



Fakultät für Chemie

Fachgebiet Analytische Chemie

# **Bildung und Dynamik von Silber- und Silbersulfid-nanopartikeln unter naturnahen aquatischen Bedingungen**

## **Schnelle und kostengünstige Verfahren zur Trennung und Größenbestimmung von Edelmetallnanopartikeln**

*Anna Kalinnik*

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Univ.-Prof. Dr. K. Köhler

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schuster
2. apl. Prof. Dr. B. Helmreich

Die Dissertation wurde am 07.12.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 28.01.2016 angenommen.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2012 bis November 2015 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Michael Schuster in der Fachgruppe Analytische Chemie am Department Chemie der Technischen Universität München.

## Danksagung

Mein größter Dank gilt dem Betreuer meiner Doktorarbeit, *Herrn Prof. Dr. M. Schuster*. Für die Bereitstellung des äußerst interessanten Themas in einem spannenden Forschungsgebiet, für das stete Interesse am Fortgang der Arbeit, für die wissenschaftliche Betreuung, die fachliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Mein Dank gilt des Weiteren meinen Arbeitskollegen: *Holger Sievers, Dr. Georg Hartmann, Dr. Lingxiangyu Li, Monika Stoiber, Vera Krekel, Stephan Fromm, Viola Kirchner, Christine Hutterer, Florian Weigl* und *Andreas Wimmer*, für die gute Arbeitsatmosphäre und für den einen oder anderen Rat.

Ebenfalls vielen herzlichen Dank an die Leute, die mir in irgendeiner Form bei der Arbeit geholfen haben. An meine Praktikanten und Bacheloranten: *Simone Stegbauer, Jessica Schneider* und *Carina Wismeth*. An *Andreas Wimmer* für die SP-ICP-MS-Messungen meiner Proben am LfU sowie an *Dr. Marina Maier* (LfU) für die Bereitstellung des SP-ICP-MS Gerätes.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich jederzeit unterstützt, an mich geglaubt und ermuntert haben. Ohne sie wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

## Kurzfassung

Durch die zunehmende Nanopartikelproduktion steigt die Emission von Nanopartikeln (NP). Jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Nanopartikel auch durch natürliche Bildung in der aquatischen Umwelt entstehen können. Da das Gefährdungspotential der Nanopartikel von ihrer Form und Größe abhängt, wurde im ersten Teil dieser Arbeit die Bildung von Silber- und Silbersulfidnanopartikeln unter naturnahen aquatischen Bedingungen im ng/L-Bereich untersucht und im zweiten Teil wurden schnelle und kostengünstige Verfahren zur Trennung und Größenbestimmung von Edelmetallnanopartikeln entwickelt.

Die Untersuchung der Ag-NP-Bildung aus Silbernitrat erfolgte ohne Reduktionsmittel und nur mit Natürlichem Organischem Material (NOM) in Abhängigkeit von der Zeit, der Temperatur, dem Lichteinfluss und dem pH-Wert. Die Ag<sub>2</sub>S-NP-Bildung aus Silbernitrat, NOM und Natriumsulfid wurde in Abhängigkeit vom Schwefelgehalt, der Zeit und der Temperatur ermittelt. Dabei wurde die Größe der gebildeten Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP mittels Einzelpartikel-Massenspektrometrie (SP-ICP-MS, engl.: single particle-ICP-MS) gemessen. Da Ag-NP im Ultrapurenbereich bestimmt wurden, wo die Adsorptionseffekte an Gefäßwände eine wichtige Rolle spielen, wurde letztere sowie die Freisetzung von Silberionen aus diesen untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ag-NP-Bildung ein dynamischer Prozess aus Ag-NP-Bildung, Ag-Ionenfreisetzung und Ag-NP-Regenerierung ist. Dabei werden Partikel mit einer breiten Größenverteilung gebildet, die sich im Laufe der Zeit und mit zunehmender Temperatur ändert. In wässrigen Lösungen wird ein Drittel der Ag-Ionen zu Ag-NP reduziert, wobei die Zugabe von NOM die Bildung deutlich verstärkt. Bereits bei 0,1 mg/L NOM in der Lösung reagieren 60 % der Ionen zu NP. Im Gegensatz zur Ag-NP-Bildung konnte bei der Ag<sub>2</sub>S-NP-Bildung eine Temperatur- und Zeitabhängigkeit ermittelt werden, da aufgrund des niedrigen Löslichkeitsprodukts des Ag<sub>2</sub>S nahezu keine Ionen frei gesetzt werden. Die Ag<sub>2</sub>S-NP werden mit einer viel schmaleren Größenverteilung als die Ag-NP gebildet, mit zunehmender Temperatur und Zeit reifen diese sehr langsam zu größeren NP heran. Die Zugabe von Salzen und NOM führt zu einer starken Adsorption der NP an die Gefäßwand des Reaktionsgefäßes, wobei Ag<sub>2</sub>S-NP stärker an die Gefäßwand adsorbieren als Ag-NP. Außerdem setzten Citrat-stabilisierte Ag-NP weniger Ionen frei als die durch die NOM-Reduktion gebildeten Ag-

NP. Durch Zugabe von NOM kann die Ionenfreisetzung bei Citrat-stabilisierten NP vollständig unterbunden werden. Damit liefern die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen einen wichtigen Beitrag zur Ermittlung des Verhaltens der Nanopartikel in der Umwelt sowie zur Risikoabschätzung. Man kann davon ausgehen, dass natürliche und anthropogene Ag-NP in der aquatischen Umwelt durch den Schwefelgehalt im Fluss- und Seewasser zu Ag<sub>2</sub>S-NP reagieren, die viel weniger toxisch sind als die Ag-NP.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Verfahren zur Größenbestimmung von Edelmetall-NP mittels Gelelektrophorese entwickelt; dabei wurden verschiedene Detektionsmethoden zur Verbesserung der Nachweisgrenze untersucht. Durch Optimierung der Methode konnte ein Gold-NP-Gemisch aus 25 und 41 nm Gold-NP mit der Konzentration 62 mg/L getrennt werden. Durch die Kopplung der Gelelektrophorese an die ET-AAS konnte die Nachweisgrenze um den Faktor 5 verbessert werden. Somit kann die Gelelektrophorese zur Größenbestimmung von Edelmetall-Nanopartikeln bis zu einer Konzentration von ca. 10 mg/L verwendet werden. Eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenze der Gelelektrophorese ist durch die in dieser Arbeit untersuchten Detektionsmethoden nicht möglich. Damit kann die Methode mit ihrer Nachweisgrenze im mg/L-Bereich zwar die teuren und aufwendigen Größenfraktionierungstechniken für Umweltproben nicht ersetzen, jedoch kann sie beispielsweise zur Produktkontrolle in der Nanopartikelproduktion eingesetzt werden und dort einen wichtigen Beitrag zur Vereinfachung der Analytik leisten.

## Abstract

With the advanced production of nanoparticles (NPs), the emission of them increases. However, it should not be disregarded that nanoparticles can also be formed naturally in the aquatic environment. Because the toxicity of nanoparticles depends on the form and size of the particles, the aim of this work was to investigate the formation and the dynamics of silver and silver sulfide nanoparticles under natural aquatic conditions in the ng/L-range and further to develop fast and cost-efficient methods for the separation and size determination of noble metal NPs. The study of the Ag-NP formation of silver nitrate was performed without a reducing agent and only with NOM depending on reaction time, temperature, light exposure and pH-value. The Ag<sub>2</sub>S-NP formation of silver nitrate, NOM and sodium sulfide was investigated depending on the sulfide concentration, reaction time and temperature. The size of the formed Ag- and Ag<sub>2</sub>S-NP was determined with SP-ICP-MS. Since adsorption effects on the vessel wall play a key role in the Ag-NPs determination in the ultratrace range, this adsorption of Ag-NPs on the reaction vessel and the ion release of the formed nanoparticles was measured. The results demonstrate that the Ag-NP formation is a dynamic process of Ag-NPs generation, Ag ion release and Ag-NPs reformation. The Ag-NPs are formed with a broad size distribution, which varies over time with increasing temperature. In an aqueous solution a third of Ag ions is reduced to Ag-NP, the addition of NOM greatly enhances this formation. Already 0.1 mg/L NOM lead to a formation of 60 % NPs. In contrast to the Ag-NP formation, the formation of Ag<sub>2</sub>S-NPs is temperature and time dependent. Because of the relative high insolubility of Ag<sub>2</sub>S in water, the Ag ion release is inhibited. The Ag<sub>2</sub>S-NPs are formed with a narrow size distribution. With increasing temperature and time, they are getting slowly bigger in size. The addition of salts and NOM is leading to a strong adsorption of the NPs on the vessel wall of the reaction vessel where Ag<sub>2</sub>S-NPs absorb more on the vessel wall than Ag-NPs. Furthermore, the citrate stabilized Ag-NPs release less silver ions than the NOM-reduced NPs. The addition of NOM to the citrate stabilized NPs can inhibit the ion release.

As a result, the investigations carried out in this work provide an important contribution to determining the behavior of nanoparticles in the environment as well as for risk assessment. One can proceed on the assumption that the anthropogenic and naturally formed Ag-NPs will be transformed to Ag<sub>2</sub>S-NPs in the aquatic environment, because

of the high concentration of reactive sulfur in river water, which are much less toxic than the Ag-NPs.

In the second part of this work, a method for the size determination of noble metal NPs by applying the gel electrophoresis was developed and different detection methods for the improvement of the detection limit were tested. Optimizing this method, an Au-NPs Mix of 25 and 41 nm particles with the concentration of 62 mg/L was separated. By coupling the gel electrophoresis to ET-AAS the detection limit was improved by the factor 5. Therefore, the gel electrophoresis can be used for the size determination of NPs until a NP concentration of ca. 10 mg/L. A further improvement of the detection limit was not possible based on the implemented detection methods in this work. This method with his detection limit in the mg/L range cannot replace the expensive and complicated size determination techniques for environmental samples but it can be used for product control in the nanoparticle production and provide an important contribution to the simplification of the analytic.

# Inhaltsverzeichnis

<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>KURZFASSUNG.....</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XVI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>XXI</b>
<b>FORMELVERZEICHNIS .....</b>	<b>XXIII</b>
<b>1        EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2        NANOPARTIKEL.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1      Definition.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2      Historischer Rückblick .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3      Eigenschaften und Verwendung .....</b>	<b>5</b>
<b>2.4      Toxizität.....</b>	<b>8</b>
2.4.1 Allgemein.....	8
2.4.2 Was ist toxischer? Silber-Ionen vs. Silber-Nanopartikel.....	11
<b>2.5      Exposition-Auswirkung auf die Umwelt.....</b>	<b>13</b>
<b>2.6      Transformation in der Umwelt .....</b>	<b>19</b>
2.6.1 Oxidation, Auflösung und Regenerierung .....	20
2.6.2 Sulfidierung.....	20
2.6.3 Chlorierung .....	21



<b>3</b>	<b>METHODEN ZUR ANALYSE VON NANOPARTIKELN.....</b>	<b>23</b>
3.1	Mikroskopische Verfahren .....	23
3.2	Optische und Spektrophotometrische Verfahren.....	24
3.3	Methoden zur Extraktion, Trennung und Größenfraktionierung.....	24
3.3.1	Cloud Point Extraktion (CPE) .....	25
3.3.2	Feldfluss-Fraktionierung (FFF).....	25
3.3.3	Chromatographische Techniken.....	26
3.3.4	Elektrophorese.....	28
3.3.5	Einzelpartikel-Massenspektrometrie.....	29
3.4	Quantifizierung .....	30
3.4.1	Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES).....	31
3.4.2	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) .....	33
3.4.3	Elektrothermale-Atomabsorptionsspektrometrie (ET-AAS).....	34
3.5	Fazit .....	35
<b>4</b>	<b>VERWENDETE METHODEN.....</b>	<b>36</b>
4.1	Cloud Point Extraktion.....	36
4.2	Atomabsorptionsspektrometrie (AAS).....	39
4.2.1	Physikalische Grundlagen .....	39
4.2.2	Aufbau .....	40
4.2.3	Zeeman-Effekt und Untergrundkorrektur.....	43
4.3	Dialyse.....	46
4.4	Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffgehalts .....	47
4.5	Zeta-Potential-Messung.....	47
4.6	Gelelektrophorese.....	50
4.7	UV-VIS Spektroskopie.....	51
4.8	Fluoreszenzspektrometrie.....	52
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>61</b>
5.1	Allgemein .....	61

<b>5.2</b>	<b>Synthese von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3</b>	<b>Cloud Point Extraktion.....</b>	<b>62</b>
<b>5.4</b>	<b>ET-AAS Messung zur Konzentrationsbestimmung von Silber .....</b>	<b>62</b>
<b>5.5</b>	<b>Natürliche Silber-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat ohne Zugabe von Reduktionsmittel .....</b>	<b>64</b>
<b>5.6</b>	<b>Silber-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat und NOM mit 2,5 M NaOAc-Puffer ...</b>	<b>65</b>
<b>5.7</b>	<b>Adsorption von Nanopartikeln und Ionen an die Polypropylen-Gefäßwand des Reaktionsgefäßes.....</b>	<b>65</b>
5.7.1	Untersuchungen zur Adsorption von Silber-Ionen und -Nanopartikeln an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes.....	66
5.7.2	Synthese von silbersulfidbeschichteten Silber-Nanopartikeln (Ag <sub>2</sub> S-NP).....	67
5.7.3	Untersuchungen zur Adsorption von Silbersulfid-Nanopartikeln an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes .....	67
5.7.4	Adsorption von Silber-Nanopartikeln und Silbersulfid-Nanopartikeln an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes in einer 0,1 mg/L SR-NOM-Lösung mit 2,5 M NaOAc-Puffer .....	68
5.7.5	Adsorption von Silber-Nanopartikeln und -Ionen an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes bei Zugabe von EDTA mit 2,5 M NaOAc-Puffer .....	68
<b>5.8</b>	<b>Silber-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat und SR-NOM.....</b>	<b>69</b>
5.8.1	Herstellung der SR-NOM-Lösungen.....	69
5.8.2	TOC-Messung der NOM-Stock-Lösung .....	69
5.8.3	Herstellung der Proben für die Untersuchung der Ag-NP-Bildung aus AgNO <sub>3</sub> und NOM .....	70
<b>5.9</b>	<b>Silbersulfid-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat, Natriumsulfid und SR-NOM....</b>	<b>70</b>
<b>5.10</b>	<b>Ionenfreisetzung aus Citrat-stabilisierten Ag-Nanopartikeln .....</b>	<b>71</b>
<b>5.11</b>	<b>Größenbestimmung der Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP mittels SP-ICP-MS.....</b>	<b>71</b>
5.11.1	Probenvorbereitung für die Größenbestimmung der Ag- und Ag <sub>2</sub> S-NP mittels SP-ICP-MS .....	72
5.11.2	Kalibrierung für die Größenbestimmung der Ag- und Ag <sub>2</sub> S-NP mittels SP-ICP-MS .....	72
5.11.3	Auswertung der ermittelten Daten zur Größenbestimmung der Ag- und Ag <sub>2</sub> S-NP mittels SP-ICP-MS .....	73
<b>5.12</b>	<b>Zeta-Potential.....</b>	<b>73</b>
<b>5.13</b>	<b>Nanopartikelsynthese für die Gelelektrophorese .....</b>	<b>73</b>

5.13.1	Gold-Nanopartikelsynthese .....	73
5.13.2	Silber-Nanopartikelsynthese.....	74
5.13.3	Palladium-Nanopartikelsynthese .....	74
<b>5.14</b>	<b>Synthese fluoreszierender Liganden für die Gelelektrophorese .....</b>	<b>74</b>
5.14.1	Synthese von Natrium 4-(3-carboxy-3-mercaptopropanamido)naphthalene-1-sulfonat (FL-1).....	75
5.14.2	Synthese von Natrium 4-(16-(tritylthio)hexadecanamido)naphthalen-1-sulfonat (FL-2) .	77
5.14.3	Synthese von 2-(7-(16-mercaptohexadecanamido)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (FL-3) .....	79
5.14.4	Synthese von 8-(16-mercaptohexadecanamido)pyren-1,3,6-trisulfonat (FL-4) .....	80
5.14.5	Synthese von 2-(3-carboxy-3-mercaptopropanamido)benzoesäure (FL-5).....	82
5.14.6	Synthese von 9-(2-mercaptoethyl)-1H-isochromeno[6',5',4':10,5,6]anthra[2,1,9-def]isoquinolin-1,3,8,10(9H)-tetraon (FL-6).....	84
<b>5.15</b>	<b>Laufpuffersynthese für die Gelelektrophorese .....</b>	<b>85</b>
<b>5.16</b>	<b>Funktionalisierung der Nanopartikelsuspensionen mit einem Liganden .....</b>	<b>85</b>
5.16.1	Funktionalisierung der Gold-NP mit MUA.....	86
5.16.2	Funktionalisierung der Gold-NP mit MHDA, MUA und MSA .....	86
5.16.3	Funktionalisierung mit Natrium 4-(3-carboxy-3-mercaptopropanamido)naphthalene-1-sulfonat (siehe Kapitel 5.14.1).....	86
5.16.4	Funktionalisierung mit Natrium 4-(16-(tritylthio)hexadecanamido)naphthalen-1-sulfonat (siehe kapitel 5.14.2) .....	86
5.16.5	Funktionalisierung mit 2-(7-(16-mercaptohexadecanamido)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (siehe Kapitel 5.14.3).....	86
5.16.6	Funktionalisierung mit 8-(16-mercaptohexadecanamido)pyren-1,3,6-trisulfonat (siehe Kapitel 5.14.4) .....	87
5.16.7	Funktionalisierung mit 9-(2-mercaptoethyl)-1H-iso-chromeno [6',5',4':10,5,6]anthra[2,1,9-def]isoquinolin-1,3,8,10(9H)-tetraon (siehe Kapitel 5.14.6) .....	87
<b>5.17</b>	<b>Trennung der Nanopartikel mittels Gelelektrophorese.....</b>	<b>87</b>
<b>5.18</b>	<b>Untersuchung der Fluoreszenzlöschung .....</b>	<b>88</b>
5.18.1	Bestimmung der Gold- und Pd-NP-Konzentration mittels ET-AAS .....	89
5.18.2	Konzentrationsbestimmung von monodispersen 20 nm Ag-NP mit Hilfe der Fluoreszenzlöschung von FITC .....	90
5.18.3	Funktionalisierung der Au-NP mit FITC.....	90
5.18.4	Optimierung der MSA-Konzentration und der Inkubationszeit .....	91
<b>5.19</b>	<b>Erhöhung der Absorption durch N-719.....</b>	<b>91</b>
5.19.1	Funktionalisierung der Edelmetall-NP mit N-719 .....	91

<b>5.20</b>	<b>Untersuchungen mit Bovine serum albumin (BSA)</b> .....	<b>91</b>
5.20.1	Funktionalisierung der NP mit BSA .....	91
5.20.2	Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R250 .....	92
<b>5.21</b>	<b>Atomspektrometrische Untersuchungen</b> .....	<b>92</b>
5.21.1	Herstellung des Au-NP-Agarose Gels .....	92
5.21.2	Bestimmung der Gold-Konzentration im Au-NP-Agarose Gel .....	92
5.21.3	Wiederfindung der Au-NP-Fractionen nach erfolgter Gelelektrophorese.....	93
	Funktionalisierung für die Wiederfindung der 25 nm und 41 nm Gold-NP .....	93
	Funktionalisierung für die Wiederfindung verschieden konzentrierter Au-NP .....	93
	Funktionalisierung einer 1:100 Verdünnung der Au-NP-Suspension.....	93
5.21.4	Wiederfindung der Ag-NP-Fractionen nach erfolgter Gelelektrophorese.....	93
	Funktionalisierung mit MSA.....	94
	Ermittlung der optimalen MSA-Konzentration zur Funktionalisierung.....	94
	Funktionalisierung kommerziell erworbener, monodisperser Ag-NP .....	94
<b>6</b>	<b>BILDUNG VON NANOPARTIKELN IN NATÜRLICHEN GEWÄSSERN</b>	
	<b>95</b>	
<b>6.1</b>	<b>Hintergrund und Aufgabenstellung</b> .....	<b>95</b>
<b>6.2</b>	<b>Natürliche Silber-Nanopartikelbildung ohne Reduktionsmittel</b> .....	<b>97</b>
<b>6.3</b>	<b>Silber-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat und NOM mit 2,5 M NaOAc-Puffer</b> <b>(Essigsäure/Acetat-Puffer)</b> .....	<b>100</b>
6.3.1	Reduktion mit SR-NOM .....	100
6.3.2	Reduktion mit NR-NOM .....	102
<b>6.4</b>	<b>Adsorption von Ag-Nanopartikeln und -Ionen an die PP-Wand des</b> <b>Reaktionsgefäßes</b> .....	<b>104</b>
6.4.1	Untersuchung der Adsorption von Ag-NP und -Ionen an die Gefäßwand .....	104
6.4.2	Einfluss von NOM und EDTA auf die Adsorption von Ag-NP, Ag-Ionen und Ag <sub>2</sub> S-NP an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes .....	109
<b>6.5</b>	<b>Silber-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat und SR-NOM</b> .....	<b>112</b>
<b>6.6</b>	<b>Silbersulfid-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat, Natriumsulfid und SR-NOM</b> ..	<b>118</b>
<b>6.7</b>	<b>Ionenfreisetzung aus Citrat-stabilisierten Ag-NP</b> .....	<b>123</b>
<b>6.8</b>	<b>Zusammenfassung der Untersuchungen zur Bildung von Nanopartikeln in</b> <b>natürlichen Gewässern</b> .....	<b>124</b>

<b>7</b>	<b>GRÖßENSEPARATION VON NANOPARTIKELN MIT DER GELELEKTROPHORESE .....</b>	<b>126</b>
7.1	Hintergrund und Aufgabenstellung.....	126
7.2	Trennung von Gold-Nanopartikeln mittels Gelelektrophorese .....	127
7.2.1	Größentrennung von Gold-Nanopartikeln mit 11-Mercaptoundecansäure .....	127
7.2.2	Trennung der Gold-Nanopartikel in Abhängigkeit vom Liganden .....	130
7.3	Untersuchungen zur Verbesserung der Nachweisgrenze bei der Gelelektrophorese .....	132
7.3.1	Fluoreszenztechniken.....	133
	Direkte Bestimmung durch Fluoreszenz.....	133
	Indirekte Bestimmung durch Fluoreszenzlöschung.....	137
	Rückgewinnung der Fluoreszenz durch Ligandensubstitution .....	146
7.3.2	Absorption.....	149
	Erhöhung der Absorption durch N-719.....	149
	Detektion durch BSA .....	152
7.3.3	Atomspektrometrische Untersuchungen .....	153
	Vorversuch.....	154
	Wiederfindung der Au-NP-Fraktionen nach erfolgter Gelelektrophorese.....	154
	Wiederfindung der Ag-NP-Fraktionen nach erfolgter Gelelektrophorese.....	159
7.4	Zusammenfassende Beschreibung der Größenseparation von Nanopartikeln mittels Gelelektrophorese .....	163
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>166</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>169</b>
9.1	Statistische Grundlagen .....	169
9.1.1	Mittelwert und Standardabweichung .....	169
9.1.2	Ermittlung der Verfahrenskenndaten aus der Kalibrierfunktion.....	169
9.2	Verwendete Geräte und Materialien .....	172
9.2.1	Verwendete Geräte.....	172
9.2.2	Verwendete Verbrauchsmittel .....	173
9.2.3	Verwendete Chemikalien.....	173
9.2.4	Verwendete Software .....	176
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>XXIV</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μ	mikro
AC	Anorganischer Kohlenstoff
AF4	Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung
AFS	Atomkraftspektroskopie (atomic force spectroscopy)
Ag <sub>2</sub> S-NP	silbersulfidbeschichtete Silber-Nanopartikel
APTS	Natrium 8-aminopyren-1,3,6-trisulfonat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
BSI	British Standards Institution
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration
CE	Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis)
cmc	kritische Mizellenbildungskonzentration (critical micelle concentration)
CPE	Cloud Point Extraktion
DAD	Diodenarray Dtektor
DIN	Deutsches Institut für Normung
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek-Theorie
DOC	Gelöster organisch gebundener Kohlenstoff (dissolved organic carbon)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (energy dispersive X-ray spectroscopy)
engl.	English
EPA	US Umweltschutzbehörde (Environmental Protection Agency)
<i>et al.</i>	und Mitautoren (lat.: et alii)
ET-AAS	Elektrothermale Atomabsorptionsspektroskopie
FFF	Feldfluss-Fraktionierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-1	Natrium 4-(3-carboxy-3-mercaptopropanamido)naphthalene-1-sulfonat
FL-2	Natrium 4-(16-(tritylthio)hexadecanamido)naphthalen-1-sulfonat

FL-3	2-(7-(16-mercaptohexadecanamido)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure
FL-4	8-(16-mercaptohexadecanamido)pyren-1,3,6-trisulfonat
FL-5	2-(3-carboxy-3-mercaptopropanamido)benzoesäure
FL-6	9-(2-mercaptoethyl)-1H-isochromeno[6',5',4':10,5,6]anthra[2,1,9-def]isoquinolin-1,3,8,10(9H)-tetraon
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FS	Fulvinsäuren
G	Gramm
Gew.-%	Gewichtsprozent
H	Stunden
HDC	Hydrodynamische Chromatographie
HKL	Hohlkathodenlampe
HS	Huminsäuren
IC	Innere Konversion (internal conversion)
ICP-MS	induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (inductively coupled plasma mass spectrometry)
ICP-OES	Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ISC	Intersystem Crossing
ISO	Internationale Organisation für Normung (International Organization for Standardization)
konz.	konzentriert
L	Liter
lat.	Latein
m	milli
M	als Einheit: molar
M	als Formelzeichen: Molare Masse
MALLS	Mehrwinkel-Laser-Lichtstreuendetektor (multiangle laser light scattering)
MHDA	16-Mercaptohexadecansäure (16-mercaptohexadecanoic acid)
min	Minuten
MSA	Mercaptobernsteinsäure (mercaptosuccinic acid)
MUA	11-Mercaptoundecansäure (mercaptoundecanoic acid)
N	Nano

