-Detektor	
Laser Beugung	kugeläquivalenter Durchmesser (aufgrund der Lichtbeugung bzw. -Streuung)	ca. 40 nm (bei Messung im Flüssigen)	Nein	Vorbehandlung (Ultraschall und ggf. Stabilisation benötigt) Brechungsindex benötigt, da Auswertung durch Mie-Theorie erfolgen sollte	ISO 13320:2020 Particle size analysis — Laser diffraction methods
<b>Fraktionierungsmethoden</b>					
Asymmetrische Flussfeldfluss-Fraktionierung (AF4)	Hydrodynamischer Durchmesser (sphärenäquivalenter Durchmesser nach Stokes-Einstein-Gleichung)	1 nm	Nein	Kopplung mit verschiedenen Detektoren möglich	ISO/TS 21362:2018 Nanotechnologies - Analysis of nano-objects using asymmetrical-flow and centrifugal field-flow fractionation
Scheibenzentrifuge (CLS)	Hydrodynamischer Durchmesser (sphärenäquivalenter Durchmesser abgeleitet von der Sedimentationsgeschwindigkeit über Stokes-Gesetz)	2–3 nm (abhängig von der Dichte des Nanomaterials)	Nein	Kein Durchflussverfahren, Probe nach Analyse „verloren“	ISO 13318-1, ISO 13318-2, ISO 13318-3
<b>Specific Surface Area</b>					
BET / VSSA	Innere Oberfläche		Ja	Derzeit nur als Positivnachweis für Nanomaterialien verwendbar (vgl. Seite 79 in [8])	ISO 9277:2010 Determination of the specific surface area of solids by gas adsorption – BET method
<b>Allgemein</b>	Anzahlkonzentration				<b>In Vorbereitung:</b> ISO/DTS 24672.2, Nanotechnologies -

					Guidance on the measurement of nanoparticle number concentration
<b>Allgemein</b>	Leitfaden zur Detektion und Identifizierung von Nanoobjekten in komplexen Matrizen				DIN CEN/TS 17273:2019-06 (D)
<b>REM, TEM spICP-MS</b>	Anorganische Lebensmittelzusatzstoffe				<b><i>In Vorbereitung:</i></b> CEN/TC 352/WG 4: CEN/TS, Nanotechnologies - Guidelines for sample preparation, detection, identification and characterization by spICP-MS and EM-EDX of nano-objects in inorganic additives incorporated in food matrices

**Weitere nützliche Quellen:**

OECD Test Guideline No. 125 (2023): Nanomaterial particle size and size distribution of nanomaterials [24]

OECD Test Guideline No. 124 (2022): Determination of the volume specific surface area of manufactured nanomaterials [25]

ACEnano Entscheidungshilfe zur Charakterisierung von Nanomaterialien:  
<https://nanodecision.z6.web.core.windows.net/Index.html>

NanoDefiner e-Tool [26]  
<https://zenodo.org/records/7607458>

## Literaturverzeichnis

1. VERORDNUNG (EU) Nr. 1169/2011 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel. 2011.
2. VERORDNUNG (EU) Nr. 2015/22831 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 25. November 2015 über neuartige Lebensmittel 2015.
3. VERORDNUNG (EU) Nr. 1223/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel. 2009.
4. COMMISSION RECOMMENDATION of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). 2011.
5. COMMISSION RECOMMENDATION of 10 June 2022 on the definition of nanomaterial (2022/C 229/01). 2022.
6. COMMISSION DELEGATED REGULATION (EU) .../... amending Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council on novel foods as regards the definition of 'engineered nanomaterials'. Entwurf noch nicht in Kraft, Stand 12.02.2025.
7. Linsinger, T.P.J., et al., *Requirements on measurement for the implementation of the European Commission definition of the term "nanomaterial"*. Reference Report by the Joint Research Centre, 2012.
8. Rauscher, H., et al., *Identification of nanomaterials through measurements*. JRC Science for Policy report, 2019.
9. EFSA Scientific Committee, *Guidance on technical requirements for regulated food and feed product applications to establish the presence of small particles including nanoparticles*. EFSA Journal, 2021. **19**(8): p. 6769.
10. Miernicki, M., et al., *Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions*. Nature Nanotechnology, 2019. **14**(3): p. 208-216.
11. Vidmar, J., L. Hässmann, and K. Loeschner, *Single-Particle ICP-MS as a screening technique for the presence of potential inorganic nanoparticles in food*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021. **69**(34): p. 9979-9990.
12. Mast, J., et al., *Chapter 2.1.2 - Characterization of nanomaterials by transmission electron microscopy: Measurement procedures*, in *Characterization of Nanoparticles*, V.-D. Hodoroaba, W.E.S. Unger, and A.G. Shard, Editors. 2020, Elsevier. p. 29-48.
13. *ISO/TS 19590:2017(E) Nanotechnologies - Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry*. 2017.
14. *ISO 19430:2016 Particle size analysis - Particle tracking analysis (PTA) method*. 2016.
15. *ASTM E2834-12(2018) Standard guide for measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by nanoparticle tracking analysis (NTA)*. 2018.
16. *ISO/TS 21362:2018(E) Nanotechnologies - Analysis of nano-objects using asymmetrical-flow and centrifugal field-flow fractionation*. 2018.
17. *ISO 13318-2:2007 Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods. Part 2: Photocentrifuge method*. 2007.
18. *ISO 13320:2020 Particle size analysis - Laser diffraction method*. 2020.
19. *DIN ISO 22412:2017 Partikelgrößenanalyse - Dynamische Lichtstreuung (DLS)*. 2017.
20. *ISO/TR 22814:2020(E) Good practice for dynamic light scattering (DLS) measurements*. 2020.
21. Loeschner, K., et al., *Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(25): p. 8185-95.
22. Grombe, R., et al., *Production of reference materials for the detection and size determination of silica nanoparticles in tomato soup*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(16): p. 3895-3907.

23. Lee, S., et al., *Nanoparticle size detection limits by single particle ICP-MS for 40 elements*. Environmental Science & Technology, 2014. **48**(17): p. 10291-10300.
24. OECD, *Test No. 125: Nanomaterial particle size and size distribution of nanomaterials*. 2023.
25. OECD, *Test No. 124: Determination of the volume specific surface area of manufactured nanomaterials*. 2022.
26. Brüngel, R., et al., *NanoDefiner framework and e-tool revisited according to the European Commission's nanomaterial definition 2022/C 229/01*. Nanomaterials, 2023. **13**(6): p. 990.