NN	Natriumnaphthionat
NOM	Natürliches Organisches Material (Natural Organic Matter)
NP	Nanopartikel
NR	Nordic Reservoir
Nr.	Nummer
NTA	Nanopartikel Tracking Analyse
NWG	Nachweisgrenze
<i>p</i>	para
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration (lat.: pondus hydrogenii)
POC	Partikulär gebundener organischer Kohlenstoff (particulate organic matter)
PP	Polypropylen
PVP	Polyvinylpropylen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIKILT	National Institute of Food Safety in the Netherlands
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
RTM	Rastertunnelmikroskopie
S.	Seite
S <sub>0</sub>	Singulettgrundzustand
S <sub>1</sub>	Singulett-Zustand
SCCP	wissenschaftlicher Ausschuss für Konsumgüter (Scientific Committee on Consumer Products)
SEC	Größenausschlusschromatographie (size-exclusion chromatography)
SedFFF	Sedimentations-Feldfluss-Fraktionierung
SERS	Oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie (surface enhanced raman spectroscopy)
SP-ICP-MS	Einzelpartikel-Massenspektrometrie (single particle-ICP-MS)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance)
SR	Suwannee River
<i>T</i>	tertiär



T	Zeitpunkt
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
T <sub>c</sub>	Cloud Point Temperatur
TC	Gesamtkohlenstoff (total carbon)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TFA	Trifluoressigsäure (trifluoroacetic acid)
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoffgehalt (total organic carbon)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-amminomethan
UPW	Reinstwasser (ultra pure water)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbar (visible)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
z.B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Definition Nanopartikel .....	3
Abbildung 2: TEM-Bilder der zeitabhängigen Bildung kleiner Ag-NP in der Nähe der 75 nm Ag-NP in wässriger Lösung. <sup>42</sup> .....	18
Abbildung 3: Trennprinzip der FFF <sup>53</sup> .....	25
Abbildung 4: Ausgangssignal verschiedener Silberlösungen bei der SP-ICP-MS Messung <sup>64</sup> .....	30
Abbildung 5: Nachweisgrenzen ausgewählter Elemente für die ICP-MS (blau), verglichen mit denen für die ICP-OES (orange) und die ET-AAS (grau). In Anlehnung an D. A. Skoog. <sup>66</sup> .....	31
Abbildung 6: Typisches induktiv gekoppeltes Plasma <sup>68</sup> .....	32
Abbildung 7: Allgemeine Struktur nichtionischer Tenside der Triton-X Familie. Für das in dieser Arbeit verwendete Tensid Triton X-114 ist $n = 7-8$ .....	36
Abbildung 8: Schematischer Ablauf einer Cloud Point Extraktion .....	37
Abbildung 9: Hohlkathodenlampe, mit 1: Kathode, 2: Anode, 3: Glimmerplatten, 4: Stromzufuhr,.....	40
Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Temperaturprogramms der ET- AAS.....	41
Abbildung 11: Transversal beheizter Graphitofen mit L'vov Plattform <sup>80</sup> .....	42
Abbildung 12: Czerny-Turner Gittermonochromator. In Anlehnung an D. C. Harris. <sup>80</sup> .....	43
Abbildung 13: Verschiebung der Resonanzlinien beim normalen Zeeman-Effekt. In Anlehnung an Perkin-Elmer <sup>81</sup> .....	44
Abbildung 14: Longitudinaler Zeeman-Effekt. In Anlehnung an Perkin-Elmer <sup>81</sup> .....	45
Abbildung 15: Inverser longitudinaler Zeeman-Effekt <sup>81</sup> .....	46
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Zeta-Potentials <sup>84</sup> .....	48
Abbildung 17: Zeta-Potential Verlauf negativ geladener Partikel in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	49
Abbildung 18: Elektronische Spinzustände bei Molekülen. In Anlehnung an D. A. Skoog <sup>66</sup> .....	53
Abbildung 19: Physikalische Vorgänge in einem Molekül nach der Absorption von Strahlung. In Anlehnung an Daniel C. Harris <sup>80</sup> .....	54

Abbildung 20: Komponenten eines Fluorimeters. In Anlehnung an D. A. Skoog <sup>66</sup> ....	58
Abbildung 21: Einfluss von Zeit und AgNO <sub>3</sub> -Konzentration auf die Bildung von Ag-NP (T = 23 °C). Die Standardabweichung ist als schwarzer Balken dargestellt.....	97
Abbildung 22: Einfluss von Temperatur und AgNO <sub>3</sub> -Konzentration auf die Bildung von Ag-NP (Inkubationszeit = 1h). Die Standardabweichung ist als schwarzer Balken dargestellt. ....	98
Abbildung 23: Einfluss von Temperatur und SR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP (Inkubationszeit = 1 h, c(AgNO <sub>3</sub> ) = 150 ng/L). ....	101
Abbildung 24: Einfluss von Zeit und SR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP (T =23 °C, c(AgNO <sub>3</sub> ) = 150 ng/L).....	101
Abbildung 25: Einfluss von Temperatur und NR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP .....	103
Abbildung 26: Einfluss von Zeit und NR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP (T =23 °C, c(AgNO <sub>3</sub> ) = 150 ng/L).....	103
Abbildung 27: Einfluss verschiedener Lösungen auf die Adsorption von Ag-NP an die PP-Wand der ProengefäÙe. ....	105
Abbildung 28: Nicht an die GefäÙwand adsorbierte Ag-NP-Konzentration in unterschiedlichen .....	106
Abbildung 29: Nicht wiedergefundener Ag-NP-Rest. (Berechnet aus eingesetzter Ag-NP-Konzentration und gefundener Ag-NP-Konzentration). ....	107
Abbildung 30: Adsorption der Ag-Ionen an die PP-Wand der ProbengefäÙe in UPW und in einer 62,5 mM NaOAc-Puffer-Lösung. ....	108
Abbildung 31: Adsorption von Nanopartikeln an die PP-Wand der ProbengefäÙe nach 24 h Inkubation, bei Zugabe eines 2,5 M NaOAc-Puffers.....	110
Abbildung 32: Zeta-Potential in Abhängigkeit vom pH-Wert der a) Ag-NP und b) Ag <sub>2</sub> S-NP.....	111
Abbildung 33: Adsorption von Nanopartikeln und Ionen an die PP-Wand der ProbengefäÙe nach 24 h Inkubation, bei Zugabe eines 2,5 M NaOAc-Puffers.....	112
Abbildung 34: Einfluss von Zeit und SR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP (T =7 °C, c(AgNO <sub>3</sub> ) = 150 ng/L). ....	113

Abbildung 35: Einfluss von Zeit, Temperatur und SR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP ( $c(\text{AgNO}_3) = 150 \text{ ng/L}$ ). .....	114
Abbildung 36: SP-ICP-MS-Messung der Partikelgrößenverteilung der durch NOM gebildeten Ag-NP bei 7 °C und 45 °C. Nach 1 h Inkubation, 4 h Inkubation und 24 h Inkubation.....	115
Abbildung 37: Einfluss der $\text{AgNO}_3$ -Konz. auf die Bildung von Ag-NP ( $T = 7 \text{ °C}$ , $c(\text{NOM}) = 0,1 \text{ mg/L}$ ). .....	116
Abbildung 38: Einfluss der Zeit und $\text{AgNO}_3$ -Konzentration auf die Bildung von Ag-NP ( $T = 7 \text{ °C}$ , $c(\text{NOM}) = 0,1 \text{ mg/L}$ ). .....	117
Abbildung 39: Einfluss der Lichteinwirkung auf die Bildung von Ag-NP ( $T = 23 \text{ °C}$ , $c(\text{NOM}) = 0,1 \text{ mg/L}$ , $c(\text{AgNO}_3) = 100 \text{ ng/L}$ ).....	118
Abbildung 40: Einfluss von Natriumsulfid auf die $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP-Bildung ( $T = 60 \text{ °C}$ , $c(\text{NOM}) = 0,1 \text{ mg/L}$ ). .....	119
Abbildung 41: Einfluss von Zeit auf die $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP-Bildung ( $c(\text{AgNO}_3) = 150 \text{ ng/L}$ , $c(\text{NOM}) = 0,1 \text{ mg/L}$ , $c(\text{Na}_2\text{S}) = 4 \text{ mM}$ ). .....	120
Abbildung 42: Einfluss von Temperatur auf die $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP-Bildung ( $c(\text{AgNO}_3) = 150 \text{ ng/L}$ , $c(\text{NOM}) = 0,1 \text{ mg/L}$ , $c(\text{Na}_2\text{S}) = 4 \text{ mM}$ ). .....	120
Abbildung 43: SP-ICP-MS-Messung der Partikelgrößenverteilung der durch NOM gebildeten $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP bei 7 °C und 45 °C. Nach 1 h Inkubation, 4 h Inkubation und 24 h Inkubation.....	122
Abbildung 44: Ionenfreisetzung aus Citrat-stabilisierten Ag-NP abhängig von der Inkubationslösung, -temperatur und -zeit. ....	123
Abbildung 45: Größentrennung zweier Au-NP-Suspensionen mit verschiedenen Liganden nach unterschiedlichen Zeitpunkten. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 25 nm + MHDA, 2) 41 nm + MHDA, 3) 25 nm + MUA, 4) 41 nm + MUA, 5) 25 nm + MSA, 6) 41 nm + MSA. ....	130
Abbildung 46: Größentrennung zweier Au-NP-Suspensionen einzeln und als Mischung mit verschiedenen Liganden nach 45 min. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 25 nm + MHDA, 2) 41 nm + MHDA, 3) Mix + MHDA, 4) 25 nm + MUA, 5) 41 nm + MUA, 6) Mix + MUA, 7) 25 nm + MSA, 8) 41 nm + MSA, 9) Mix + MSA.....	131

Abbildung 47: Größentrennung einer MUA-funktionalisierten Au-NP-Mischung. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 25 nm + MUA, 2) 41 nm + MUA, 3) Mix + MUA. ....	132
Abbildung 48: Mit Fluoreszenzliganden funktionalisierte Au-NP: 1) 25 nm + FL-2, 2) 41 nm + FL-2,.....	134
Abbildung 49: Gel mit Fluoreszenzliganden funktionalisierten Au-NP unter der UV-Lampe 366 nm. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 25 nm + FL-2, 2) 41 nm + FL-2, 3) 25 nm + FL-4,.....	134
Abbildung 50: Gelelektrophorese mit Fluoreszenzliganden funktionalisierter Au-NP, Laufzeit = 20 min, bei a) Tageslicht und b) unter der UV-Lampe 366 nm. Auftragung siehe Abbildung 49. ....	135
Abbildung 51: Gelelektrophorese mit Fluoreszenzliganden funktionalisierter Au-NP, Laufzeit = 30 min, bei a) Tageslicht und b) unter der UV-Lampe 366 nm. Auftragung siehe Abbildung 49. ....	136
Abbildung 52: Gelelektrophorese mit FL-6 funktionalisierten Au-NP, bei Tageslicht a) und unter der UV-Lampe 366 nm b), nach 15 min Laufzeit. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 25 nm + FL-6, 2) 41 nm + FL-6.....	137
Abbildung 53: Löschung der Fluoreszenz von NN durch Au-NP verschiedener Größen.....	138
Abbildung 54: Löschung der Fluoreszenz von NN durch Au-NP verschiedener Größen, sowie Ag- und Pd-NP.....	139
Abbildung 55: Löschung der Fluoreszenz von Natriumnaphthionat durch Au- und Ag-NP verschiedener Größen, sowie durch Au- und Ag-Ionen.....	140
Abbildung 56: Einfluss von MUA auf die Fluoreszenzlöschung von Natriumnaphthionat.....	140
Abbildung 57: Fluoreszenzlöschung von FITC durch verschiedene NP.....	141
Abbildung 58: Fluoreszenzlöschung von APTS, NN und FITC durch Au-NP (20 nm).....	142
Abbildung 59: Fluoreszenzlöschung von FITC durch Ag-NP verschiedener Größen.....	143
Abbildung 60: Ligandensubstitution in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der MSA-Konzentration.....	147

Abbildung 61: Gelelektrophorese der 25 und 41 nm FITC funktionalisierter Au-NP .....	148
Abbildung 62: Absorptionsspektrum von N-719 in UPW .....	150
Abbildung 63: Absorptionsspektrum N-719-funktionalisierter Au- und Ag-NP .....	150
Abbildung 64: Gelelektrophorese N-719-funktionalisierter NP-Suspensionen nach unterschiedlichen Zeitpunkten. Von links nach rechts wurden aufgetragen: a) 1) 25 nm Au-N-719-NP, 2) 41 nm Au-N-719-NP, 3) 20 nm Ag-N-719-NP, 4) Pd-N-719-NP; b) 1) 25 nm Au-N-719-NP, 2) 41 nm Au-N-719-NP.....	151
Abbildung 65: Gelelektrophorese BSA-funktionalisierter NP-Suspensionen a) vor Färbung mit Coomassie Brillant Blau R250 b) nach Färbung mit Coomassie Brillant Blau R250. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) BSA, 2) Ag-BSA-NP, 3) 25 nm Au-BSA-NP, 4) 41 nm Au-BSA-NP, 5) Pd-BSA-NP. ....	152
Abbildung 66: Vertikale Gelelektrophorese MSA-funktionalisierter Au-NP-Suspensionen. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 41 nm Au-NP, 2) 25 nm Au-NP. ....	155
Abbildung 67: Schnittschema des Agarosegels nach der Gelelektrophorese. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 41 nm MUA-Au-NP, 2) 1:10 Verdünnung von 1), 3) 1:100 Verdünnung von 1).....	156
Abbildung 68: Schematische Darstellung der Wiederfindung bezogen auf die gemessene Au-Gesamtkonzentration im Gel.....	157
Abbildung 69: Schnittschema des Agarosegels nach Gelelektrophorese. Aufgetragen wurde eine 41 nm MUA-Au-NP-Lösung (1:100 Verdünnung).....	158
Abbildung 70: Schematische Darstellung der Wiederfindung bezogen auf die gemessene Au-Gesamtkonzentration im Gel.....	159
Abbildung 71: Schnittmuster und Wiederfindung der Ag-NP im Agarosegel; mit a) 16 mg/L und b) 1,6 mg/L MUA funktionalisierter Ag-NP-Lösung.....	160
Abbildung 72: Schnittschema zur Wiederfindung der 20 und 60 nm Ag-NP im Gel nach der Gel- .....	161

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Graphitofen-Temperaturprogramm für die Konzentrationsbestimmung der synthetisierten Silber-Nanopartikel. Die Messung erfolgt jeweils während des Atomisierungsschritts. ....	63
Tabelle 2: Graphitofen-Temperaturprogramme für die Messung der Tensid-Phase nach der CPE von Silber-Nanopartikeln. Die Messung erfolgte jeweils während des Atomisierungs-Schritts. ....	63
Tabelle 3: ICP-MS Systemparameter für die Messung von Ag- und Ag <sub>2</sub> S-NP im Einzelpartikel Modus .....	72
Tabelle 4: Parameter für die Messung der Fluoreszenzintensität im Fluorimeter.....	88
Tabelle 5: Graphitofen-Temperaturprogramm für die Konzentrationsbestimmung von Gold-Nanopartikeln. Die Messung erfolgt jeweils während des Atomisierungsschritts. ....	89
Tabelle 6: Graphitofen-Temperaturprogramm für die Konzentrationsbestimmung der synthetisierten Palladium-Nanopartikel. Die Messung erfolgt jeweils während des Atomisierungsschritts.....	90
Tabelle 7: Vergleich zwischen der gebildeten Konzentration an NP ohne und mit 4 mM Na <sub>2</sub> S nach 24 h Inkubation nach Zugabe von 0,1 mg/L NOM und 150 ng/L AgNO <sub>3</sub> bei verschiedenen Temperaturen.....	121
Tabelle 8: Abhängigkeit der Laufstrecke der Gold-NP im Gel von der angelegten Gleichspannung bei einer Laufzeit von t <sub>1</sub> = 30 min. ....	127
Tabelle 9: Abhängigkeit der Laufstrecke der Gold-NP im Gel von der angelegten Gleichspannung bei einer Laufzeit von t <sub>1</sub> = 60 min .....	128
Tabelle 10: Abhängigkeit der Laufstrecke der Gold-NP im Gel von der Gelkonzentration. ....	129
Tabelle 11: Abhängigkeit der Laufstrecke der Gold-NP im Gel von der Pufferkonzentration. ....	129
Tabelle 12: Verwendete Fluoreszenzliganden zur Fluoreszenzdetektion im Agarose-Gel.....	133
Tabelle 13: Gegenüberstellung der zugegebenen und durch Fluoreszenzlöschung ermittelten Ag-NP-Konzentration. Mit $y = 0,0151x - 0,0016$ . ....	145

Tabelle 14: Gegenüberstellung der zugegebenen, durch Fluoreszenzlöschung und durch ET-AAS-Messung ermittelten Ag-NP-Konzentration. Mit $y = 0,0028x - 0,0013$ , vgl. Abbildung 59.....	145
Tabelle 15: Bestimmung der Au-Konzentration im Au-NP-Agarose Gel.....	154
Tabelle 16: Wiederfindung der Gold-NP im Agarosegel.....	155
Tabelle 17: Wiederfindung unterschiedlich konzentrierter Gold-NP-Fraktionen im Agarosegel.....	157
Tabelle 18: Vergleich der dialysierten und nicht dialysierten Ag-NP .....	160
Tabelle 19: Ergebnisse der Untersuchung zur Ermittlung der optimalen Ligandkonzentration.....	161
Tabelle 20: Laufverhalten der Ag-NP in Abhängigkeit von der Spannung.....	162
Tabelle 21: Laufverhalten der Ag-NP in Abhängigkeit von der Gelkonzentration bei 200 V.....	162
Tabelle 22: Laufverhalten der Ag-NP in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration in 0,5 Gew.-% Gel, bei 200 V.....	163



## Formelverzeichnis

Formel 1: Lambert-Beer'sches Gesetz .....	39
Formel 2: Für die ET-AAS gültige Abwandlung des Lambert-Beer'schen Gesetzes.....	40
Formel 3: Henry-Gleichung <sup>85</sup> .....	49
Formel 4: Quantenausbeute eines Chromophors.....	55
Formel 5: Lambert-Beer'sche Gesetz für die Fluoreszenz.....	56
Formel 6: Lichtanteil der als Fluoreszenz emittiert wird.....	56
Formel 7: Vereinfachte Formel für die Intensität des Fluoreszenzlichts .....	56
Formel 8: Stern-Volmer-Gleichung.....	58
Formel 9: Verdünnungsformel zur Bestimmung der Ag-NP-Konzentration .....	144
Formel 10: Formel zur Bestimmung der Ag-NP-Konzentration durch Fluoreszenzlöschung .....	144
Formel 11: Mittelwert.....	169
Formel 12: Standardabweichung.....	169
Formel 13: Steigung der Kalibriergeraden.....	170
Formel 14: Achsenabschnitt der Kalibriergeraden.....	170
Formel 15: Reststandardabweichung der Kalibriergeraden .....	170
Formel 16: Verfahrensstandardabweichung.....	170
Formel 17: Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion .....	170
Formel 18: Prognoseintervall der Kalibrierfunktion.....	171
Formel 19: Nachweisgrenze der zugrunde liegenden Methode .....	171
Formel 20: Hilfwert zur Berechnung der Nachweisgrenze.....	171

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Mit dem Fortschritt der Nanotechnologie finden Metall-Nanopartikel in der Industrie vermehrt Einsatz und werden verstärkt in verschiedenen Bereichen eingesetzt. Mittlerweile gibt es mehr als 1600 registrierte, auf der Nanotechnologie basierende Produkte, von denen 23 % Silber-Nanopartikel enthalten.<sup>1</sup> In Folge des erhöhten Einsatzes von Nanopartikeln in Verbrauchsgegenständen steigt deren Emission in die Umwelt sowie durch ihre mögliche toxische Wirkung die Gefahr für Wasserorganismen, Tiere und Menschen.

Vor allem zu Silbernanopartikeln gibt es zahlreiche Studien, welche die Toxizität von Ag-Nanopartikeln belegen.<sup>2,3,4</sup> Jedoch ist immer noch unklar, ob die Toxizität von Silbernanopartikeln oder von den aus ihnen freigesetzten Silberionen ausgeht.<sup>5</sup> Des Weiteren spielen bei der Toxizität von Nanopartikeln auch andere Faktoren wie die Oberflächenbeschichtung (engl.: *Coating*), ihre Größe sowie die Konzentration eine große Rolle. Diese potentielle Gefahr für die Umwelt und den Menschen macht eine Überwachung des Silbergehalts in Gewässern erforderlich. Da sich Nanopartikel auch selbst durch Reduktion von ionischem oder nicht partikulärem Silber mit natürlichen Reduktionsmitteln – die ubiquitär in natürlichen Gewässern vorkommen – bilden können, gilt es, auch diese natürliche Bildung und das Verhalten dieser natürlich gebildeten Nanopartikel in der Umwelt zu untersuchen. Es ist bekannt, dass Silbernanopartikel thermodynamisch instabil sind, wodurch sie in der aquatischen Umwelt verschiedene Transformationen durchlaufen können. Es wird angenommen, dass sie durch den Sauerstoffgehalt im Wasser zu Ionen oxidiert werden und mit Chlorid oder Sulfid zu AgCl- und Ag<sub>2</sub>S-beschichteten Ag-NP reagieren. Da die Toxizität der Nanopartikel von ihrer Oberflächenfunktionalisierung abhängt, ist es wichtig, diese Transformationen bei der Untersuchung des Verhaltens der NP in der Umwelt zu beachten.

Wie bereits erwähnt, hat auch die Größe der Edelmetall-Nanopartikel einen enormen Einfluss auf ihre Toxizität. Deswegen bedarf es einer nachweisstarken, einfachen und kostengünstigen Methode, um diese in Umweltproben zu bestimmen. Die Methoden, die im Moment zur Größenbestimmung von Nanopartikeln in Umweltproben verwendet werden, sind mit aufwendiger Instrumentierung, langen Mess- bzw. Auswertzeiten und hohen Kosten verbunden. Deswegen ist es die Aufgabe der Analytiker, eine einfache

und kostengünstige Methode zur Größenbestimmung von Nanopartikeln zu entwickeln, um das Umweltmonitoring von Edelmetall-Nanopartikeln deutlich zu vereinfachen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der natürlichen Bildung von Ag-NP aus  $\text{AgNO}_3$  und von  $\text{Ag}_2\text{S-NP}$  aus  $\text{AgNO}_3$  und  $\text{Na}_2\text{S}$  in der aquatischen Umwelt. Dabei soll die Frage geklärt werden, wie sich diese natürlich gebildeten Ag- und  $\text{Ag}_2\text{S-NP}$  bezüglich ihrer Konzentration und Größe in Abhängigkeit von der Zeit, Temperatur, dem pH-Wert sowie dem Lichteinfluss verhalten. Weiterhin soll die Ionenfreisetzung aus Ag- und  $\text{Ag}_2\text{S-NP}$  sowie deren Adsorption an die Polypropylen-Gefäßwand der Reaktionsgefäße untersucht werden, da die Ag-NP-Bestimmung im Ultraspurenbereich erfolgt, wo die Adsorptionseffekte an Gefäßwände eine wichtige Rolle spielen. Schließlich soll geklärt werden, wie der gemessene Ag-NP-Gehalt im Flusswasser durch die natürlich gebildeten Ag-NP beeinflusst wird.

Außerdem wird der Versuch unternommen, mit der Gelelektrophorese ein einfaches und kostengünstiges Verfahren zur Größenbestimmung von Edelmetall-NP zu entwickeln. Dabei werden verschiedene Verfahren zur Nanopartikeldetektion bei der Gelelektrophorese untersucht, die der Verbesserung der Nachweisgrenze dieser Methode dienen sollen.

## 2 Nanopartikel

### 2.1 Definition

Was bedeutet „Nano“? Die Bezeichnung „Nano“ leitet sich aus dem griechischen Wort „nanos“ zu Deutsch „Zwerg“ ab und wird als Präfix für den milliardsten Teil ( $10^{-9}$ ) benutzt.<sup>6</sup> Bei der Definition von „Nanoteilchen“ gilt es zwischen Nanoobjekten und Nanomaterialien zu unterscheiden, siehe Abbildung 1.

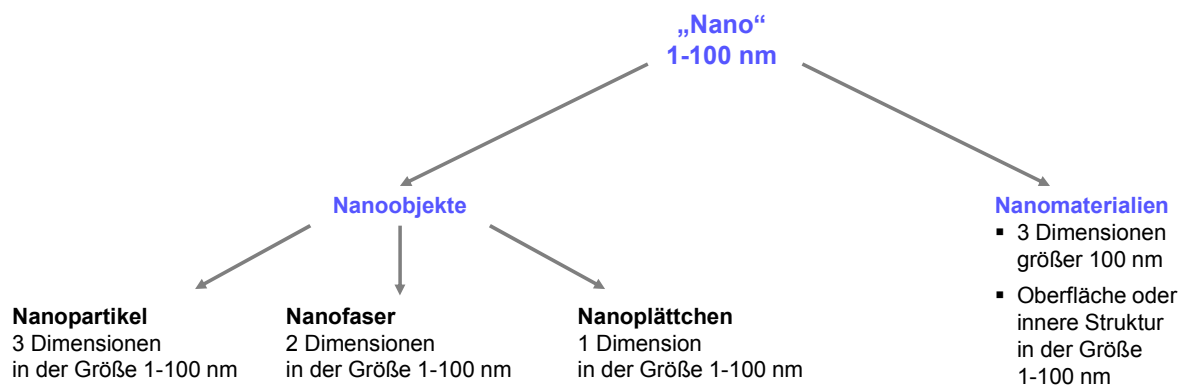


Abbildung 1: Definition Nanopartikel

Laut der Definition der Internationalen Organisation für Normung (ISO, engl.: *International Organization for Standardization*) sind Nanoobjekte Teilchen, deren äußere Abmessungen im Nanobereich zwischen 1 bis 100 nm liegen. Diese werden in Nanopartikel, Nanofaser und Nanoplättchen unterteilt. Die Maße der Nanopartikel liegen in allen drei Dimensionen in diesem zuvor geschilderten Nanobereich. Im Gegensatz dazu weisen die anderen beiden Unterschiede in ihrer Größe auf, wobei bei den Nanofasern nur zwei Dimensionen und bei den Nanoplättchen nur eine Dimension in diesem Größenbereich liegt.<sup>7</sup>

Nanomaterialien hingegen zu denen z.B. Agglomerate zählen<sup>8</sup> sind nach der Definition der British Standards Institution (BSI) und dem wissenschaftlichen Ausschuss für Konsumgüter (SCCP, engl.: *Scientific Committee on Consumer Products*) Teilchen mit einer deutlich größeren dreidimensionalen Struktur als 100 nm. Jedoch ist ihre Oberfläche oder die innere Struktur 1 bis 100 nm groß.<sup>9</sup>

In dieser Arbeit werden lediglich Edelmetall-Nanopartikel behandelt.

## 2.2 Historischer Rückblick

Edelmetall-Nanopartikel sind keine moderne Erfindung, sondern finden bereits seit Jahrhunderten, wenn auch unbewusst Anwendung. Gold ist eines der ersten Metalle, welches vom Menschen verarbeitet wurde. Die erste Goldgewinnung geht nach wissenschaftlichen Erkenntnissen auf das Jahr 5000 v. Chr. zurück und erreichte im Zeitraum 1200 bis 1300 v. Chr. in Ägypten ihren Höhepunkt mit 10.000 kg/Jahr.

„Kolloidales Gold“, wie Gold-Nanopartikel (Au-NP) früher bezeichnet wurden, ist aus China und Ägypten seit 5000 v. Chr. bekannt. Damals wie heute wurde kolloidales Gold für die Glas- und Keramikfärbung benutzt. Das wohl bekannteste Beispiel ist der Lykurgosbecher, welcher 4000 v. Chr. wahrscheinlich in Rom angefertigt wurde und heute im British Museum in London bewundert werden kann. Der außergewöhnliche Becher erscheint rubinrot, wenn Licht hindurchscheint und gelbgrün im reflektierten Licht. Der Lichteffekt kommt durch die in den Becher eingearbeiteten Gold- und Silber-Nanopartikel (Ag-NP) zustande, die ihm diese besonderen optischen Eigenschaften verleihen.<sup>10</sup>

Bis ins Mittelalter wurden dem Gold (in ionischer und kolloidaler Form) wundersame und heilende Kräfte gegen viele verschiedene Krankheiten, wie z.B. Herz-, Durchfall-, Geschlechtskrankheiten und Epilepsie, nachgesagt. Die Hauptanwendung von Goldkolloiden im Mittelalter lag in der medizinischen Diagnostik von Syphilis. Diese Methode blieb sogar bis ins 20te Jahrhundert im Einsatz, bevor sie letztendlich wegen ihrer Unzuverlässigkeit abgesetzt wurde.<sup>11</sup>

Die ersten Schriften zur medizinischen Wirkung von kolloidalem Gold entstanden im 17. Jahrhundert, eines davon ist das 1618 veröffentlichte Buch des Philosophen und Arztes Francisci Antonii, welches Informationen zur Bildung von kolloidalem Gold und dessen medizinischer Anwendung enthielt. 1676 publizierte der deutsche Alchimist und Glasmacher Johannes Kunckel ein Buch mit dem Kapitel „trinkbares, metallisches Gold in einer schwach pinken Lösung, mit heilender Wirkung für etliche Krankheiten“. Kunckel war auch derjenige, dem als erstes die gewerbliche Herstellung von Goldrubinglas gelang, welches als Luxusartikel für den Export sehr gefragt war.<sup>11</sup> Ein Becher mit Deckel aus Goldrubinglas von Johannes Kunkel ist heute in der Schatzkammer der Münchener Residenz ausgestellt.

Die frühen Anfänge der Nanotechnologie lassen sich heute in Glasfenstern vieler gotischer Kathedralen in Europa betrachten. Eines dieser Meisterwerke befindet sich in

der Leon Kathedrale in Spanien. Die Farbänderungen kommen dort durch Gold- und Silber-Nanopartikel verschiedener Größen zustande. Ein weiteres Beispiel ist das Glasfenster mit der Rose in der Notre-Dame Kathedrale in Frankreich.<sup>11</sup>

Ein Meilenstein in der Nanopartikelforschung gelang Faraday 1857 mit seiner Arbeit zu den Eigenschaften und der Synthese von Nanopartikeln. Er berichtete über die Bildung von roten, kolloidalen Gold-Suspensionen bei der Reduktion von Tetrachloridogoldsäure ( $\text{HAuCl}_4$ ) in Schwefelkohlenstoff mit Phosphor. Die optischen Eigenschaften von kolloidalem Gold erforschte er durch Eintrocknen der Kolloid-Lösungen zu dünnen Schichten. Dabei stellte er reversible Farbänderungen der Schichten durch mechanischen Druck fest. Nach dieser Pionierarbeit wurden viele verschiedene Methoden zur Herstellung und Modifizierung sowie zu den Eigenschaften und der Zusammensetzung von Gold-Nanopartikeln veröffentlicht.<sup>10</sup>

Anfang des 20. Jahrhunderts, mit der Entwicklung der chemischen Industrie, begann die industrielle Produktion von Nanomaterialien, z.B. die Herstellung von Pigmenten wie  $\text{SiO}_2$  und  $\text{TiO}_2$  mit der Hochtemperatur-Verbrennungsmethode und Kohlenstoffpartikeln bei der Gummireifenproduktion. Nach der Entdeckung des Transmissions-elektronenmikroskops (TEM) 1931 und des Rasterelektronenmikroskops (REM) 1937 kam es zu einer raschen Entwicklung in der Nanotechnologie, die wir als solche heute kennen.<sup>11</sup> Diese Entwicklung führte 1954 dazu, dass Silber-Nanopartikel als biozides Material in den USA registriert wurden.

Seit den 70er Jahren besteht die innovative Entwicklung von Nanopartikeln aus einer Kombination aus Theorie und experimentellen Ergebnissen in den Feldern der Physik, Chemie, Material- und Biowissenschaften. Ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften, anders als ihre optischen Eigenschaften, haben zu einem breiten Anwendungsspektrum geführt.<sup>11</sup>

## **2.3 Eigenschaften und Verwendung**

In den letzten zwei Jahrzehnten sind die Menschen Zeugen einer stark wachsenden Nanoindustrie geworden. Laut dem Nanotechnologie-Verbraucher-Inventar wurden 2013 mehr als 1600 „Nanoprodukte“ gelistet, von denen 23 % Ag-NP enthalten.<sup>1</sup> Während einige Nanomaterialien bereits seit Jahrhunderten Anwendung in Fensterscheiben finden, sind viele Anwendungsbereiche neu.

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Metall-Nanopartikel unterscheiden sich immens von denen der elementaren (nichtpartikulären) oder ionischen Form des Metalls. Silber-Ionen besitzen keine Oberfläche, sind hoch reaktiv und präzipitieren. Sie können leicht in Zellen diffundieren sowie organische und anorganische Komplexe bilden. Elementares (nichtpartikuläres) Silber hat eine kleine Oberfläche, ist schlecht löslich und besitzt limitierte oxidative Eigenschaften. Es wird nicht von Zellen aufgenommen und kann nur schlecht Biomoleküle binden.<sup>12</sup> Nanopartikel dagegen sind von großem Interesse wegen ihrer extrem geringen Größe, hoher Reaktivität, ihres hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses, dem niedrigeren Schmelzpunkt, ihres hohen Oxidationspotentials, einer höheren spezifischen Oberfläche und der Bindung von Biomolekülen. Sie besitzen charakteristische optische Eigenschaften, genauso wie mechanische Festigkeit und eine spezifische Magnetisierung.<sup>13</sup> Edelmetall-Nanopartikel, wie Gold, Silber, Platin und Palladium sind in schnelldrehenden Produkten mit hoher Umschlagshäufigkeit weit verbreitet d.h. in Warengütern, die schnell im Verkaufsregal rotieren. So finden sie ihre Anwendung in Shampoo, Zahnpasta, Seifen, Waschmitteln, Kosmetikprodukten und Schuhen.<sup>14</sup>

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Medizin und Pharmazie. Edelmetall-Nanopartikel werden zur chemischen und biologischen Markierung, zur Photothermalen Therapie, für biomedizinische bildgebende Verfahren, zur Arzneistoffabgabe und zur Krebstherapie eingesetzt. Aber auch in der Mikroskopie für die photoakustische Bildgebung und für die Oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie (SERS, engl.: *surface enhanced raman spectroscopy*) leisten sie ihren Beitrag. Auch in der Katalyse wird verstärkt auf Nanopartikel gesetzt.

Das Hauptanwendungsgebiet von Gold-Nanopartikeln liegt vor allem in der Medizin. Wegen ihrer kleinen Größe und der großen Oberfläche, Form und Kristallinität haben sich Nanopartikel als exzellente Therapeutika erwiesen, sie können mit viel Wirkstoff beladen werden und schnell zu den Zielzellen gelangen. Auch aufgrund ihrer inerten Beschaffenheit, Stabilität, hohen Dispersität, Biokompatibilität und weil sie von allen Metall-Nanopartikeln am wenigsten zytotoxisch sind, werden Au-NP zur Diagnostik und in Arzneimittelzufuhrsystemen verwendet. In Arzneimittelssystemen bekämpfen sie gezielt und effektiver als die konventionellen Methoden bösartige Tumore. In der Biomedizin wird ihre große Oberfläche mit Zielmolekülen oder spezifischen Biomarkern modifiziert.<sup>6</sup> In der Wasseranalytik werden Gold-Nanopartikel für die Bestimmung von

Kupfer, Quecksilber, Blei und Arsen als Sensoren eingesetzt. Die Detektion erfolgt durch ihre Farbänderung bei Aggregation, verursacht durch den zu bestimmenden Analyten.

Silber-Nanopartikel haben ein noch viel breiteres Verwendungsspektrum und werden von allen Edelmetall-Nanopartikeln am häufigsten von der Industrie in Produkte implementiert. Mit Hilfe von Silber-Nanopartikeln und -Nanodrähten werden Dünnschicht-transistor-Elektroden hergestellt. Sie werden in Pasten und Tinten für die Leiterplattenherstellung, in der Optoelektronik und in Datenspeichergeräten verwendet. Silber-Nanopartikel und -Nanoverbundwerkstoffe katalysieren eine Reihe von Reaktionen wie z.B. die Oxidation von Kohlenstoffmonoxid und Benzol, die Reduktion von 4-Nitrophenol (in Anwesenheit von Natriumborhydrid) und von Rhodamin B sowie viele weitere Reaktionen. In der SERS bewirken Ag-NP eine  $10^{14}$ -fache Erhöhung der SERS-Effizienz. In der Bildsensor Technologie werden Silber-Nanopartikel zur DNA-Detektion und zur kolorimetrischen Analyse von Cystein und Quecksilber verwendet. Die wohl bekannteste Eigenschaft von Nanosilber ist die antimikrobielle Wirkung. Silber-Nanopartikel können sowohl das Wachstum gram-positiver als auch das gram-negativer Bakterien hemmen, deswegen können sie zugesetzt in Antibiotika, deren Wirkung verstärken und sogar helfen, die Antibiotikaresistenz mancher Bakterien zu überwinden. Silber-Nanopartikel haben fungizide und antivirale Eigenschaften, so können sie z.B. eine Reihe von einfachen Pilzstämmen abtöten und eine Reihe von Viren wie z.B. HIV, Hepatitis B und Herpes-simplex-Viren hemmen. Des Weiteren wird ihre antimikrobielle Wirkung zur Wasserreinigung, in Warengütern wie Lebensmittelverpackungen und Vorratsbehältern, in Socken, Unterwäschen, Raumsprays, Waschmitteln, Waschmaschinen, Lotionen, weiblichen Hygieneprodukten und Seifen genutzt. In der Medizin werden sie außerdem in Verbandmaterialien, in Operationsbesteck, in Knochenzement und in Implantaten verwendet.<sup>2</sup>

Platin-Nanopartikel sind als Katalysatoren weit verbreitet und werden in Autoabgaskatalysatoren sowie in der Biomedizin in Verbindung mit anderen Nanopartikeln in Legierungen, Kern-Schale-Partikeln und Bimetall-Nanostrukturen angewandt.

Ähnlich wie Platin- werden Palladium-Nanopartikel in der Katalyse, Elektrokatalyse, der Sensorik und in der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie, engl.: *surface plasmon resonance spectroscopy*) benutzt.<sup>14</sup>



## 2.4 Toxizität

### 2.4.1 Allgemein

Mit dem vermehrten Einsatz von Nanopartikeln vor allem in Verbrauchsgegenständen wie Kosmetika und Lebensmitteln, stellt sich die Frage, welche Risiken die Nanotechnologie für die Menschen und die Umwelt mit sich bringt. Da in der Nanotechnologie im Vergleich zu anderen Edelmetall-Nanopartikeln am häufigsten Silber-Nanopartikel eingesetzt werden (rund 23 % aller Nanoprodukte enthalten Silber), soll in diesem Kapitel hauptsächlich die Toxizität von Silber-Nanopartikeln diskutiert werden. Silber ist eine für die Menschen grundsätzlich toxische Substanz. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl.: *World Health Organization*) und die US Umweltschutzbehörde (EPA, engl.: *Environmental Protection Agency*) stufen Silber als giftig ein. Für Trinkwasser gibt es gemäß der Trinkwasserverordnung von 2001, einen gesetzlich festgeschriebenen Grenzwert von 100 µg/L.<sup>15</sup>

Um die Toxizität von Nanopartikeln beurteilen zu können, soll erst geklärt werden, über welche Wege die Nanopartikel in den menschlichen Körper gelangen können. Faktoren wie Größe, Form, Oberflächenchemie, Methoden der Exposition und die Expositionszeit sind dabei für den Aufnahmeweg entscheidend. Dabei kommen viele Möglichkeiten in Frage: über die Haut, oral über den Gastro-Intestinal Trakt, durch Inhalation über die Atemwege, über den Blutkreislauf durch intravenöse Injektion usw. Über den Blutkreislauf injiziert, haben *in vivo* Versuche gezeigt, dass Nanopartikel schnell in den Kreislauf gelangen können.<sup>16</sup> Dabei haben Studien ergeben, dass die Leber die größte „Eingangstür“ für Nanopartikel darstellt, gefolgt von der Milz, der Lunge und den Nieren, wobei die großen Silbernanopartikel (80 und 110 nm) sich eher in der Milz, gefolgt von der Leber und der Lunge ansammeln.<sup>17</sup> Interessant ist, dass nach Injektion von Silber-Nanopartikel die Silber-Konzentration im Blut bis zu 6 Tage auf einem hohen Niveau bleibt und danach abfällt, was darauf hindeuten könnte, dass Silber-Nanopartikel im Laufe der Zeit abgebaut und entfernt werden können.<sup>16</sup> Jedoch belegt eine andere Studie, dass nach der Injektion ins Blut, die Ag-NP sich sofort auf anderes Gewebe verteilen.<sup>12</sup> Darüber hinaus ergab eine Untersuchung zur Toxizität von Silber-Nanopartikeln durch Inhalation, dass die Distribution in der Lunge und in der Leber Entzündungen wie z.B. eine entzündliche Infiltration der Zellen und chronische alveoläre Entzündungen hervorruft. Nach dem Einatmen werden die Ag-NP in

der Riechschleimhaut angelagert und gelangen anschließend zu den Geruchsnerve, wo sie zur Beeinträchtigung und Störung der Gehirnzellen und Immuntoxizität führen können. Trotz ähnlicher Exposition in der Lunge, hat eine andere Studie gezeigt, dass Ag-NP eine vernachlässigbare Auswirkung auf die Nasenhöhle und die Lungen haben. Außerdem beeinträchtigen Ag-NP die Expression von biochemischen Markern, wie der Alkalischen Phosphatase und Cholesterin und führen somit zur Lebertoxizität, Apoptose und Entzündungen. Zusätzlich ist anzumerken, dass durch die orale Aufnahme, Ag-NP im sauren Milieu des Gastro-Intestinal Trakts zu Silber-Ionen oxidiert werden.<sup>16</sup>

Der genaue toxische Mechanismus von Ag-NP ist bisher noch weitgehend ungeklärt und es werden mehrere Wirkungsmechanismen diskutiert:

1. Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl.: *reactive oxygen species*) wie z.B.  $O^{\cdot 2}$ , die an der Oberfläche von Ag-NP gebildet werden, verursacht durch oxidativen Stress.
2. Anlagerung an die Zellmembran und deren Schädigung.
3. Veränderung der Membranpermeabilität.
4. Interaktion mit Proteinen und Störung ihrer normalen Funktion.
5. Beeinträchtigung der DNA-Replikation, welche zu DNA-Schäden führt.

Die letzten vier Mechanismen kommen durch die Wechselwirkung von Ag-Ionen mit Thiolgruppen von Enzymen und Proteinen zustande.<sup>18</sup> Die ROS-Bildung kann jedoch nicht alleine auf Ag-Ionen zurückgeführt werden. Vielmehr hat man festgestellt, dass Ag-NP zur einer höheren ROS-Produktion führen als Ag-Ionen. Dieser Zusammenhang wird detailliert in Abschnitt 2.4.2 behandelt.

Normalerweise sind ROS Nebenprodukte des Zellmetabolismus von Sauerstoff und können durch Radikalfänger in der Zelle beseitigt werden. Bei Überproduktion können diese jedoch nicht von der Zelle beseitigt werden, die überschüssigen ROS sammeln sich an und führen zum oxidativen Stress. Diese freien Radikale können Zellmembranen angreifen, mit Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren reagieren und somit das zelluläre Transportsystem beeinträchtigen.<sup>2</sup> Mittlerweile wurde die Toxizität von Ag-NP *in vivo* an einer Reihe von Tiermodellen, untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass Ag-NP die Genexpression im Gehirn von Mäusen verändern und durch die ROS-Bildung (oxidativer Stress) zur Neurotoxizität und Apoptose führen.<sup>2</sup>

Die Membranschädigung durch Ag-NP ist ebenfalls durch Studien belegt. *Kim et al.* konnten in der Zellmembran des Pilzes *C. albicans* die Bildung von Grübchen und Poren durch Ag-NP beobachten, somit stellten sie fest, dass Ag-NP die Lipiddoppelschicht der Zellmembran angreifen und die Membran-Permeabilitätsbarriere zerstören, was zur Ausströmung von Ionen, der Porenbildung und zum Zelltod führt.<sup>3</sup> In *E. coli* wurde die Membranschädigung durch Ag-NP ebenfalls nachgewiesen. Auch verdeutlichen TEM-, REM- und energiedispersive Röntgenspektroskopie- (EDX, engl.: *energy dispersive X-ray spectroscopy*) Ergebnisse, dass Ag-NP sich auf der Zellmembran ansammeln und nach Aufnahme in die Lipiddoppelschicht zu Poren in der Außenmembran führen.<sup>4</sup>

Weiterhin wurden viele Wasserorganismen hinsichtlich der Toxizität von Ag-NP untersucht. So zeigen in vivo Untersuchungen am Zebrafisch, dass monodisperse Ag-NP ( $11,6 \pm 3,5$  nm) durch den Chorion-Poren-Kanal gelangen und im Embryo in jeder Entwicklungsphase nachgewiesen werden können. Ab einer kritischen Konzentration von 0,19 nM konnten Abnormalitäten in der Entwicklung des Embryos festgestellt werden. Eine andere Studie ergab eine 100 % Mortalität nach 120 Stunden Exposition von 250  $\mu$ M Ag-NP verschiedener Größen.<sup>2</sup> Jüngste Studien haben gezeigt, dass größere Ag-NP ( $41,6 \pm 9,1$  nm) zu einer höheren Toxizität im Modell Zebrafisch führen, als kleinere ( $11,6 \pm 3,5$  nm).<sup>19</sup> Der negative Effekt von Ag-NP auf das embryonale Wachstum wurde am japanischen Reiskämpfling bestätigt, dort führen hohe Dosen an Ag-NP ( $\geq 400$   $\mu$ g/L) zu Entwicklungsstörungen und zu einer reduzierten Pigmentierung der Embryonen. Außerdem wurden nach Langzeiteinwirkung verschiedene Arten morphologischer Missbildungen wie Ödeme, Rückgratabnormalitäten, Flossensaumabnormalitäten, Herzmissbildungen und Augendefekte festgestellt, die die toxische Wirkung von Ag-NP aufzeigen.<sup>2</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Problem bereits vorhandener Toxizitätsstudien zu Ag-NP die häufig unrealistisch eingesetzten hohen Dosen sind, die weit oberhalb der real auftretenden Konzentrationen liegen. Außerdem wird aus neuen Untersuchungen deutlich, dass es für zukünftige Studien eine Materialcharakterisierung in den relevanten Expositionsmedien (Nährböden) und zeitabhängige Experimente geben muss. Der Toxizitätsmechanismus von Silber-Nanopartikeln ist noch weitgehend ungeklärt, denn obwohl immer mehr experimentelle Daten entstehen, ist es aufgrund der Vielzahl von Materialien, biologischen Modellen und experimentellen

Methoden die verwendet werden, schwer diese im Ganzen zu beurteilen und einen Überblick zu bewahren.<sup>12</sup>

#### **2.4.2 Was ist toxischer? Silber-Ionen vs. Silber-Nanopartikel**

Es existiert eine heiße Debatte über den Ursprung der Toxizität von Ag-NP. Trotz großem Durchbruch, stellt sich die Frage, ob die Toxizität durch Nanopartikel oder durch Ionen verursacht wird, denn NP können unkontrolliert Silber-Ionen freisetzen. Nach *Liu* kann man sich die Ag-NP als eine Art Arzneimittelabgabesystem vorstellen, die einen konzentrierten Vorrat an einer reaktiven Spezies besitzen, den Ag-Ionen. Diese werden transportiert und an oder in der Nähe der biologischen Zielstelle freigesetzt.<sup>5</sup> Damit ergibt sich eine Konkurrenz von Ag-Ionen mit Ag-NP. Die biologische Aktivität von Ag-NP lässt sich somit wahrscheinlich auf die Silber-Kationen zurückzuführen, mit der Ergänzung dass durch die Oberflächenreaktion der Partikel zusätzliche ROS gebildet werden und die Oxidation zellulärer Bestandteile durch die NP katalysiert wird.<sup>5</sup>

Es gibt nur wenige Studien, die versucht haben, zwischen diesen beiden Spezies zu differenzieren und die, welche es gibt sind zum Teil kontrovers. Eine Ursache dafür ist z.B. dass Nährböden mit hoher Salzkonzentration benutzt werden, die für die Aggregation von NP verantwortlich sind.<sup>20</sup> Eine andere Ursache hängt damit zusammen, dass die Zytotoxizität oft an verschiedenen Zellen untersucht wird, obwohl sie vom Zelltyp abhängig ist.<sup>21</sup> Manche Untersuchungen zeigen, dass nur das gelöste Silber für die Toxizität maßgeblich ist, viele andere Studien nehmen jedoch an, dass beide Spezies sowohl Ag-Ionen als auch Ag-NP für die Toxizität zuständig sind, wobei Ag-Ionen die Hauptverantwortlichen für die Toxizität sind.

*Kawata et al.* fanden heraus, dass sowohl Ag-NP als auch Ag-Ionen die Toxizität von Ag-NP bestimmen.<sup>22</sup> *Navarro* dagegen, stellte fest, dass die Toxizität nicht nur auf die vorhandenen Ag-Ionen in den Ag-NP-Lösungen zurück zu führen ist.<sup>23</sup> Genauso zeigte auch *Foldberg* an menschlichen alveolaren Zelllinien (A 549), dass Silber-NP doppelt so toxisch wie Ag-Ionen sind und viel mehr ROS produzieren.<sup>24</sup> Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die ROS-Bildung auf den spezifischen Charakter der NP zurückzuführen ist und nicht nur durch die Ag-Freisetzung verursacht wird.<sup>12</sup> Auch bei Untersuchungen an *Lolium multiflorum* stellte *Yin* fest, dass Ag-NP toxischer sind als Ag-Ionen.<sup>25</sup> In *Caenorhabditis elegans* wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Toxizität von Ag-Ionen und Ag-NP festgestellt, was auf die Theorie hindeutet, dass die

Toxizität von Ag-NP durch die vorhandenen Ag-Ionen verursacht wird.<sup>26</sup> Dieselbe Linearität stellten auch *Bouwmeester* et al. bei einer Co-Kultivierung von Caco 2 und M-Zellen fest. Dabei erforschten sie den Einfluss der Zellen auf die gesamte Genom-mRNA Expression.<sup>12,27</sup> *Xiu* wiederum fand heraus, dass Ag-Ionen für *E. coli* zwanzig Mal toxischer sind als Ag-NP.<sup>28</sup> *Suresh* et al. stellten fest, dass die physischen bzw. chemischen Eigenschaften der Ag-NP, wie Oberflächenladung und Bindungs- und Aggregationspotential, die durch das Coating der Partikel bestimmt werden maßgeblich für die Zytotoxizität verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang untersuchten sie die Toxizität von vier unterschiedlich stabilisierten Ag-NP-Suspensionen mit Partikeln gleicher Form und Größe an der Maus-Macrophage (RAW-264.7) und den epithelialen Lungenzelllinien (C-10). Sie konnten aufzeigen, dass die Toxizität Coating-abhängig ist und die Unterschiede in den verschiedenen Zytotoxizitätsstudien dadurch bedingt sind und nicht wie vermutet durch die Ag-Ionen Freisetzung aus den Ag-NP. Sie fanden ebenfalls heraus, dass nicht stabilisierte Ag-NP, die wahrscheinlich adsorbiertes Nitrat an ihrer Oberfläche enthalten und Silber-Ionen (aus AgNO<sub>3</sub>), am wenigsten toxisch für die untersuchten Zellen sind. Dabei sind epitheliale Lungenzellen resistenter gegenüber Ag, als die RAW-264.7.<sup>21</sup> Auch *El Badaway* et al. nehmen an, dass die Toxizität von Nanopartikeln maßgeblich von ihrer Oberflächenladung bestimmt wird. Dazu führten sie Toxizitätsuntersuchungen von 10-18 nm Ag-NP mit drei verschiedenen Coatings (Citrat, PVP und Polyetylenamin) an gram-positiven Bakterien durch. Sie schlussfolgerten, dass je positiver die Oberflächenladung der Partikel ist, desto toxischer wirken sie auf dieses Bakterium. Was aber nicht heißen sollte, dass Ag-Ionen keine Rolle in der Toxizität von Ag-NP spielen, denn trotz Widersprüchen sind sich alle Forscher einig, dass ein Teil der Toxizität von NP durch die Ag-Ionen-Freisetzung verursacht wird.<sup>29</sup>

Eine junge Studie von *Liu J.-F.* hat gezeigt, dass für *D. magna* nur freie Ag-Ionen toxisch sind. Für die weiteren untersuchten Formen von Silber wie Ag-NP, komplexierte Ag-Ionen und an der Ag-NP-Oberfläche absorbierte Ag-Ionen ließ sich keine Toxizität feststellen.<sup>30</sup>

Zusammenfassend kann man sagen, dass Ag-Ionen und Ag-NP toxisch auf Wasserorganismen wirken, außerdem wirken Ag-NP zytotoxisch und gentoxisch, sie führen zu Entwicklungsabnormitäten, DNA-Schäden, Veränderung der Genexpression und metabolischen Störungen. Ag-Ionen spielen eine wichtige Rolle in der Toxizität von

Ag-NP, während Ag-NP als Quelle für Ag-Ionen fungieren. Dennoch kann der toxische Effekt der Ag-NP nicht allein durch die Freisetzung der Silber-Ionen erklärt werden, sondern hängt von vielen Faktoren ab, wie z.B. von dem Aussetzungsweg, der Konzentration, der Größe, der Form und den Stabilisierungsreagenzien der Ag-NP.<sup>2</sup> Tatsächlich existieren Studien die Unterschiede zwischen der Wechselwirkung von Ag-Ionen und Ag-NP im Körper aufzeigen z.B. die mangelnde Selektivität der Citrat-stabilisierten Ag-NP zwischen DNA und Proteinsynthese in undifferenzierten Zellen, während Silber-Ionen eine starke Selektivität gegenüber DNA zeigen.<sup>12</sup>

## **2.5 Exposition-Auswirkung auf die Umwelt**

Durch den zunehmenden Einsatz von Nanomaterialien auf dem Markt und ihrer potentiellen Gefahren, kann die Exposition zu erheblichen Auswirkungen auf die Umwelt und den Menschen führen. Dabei finden von der Industrie hergestellte NP ihren Weg in Gewässer, Böden und Sedimente vor allem durch Abwasseraufbereitungsanlagen. Sobald NP in die Gewässer freigesetzt werden, ist ihr Abbauverhalten, Transport und ihre Bioverfügbarkeit von verschiedenen Eigenschaften wie Größe, Oberflächenladung bzw. der Art ihrer stabilisierenden Gruppen abhängig. Die Mobilität und Aggregation von NP wird durch den pH-Wert, die Ionenstärke und der einzelnen ionischen Komponenten natürlicher Gewässer beeinflusst.<sup>31</sup>

Das Verhalten der freigesetzten NP und ihr Transport in der Umwelt, im Boden und im Sediment ist bis heute weitgehend ungeklärt und bedarf der Notwendigkeit, um die Kurz- und Langzeitfolgen von NP im natürlichen Wassersystemen abzuschätzen.

Wegen dem besonders häufigen Einsatz von Ag-NP, werden diese folglich auch am stärksten abgesondert. Ag-NP können aus Ag-NP-enthaltenden Produkten durch die Produktion, den Transport, Erosion oder durch den Waschvorgang in die Umwelt freigesetzt werden. Am leichtesten können Ag-NP und Ag-Ionen durch den Waschvorgang von kommerziell erhältlicher Kleidung ins Abwasser gelangen. Manche Sockenmarken verlieren bereits nach vier Waschvorgängen 100 % ihres Silbergehalts. Es wurde gezeigt, dass bei niedrigem pH-Wert, mechanischer Belastung und der Anwesenheit von Bleichmitteln die Ag-Freisetzung stark zunimmt.<sup>2</sup> Jüngste Studien haben sogar gezeigt dass Produkte, die Silber-Ionen enthalten beim Waschvorgang mindestens genauso viele Ag-NP freisetzen als Ag-NP-enthaltende Produkte.<sup>32</sup>

*Cleveland* hat die Ag-Freisetzung von drei Ag-NP-enthaltenden Konsumprodukten in Ästuar-Gewässerproben untersucht. Er fand heraus, dass 82 bis 99 % der Ag-NP innerhalb von 60 Tagen aus den Konsumprodukten in die Ästuar-Wassersäule gelangen und von dort entweder in die Ästuar-Biota, oder sich in Venusmuscheln, Schwimmgarnelen, Deckenschnecken, Stängeln und Blättern vom Schlickgras, im Biofilm, im Gezeitenbereichsediment und im Sand ansammeln.<sup>33</sup>

Aber nicht alle Ag-NP die in der Umwelt gefunden werden, haben einen industriellen Ursprung. Über die Anwesenheit von kolloidalem Silber in Küstenregionen wurde Mitte der 1990er Jahre, noch vor der weit verbreiteten Verwendung von Ag-NP in Konsumgütern berichtet. So wurden Ag-NP auch in Flüssen und Ästuar-Gewässern von Texas gefunden.<sup>2</sup> In jüngerer Zeit wurden beträchtliche Silberkontaminationen in Bergbau Abwässern, der weniger entwickelten Regionen registriert, wo die Verwendung von Produkten, die Ag-NP enthalten eher unwahrscheinlich ist. Eine dieser Regionen ist ein altes Silberabbaugebiet in Mexiko. Solche Vorkommen von Ag-NP können nur durch Reduktion von Ag-Ionen zu Ag-NP erklärt werden.<sup>31</sup> Es gibt eine Reihe natürlicher Reduktionsmittel in der Umwelt, wie z.B. Huminsäuren (HS), die für die Ag-NP-Bildung verantwortlich sind.

HS kommen ubiquitär vor und enthalten viele funktionelle Gruppen, einschließlich Chinin, Ketone, Aldehyde, Phenol- und Hydroxylgruppen, die in der Lage sind, Metallionen zu Metall-NP zu reduzieren. NOM ist ein komplexes Gemisch organischer Stoffe und eine Hauptkomponente in der aquatischen Umwelt. Es besteht aus alkalilöslichen Huminsäuren, die den Hauptbestandteil von NOM ausmachen, aus wasserlöslichen Fulvinsäuren und dem sowohl wasser- als auch alkalilöslichen Humin.<sup>34</sup> NOM kommt ubiquitär im Wasser, Sediment und Boden vor und entsteht bei der Zersetzung von Pflanzenmaterial (Humifizierung), wobei sein Molekulargewicht 100 Da bis 300 kDa betragen kann.<sup>1</sup> Die Zusammensetzung, Konzentration und die chemischen Eigenschaften des NOM variieren je nach Herkunft des NOM, den Hauptkation-Komponenten des Wassers, dem Alter der vorhandenen Umgebung sowie der Umgebungs-Temperatur, -Ionenstärke, dem -pH-Wert und hängen von dem biologischen Zyklus seiner Umweltumgebung ab.<sup>35</sup> Zur Quantifizierung des NOM-Gehalts in aquatischen Systemen wird der gesamte organische Kohlenstoffgehalt (TOC, engl.: *Total organic carbon*) gemessen. Der TOC setzt sich aus dem gelösten, organisch gebundenen Kohlenstoff (DOC, engl.: *Dissolved organic carbon*) kleiner 0,45 µm und dem partikulären

organisch gebundenen Kohlenstoff (POC, engl.: *particulate organic carbon*) größer 0,45 µm zusammen, wobei der POC Gehalt nur maximal zehn Prozent des TOC-Gehalts ausmacht. Die DOC-Konzentration variiert zwischen 0,1 mg/L im Grundwasser und 50 mg/L in Sumpfgewässern.<sup>35</sup> Wegen der Allgegenwärtigkeit von NOM in natürlichen Gewässern kann es die Oberflächenladung von Nanopartikeln verändern, an der Mineraloberfläche adsorbieren und mit Mineral-Auflösungs- bzw. -Ausfällungs-Reaktionen interferieren. Außerdem spielt NOM eine entscheidende Rolle in der Kinetik von Umweltreaktionen und dem Vorhandensein von Metallen, denen Organismen ausgesetzt werden.<sup>36</sup> Deswegen ist es wichtig den Transport und die Deposition dieser Art von natürlich geformten Ag-NP im Wasser, Boden und Sediment zu untersuchen. Es gibt mittlerweile zahlreiche Arbeiten, die die Bildung von Ag-NP aus Silbernitrat durch Huminsäuren oder NOM untersucht haben, doch viele dieser Arbeiten, die sich mit der Aufklärung der NOM-Metall-Kolloid-Chemie beschäftigen, bewegen sich in einem unrealistischen Konzentrationsbereich, der weit über dem Konzentrationsbereich von Ag-NP in Umweltproben liegt.<sup>36</sup> Der Silbergehalt in Wasserumweltproben liegt zwischen 1-100 ng/L.<sup>18,37</sup>

Die wichtigsten bereits vorhandenen Arbeiten zu diesem Thema sollen an dieser Stelle aufgelistet werden. Dabei soll auch auf die benutzten Konzentrationen und Temperaturen bei den Untersuchungen eingegangen werden.

*Akaighe* hat die Bildung von Ag-NP durch Reduktion von Ag-Ionen (bis 0,47 mg/L) bei 22 °C und 90 °C mit Huminsäuren (30 mg/L) aus verschiedenen Quellen untersucht. Dabei stellte er fest, dass sich bei 90 °C schon nach 90 Minuten Ag-NP bilden, wobei die Ag-NP-Bildung bei 22 °C zwei bis vier Tage dauert. Er belegte die Bildung von Ag-NP aus Ag-Ionen mit dynamischer Lichtstreuung (DLS), TEM und Atomkraftspektroskopie (AFS, engl.: *atomic force spectroscopy*). Die Ag-NP, die sich dabei bilden sind sphärisch und haben eine breite Größenverteilung, mit einem Anteil an NP kleiner 5 nm und einem anderen größer 50 nm.<sup>37</sup> Des Weiteren untersuchte er die Ag-NP-Bildung durch Reduktion von Ag-Ionen mit NOM und den Einfluss mono- und divalenter Kationen, die im Wasser enthalten sind auf die Ag-NP-Stabilität. Dabei konnte er feststellen, dass NP ziemlich instabil in Lösungen mit hoher Ionenkonzentration sind und dass divalente Kationen wie  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  viel stärker die NP destabilisieren als monovalente Kationen wie  $Na^+$  und  $K^+$ . Da die Ionenkonzentration im Wasser vom Fluss- und Quellwasser über Ästuar Gewässer zum Meerwasser hin steigt, kann man



mit dieser Erkenntnis annehmen, dass im Meerwasser keine, oder deutlich weniger Ag-NP vorhanden sind. Vielmehr liegen sie dort wahrscheinlich transformiert vor. Zur weiteren Erklärung sei hier auf Abschnitt 2.6 verwiesen, in dem die Transformation von Nanopartikeln näher erläutert wird. Des Weiteren konnte *Akaighe* aufzeigen, dass Ag-NP, die durch Reduktion von Ag-Ionen (47 mg/L) durch NOM oder HS (30 mg/L) gebildet werden, wesentlich stabiler gegenüber Ionen sind, da sie vom adsorbierten NOM oder den HS an ihrer Oberfläche stabilisiert werden.<sup>38</sup> Ebenfalls untersuchte er den Transport und die Ablagerung von HS-Ag-NP und NOM-Ag-NP in Silicamatrices unter dem Einfluss verschiedener Ionenstärken und pH-Werten, in dem Bemühen potenzielle Auswirkungen auf den Boden und die Grundwasserverschmutzung zu erkennen. Dabei stellte er fest, dass bei einem basischen pH-Wert und niedriger Ionenstärke, welche relevant für die meisten Böden und Sedimente ist, beide Arten von Nanopartikeln sehr mobil sind und sich nur begrenzt an der Siliziumdioxid-Matrix abscheiden. Im sauren pH-Bereich und bei hoher Ionenstärke hingegen konnte er den gegenteiligen Effekt beobachten.<sup>39</sup>

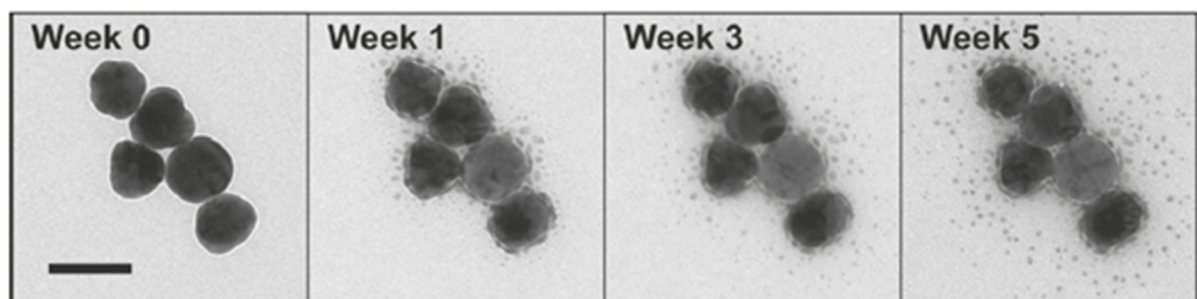
*Yin* konnte zeigen, dass ionisches Ag und Au in wenigen Stunden unter Sonnenlicht durch NOM photochemisch zu NP reduziert wird. Dazu hat er Ag- und Au-Ionen (200 mg/L) in DOC-reiche (9-34 mg/L) Wasserproben gegeben. Durch UV-VIS und TEM-Messungen stellte er fest, dass ein Teil der Ionen zu NP reagiert und der andere Teil zu Agglomeraten. Um die Ag-NP-Bildung zu veranschaulichen, wurde eine der DOC-reichen Wasserproben dialysiert, um Metallkationen zu entfernen und mit 1 g/L Ag-Ionen versetzt. Durch die Gelbfärbung der Wasserprobe konnte *Yin* folgern, dass sich Ag-NP gebildet haben. Weiterhin konnte er feststellen, dass die Ag-NP-Bildung durch HS vom pH-Wert, der Ag-Ionen- und der HS-Konzentration abhängig ist. Er nahm zum Mechanismus der Ag-NP-Bildung an, dass die Reduktion durch das aus der Phenolgruppe der HS bei Lichteinstrahlung gebildete Superoxid verursacht wird und gelöster Sauerstoff die Ag-NP-Bildung erhöht.<sup>40</sup> Des Weiteren untersuchte *Yin* das Wachstum der Au-NP, die durch Reduktion von Au-Ionen (40 mg/L) durch NOM entstehen. Dabei stellte er fest, dass zuerst kleine Partikel entstehen und mit der Zeit die NP größer werden, wobei es zu einer bimodalen Größenverteilung kommt, d.h. es entstehen kleinere 1,8 nm und größere 11,7 nm Au-NP. Bei der Au-NP-Bildung konnte er außerdem genauso wie beim Silber eine pH-Abhängigkeit feststellen, dabei findet die Reduktion mit HS bei hohen pH-Werten bevorzugt statt. Bei einer DOC-Konzentration von 50 und

100 mg/L NOM reagieren nach 36 Stunden unter Erhitzen fast alle Au-Ionen zu Au-NP, im Gegensatz dazu werden aber nur vier Prozent der Ag-Ionen zu Ag-NP reduziert. *Yin* geht damit von einer höheren Reduktionskapazität von NOM für Au(III) im Vergleich zu Ag(I) aus. Da für niedrigere NOM-Konzentrationen < 20 mg/L nur ein Teil der Au-Ionen zu Au-NP reduziert wird, deutet das auf eine HS-Konzentrationsabhängigkeit der Reduktion hin. Ergänzend stellte *Yin* fest, dass mit höherer HS-Konzentration, also bei 100 mg/L verglichen mit 10 mg/L DOC bei 65 °C, kleinere NP gebildet werden. Auch bei höherer Au-Ionen-Konzentration (200 mg/L) werden signifikant mehr Au-NP gebildet, wobei die Größe dieser mit der Au-Ionen-Konzentration zunimmt. Weiterhin zeigte *Yin*, dass die Temperatur und die Reaktionszeit, die Reduktion maßgeblich beeinflussen: Bei 4 °C war keine NP-Bildung zu beobachten (mit der UV-VIS-Spektroskopie), wobei mit Zunahme der Temperatur und Zeit die NP-Bildung zunahm.<sup>1</sup> In seiner jüngsten Studie konnte *Yin* eine Abhängigkeit vom pH-Wert, der NOM-Konzentration (1-20 mg/L DOC), der Ag-Ionen-Konzentration (2,35-23,5 mg/L), von der Lichtquelle und vom Molekulargewicht des NOMs für die Reduktion von Ag-Ionen zu Ag-NP durch NOM feststellen. Dabei stabilisieren höhere Molekulargewichtsfractionen des NOMs die NP besser gegen die Ca<sup>2+</sup>-induzierte Aggregation. Höherer pH-Wert führt zu einer verstärkten Bildung kleinerer Ag-NP. Diese pH-Abhängigkeit auf die Größe der gebildeten NP tritt dabei verstärkt bei NOM-Fractionen mit niedrigem Molekulargewicht auf. Für die Ag-Ionen-Konzentrationsabhängigkeit konnte *Yin* einen linearen Zusammenhang zur Ag-NP-Bildung feststellen, wobei für die NOM-Abhängigkeit kein linearer Zusammenhang gezeigt werden konnte. Dennoch wird deutlich, dass bei einer höheren NOM-Konzentration mehr Ag-NP aus Ag-Ionen gebildet werden.<sup>1</sup>

*Hou* untersuchte die Transformation von Ag-NP unter simuliertem Sonnenlicht ( $\lambda > 300$  nm) in Flusswasser- und synthetisch hergestellten Flusswasserproben, die NOM und Ag-Ionen enthalten. Dabei konzentrierte er sich auf die Dynamik und den Mechanismus der Photoreaktion. Er stellte fest, dass die Ag-NP, die durch die Photoreduktion von Ag-Ionen (100 mg/L) mit NOM (er wählte HS als NOM-Modell, 5 mg Kohlenstoff/L DOC) entstehen, während der Dauer der Lichteinstrahlung größer werden und ihre Farbe und Form verändern. Zuerst sind die Partikel sphärisch, nach 19 Stunden bilden sich plattenförmige hexagonale und dreieckförmige Partikel, nach 29 Stunden kommt es schließlich zur Bildung stäbchenförmiger Partikel. Seine Studien zum Mechanismus

zeigten, dass die Änderung der Konzentration an gelöstem Sauerstoff, die Ag-NP-Bildungsrate nicht signifikant ändert. Dadurch konnte er schlussfolgern, dass Superoxid-Ionen, hydratisierte Elektronen und Triplet-NOM-Spezies keine Rolle bei der Ag-Ionen-Photoreduktion spielen. Durch Änderung des pH-Werts, der NOM-Konzentration und durch Zugabe von Konkurrenz-kationen konnte *Hou* zeigen, dass die Bindung von Ag-Ionen an NOM zur Photoreduktion der Ag-Ionen zu Ag-NP führt.<sup>41</sup> *Adegboyega* untersuchte in seiner Studie den Effekt des pH-Wertes, der Temperatur, der Fulvinsäure (FS)-Konzentration und der Ag-Ionen-Konzentration auf die Ag-NP-Bildung in Ag-Ionen-FS-Lösungen, mit 47 mg/L Ag-Ionen und 100 mg/L FS. Er stellte nur eine sehr langsame Bildung von Ag-NP bei Raumtemperatur (RT) fest im Vergleich zu der NP-Bildung bei 90 °C. Nach 2 Stunden bei 90 °C bilden sich fast genauso viele NP wie nach 21 Tagen bei RT. Ebenso postulierte er, dass mit der Zunahme des pH-Werts, der Ag-Ionen- und der Fulvinsäurekonzentration die Ag-NP-Bildung sowie die Größe der Partikel bei 90 °C zunimmt. Des Weiteren konnte er beobachten, dass UV-Licht die Ag-NP-Bildung verstärkt. Er geht davon aus, dass die Wechselwirkungen zwischen Ag-Ionen, Ag-NP und den reaktiven Spezies, die sich bei der Photoreduktion bilden für die Bildung von Ag-NP verantwortlich sind.<sup>31</sup>

Silber-Nanopartikel können aber auch in der Natur spontan aus metallischem, nicht-partikulärem Ag und Ag-Ionen durch den Kontakt mit Wasser entstehen.<sup>42</sup> Sobald Silber in jeglicher Form in Kontakt mit Wasser oder Luftfeuchtigkeit kommt bilden sich Ag-NP. Wenn Silber ionisiert wird, lösen sich diese Ag-Ionen in der adsorbierten Wasserschicht, diffundieren vom Ursprungsmetall weg und werden zu kleinen NP reduziert, siehe Abbildung 2.<sup>42</sup>



**Abbildung 2:** TEM-Bilder der zeitabhängigen Bildung kleiner Ag-NP in der Nähe der 75 nm Ag-NP in wässriger Lösung.<sup>42</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erwähnten Studien gezeigt haben, dass die NP-Bildung aus Ionen mit NOM durch folgende Faktoren beeinflusst wird:

- NOM-Konzentration
- pH-Wert
- Temperatur
- Metall-Ionen-Konzentration
- Licht
- Salzkonzentration

Wobei sich für die NOM-Konzentration kein linearer Zusammenhang für die Ag-NP-Bildung feststellen lässt. Mit Zunahme des pH-Werts, der Temperatur, der Ag-Ionenkonzentration und bei stärkerer Lichteinstrahlung nimmt die Ag-NP-Bildung zu. Hohe Salzkonzentrationen führen zur Aggregation der NP, wobei NOM die NP stabilisiert und die Aggregation unterbindet. Die gebildeten NP unterliegen einer breiten und bimodalen Größenverteilung, die ebenfalls von den oben genannten Faktoren beeinflusst wird. Obwohl es inzwischen viele Studien zur NP-Bildung durch NOM gibt, wurden bis jetzt alle Untersuchungen mit Silber-Ionen-Konzentrationen zwischen 0,47-200 mg/L durchgeführt. Auch die NOM-Konzentrationen und die Temperaturen wurden teilweise viel zu hoch gewählt. Diese Konzentrationen und Reaktionsbedingungen entsprechen in keiner Weise den natürlichen Gegebenheiten und sind damit nur eingeschränkt als umweltrelevant zu betrachten. Außerdem können Metall-NP auch spontan in Anwesenheit von Wasser aus leicht oxidier- und reduzierbaren Metallen, wie Silber und Kupfer und ihren Metallionen unter Umweltbedingungen entstehen, d.h. die Gegenwart von NOM ist zu ihrer Bildung nicht zwingend erforderlich.<sup>42</sup>

## **2.6 Transformation in der Umwelt**

Sobald die Edelmetall-Nanopartikel aus den Konsumgütern in die Umwelt gelangen, werden sie transformiert. Durch diese Umwandlung ändern sich ihre Eigenschaften, ihr Transport, ihr Umweltverhalten und ihre Toxizität. Deswegen ist es wichtig, diese Transformation nicht aus den Augen zu lassen, wenn man die potentiellen Umweltauswirkungen von Edelmetallnanopartikeln betrachtet.<sup>18</sup> Wie bereits erwähnt, werden

vor allem Ag-NP verstärkt industriell eingesetzt, deswegen soll in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf Ag-NP liegen. Es sind viele verschiedene Umwandlungen denkbar, wobei hier auf die wichtigsten, wie Oxidation, Auflösung und Regenerierung, Sulfidierung, und Chlorierung eingegangen werden soll.

### **2.6.1 Oxidation, Auflösung und Regenerierung**

Metallisches Silber ist thermodynamisch nicht sehr stabil und kann leicht oxidiert werden, sodass sich bei RT rasch eine Ag<sub>2</sub>O-Schicht bildet.<sup>18</sup> Die große Oberfläche von Ag-NP erleichtert die Reaktion mit Sauerstoff, deswegen sind diese viel reaktiver als ihre metallische, nichtpartikuläre Form. Weiterhin begünstigt eine hohe Feuchtigkeit die Bildung der Ag<sub>2</sub>O-Schicht. Bei 80 % relativer Feuchtigkeit wird die Silberoxidschicht bereits nach 2 Stunden (h) gebildet.<sup>43</sup>

*Liu et al.* haben die Kinetik der Ionenfreisetzung aus Ag-NP untersucht und dabei festgestellt, dass die Ag-Ionen-Bildung durch Entfernen des gelösten Sauerstoffs in Ag-NP-Suspensionen durch das Einleiten eines Argonstroms verhindert werden kann. Außerdem wird die Ionenfreisetzung durch höhere Temperatur, längere Zeiteinwirkung und mit abnehmendem pH-Wert in luftgesättigtem Wasser verstärkt.<sup>2</sup> *Sotiriou et al.* fanden heraus, dass kleine Ag-NP ( $\leq 10$  nm) in stärkerem Ausmaß Ag-Ionen freisetzen als größere Partikel.<sup>29</sup> Diese Befunde zeigen, dass sowohl Größe, Temperatur, Zeit und Protonen, als auch gelöster Sauerstoff eine eminente Rolle bei der Ionenfreisetzung spielen. Somit enthält jede einfache Silber-Nanopartikel-Suspension drei verschiedene Formen von Silber: Ag-NP, Silber-Ionen und an der Ag-NP-Oberfläche adsorbierte Ag-Ionen.<sup>44</sup>

Genauso wie sich aus Ag-NP spontan Ionen bilden, können auch aus Ag-Ionen bei einer Feuchtigkeit von über 50 % spontan NP entstehen. Dabei kann es außerdem zu einer Regenerierung kommen, indem sich neue kleinere Partikel in der Nähe der Originalpartikel bilden.<sup>42</sup>

### **2.6.2 Sulfidierung**

Ähnlich wie bei der Oxidation in Abschnitt 2.6.1, erfolgt wahrscheinlich eine Oberflächensulfidierung der Ag-NP bei Reaktion mit H<sub>2</sub>S, COS, SO<sub>2</sub> oder anderen schwefelhaltigen Spezies. Studien zufolge korrodieren Polyvinylpropylen (PVP)-stabilisierte

Ag-NP und Ag-Nanodrähte bei Kontakt mit schwefelhaltigen Lösungen.<sup>45,46</sup> TEM Bilder bestätigen, dass sich eine Schicht aus Ag<sub>2</sub>S um den Nanokristall herum bildet und Ag-Ag<sub>2</sub>S-Kern-Schalen-Nanostrukturen entstehen. Silbersulfid-Nanopartikel (Ag<sub>2</sub>S-NP) konnten auch in der Endstufe des Klärschlammes in Kläranlagen nachgewiesen werden. Kläranlagen stellen die wichtigste Zwischenstation für anthropogene NP dar.<sup>47</sup> Die Ag<sub>2</sub>S-NP können sich ganz leicht bei der Abwasserreinigung durch Reaktion von Ag-NP oder Ag-Ionen mit schwefelreichen Substanzen bilden. Untersuchungen einer Pilot-Kläranlage bestätigen, dass der Hauptanteil von Silber im Schlamm und im Abwasser Ag<sub>2</sub>S ist.<sup>48</sup> *Levard et al.* stellten bei Untersuchungen der Reaktion von PVP-Ag-NP in Na<sub>2</sub>S-haltigen Lösungen fest, dass sich NP mit einer anderen Morphologie und anderen Oberflächeneigenschaften bilden. Die vorher feinverteilten NP bildeten kettenartige Strukturen, was darauf schließen lässt, dass die Ag-NP teilweise oxidiert werden, sich lösen und Ag<sub>2</sub>S-Nanobrücken zwischen den benachbarten Partikeln bilden.<sup>29</sup> Eine andere Studie hat sich ebenfalls mit dem Mechanismus der Oxisulfidierung befasst. Es resultierten zwei verschiedene Mechanismen, welcher davon auftritt ist von der Sulfid-Konzentration abhängig. Bei hohen Sulfid-Konzentrationen reagieren Ag-NP direkt zu Ag<sub>2</sub>S-NP in einer Partikel-Fließ-Reaktion, während bei niedrigen Sulfid-Konzentrationen die Ag-NP wahrscheinlich zuerst oxidiert werden, Ag-Ionen freisetzen und dann mit Sulfid zu Ag<sub>2</sub>S reagieren.<sup>49</sup>

Wegen dem hohen Vorkommen von Sulfid, der Thiophilie der Edelmetall-NP und der niedrigen Löslichkeit von Ag<sub>2</sub>S, bestimmt die Bildung von Ag<sub>2</sub>S-NP das Umweltverhalten der Ag-NP vor allem in Punkten der Bioverfügbarkeit und Toxizität.<sup>2</sup> Studien belegen, dass Sulfidierung von Ag-NP die Ag-Ionen Freisetzung minimiert und somit ihre Toxizität verringert.<sup>50</sup>

### 2.6.3 Chlorierung

Es wird angenommen, dass genauso wie bei der Sulfidierung Metall-Nanopartikel, wegen ihrer großen Oberfläche und ihrer hohen Oberflächenenergie auch reaktiver gegenüber chlorhaltigen Substanzen im Vergleich zu ihrer nichtpartikulären, metallischen Form sind. *Impellitteri et al.* untersuchten die chemische Umwandlung von Ag-NP indem sie eine Ag-NP-enthaltende Socke in eine Hypochlorid-Lösung tauchten. Es zeigte sich, dass mehr als 50 % der Ag-NP aus den Socken in der Hypochlorid-Lösung zu AgCl-NP umgewandelt werden.<sup>2</sup> Es sollte allerdings beachtet werden, dass eine

anfängliche Oxidation der Ag-Oberfläche Voraussetzung für eine Reaktion mit Chlorid ist.

Relativ kleine Konzentrationen von Chlorid können durch AgCl-Bildung die toxischen Ag-Ionen aus der Umwelt entfernen. Dabei führen hohe Chlorid-Konzentrationen zur Bildung von bioverfügbaren anionischen Silberkomplexen wie  $\text{AgCl}_2^-$ ,  $\text{AgCl}_3^{2-}$  und  $\text{AgCl}_4^{3-}$ , die wahrscheinlich die Toxizität erhöhen. In der Umwelt wird eine langsame Bildung von Ag-Ionen erwartet. In Meereswasser dagegen dominiert die Natriumchlorid Konzentration, deshalb würden dort die Ag-Ionen mit Chlorid zu  $\text{AgCl}_2^-$ ,  $\text{AgCl}_3^{2-}$  und  $\text{AgCl}_4^{3-}$  reagieren. Die Silberionenfreisetzungsrates aus Ag-NP in aeroben Systemen in Anwesenheit von Chlorid lässt sich schwer abschätzen. *Ho et al.* zeigten, dass bei Anwesenheit von Chlorid-Ionen in einer Lösung, die Kinetik der Ag-Ionen-Freisetzung aus Ag-NP komplett gehemmt oder stark minimiert ist. Sie postulieren, dass der relativ unlösliche AgCl-Niederschlag an der Ag-NP-Oberfläche die Ag-Ionen Freisetzung und damit wahrscheinlich die Reaktion mit Sauerstoff und die Oxidation von  $\text{Ag}^0$ -Substraten limitiert. Eine weitere Studie belegt die Präzipitation von AgCl sowohl als getrennte Phase, als auch mit der Ag-NP-Oberfläche assoziiert.<sup>18</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele Transformationen der Ag-NP in der Umwelt denkbar sind. Man geht zwar davon aus, dass sich im Meerwasser wegen der typisch hohen Cl-Konzentrationen hauptsächlich  $\text{AgCl}_{(\text{aq})}$  und  $\text{AgCl}_2^-$  aber auch Verbindungen wie  $\text{AgCl}_3^{2-}$  und  $\text{AgCl}_4^{3-}$  bilden. Bei kleineren Cl-Konzentrationen, d.h. im Grundwasser liegen diese jedoch höchstwahrscheinlich als  $\text{AgCl}_{(\text{s})}$  vor. In aerober, schwefelhaltiger Umgebung dagegen (z.B. beim Sedimentationsprozess in Kläranlagen) liegen diese wegen der Thiophilie von Edelmetallnanopartikeln, als  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP vor. Sobald sie sich gebildet haben ist eine Auflösung zu Ag-Ionen oder Freisetzung von Ag-Ionen wegen dem niedrigen Löslichkeitsprodukt von  $\text{Ag}_2\text{S}$  eher unwahrscheinlich.

### **3 Methoden zur Analyse von Nanopartikeln**

Analytische Verfahren zur physikalischen und chemischen Charakterisierung sowie zur quantitativen Bestimmung von Nanopartikeln in Umweltproben, sind für die Bewertung des Risikos für Umwelt und Gesundheit unabdingbar. Langfristig wird die erhöhte NP-Emission zu einem zunehmenden Eintrag in die Hydrosphäre und den Boden führen. Daher ist es wichtig, einen Überblick zu haben, in welcher Konzentration und in welcher Form die NP dorthin gelangen und dort existieren. Hierfür sind nachweisstarke Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse in niedrigen umweltrelevanten Konzentrationen notwendig, die kostengünstig und einfach in der Ausführung sind, zumindest dann, wenn eine flächenüberdeckende Überwachung gefordert wird. Es existieren eine Reihe analytischer Techniken zur Bestimmung der Eigenschaften und der Konzentration von NP die z.B. auf der Mikroskopie, Chromatographie, Zentrifugation, Filtration sowie Spektroskopie beruhen.<sup>51</sup> Die folgende Aufstellung soll einen Überblick über die wichtigsten bekannten Analysetechniken für NP geben und ihre Vor- und Nachteilen aufzeigen.

#### **3.1 Mikroskopische Verfahren**

Mikroskopische Verfahren werden am häufigsten als Charakterisierungsmethoden zur Abbildung von Partikeln bzw. Partikeloberflächen eingesetzt. Vertreter mikroskopischer Verfahren, wie z.B. die Atomkraftmikroskopie geben Aufschluss über die Topographie von Partikeloberflächen und gestatten eine Bestimmung der Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit von NP. Zur chemischen Identifizierung von NP eignet sich unter anderem die Rastertunnelmikroskopie (RTM). Weiterhin liefern die Raster- (REM) und die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) mit ihrer hohen Auflösung einen beeindruckenden Einblick in die Morphologie von Nanopartikeln. Durch Kombination der TEM mit EDX, kann man neben der Größe und der elementaren Oberflächenzusammensetzung von NP auch die Verteilung einzelner Elemente in den Partikeln identifizieren.

Allerdings sind mikroskopische Methoden sehr zeit- und arbeitsintensiv, da die Probenzufuhr manuell erfolgt und die Messung meist ein Hochvakuum erfordert. Ebenso benötigt man für die statistische Auswertung eine hohe Anzahl an Partikeln (mindestens  $10^9$  Partikel/mL) und somit eine hohe Partikelkonzentration. Dadurch entsteht



eine Menge Bildmaterial, dessen Auswertung sich nicht automatisieren lässt. Dies erschwert die Analyse einer hohen Anzahl von Proben und macht die Methode für die quantitative Routineanalytik ungeeignet.<sup>52</sup>

### **3.2 Optische und Spektrophotometrische Verfahren**

Die Standardtechniken zur Charakterisierung von Nanopartikeln sind die Dynamische Lichtstreuung (DLS), die Nanopartikel Tracking Analyse (NTA), sowie die UV-VIS Spektrometrie.

Die DLS ist eine sensitive, einfache und leistungsfähige Analysetechnik zur Charakterisierung von Makromolekülen und Kolloiden in Lösung. Sie und die NTA bieten eine schnelle Methode zur Ermittlung der Partikelgrößenverteilung.

Das Lambert-Beer'sche-Gesetz erlaubt bei der Photometrie die Konzentrationsbestimmung von Partikeln, die im UV-VIS-Bereich photoaktiv sind. Aufgrund der SPR von NP gibt die Photometrie außerdem Informationen zur Größe, Aggregation, Struktur, Stabilisierung und Oberflächenchemie. Durch das einfallende Licht, welches in Resonanz mit den Leitungsbandelektronen auf der NP-Oberfläche tritt, zeigen die Metall-Nanopartikel eine spezifische Absorptionsbande im Spektrum, die von der Art der NP, ihrer Größe und den oben genannten Faktoren abhängig ist.

Der Nachteil aller drei Methoden sind allerdings mangelnde Nachweisempfindlichkeit und die geringe Selektivität. Die DLS, sowie die NTA-Methode sind für kleine Partikel nicht effektiv und nur für homogenen Proben geeignet, da hier eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Partikelarten nicht möglich ist. Auch die Photometrie wird durch andere photoaktive Substanzen in der Probe gestört und ist deswegen für Proben mit einer komplexen Matrix, wie z.B. Umweltproben, nicht geeignet.<sup>52</sup>

### **3.3 Methoden zur Extraktion, Trennung und Größenfraktionierung**

Die Größencharakterisierung von NP ist enorm wichtig, da ihre Eigenschaften, wie z.B. ihre Toxizität maßgeblich durch ihre Größe bestimmt werden. Zur vollständigen Charakterisierung der NP werden die Techniken zur Trennung und Größenbestimmung mit elementspezifischen Detektionsmethoden, siehe Kapitel 3.4 gekoppelt. Diese Kopplungstechniken können dann sowohl Informationen zur Größe, als auch zur chemischen Natur der NP in einer Probe liefern.

### 3.3.1 Cloud Point Extraktion (CPE)

Neben den Matrixeffekten in Umweltproben, erfordert die niedrige Konzentration an NP in diesen einen Anreicherungsschritt vor der Quantifizierung.

Die Cloud Point Extraktion ist eine Methode zur Extraktion und Anreicherung von NP. Bei der CPE wird ein Tensid in einer Konzentration, die die kritische Mizellenkonzentration übersteigt, zugegeben. Wird die Temperatur nun über den Trübungspunkt hinaus erhöht, bilden sich Mizellen aus, in denen unpolare Substanzen, wie z.B. NP eingeschlossen werden. Da die Dichte der Mizellen höher ist, als die von Wasser, sinken die Mizellen nach einiger Zeit ab und die wässrige Phase kann abdekantiert werden. Da das Volumen der unpolaren Phase deutlich geringer ist als das Probenvolumen, gelingt mit der CPE nicht nur eine Trennung von NP, sondern auch deren Anreicherung.<sup>52</sup>

Für eine detaillierte Beschreibung der Methode sei an dieser Stelle auf Kapitel 4.1 verwiesen.

### 3.3.2 Feldfluss-Fraktionierung (FFF)

Eine vielversprechende Technik zur Größenfraktionierung von Nanopartikeln ist z.B. die FFF. Sie wurde 1966 von Prof. C. Giddings in den USA erfunden und ist eine Chromatographie-ähnliche Trenntechnik, jedoch unter Verwendung eines sehr flachen Kanals zur Trennung. Durch eine Flussrate von 1 mL/min und eine geringe Kanalhöhe bildet sich ein laminarer Fluss mit einem parabolischen Strömungsprofil aus. Die NP werden durch Wechselwirkung mit einem extern generierten Kraftfeld getrennt, welches senkrecht zu diesem parabolischen Fluss verläuft. (Siehe Abbildung 3).

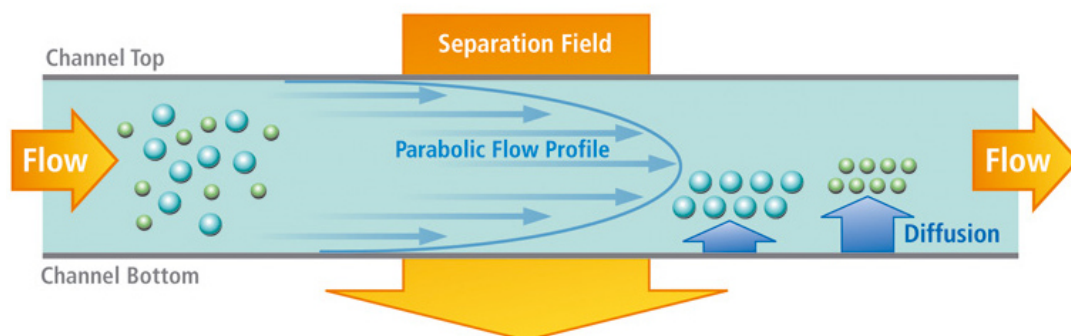


Abbildung 3: Trennprinzip der FFF<sup>53</sup>

Das Kraftfeld kann eine weitere Flüssigkeitsströmung, ein Temperaturgradient, ein Zentrifugalfeld oder eine andere physikalische Kraft sein. Die unterschiedlichen FFF-Variationen werden nach den verwendeten Kraftfeldern unterschieden. Die zwei wichtigsten Varianten dieser Trennmethode sind die Sedimentations-FFF (SedFFF) und die asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4). Wobei letztere insbesondere für die Analyse von NP geeignet ist. Mit der AF4 können Partikelgrößen von 1 bis 1000 nm getrennt werden können.

Bei der AF4 wird die Trennkraft durch einen Querfluss erzeugt. Der Kanal setzt sich aus einer oberen, undurchlässigen Wand und einer unteren, durchlässigen Fritte zusammen, durch welche der Querfluss geleitet wird. Auf der unteren porösen Fritte ist eine Membran aufgebracht, welche das Lösemittel, nicht aber die Partikel durchlässt. Längsseits wird durch den Trennkanal ein Trägerstrom geleitet, der ein laminares Strömungsprofil ausbildet. Der Querfluss wird als Teilströmung vom Hauptstrom der Trägerflüssigkeit im Kanal abgezweigt und durch die untere Membran hindurch abgeleitet.

<sup>53</sup> Kleine Partikel mit hohen Diffusionskoeffizienten können besser entgegen der Trennkraft diffundieren als große Partikel, infolgedessen werden durch den senkrecht zur Trennkraft wirkenden Volumenstrom, die kleinen Partikel als erstes aus dem Trennkanal befördert, gefolgt von den größeren, siehe Abbildung 3. FFF-Systeme lassen sich mit UV/VIS-Detektoren, Lichtstreuendetektoren und mit induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie-Geräten (ICP-MS, engl.: *inductively coupled plasma mass spectrometry*) koppeln. Ein erheblicher Vorteil der AF4 ist neben dem großen dynamischen Trennbereich die Aufkonzentrierung der Probe in der Flusszelle. Dennoch hat diese Technik einige Nachteile, wie z.B. die sehr hohen Anschaffungskosten und die langen Analysen- und Methodenentwicklungszeiten. Außerdem werden durch die Adsorption der Partikel an die Membran und die dadurch entstehende Verstopfung der Membranporen durch den Analyten, die Betriebskosten durch den häufigen Austausch der teuren Membran erhöht und die Analyt-Wiederfindung erschwert.<sup>52</sup>

### 3.3.3 Chromatographische Techniken

Die Chromatographie ist ein schnelles Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen durch unterschiedliches Verhalten der Einzelkomponenten zwischen der stationären und mobilen Phase und kann auch zur Nanopartikelfraktionierung verwendet werden. Ein Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass die Probe nicht in ihrem ursprünglichen

Medium analysiert und durch die verwendeten Lösemittel und die Wechselwirkung mit diesen, verändert oder zerstört werden kann.<sup>51</sup>

Die Größenausschlusschromatographie (SEC, engl.: *size-exclusion chromatography*) ist eine gängige Methode zur Bestimmung der Molaren Masse von organischen Makromolekülen, wie synthetischen Polymeren oder natürlichen Proteinen, allerdings kann sie auch für die Größentrennung von anorganischen Nanopartikeln verwendet werden. Die Trennung erfolgt dabei in einer mit porösem Gel gefüllten chromatographischen Säule bei laminarer Strömung der mobilen Phase. Kleinere Partikel diffundieren schneller in die Poren des Gels als größere und passieren somit das Gel langsamer, somit werden die großen Partikel, die nicht in die Poren passen, zuerst eluiert.<sup>54</sup> Durch die Kopplung mit einem Diodenarray Detektor (DAD)<sup>55</sup> oder einem Mehrwinkel-Laser-Lichtstredetektor (MALLS, engl.: *multiangle laser light scattering*) kann auf die Größenzusammensetzung der NP-Suspension geschlossen werden. Weiterhin kann zur Quantifizierung die SEC mit der ICP-MS gekoppelt werden.<sup>51</sup>

Ein Nachteil dieser Trennmethode ist die hohe Nachweisgrenze sowie die Zersetzung oder der Verlust des Analyten durch irreversible Adsorption der Partikel im Säulenmaterial.<sup>52</sup>

Die Hydrodynamische Chromatographie (HDC) ist eine Größentrennmethode für Polymerlösungen oder Partikelsuspensionen. Wie auch die AF4 trennt die HDC die Partikel nach ihren Diffusionskoeffizienten, die mit den hydrodynamischen Radien dieser in Beziehung stehen. Die stationäre Phase in der Säule besteht aus einem nicht porösen Material, in dem der Porenraum aus Fließkanälen oder Kapillaren mit einem parabelförmigen Fluss aufgebaut ist.<sup>56</sup> Die NP können somit durch unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten und den Flussgradienten um die Partikel herum getrennt werden. Die Elutionsreihenfolge ist analog der SEC, wobei zuerst die großen Partikel eluiert werden, die nicht in den Porenraum gelangen können.

Im Vergleich zu der SEC wird durch das nicht poröse Säulenmaterial das Risiko der Wechselwirkung der Partikel mit der stationären Phase wesentlich reduziert. Auch die Größentrennungsrates der HDC ist bedeutend größer, als die der SEC. Abhängig von der Säulenlänge kann sie Partikel zwischen fünf und 1200 nm trennen.<sup>51</sup> Die HDC kann mit UV-VIS-, DLS- aber auch mit ICP-MS- und SP-ICP-MS Detektoren gekoppelt werden.

Die großen Vorteile der Methode sind die im Vergleich zur AF4 deutlich kürzeren Analysenzeiten, eine hohe Wiederfindung von NP 98 %<sup>57</sup> und die Möglichkeit der Beseitigung von Matrixbestandteilen, wie organischen Kolloiden, NOM und des ionischen Hintergrunds. Ein Nachteil ist die schlechtere Größenauflösung im Vergleich zur AF4. Vor allem mit SP-ICP-MS gekoppelt scheint die HDC eine viel versprechende Trennmethode zu sein, wobei jedoch die Nachweisgrenzen für Silber momentan mit 4 bis 10 µg/L noch weit jenseits der Konzentrationen in Umweltgewässern liegen.<sup>56</sup>

### 3.3.4 Elektrophorese

Elektrophoretische Techniken werden schon seit langem für die Auftrennung von Biomolekülen verwendet. Die Trennung basiert auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen im elektrischen Feld, die von der Größe und Ladung dieser abhängig ist. Auch NP können sowohl mit der Gelelektrophorese, als auch mit der Kapillarelektrophorese (CE, engl.: *capillary electrophoresis*) getrennt werden. *Hanauer et al.* zeigten, dass man Gold- und Silber-NP nach ihrer Größe und Form, mittels Agarose-Gelelektrophorese trennen kann. Die Trennung wurde optisch durch die Plasmonenresonanz überwacht und durch TEM-Bilder bestätigt. Die stäbchenförmigen Nanopartikel wandern dabei aufgrund ihres Längenverhältnisses am langsamsten. Für die sphärischen Nanopartikel konnte ein klarer Trend zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Größe beobachtet werden, dabei wandern die größeren Partikel schneller als die kleineren, wohingegen die dreieckförmigen Nanopartikel keinen klaren Trend zeigen.<sup>58</sup> *Xu et al.* nutzten ebenfalls die Agarose-Gelelektrophorese für die präoperative Trennung von fünf, 15 und 20 nm großen Gold-Nanoclustern. Gold-Bälle, -Plättchen und lange -Stäbchen konnten nach ihrer Form getrennt werden. Das Ergebnis der Trennung wurde ebenfalls durch TEM bestätigt.<sup>59</sup> *Helfrich et al.* demonstrierten eine on-line Kopplung von Flüssigchromatographie und Gelelektrophorese mit ICP-MS zur Größentrennung von Au-NP-Standardlösungen. Ihre Ergebnisse konnten sie durch TEM und DLS als Referenzmethoden bestätigen.<sup>60</sup>

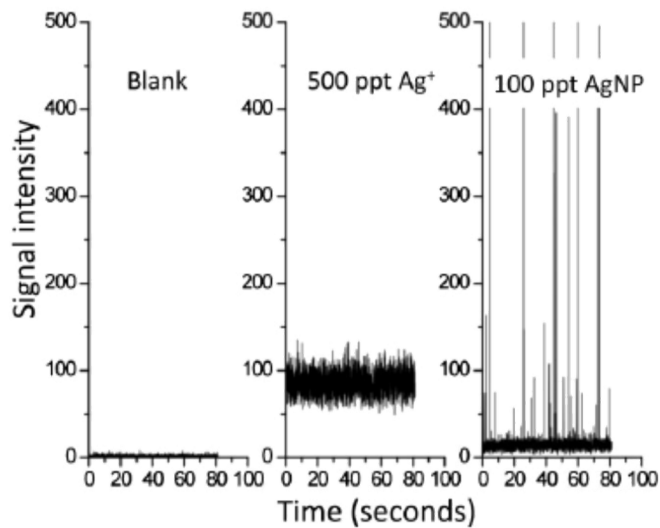
Im Falle der CE erfolgt die Trennung durch die unterschiedliche Mobilität der Spezies, die in haardünne Kapillaren, gefüllt mit einem Elektrolyten, injiziert werden. Die Kapillarenden tauchen dabei in ein Elektrolyt Reservoir in dem eine Hochspannung anliegt.<sup>61</sup> Weiterhin entwickelten *Lin et al.* eine Methode zur Größentrennung von Au und Ag-Au-NP-Gemischen.<sup>62</sup>

Die großen Vorteile der CE gegenüber der GE sind die Automatisierung, eine bessere Auflösung, ein kleinerer Probenverbrauch und eine wesentlich höhere Durchlaufleistung, wobei in einigen Stunden einige hundert Proben analysiert werden können.<sup>61</sup> Der Nachteil der CE liegt in der geringen Sensitivität von UV-Detektoren. Außerdem können wegen der geringen Länge der CE Kapillaren, diese nur mit einem kleinen Volumen beladen werden und haben deswegen auch einen deutlich kleineren Trennweg. Zur Aufkonzentrierung und Erhöhung des Probenvolumens wurden deswegen viele *on-line*-Signalverstärkungstechniken für verschiedene elektrophoretische Verfahren entwickelt.<sup>62</sup> Da es jedoch bislang keine kommerziell erhältliche Standard-Instrumentierung der CE gibt, ist diese Methode mit großem Aufwand und hohen Kosten verbunden. Elektrophoretische Methoden können wegen ihrer geringen Sensitivität nicht zur Trennung von Umweltproben verwendet werden, können jedoch als effiziente und kostengünstige Methoden bei der Qualitätskontrolle und Sicherheitssteuerung genutzt werden.<sup>61</sup>

### 3.3.5 Einzelpartikel-Massenspektrometrie

Die SP-ICP-MS ist eine innovative, aufstrebende Methode zur Detektion, Charakterisierung und Quantifizierung von Nanopartikeln. Das Prinzip der SP-ICP-MS wurde 2003 von *Degveldre et al.* vorgestellt. In der Einzelpartikelanalyse wird durch die Partikel ein diskontinuierliches, gepulstes Signal erzeugt, während die gelösten Metallsalze ein kontinuierliches Signal bilden. Die Signalintensität eines bestimmten Isotops (z.B. <sup>107</sup>Ag für die Bestimmung von Silber-NP) in der Probe wird dabei zeitaufgelöst betrachtet.<sup>63</sup> Tritt ein Partikel in das Plasma ein, bilden die Atome des Analyten eine Gaswolke aus Ionen im Plasma, welche als einzelner Puls vom Detektor detektiert wird und ein Signal mit hoher Intensität erzeugt. Im Falle von Silber wird jeder Ag-NP als ein einzelner Puls detektiert, während die gelösten Silber-Ionen (von statistischen Schwankungen abgesehen) einen kontinuierlichen Hintergrund erzeugen, siehe Abbildung 3. Somit können die einzelnen Silberspezies in Abhängigkeit des Puls-Typs und der Signalintensität detektiert werden. Die Partikelanzahl in der Probe entspricht dabei der Anzahl der gemessenen Ionenwolken, während die Metallmasse des NP durch die Größe des Signals ermittelt werden kann. Die Größe der Ag-NP wird durch die Anzahl der Ionen relativ zur Masse der Ag-Ionen, die in das Plasma eintreten, ermittelt.<sup>2</sup> Durch kurze Messzeiten (3-10 ms) wird sichergestellt, dass in jedem Messintervall maximal

eine Ionenwolke detektiert wird. Jedes Signal größer als das Hintergrundrauschen repräsentiert einen detektierten NP.



**Abbildung 4:** Ausgangssignal verschiedener Silberlösungen bei der SP-ICP-MS Messung<sup>64</sup>

Dies ist jedoch nur möglich, wenn der Partikel groß genug ist, um ein Signal zu erzeugen, welches sich deutlich vom Hintergrundsignal der Ionen abhebt. Dies ist bei Partikeln kleiner 20 nm nicht der Fall, weswegen diese nicht detektiert werden können. Ein weiterer Nachteil sind die Messartefakte, die sich bei der Messung ergeben können. Wählt man die Messzeit zu kurz, so wird eine Ionenwolke gar nicht oder nur teilweise erfasst, wählt man diese zu lang, so kommt es zu Doppelbestimmungen der Partikel. Probleme bei der Bestimmung können auch durch Matrixeffekte, vor allem bei komplexen Proben verursacht werden, da die Matrixtoleranz wie bei allen ICP-Methoden ein limitierender Faktor ist.

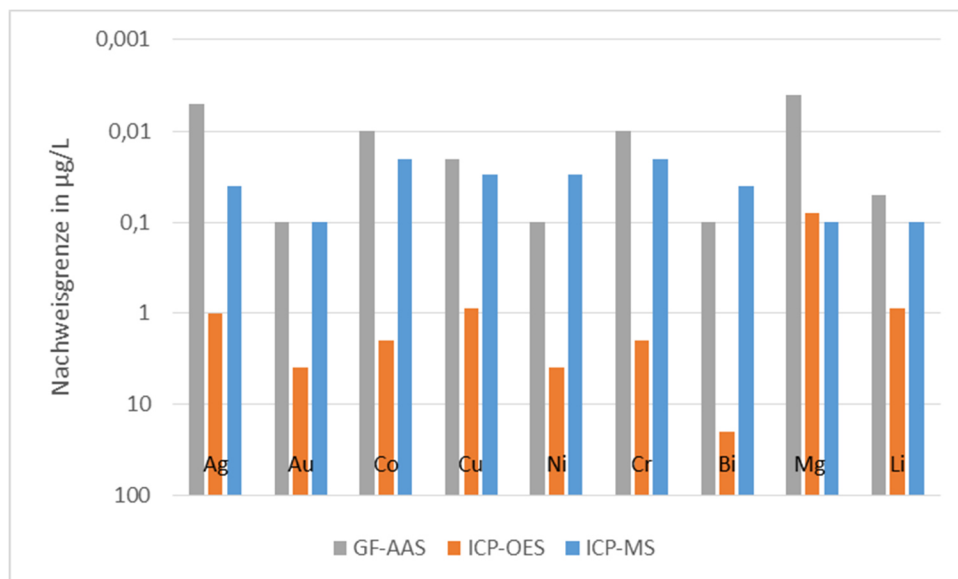
Nichtsdestotrotz ist die SP-ICP-MS ein sehr nachweisstarkes und schnelles Verfahren, welches zur Bestimmung von Umweltproben geeignet ist.<sup>65</sup>

### 3.4 Quantifizierung

Prinzipiell können zur Quantifizierung von Nanopartikeln in Umweltproben alle elementspezifischen Detektionsmethoden verwendet werden, die niedrige Nachweisgrenzen (im ng/L und pg/L-Bereich) für das zu bestimmende Element besitzen. Durch einen Voranreicherungsschritt vor der Quantifizierung kommen auch Detektionsme-

thoden mit Nachweisgrenzen im unteren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich für das zu untersuchende Element in Frage. Diese Quantifizierungstechniken können in der Regel jedoch nicht zwischen NP und der gelösten ionischen Form des Metalls differenzieren, weswegen vor der Analyse eine Trennung der beiden Spezies erfolgen muss.

Die am häufigsten verwendeten Quantifizierungstechniken sollen an diesem Kapitel kurz erläutert werden. Es ist zu beachten, dass die Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) eine im Vergleich zur ICP-MS und elektrothermaler Atomabsorptionsspektroskopie (ET-AAS) mäßige Nachweisgrenze hat. In Abbildung 5 sind die Nachweisgrenzen ausgewählter Elemente für die ICP-MS, verglichen mit denen für die ICP-OES und ET-AAS, auf einer logarithmischen Skala für die Konzentration in  $\mu\text{g/L}$  dargestellt.<sup>66</sup>



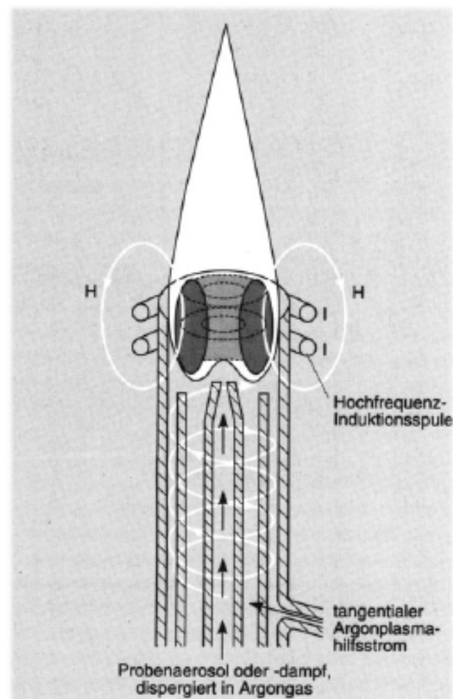
**Abbildung 5:** Nachweisgrenzen ausgewählter Elemente für die ICP-MS (blau), verglichen mit denen für die ICP-OES (orange) und die ET-AAS (grau). In Anlehnung an D. A. Skoog.<sup>66</sup>

### 3.4.1 Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES)

Die ICP-OES ist eine klassische Technik für Multielementanalysen und beruht auf der Tatsache, dass Ionen oder Atome im angeregten Zustand, durch thermische Anregung von Atomen gebildet werden, die charakteristische, elementspezifische Strahlungsenergien emittieren. Die Analyse erfolgt qualitativ durch Messung der Wellenlänge der emittierten Strahlung und quantitativ über die Messung der Strahlungsintensität.<sup>67</sup>



Zur thermischen Anregung von Atomen werden in den meisten Fällen Edelgase durch intensive Zufuhr von elektromagnetischer Energie (z.B. durch Hochfrequenzspulen) in ein Plasma umgewandelt. Unter einem Plasma versteht man ein elektrisch leitendes, gasförmiges Gemisch aus Kationen und Elektronen, deren Gesamtladung nahezu null ist. Meist wird bei den Emissionsanalysen ein Argonplasma, aus Ar-Ionen und Elektronen verwendet. Die ICP-Quelle wird oft auch als Plasmafackel bezeichnet und besteht aus drei konzentrischen Quarzröhren durch die Argongas strömt, siehe Abbildung 6.



**Abbildung 6:** Typisches induktiv gekoppeltes Plasma<sup>68</sup>

Der obere Teil der größten Röhre ist von einer wassergekühlten Induktionsspule umgeben, die von einem Hochfrequenzgenerator versorgt wird. Dieser Generator gibt typischerweise eine Leistung von 0,5 bis 2 kW bei Frequenzen von 27,12 oder 40,68 MHz ab. Der Argonstrom wird durch einen Zündfunken der Tesla-Spule ionisiert. Die dadurch erzeugten Ionen und Elektronen treten mit dem fluktuierenden Magnetfeld in Korrelation, welches durch die Induktionsspule gebildet wird. Durch diese Wechselwirkung werden die Ladungsträger im magnetischen Wechselfeld beschleunigt, wodurch das Plasma entsteht, in das schließlich das Proben-aerosol eingetragen wird. Der Pro-

beneintrag in das ICP erfolgt mithilfe eines Argonstroms durch die zentrale Quarzröhre. Durch den Gasstrom wird die Probenlösung in feine Tröpfchen unterschiedlicher Größe zerstäubt und in das Plasma getragen. Dort wird das Aerosol auf ca. 6000-10000 °C erhitzt, wobei das Lösemittel und der verbleibende Feststoff verdampfen. Die Moleküle des entstandenen Gases dissoziieren zu Atomen. Durch Stöße mit den freien Elektronen im Plasma werden die Elektronen aus den Atomhüllen herausgeschlagen und die äußeren Elektronen in ein höheres Orbital und somit in einen angeregten Zustand angehoben. Nach kurzer Zeit (ca.  $10^{-8}$  s) fallen die Elektronen auf energetisch niedriger liegende Orbitale zurück, wobei die freiwerdende Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung abgegeben wird und die angeregten Ionen bei der Relaxation ihr charakteristisches Spektrum ausstrahlen. Die emittierte Strahlung wird spektral zerlegt und in elektrische Signale umgewandelt. Aus den Intensitäten der Spektrallinien können über Kalibrierungen die Konzentrationen der Analyten bestimmt werden. Nachteile dieser Methode sind die hohen Betriebskosten, die durch den hohen Argonverbrauch von 5-20 L/min einer typischen Plasmafackel entstehen und die im Vergleich zu ICP-MS und ET-AAS höheren Nachweisgrenzen. Weiterhin stellt die Matrixtoleranz wie bei allen ICP-Methoden einen limitierenden Faktor da.<sup>66</sup>

### **3.4.2 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)**

Die ICP-MS ist eine sehr sensitive und leistungsfähige analytische Technik für die Elementanalyse eines oder mehrerer Elemente. Die Massenspektrometrie ist ein physikalisches Verfahren, welches im Vakuum stabile Ionen, nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) trennt. Die Aufteilung der Analyten gemäß ihrem  $m/z$ -Verhältnis findet dabei in einem Hochvakuum statt<sup>67</sup>, wobei das ICP als Atomisator und Ionenquelle dient. Genauso wie bei der ICP-OES erfolgt hier der Probeneintrag über einen Zerstäuber, dabei werden die positiven Metallionen aus einer konventionellen ICP-Flamme über ein Transportsystem mit schrittweise reduzierendem Druck einem Massenanalysator, gewöhnlich einem Quadrupol zugeführt. Das Transportsystem besteht aus einem Sampler, einem Expansionsraum und einem Skimmer. Durch eine kleine Düse in der Spitze eines wassergekühlten Nickelkegels, den Sampler gelangt das heiße Plasmagas in den Expansionsraum, in dem ein Druck von einem Torr herrscht. Dort dehnt sich das Gas aus und kühlt dadurch ab. Ein Teil des Gases tritt durch eine kleine Öffnung des zweiten Kegels, dem Skimmer in die nächste Kammer

in der ein Druck von  $10^{-4}$  Torr herrscht, bei dem auch das Massenspektrometer betrieben wird. Hier werden die positiven Ionen durch ein negatives Potenzial von Elektronen und anderen negativen Ionen separiert, beschleunigt und durch eine magnetische Ionenlinse auf die Eintrittsblende eines Quadrupolmassenanalysators fokussiert. Die Ionen werden im Massenspektrometer entsprechend ihrer Masse pro Ladung getrennt, registriert und die entstehenden Massenspektren quantitativ ausgewertet (Kalibrierung).

Nachteile der ICP-MS sind die spektroskopischen Störungen, die entstehen können wenn das Analyt-Ion und eine im Plasma erzeugte Ionenart dasselbe Masse- zu Ladungsverhältnis aufweisen, die Matrixeffekte, die eine Reduzierung oder manchmal auch eine Verstärkung des Analytsignals hervorrufen und die hohen Betriebskosten.

Vorteile der ICP-MS sind die erzielbaren niedrigen Nachweisgrenzen von 0,02 bis 0,7  $\mu\text{g/L}$ , wobei für den Großteil der Elemente Werte von 0,02 bis 0,1  $\mu\text{g/L}$  erreicht werden. Zusätzlich bietet die ICP-MS den großen Vorteil von Schnelligkeit und der Einsetzbarkeit für Multielementanalysen und Isotopenbestimmungen.<sup>66</sup>

### **3.4.3 Elektrothermale-Atomabsorptionsspektrometrie (ET-AAS)**

Das Prinzip der AAS beruht auf der elementspezifischen Absorption elektromagnetischer Strahlung einer atomisierten Probe. Durch die Atomisierung der Probe wird eine Atomwolke erzeugt, die mit charakteristischem Licht des zu analysierenden Elements durchstrahlt wird. Die Energie der absorbierten Photonen entspricht dabei der Energiedifferenz zwischen Grundzustand und dem elektronisch angeregten Zustand des Elektrons. In Folge der Absorption kommt es zur Schwächung der Strahlungsintensität, welche gemessen und zur Quantifizierung des Elements in der Probe herangezogen werden kann. Bei elektrothermischen Atomisatoren werden zunächst einige wenige Mikroliter der Probe bei niedriger Temperatur eingedampft und bei etwas höherer Temperatur in einem elektrisch geheizten Graphitrohr pyrolysiert. Nach der Pyrolyse wird der Strom schnell auf mehrere Hundert Ampere erhöht, was einen Temperaturanstieg auf 1500 °C bis 3000 °C bewirkt. Die Atomisierung der Probe tritt dabei in einem Zeitraum von wenigen Millisekunden ein und die Absorption des atomaren Dampfes wird im Bereich, direkt über der erhitzten Oberfläche gemessen. Die genaue Steuerung der Temperatur bei der ET-AAS ermöglicht die Erstellung eines jeweilig optimalen Programms zur Trocknung, Pyrolyse und Atomisierung verschiedenster Proben.

Für eine detaillierte Beschreibung der Methode sei an dieser Stelle auf Kapitel 4.2 verwiesen.

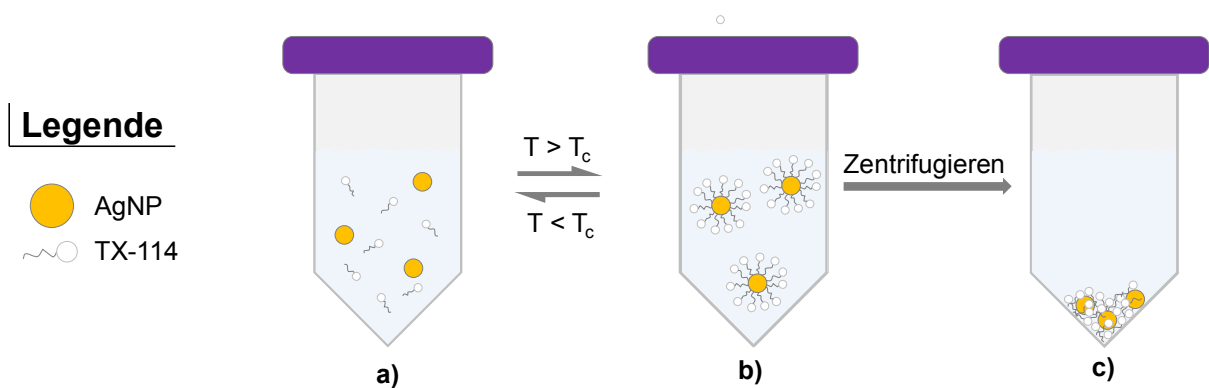
Vorteile der ET-AAS sind die sehr hohe Empfindlichkeit bei kleinen Probevolumina von 20 µL sowie die hohe Matrixtoleranz, da die Matrixbestandteile bei der Pyrolyse oft beseitigt werden können. Ein Nachteil ist der geringe Messbereich, der oft weniger als zwei Größenordnungen umfasst.<sup>66</sup>

### **3.5 Fazit**

In diesem Kapitel wurde eine Reihe analytischer Techniken zur Charakterisierung und Konzentrationsbestimmung von NP vorgestellt. Viele von ihnen sind trotz ihrer großen Vorteile auch mit vielen Nachteilen behaftet. Die meisten Methoden sind teuer und/oder nicht nachweisstark genug, um die NP-Konzentration in niedrig konzentrierten Umweltproben zu messen. Außerdem spielt die Unterscheidung zwischen gelöster und nanopartikulärer Form, die Matrixtoleranz, sowie die Größenbestimmung der NP eine große Rolle. Diese Faktoren müssen bei der Entwicklung einer alternativen Methode zur Größenbestimmung und Quantifizierung von NP beachtet werden, für die, wie aus Kapitel 3 deutlich wird, durchaus Bedarf besteht.



ser-Grenzfläche zusammen, mit Ausrichtung der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten zur Luft und der hydrophilen Kopfgruppen zum Wasser, wodurch eine Verringerung der Oberflächenspannung erreicht wird. Bei weiterer Tensid-Zugabe beginnen sich die Tenside im Innern der Lösung anzuordnen, mit einer möglichst minimalen Wechselwirkung des hydrophoben Teils mit dem Wasser.<sup>75</sup> Sobald die Tensidkonzentration die kritische Mizellenbildungskonzentration (cmc, engl.: *critical micelle concentration*) erreicht, bilden sich kugel-, diskus- oder stäbchenförmige Mizellen aus.<sup>74</sup> Nichtionische Tenside sind besonders zur Anwendung temperaturinduzierter Phasentrennung geeignet, siehe Abbildung 8.



**Abbildung 8:** Schematischer Ablauf einer Cloud Point Extraktion

Beim Überschreiten einer bestimmten Temperatur, der so genannten Cloud Point Temperatur ( $T_c$ ) oder auch Trübungspunkt genannt, bilden die Tenside in wässriger Lösung Mizellen und gehen von einer pseudohomogenen Lösung in ein Zweiphasengebiet mit einer wässrigen und einer Tensid-reichen Phase über. Voraussetzung hierfür ist, dass die Konzentration des Tensids in Lösung die cmc übersteigt. Die Mizellenbildung ist entropiegetrieben und reversibel, bei Temperaturen kleiner  $T_c$  ist die Lösung klar und die Tenside sind in Wasser löslich (Vgl. Abbildung 8a). Nach Überschreitung der cmc besitzt die mizellare Tensidlösung die Fähigkeit zur Solubilisierung unpolarer Substanzen, indem diese im hydrophoben Innern der Mizelle eingeschlossen werden (Vgl. Abbildung 8b). Solche unpolaren Substanzen sind z.B. Metallnanopartikel. Polare Substanzen und Ionen hingegen verbleiben in der wässrigen Phase. Um eine Co-Extraktion von gelösten Metallionen des Analyten zu vermeiden bzw. die ionische Form des Analyten abzutrennen, kann ein Komplexbildner (Ligand) zur Proben-

lösung hinzugeben werden. Dabei werden Liganden eingesetzt, die polare gut wasserlösliche Komplexe bilden, die in der wässrigen Phase verbleiben. Die Tensid-reiche Phase ist, abhängig von der Art des Tensids, entweder leichter oder schwerer als die wässrige Phase und kann deswegen leicht von dieser abgetrennt werden. Da die Dichte der Mizellen beim benutzten Tensid TX-114 größer als die des Wassers ist, sinken diese mit den eingeschlossenen Partikeln nach einiger Zeit zu Boden. Dieser Prozess kann durch Zentrifugation beschleunigt werden (vgl. Abbildung 8c). Durch den Einsatz eines Liganden wird eine Speziesselektivität erreicht. Für Au-Ionen eignet sich dabei der Ligand  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , für Ag-Ionen hat sich EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) als Ligand bewährt.<sup>71,72</sup> Aufgrund der pH-Abhängigkeit der CPE ist es wichtig diesen mit einem Puffer einzustellen.

Da die cmc der typischen Tenside bei 0,1 Gew.-% liegt und das Volumen der unpolaren Phase somit deutlich geringer als das gesamte Probenvolumen ist, gelingt mittels der CPE nicht nur die Separation des Analyten, sondern auch seine Anreicherung.<sup>71</sup> Für das Tensid TX-114, welches in dieser Arbeit verwendet wird, ist die cmc 0,01 Gew.-% und die  $T_C$  23 °C.<sup>72,76</sup> Dadurch resultiert der Vorteil, dass bei einer niedrigen Temperatur und Tensidkonzentration gearbeitet werden kann, was sowohl eine hohe Anreicherung als auch eine geringe thermische Beanspruchung des Analyten ermöglicht. Ergänzend belegen Untersuchungen, dass durch die CPE Größe und Form der Partikel nicht beeinträchtigt werden.<sup>71,72,73,76</sup>

Zur anschließenden Quantifizierung der NP kommen nachweisstarke Methoden wie Atomabsorption (ET-AAS) und Massenspektrometrie (ICP-MS) in Frage. Wegen der hohen Viskosität, verbunden mit dem hohen Tensid-Gehalt der Proben, müssen diese jedoch vor der ICP-MS-Messung aufgeschlossen oder stark verdünnt werden. Durch die Quantifizierung mit der ET-AAS kann dies umgangen werden, da durch ein geeignetes Temperaturprogramm, die organische Matrix eliminiert und die Tensid-reiche Phase direkt und störungsfrei gemessen werden kann. Die CPE zusammen mit der ET-AAS Messung führen sowohl zu hohen Anreicherungsfaktoren (Faktor 80 für Au-NP und Faktor 100 für Ag-NP) als auch zu sehr niedrigen Nachweisgrenzen (5 ng/L für Au-NP und 0,7 ng/L für Ag-NP).<sup>71,72</sup> Damit bietet die CPE gekoppelt an die ET-AAS eine schnelle und im Vergleich zur Kopplung an die ICP-MS, eine kostengünstige und nachweisstarke Methode, um die NP-Konzentration in niedrig konzentrierten Umweltproben zu messen.

## 4.2 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Gemäß dem Deutschen Institut für Normung (DIN) ist die AAS ein spektralanalytisches Verfahren zum quantitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Elementen mit Hilfe der Absorption optischer Strahlung durch freie Atome im Gaszustand.<sup>77</sup>

### 4.2.1 Physikalische Grundlagen

Das Prinzip der AAS beruht auf der Anregung von Valenzelektronen durch elektromagnetische Strahlung und der Resonanzabsorption von Photonen, durch die in der Probe enthaltenen Atome.<sup>77</sup> Die Atomisierung der Probe kann abhängig von der gewählten Technik entweder in einer Flamme (F-AAS) oder elektrothermisch (ET-AAS) in einem Graphitrohr erfolgen. Bei der ET-AAS wird die Probe in ein, durch Stromfluß beheiztes Graphitrohr (Widerstandsheizung) pipettiert und elektrothermisch verdampft. Die freien Atome, bzw. ihre Valenzelektronen werden durch eine Lichtquelle, mit einer für das zu bestimmende Element charakteristischen Wellenlänge angeregt und absorbieren Licht der elementtypischen Wellenlänge, was zur Abschwächung der Messstrahlintensität führt. Dieser Intensitätsverlust ist direkt proportional zu der Zahl der Atome in der Probe und kann damit zu deren Quantifizierung des Elements in der Probe herangezogen werden.<sup>78</sup> Dieser Zusammenhang lässt sich mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes, siehe Formel 1 beschreiben.

$$E_{\lambda} = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c_1 \cdot d$$

**Formel 1:** Lambert-Beer'sches Gesetz

Dabei ist  $E_{\lambda}$  die Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $I_0$  die Intensität des eingestrahlteten Lichts,  $I$  die Intensität des transmittierten Lichts,  $\varepsilon_{\lambda}$  der Extinktionskoeffizient des Analyten bei einer Wellenlänge  $\lambda$ ,  $c_1$  die Analytkonzentration und  $d$  die Schichtdicke der Probekammer.

Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass reale Systeme bei der ET-AAS von dieser Gleichung nur schlecht beschrieben werden. So ist die Schichtdicke  $d$  nicht genau definierbar. Auch beschreibt  $c_1$  vielmehr die Konzentration des Analyten in der „Atomwolke“ und nicht in der Probe selbst. Außerdem kann es neben der Resonanzabsorption auch zu anderen Prozessen kommen, die zu einer Abschwächung der



Messstrahlintensität führen. Beispiele für solche Prozesse sind die Reflexion sowie unspezifische Streuung und Absorption, etwa durch Moleküle oder Rußpartikel. Aufgrund dessen wird für die ET-AAS eine allgemeinere Version des Lambert-Beer'schen Gesetzes, siehe Formel 2 verwendet:

$$E_{\lambda} = \log \left( \frac{I_0}{I} \right) = c_2 \cdot b \cdot a$$

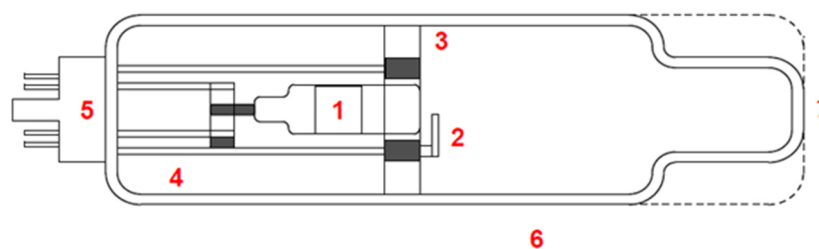
**Formel 2:** Für die ET-AAS gültige Abwandlung des Lambert-Beer'schen Gesetzes.

Hier ist  $c_2$  die Konzentration des Analyten in der Probe.  $b$  eine Konstante, die die Weglänge des Lichts durch die Atomzelle und die Geometrie des Strahlengangs einbezieht und  $a$  die gerätespezifische Absorptionskonstante, die die Atomisierungsrate des zu bestimmenden Elements bei den gegebenen Messbedingungen und das aufzugebene Probenvolumen berücksichtigt.<sup>79</sup>

#### 4.2.2 Aufbau

Ein AAS-Spektrometer besteht aus einer Strahlungsquelle, einer Atomisierungseinheit, einem Monochromator, einer Einheit zur Untergrundkorrektur und einem Detektor.

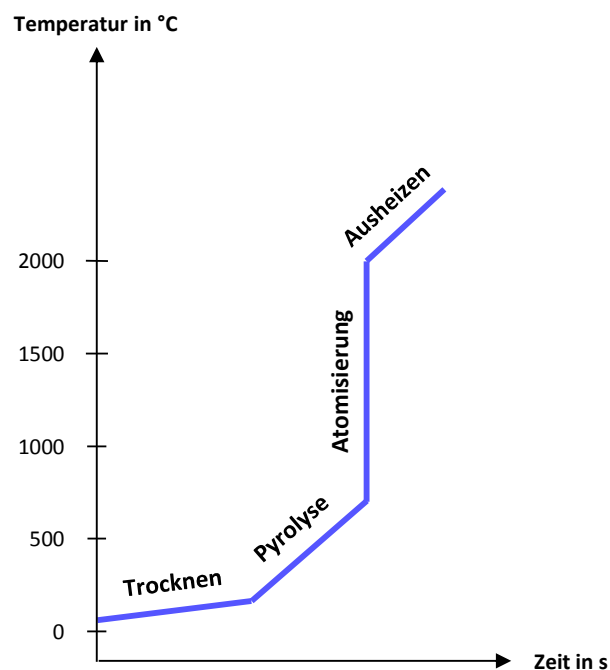
Als Strahlungsquelle wird bei der AAS eine Vorrichtung zur Erzeugung elektromagnetischer Strahlung verstanden, beispielsweise in Form einer elektrischen Glimmentladung. Dabei werden in der AAS bevorzugt Linienstrahler eingesetzt, welche die Spektrallinien eines Elements, bzw. des zu messenden Elements imitieren. Eine Hohlkathodenlampe (HKL) ist einer dieser Linienstrahler, deren Aufbau in Abbildung 9 dargestellt ist.<sup>77</sup>



**Abbildung 9:** Hohlkathodenlampe, mit 1: Kathode, 2: Anode, 3: Glimmerplatten, 4: Stromzufuhr, 5: Sockel, 6: Glaskörper und 7: Quarzglasfenster.

Die Kathode (1) der Hohlkathodenlampe besteht aus dem zu bestimmenden Element bzw. ist damit beschichtet. Die Anode (2) besteht meist aus Wolfram oder Nickel. Der Glaszylinder (6) ist mit einem Edelgas (meist Argon) unter einem Druck von einigen Millibar gefüllt. Wird eine elektrische Spannung von einigen hundert Volt (Stromstärke 5-50 mA) angelegt, so bildet sich eine Glimmentladung und das Füllgas wird ionisiert. Ein Strom positiver Gas-Ionen wird zu Kathode hin beschleunigt, schlägt dort durch den Aufprall Atome aus der Oberfläche des Kathodenmaterials heraus und regt sie zur Emission an. Durch Relaxation der angeregten Metallatome kommt es zur Emission charakteristischer Elementstrahlung (mit einer Linienbreite von einigen Picometern), die durch ein Quarzfenster (7) aus der Lampe austritt und die atomisierte Probe durchläuft.<sup>66</sup>

Wie bereits erwähnt, ist bei der ET-AAS die Atomisierungseinheit ein durch elektrischen Widerstand beheizter Graphitrohrföfen, indem die elektrothermische Atomisierung der Probe erfolgt. Dabei wird ein Aliquot der Probe (meist 10-50 µL) mit einer Mikroliterpipette in den Graphitrohrföfen eingebracht und dessen Temperatur durch Anlegen einer Spannung schrittweise erhöht, um vor dem Atomisieren Lösemittel und Matrixkomponenten möglichst weitgehend zu entfernen.<sup>77</sup> Die Temperaturerhöhung erfolgt dabei innerhalb eines genau definierten Temperaturprogramms. Ein Beispiel für ein mögliches Temperaturprogramm ist in Abbildung 10 dargestellt.

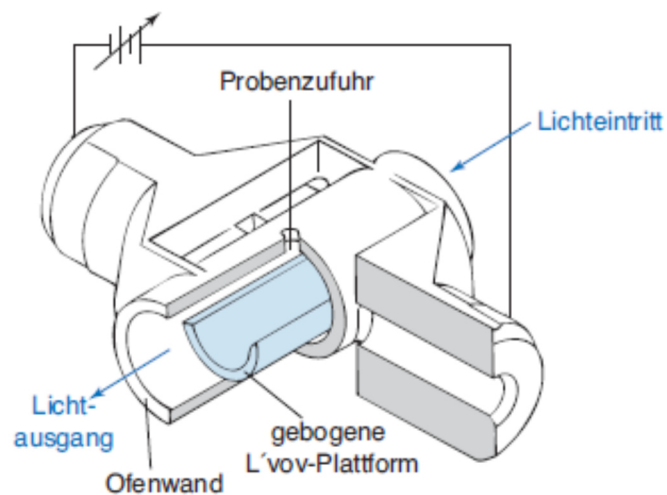


**Abbildung 10:** Schematische Darstellung eines Temperaturprogramms der ET-AAS.

Die Messung beginnt mit einer meist zweistufigen Trocknungsphase bei der das Lösemittel langsam verdampft wird. In der anschließenden Pyrolysephase werden störende Begleitsubstanzen der Probe entfernt. Die Temperatur für die anschließende Atomisierung muss hoch genug sein, um eine möglichst vollständige Atomisierung des Analyten zu garantieren, diese ist von dem Analyten und der Zusammensetzung der Probe abhängig. Im Anschluss wird der Graphitrohrföfen zur Reinigung bei maximaler Temperatur ausgeheizt um alle verbleibenden Substanzen zu entfernen und den nächsten Messzyklus vorzubereiten.

Da die Atomisierung in kürzester Zeit erfolgt, entsteht ein peakförmiges, zeitabhängiges Extinktionssignal, dessen Fläche über die Zeit integriert, als analytisches Signal verwendet wird.<sup>77</sup> Bei jedem Temperaturschritt, außer bei der Atomisierung wird der Ofen zur Entfernung flüchtiger Stoffe mit Ar oder N<sub>2</sub> gespült. Dagegen wird während der Atomisierung der Gasfluss angehalten, um ein Herausblasen des Analyten aus dem Ofen während der Messung zu verhindern.<sup>80</sup>

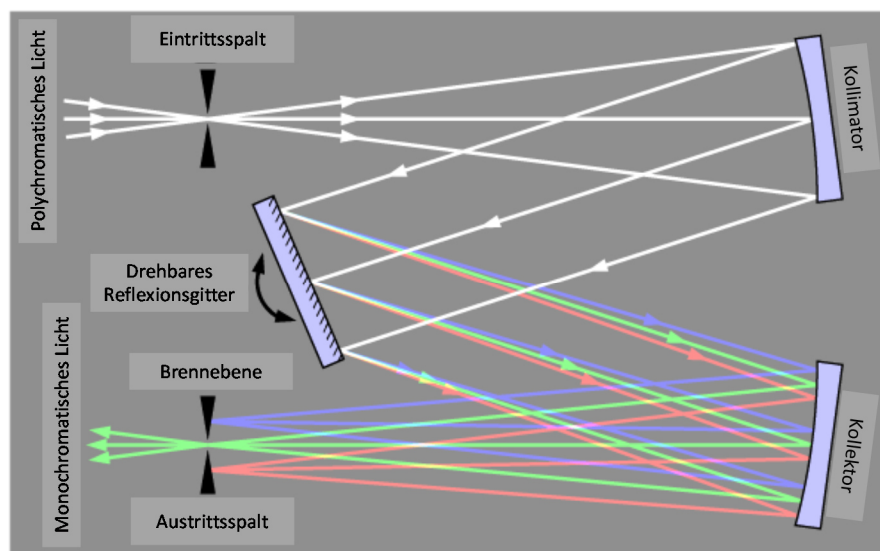
Durch die spezielle Plattform für die Probeaufnahme (L'vov-Plattform, siehe Abbildung 11) und die transversale Beheizung des Graphitrohrs, wird eine relativ konstante Temperatur in der Messzelle und eine effektive Atomisierung ermöglicht.<sup>66</sup>



**Abbildung 11:** Transversal beheizter Graphitofen mit L'vov Plattform<sup>80</sup>.

Ein Inertgasstrom, meistens Argon, verhindert ein Verbrennen des Graphitrohrs. Ein weiterer Argonstrom im Innern des Graphitrohrs ermöglicht den Abtransport der durch die thermische Vorbehandlung entstandenen Gase und Dämpfe.

Der Monochromator zerlegt polychromatisches Licht in seine Wellenlängen und wählt eine schmale Bande für den Durchgang durch die Probe oder für den Detektor aus. Im Gittermonochromator (siehe Abbildung 12) gelangt polychromatisches Licht durch den Eintrittsspalt und wird durch einen konkaven Spiegel (den Kollimator) zu parallelen Strahlen gebündelt.<sup>80</sup>



**Abbildung 12:** Czerny-Turner Gittermonochromator. In Anlehnung an D. C. Harris.<sup>80</sup>

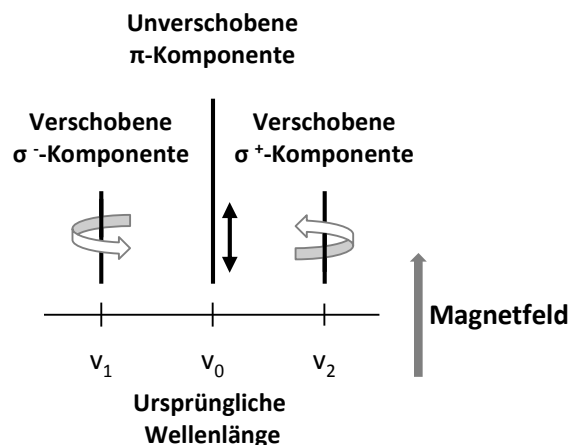
Diese Strahlen treffen auf ein drehbares Reflexionsgitter, an dem unterschiedliche Wellenlängen mit unterschiedlichen Winkeln gebeugt werden. Anschließend trifft das Licht auf einen weiteren konkaven Spiegel, den Kollektor, der jede auftreffende Wellenlänge auf einen anderen Punkt der Brennebene fokussiert. Durch die Stellung des Reflexionsgitters wird nur ein schmaler Wellenlängenbereich auf den Austrittsspalt des Monochromators gerichtet, wobei durch die Drehung des Reflexionsgitters unterschiedliche Wellenlängen nacheinander den Austrittsspalt passieren können.<sup>80</sup> Die Strahlungsintensität wird mit Hilfe eines Detektors ermittelt und in ein elektronisches Signal umgewandelt.

#### 4.2.3 Zeeman-Effekt und Untergrundkorrektur

Unspezifische Streuung und Absorption führen bei der AAS zu einer Untergrundabsorption, die das Messsignal beeinflusst und zu systematischen Fehlern führt. Mit

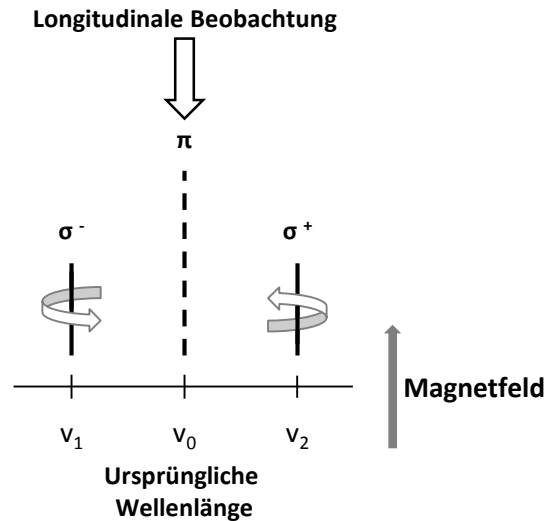
Hilfe von Untergrundkorrektursystemen können spektrale Interferenzen beseitigt werden. Diese Korrektursysteme messen das Untergrundabsorptionssignal und subtrahieren dieses vom totalen Absorptionssignal. Moderne ET-AA-Spektrometer nutzen dabei meistens den Zeeman-Effekt.<sup>77</sup>

Unter dem Zeeman-Effekt, der 1896 von Pieter Zeeman nachgewiesen wurde, versteht man allgemein die Aufspaltung von Absorptionslinien beim Anlegen eines magnetischen Feldes. Dabei spalten sich die Resonanzlinien eines Elements, jeweils in drei Linien auf, in eine  $\pi$ -Komponente und zwei  $\sigma$ -Komponenten, die mit  $\sigma^+$  und  $\sigma^-$  bezeichnet werden. Die  $\pi$ -Komponente entspricht dabei der Linie des ursprünglichen Übergangs  $\nu_0$  und ist parallel zum Magnetfeld linear polarisiert. Die beiden  $\sigma$ -Komponenten sind gegenüber der ursprünglichen Wellenlänge  $\nu_0$  zur höheren bzw. niedrigen Wellenlänge verschoben  $\nu_0 \pm \nu_1$  und aufgrund der Spinumkehr gegenläufig zirkular polarisiert, wobei die Achsen der zirkularen Wellen ebenfalls parallel zum Magnetfeld ausgerichtet sind, siehe Abbildung 13.



**Abbildung 13:** Verschiebung der Resonanzlinien beim normalen Zeeman-Effekt. In Anlehnung an Perkin-Elmer<sup>81</sup>

Wird das Magnetfeld parallel zum Strahlengang angelegt (longitudinaler Zeeman-Effekt) bleibt die unverschobene Linie unsichtbar, weil die Richtung des elektrischen Vektors der  $\pi$ -Komponente mit der Beobachtungsrichtung zusammenfällt. Die verschobenen Linien  $\sigma^+$  und  $\sigma^-$  werden als gegenläufig zirkular polarisiert gesehen, siehe Abbildung 14.



**Abbildung 14:** Longitudinaler Zeeman-Effekt. In Anlehnung an Perkin-Elmer<sup>81</sup>

Wenn das Magnetfeld auf einen Linienstrahler wirkt spricht man vom direkten Zeeman-Effekt. Im Gegensatz dazu spricht man beim Einwirken des Magnetfelds auf die Atomwolke eines Elements z.B. im Graphitrohr von einem inversen longitudinalen Zeeman-Effekt. Durch das Anlegen eines magnetischen Wechselfeldes an die Atomisierungseinrichtung, ergibt sich hintereinander ein schneller Wechsel zwischen den Phasen „Magnetfeld ein“ und „Magnetfeld aus“. In der Phase „Magnetfeld aus“ wird die Summe aus spezifischer und unspezifischer Absorption gemessen. In der Phase „Magnetfeld ein“ findet keine elementspezifische Absorption mehr statt und es wird nur noch die unspezifische Absorption des Untergrunds bestimmt. Das untergrundkorrigierte Absorptionssignal des zu quantifizierenden Elements wird durch die Differenz der Messsignale in den Phasen „Magnetfeld aus“ und „Magnetfeld ein“ vom System ermittelt, siehe Abbildung 15.<sup>81</sup>

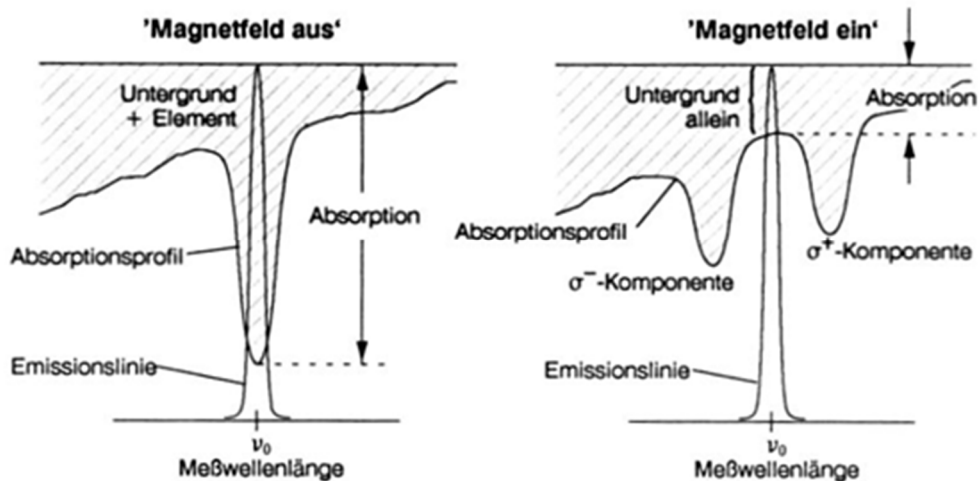


Abbildung 15: Inverser longitudinaler Zeeman-Effekt<sup>81</sup>

### 4.3 Dialyse

Die Dialyse ist ein konzentrationsgetriebenes, physikalisches Trennverfahren zur Abtrennung hochmolekularer Substanzen, großer Moleküle und Partikel von kleinen Molekülen oder anorganischen Ionen, durch Diffusion aus einer Dispersion in das laufend erneuerte reine Lösungsmittel (meist Wasser).<sup>82</sup> Die Trennung erfolgt an einer semipermeablen Membran, die Poren definierten Durchmessers besitzt und von größeren Molekülen und Partikeln nicht durchquert werden kann. Aus diesem Grund lässt sich die Dialyse zur Aufreinigung von Nanopartikeln verwenden.<sup>80</sup> Da eine frisch synthetisierte Nanopartikelsuspension außer Nanopartikeln noch weitere Bestandteile, wie nicht verbrauchtes Reduktionsmittel, überschüssiges Stabilisierungsreagenz und nicht reduzierte Metall-Kationen enthält, können diese mittels Dialyse entfernt werden. Dazu wird die zu reinigende Nanopartikelsuspension in einen Dialyseschlauch gefüllt, der aus einer eben solchen semipermeablen Membran besteht, verschlossen und in ein Bad mit Reinstwasser gegeben. Die geringe Porengröße der Membran ermöglicht die Diffusion niedermolekularer Substanzen und Ionen durch diese in Richtung des Konzentrationsausgleichs in die angrenzende wässrige Phase, während die Nanopartikelsuspension im Schlauch verbleibt. Damit sich kein Gleichgewicht einstellt, wird die Membran ständig von neuem Lösemittel umspült.

#### 4.4 Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffgehalts

Zur Charakterisierung und Kontrolle von Trinkwasser- und Industrieabwasserströmen sowie zur Quantifizierung des NOM-Gehalts in aquatischen Systemen wird der TOC-Gehalt gemessen. Kommunale und industrielle Abwässer haben gewöhnlich TOC-Werte kleiner 0,1 mg C/L.<sup>80</sup>

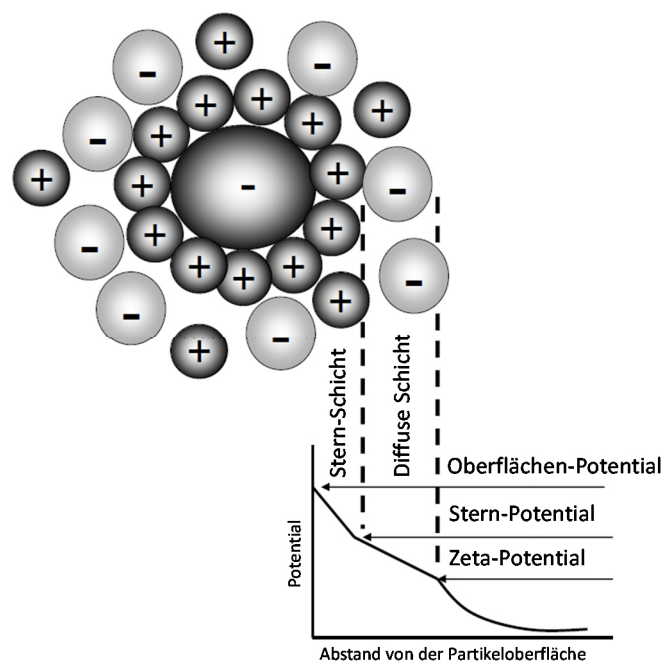
Das Prinzip der TOC-Messung beruht auf der vollständigen Oxidation aller Kohlenstoffverbindungen in der Probe zu CO<sub>2</sub> und anschließender quantitativer Bestimmung dieses Kohlendioxidgehalts. Dabei ergibt sich der TOC aus der Differenz des Anorganischen Kohlenstoffs (AC) vom Gesamtkohlenstoff (TC, engl.: *total carbon*).<sup>67</sup> Der AC ist das CO<sub>2</sub>, welches dem CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Gehalt in der Probe entspricht und durch Ansäuern mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (auf pH kleiner 2) mit Stickstoff oder Argon ausgetrieben und freigesetzt wird. Nach Entfernen des AC ergibt sich der TOC aus der Menge von CO<sub>2</sub>, die bei vollständiger Oxidation der Probe bei hoher Temperatur gebildet wird. In kommerziell erhältlichen Instrumenten wird der TOC-Wert durch thermische Oxidation ermittelt und der CO<sub>2</sub>-Gehalt durch Messung seiner Infrarotabsorption bestimmt.<sup>80</sup> Der in dieser Arbeit verwendete *TOC-L Analytator* misst ebenfalls nach diesem Prinzip. Der AC wird nach Ansäuern der Probe durch das Spülgas entfernt. Anschließend wird ein Aliquot der entgasten Probe mit einem Trägergas in ein Brennröhr (welches auf 680 °C erhitzt wird und einen Katalysator zur Oxidation enthält) getragen und verbrennt unter Bildung von CO<sub>2</sub>. Das Trägergas welches nun das gebildete CO<sub>2</sub> und weitere Verbrennungsprodukte enthält, kühlt in einem Entfeuchter ab und wird dehydriert. Nach Passieren eines Halogenentferners erreicht es einen nicht-dispersiven Infrarot-Detektor, wo die CO<sub>2</sub>-Menge detektiert wird. Da die Signalfäche proportional zur TOC-Menge ist, kann diese nach Kalibrierung mit einer Standardlösung ermittelt werden.<sup>83</sup>

#### 4.5 Zeta-Potential-Messung

Partikel weisen in einer wässrigen Suspension eine Oberflächenladung auf. Diese Ladung wird kompensiert durch Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht durch Anlagerung von Gegenionen im Suspensionsmedium. Die elektrochemische Doppelschicht besteht aus einer inneren Stern-Schicht, in der die Ionen stark an die Oberfläche der Partikel gebunden sind und einer äußeren diffusen Schicht aus solva-



tisierten Kationen und Anionen (siehe Abbildung 16). Dies führt zu einem Potentialverlauf zwischen der Partikeloberfläche und dem Volumen der Dispersionsflüssigkeit.<sup>84</sup> Aufgrund der Ladungskompensation durch die Gegenionen nimmt das Potential mit zunehmender Entfernung zum Partikel ab. Bewegt sich nun der Partikel, so wandert entweder seine ganze elektrochemische Doppelschicht mit oder nur die feste Sternschicht und ein Teil der diffusen Schicht, da deren anderer Teil sich durch die Reibung ablöst. Ist das Letztere der Fall, dann sind die Partikel nicht mehr neutral, sondern besitzen ein Potential. Das Potential an der Scherebene, innerhalb derer sich alle Ionen mit dem Partikel mitbewegen und außerhalb derer keine Bewegung der Ionen stattfindet, wird als Zeta-Potential bezeichnet. Wenn die Partikel in einer Suspension ein hohes positives oder negatives Potential aufweisen, dann stoßen sie sich gegenseitig ab und sind somit stabil. Partikel mit einem Zeta-Potential größer als 30 mV oder kleiner als -30 mV werden damit als stabil bezeichnet.<sup>85</sup>



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung des Zeta-Potentials<sup>84</sup>

Die Messung des Zeta-Potentials erfolgt durch die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität (durch Messen der Geschwindigkeit der Teilchen in einem Elektrophorese-Experiment) und der Anwendung der Henry-Gleichung. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die geladenen Partikel zur entgegengesetzt geladenen

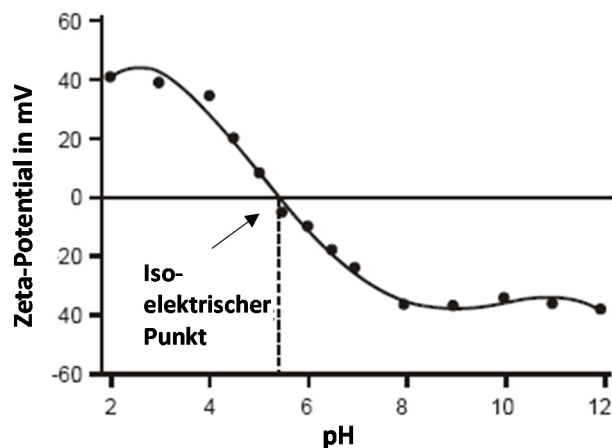
Elektrode; dabei wirken Reibungskräfte, bedingt durch die Viskosität der Lösung auf die Partikel, welche deren Wanderung behindern. Kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen den Reibungs- und den elektrophoretischen Kräften, so bewegen sich die Partikel mit einer konstanten Geschwindigkeit, die durch die Henry-Gleichung (siehe Formel 3) beschrieben wird.<sup>85</sup>

$$U_E = \frac{2\epsilon \cdot z \cdot f(\kappa a)}{3\eta}$$

**Formel 3:** Henry-Gleichung<sup>85</sup>

Dabei ist  $U_E$  die elektrophoretische Mobilität,  $\epsilon$  die dielektrische Konstante,  $z$  das Zeta-Potential,  $f(\kappa a)$  die Henry-Funktion und  $\eta$  die dynamische Viskosität. In wässrigen Systemen entspricht  $f(\kappa a)$  dem Wert 1,5 und bei kleinen Partikeln in Medien mit geringem  $\epsilon$  dem Wert 1. Die Elektrophoretische Mobilität wird mithilfe einer Laser-Doppler-Geschwindigkeitsmessung bestimmt. Diese Messung erfolgt in einer Mikro-Elektrolyse-Probenzelle. Während der Elektrophorese wird Laserlicht auf die Kapillare fokussiert und die Streulichtintensität (Detektionswinkel  $17^\circ$ ) wird gemessen, dabei generieren die Partikel im Photodetektor ein Streulichtsignal, dessen Frequenz direkt proportional zu deren Bewegungsgeschwindigkeit ist.<sup>85</sup>

Das Zeta-Potential wird maßgeblich vom pH-Wert beeinflusst. In Abbildung 17 ist der Verlauf des Zeta-Potentials für negativ geladene Partikel in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Besitzen die Partikel ein negatives Zeta-Potential, so wird ihre Oberflächenladung mit zunehmender NaOH-Zugabe immer negativer.



**Abbildung 17:** Zeta-Potential Verlauf negativ geladener Partikel in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Bei Säurezugabe steigt mit abnehmendem pH-Wert das Zeta-Potential, wobei ein Punkt durchlaufen wird, an dem die negative Ladung neutralisiert wird: der Isoelektrische Punkt, an dem das Zeta-Potential den Wert Null annimmt. Weitere Säurezugabe führt zu einer Ansammlung positiver Ladung an der NP-Oberfläche. Daher ist eine Zeta-Potential-pH-Kurve einer Partikelsuspension mit negativem Zeta-Potential positiv bei kleinen pH-Werten und negativ bei hohen pH-Werten.

Es sollte jedoch beachtet werden, dass bei der Zeta-Potential-Messung von Nanopartikeln nur ein durchschnittliches Zeta-Potential bestimmt wird. Besonders bei polydispersen NP kann das gemessene Zeta-Potential von dem eigentlichen Wert abweichen, da die Partikelgröße die Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht und damit das Zeta-Potential beeinflusst.<sup>85</sup>

## 4.6 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde von Arne Tiselius in den 1930er-Jahren für die Untersuchung von Proteinen im Blutserum entwickelt. Bei der Gelelektrophorese werden geladene Teilchen aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld getrennt. Die zu trennende Substanz wird dazu in eine schmale Proben tasche eines porösen Trägermediums, z.B. eines halbfesten Gels, welches sich in einer Pufferlösung befindet, injiziert. Mithilfe zweier Elektroden, die an den Enden des Puffers lokalisiert sind, wird eine Hochspannung über die Länge des Puffers angelegt. Durch das erzeugte elektrische Feld wandern die geladenen Moleküle zu einer der Elektroden mit entgegengesetzter Ladung. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist dabei von ihrer Ladung sowie ihrer Größe abhängig und die Trennung basiert auf dem Ladung-zu-Größe-Verhältnis des Analyten in der Probe. Je größer dieses Verhältnis ist, desto schneller wandert der Analyt im elektrischen Feld.<sup>66</sup>

Die Gelelektrophorese wird schon seit langem zur Trennung von unter anderem Proteinen, Enzymen, Antikörpern, Arzneiwirkstoffen und DNA verwendet, kann aber auch zur Größentrennung von Nanopartikeln genutzt werden. Kleinere Nanopartikel erfahren einen geringeren Widerstand vom Gel und wandern deswegen schneller als größere Nanopartikel. Die Größentrennung von Nanopartikeln erfolgt dabei in einem Agarosegel mit einer Porengröße von 100 nm. Agarose ist ein hochreines Polysaccharid, welches aus Agar gewonnen wird. Für die Gelherstellung wird es im kochenden Elekt-

rolyten gelöst und geliert beim Abkühlen ab ca. 40 °C. Die übliche Agarosekonzentration des Gels liegt bei etwa 0,4-2 Gew.-%, wobei höhere Konzentrationen zu kleineren Poren, einem größeren Widerstand und somit zu einer geringeren Mobilität der Teilchen führen. Als Elektrolyt dienen meist die kommerziell erhältlichen Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Puffer, wie der TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) und der TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE).<sup>61</sup> Vor der Trennung müssen die NP mit einem Liganden funktionalisiert werden, der im elektrophoretischen Feld wandern und die Nanopartikel binden kann. Nur durch die Funktionalisierung mit einem geladenen Liganden kann eine zufriedenstellende Trennung der Nanopartikel im Gel erreicht werden. Theoretisch können alle Liganden verwendet werden, die auf der einen Seite eine Bindestelle für NP haben (meistens eine SH-Gruppe) und auf der anderen Seite (eine) elektrophoretisch mobile Gruppe(n) besitzen (beispielsweise NH<sub>3</sub>- oder COOH-Gruppen). Bekannte Liganden sind z.B. 11-Mercaptoundecansäure (MUA, engl.: *mercaptoundecanoic acid*) und Mercaptobernsteinsäure (MSA, engl.: *mercaptosuccinic acid*).<sup>30,59</sup> Aufgrund der Eigenfärbung der Edelmetallnanopartikel (Au, Ag und Pt), vor allem aber der intensiven Farbe von Au-NP und Ag-NP ist eine Analyse von Au-NP- und Ag-NP-Proben im unteren bis mittleren mg/L-Bereich möglich. Damit bietet die Gelelektrophorese eine kostengünstige, schnelle und effektive Methode zur Produktkontrolle von NP-Suspensionen. Um jedoch NP-Proben mit geringeren Konzentrationen nach ihrer Form und Größe zu trennen, bedarf es einer Optimierung dieser Methode.

## 4.7 UV-VIS Spektroskopie

Die UV-VIS-Spektroskopie ist von allen quantitativen Analyseverfahren die am häufigsten eingesetzte Methode zur Identifizierung und Bestimmung von organischen und anorganischen Verbindungen durch Absorptionsmessungen im ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS, engl.: *visible*) Spektralbereich.<sup>66</sup> Sie beruht auf der Anregung der Valenzelektronen von Molekülen durch UV oder VIS-Licht und deren resonanter Absorption. Die Lichtabsorption im sichtbaren Bereich wird durch Chromophore – sogenannte Farbträger in einem Molekül hervorgerufen und ist nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (siehe Formel 1, Abschnitt 4.2.1) proportional zur Konzentration des Analyten. Damit lassen sich durch die Lage des Absorptionsmaximums Rückschlüsse auf die

Struktur des Analyten ziehen und durch Messung der Extinktion ( $\log \frac{I_0}{I}$ ) dessen Konzentration bestimmen.<sup>67</sup>

Metall-Nanopartikel, vor allem Au und Ag, zeigen im Vergleich zu ihrer nichtpartikulären Form eine starke Lichtabsorption im sichtbaren Bereich. Diese starke und breite Absorptionsbande, auch Oberflächenplasmonbande genannt, ist auf die kollektive Schwingung der Leitungselektronen durch optische Anregung zurückzuführen. Diese Absorption kann bei Edell-, Alkali-, Erdalkali- (Ca, Sr, Ba) und Seltenerd-Metall-Nanopartikeln (Eu, Yb) beobachtet werden.<sup>86</sup> Die kollektive Schwingung der freien Elektronen ist dabei von der Größe der Nanopartikel abhängig. Bei kleineren Partikeln ist die Energie, die zur kollektiven Anregung der Oberflächenplasmon Elektronen benötigt wird höher als bei größeren. So ist z.B. für fünf nm große Au-NP die Energie zur Anregung der Oberflächenplasmonen vergleichbar mit der des sichtbaren Lichts, weswegen die Partikel stark im sichtbaren Bereich mit einem Absorptionsmaximum bei 520 nm absorbieren. Größere Au-NP haben demnach ein Absorptionsmaximum bei höheren Wellenlängen. Die Oberflächenplasmonenbande ist jedoch nicht nur größenselektiv, sondern auch von der Form und der chemischen Zusammensetzung der Nanopartikel abhängig.<sup>87</sup> Aufgrund dessen lässt sich mit der UV-VIS-Spektroskopie schnell und günstig die Größe, Form und Zusammensetzung von Nanopartikeln ermitteln.<sup>88</sup> Diese Methode stößt bei niedrigen Konzentrationen jedoch wegen der bescheidenen Nachweisgrenzen im mg/L-Bereich an ihre Grenzen und ist aufgrund der Störung durch andere photoaktive Substanzen nur für Proben mit einer einfachen Matrix geeignet. Sie kann allerdings in der Produktkontrolle als schnelle Methode zur Charakterisierung von NP-Suspensionen verwendet werden.

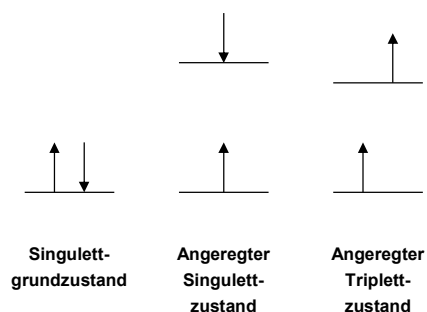
#### 4.8 Fluoreszenzspektrometrie

Leuchterscheinungen durch Lichtemission aus einem angeregten Molekülzustand chemischer Substanzen werden unter dem Begriff Lumineszenz zusammengefasst. Dabei unterscheidet man zwischen Photolumineszenz (Anregung durch Absorption eines Photons), zu der Fluoreszenz und Phosphoreszenz gehören, Chemilumineszenz (Anregung durch chemische und elektrochemische Reaktion) und Biolumineszenz (Anregung durch einen Stoffwechselprozess).<sup>66,67</sup>

Für die Unterscheidung der beiden Photolumineszenzprozesse soll in diesem Kapitel näher auf den Elektronenspin und die angeregte Singulett- und Triplettzustände eingegangen werden.

Nach dem Ausschlussprinzip von Pauli können zwei beliebige Elektronen eines Atoms nie denselben Satz von vier Quantenzahlen besitzen. Aus dieser Einschränkung folgt, dass höchstens zwei Elektronen ein Orbital besetzen können. Wird das Orbital mit zwei Elektronen besetzt, so müssen diese zwei Elektronen entgegengesetzte Spinzustände aufweisen. Unter diesen Bedingungen spricht man von gepaarten Spins.<sup>66</sup>

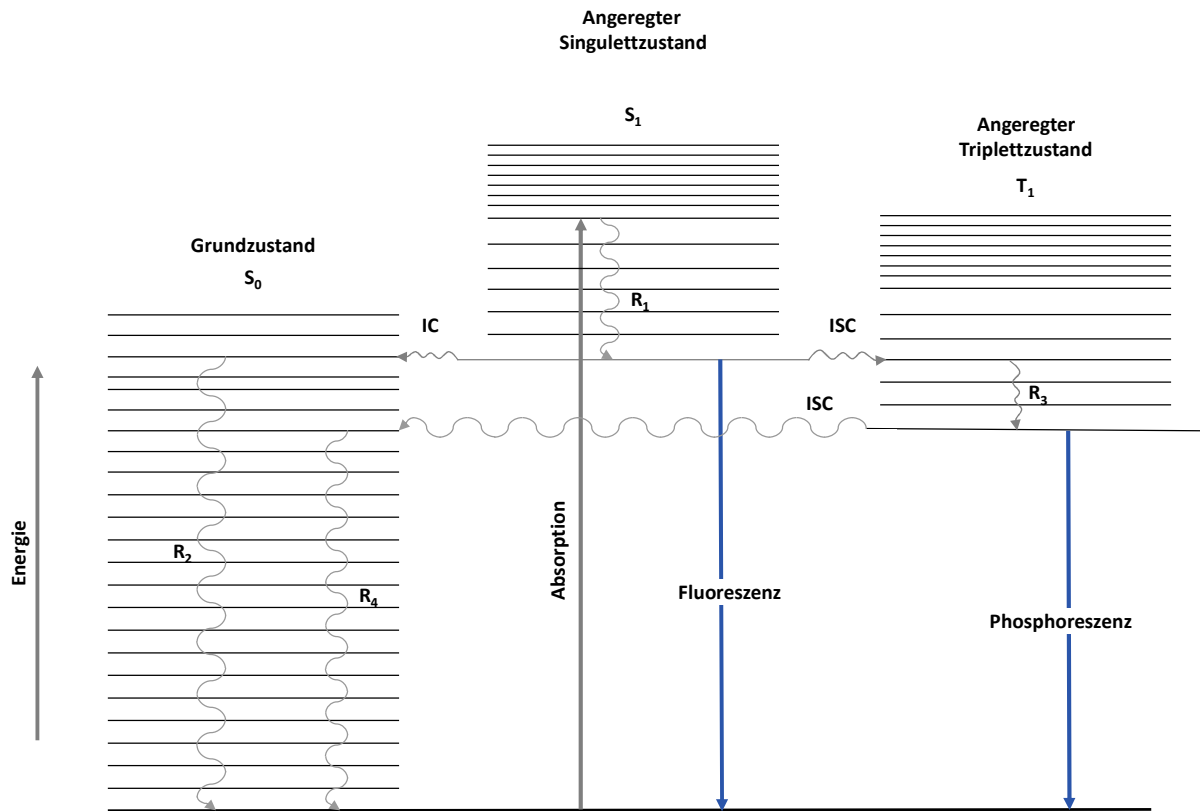
Ein molekularer Elektronenzustand, in dem alle Elektronenspins gepaart sind wird Singulettzustand genannt. Bei Anregung eines Elektrons aus einem Elektronenpaar auf ein höheres Energieniveau kann entweder ein Singulett- oder ein Triplettzustand entstehen. Im angeregten Singulettzustand ist der Spin des angehobenen Elektrons immer noch mit dem Elektron im Grundzustand gepaart; im Triplettzustand sind die Spins der beiden Elektronen gleichsinnig ausgerichtet und dadurch ungepaart (siehe Abbildung 18). Des Weiteren soll beachtet werden, dass der angeregte Triplettzustand weniger Energie hat als der korrespondierende Singulettzustand.<sup>66</sup>



**Abbildung 18:** Elektronische Spinzustände bei Molekülen. In Anlehnung an D. A. Skoog<sup>66</sup>

In Abbildung 19 sind die physikalischen Vorgänge in einem Molekül nach der Absorption von UV oder sichtbarer Strahlung abgebildet.  $S_0$  ist der elektronische Singulettgrundzustand,  $S_1$  und  $T_1$  sind der niedrigste angeregte Singulett- und Triplettzustand. Gerade Pfeile stellen Vorgänge an denen Photonen beteiligt sind dar, gewellte Pfeile kennzeichnen strahlungslose Übergänge. R bedeutet Schwingungsrelaxation. Die Ab-

sorption kann bei jedem der Schwingungsniveaus von  $S_1$  enden, nicht nur dem in dieser Abbildung gezeigten. Ebenso können Fluoreszenz und Phosphoreszenz auf jedem der Schwingungsniveaus von  $S_0$  enden.<sup>80</sup>



**Abbildung 19:** Physikalische Vorgänge in einem Molekül nach der Absorption von Strahlung. In Anlehnung an Daniel C. Harris<sup>80</sup>

Wird ein Molekül durch Absorption aus dem Elektronengrundzustand  $S_0$  in ein schwingungs- und rotationsangeregtes Niveau des angeregten Elektronenzustands  $S_1$  angehoben so findet normalerweise als erstes ein strahlungsloser Übergang (eine Schwingungsrelaxation) auf das niedrigste Schwingungsniveau von  $S_1$  statt (siehe Abbildung 19,  $R_1$ ). Die freiwerdende Energie bei dieser Relaxation wird nicht durch Emission eines Photons, sondern durch Kollisionen auf andere Moleküle übertragen. Als Nettoeffekt wird ein Teil der Energie des absorbierten Photons in Wärme umgewandelt. Vom  $S_1$  Niveau können unterschiedliche Vorgänge ablaufen. Das Molekül kann in einen sehr stark angeregten Schwingungszustand von  $S_0$  übergehen, der die gleiche Energie wie  $S_1$  besitzt. Solch ein Vorgang wird als innere Konversion (IC, engl.: internal conversion) bezeichnet und ist ein strahlungsloser Übergang zwischen Zuständen der

gleichen Spinquantenzahl. Aus diesem angeregten Zustand kann das Molekül in den Schwingungsgrundzustand zurückgehen und die Energie durch Kollisionen auf die Nachbarmoleküle übertragen (siehe R<sub>2</sub>). Folgt das Molekül dem Weg Absorption-R<sub>1</sub>-IC-R<sub>2</sub> (siehe Abbildung 19), wird die gesamte Energie des Photons in Wärme umgewandelt.<sup>80</sup>

Alternativ dazu kann das Molekül vom S<sub>1</sub>-Zustand in ein angeregten Triplettzustand T<sub>1</sub> übergehen. Dieser strahlungslose Vorgang wird als Intersystem Crossing (ISC) bezeichnet und ist ein Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Spinquantenzahlen. Folgt darauf die strahlungslose Schwingungsrelaxation R<sub>3</sub>, so befindet sich das Molekül auf dem niedrigsten Schwingungsniveau von T<sub>1</sub>. Von hier aus kann das Molekül einen zweiten ISC-Vorgang zum Grundzustand S<sub>0</sub> durchlaufen, dem die strahlungslose Relaxation R<sub>4</sub> folgt. Bei all diesen strahlungslosen Übergängen wird Lichtenergie in Wärme umgewandelt. Ein Molekül kann jedoch auch von S<sub>1</sub> oder T<sub>1</sub> aus zu S<sub>0</sub> unter Emission eines Photons relaxieren. Der Strahlungsübergang von S<sub>1</sub> zu S<sub>0</sub> wird als Fluoreszenz und der Strahlungsübergang von T<sub>1</sub> zu S<sub>0</sub> wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Strahlungsübergänge treten relativ selten auf, meist verlassen die Moleküle den angeregten Zustand durch strahlungslose Übergänge. Die Fluoreszenz unterscheidet sich von der Phosphoreszenz dadurch, dass die für die Fluoreszenz verantwortlichen elektronischen Übergänge nicht mit der Änderung des Elektronenspins einhergehen. Daher sind die angeregten Zustände bei der Fluoreszenz kurzlebiger (10<sup>-10</sup>-10<sup>-7</sup> s). Im Gegensatz dazu tritt bei der Phosphoreszenz eine Änderung des Elektronenspins auf, weshalb die Lebensdauer der angeregten Zustände viel länger ist (10<sup>-4</sup>-10<sup>2</sup> s). Da die Energie der Phosphoreszenz niedriger ist als die der Fluoreszenz, findet diese bei größeren Wellenlängen als die Fluoreszenz statt.<sup>80</sup>

Die Quantenausbeute Q gibt dabei an, welcher Teil der absorbierten Strahlung als Fluoreszenzlicht emittiert wird und ist ein Maß für das Verhältnis der Lichtemission zu den übrigen (strahlungslosen) Deaktivierungsprozessen.<sup>67</sup> Die Quantenausbeute einer Verbindung wird durch die relativen Geschwindigkeitskonstanten k<sub>x</sub> der Umwandlungsprozesse bestimmt, siehe Formel 4.

$$Q = \frac{k_f}{k_f + \sum k_{Deaktivierung}}$$

**Formel 4:** Quantenausbeute eines Chromophors



Dabei ist  $Q$  die Quantenausbeute,  $k_f$  die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und  $k_{\text{Deaktivierung}}$  die Geschwindigkeitskonstante eines Deaktivierungsprozesses.

Für ein Molekül, welches leicht zur Fluoreszenz angeregt werden kann, wie z.B. Fluoreszein, erreicht  $Q$  unter bestimmten Bedingungen den Wert eins, chemische Stoffe, die nicht nennenswert fluoreszieren haben Quantenausbeuten von nahezu null. Die intensivste Fluoreszenz liefern Verbindungen mit energiearmen  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangsniveaus. Wegen der kürzeren mittleren Lebensdauern dieser Übergänge, ist es weniger wahrscheinlich, dass es zu strahlungslosen Deaktivierungsprozessen kommt (demnach ist  $k_f$  und damit auch  $Q$  größer). Gewöhnlich treten solche Übergänge bei organischen Fluorophoren mit einem ausgedehnten  $\pi$ -Elektronensystem auf, die Licht aus dem UV- oder VIS-Bereich absorbieren.<sup>66</sup>

Der Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenz ergibt sich, mit einer kleinen Abwandlung durch das Lambert-Beer'sche Gesetz, siehe Formel 5. Die Fluoreszenzemissionsleistung ist dabei proportional zur Strahlleistung des vom System absorbierten Anregungsstrahls.

$$\frac{I_f}{I_0} = 10^{-\varepsilon_{\lambda}dc}$$

**Formel 5:** Lambert-Beer'sche Gesetz für die Fluoreszenz

Mit der Quantenausbeute  $Q$  ist  $I_f$ , der Lichtanteil der als Fluoreszenz emittiert wird:

$$I_f = Q \cdot I_0(1 - 10^{-\varepsilon_{\lambda}dc})$$

**Formel 6:** Lichtanteil der als Fluoreszenz emittiert wird

Für sehr kleine Werte von  $\varepsilon_{\lambda}dc$  ( $1 - 10^{-\varepsilon_{\lambda}dc} \ll 1$ ), wie sie bei geringen Fluorophorkonzentrationen auftreten, kann die Formel 6 vereinfacht und linearisiert werden, siehe Formel 7.<sup>67,66</sup>

$$I_f \approx 2,303 \cdot Q \cdot I_0 \cdot \varepsilon_{\lambda}dc$$

**Formel 7:** Vereinfachte Formel für die Intensität des Fluoreszenzlichts

In der Analytik sind fluorimetrische Verfahren wegen ihrer sehr hohen Sensitivität und Selektivität vor allem für die Bestimmung im Spurenbereich interessant. Die erhöhte Empfindlichkeit kommt dadurch zustande, dass der konzentrationsbezogene Parameter für Fluorimetrie  $F$  direkt proportional der Strahlungsleistung der Quelle  $I_0$  ist. Die Fluoreszenzintensität kann unabhängig von  $I_0$  gemessen werden. Im Gegensatz dazu erfordert die Extinktionsmessung sowohl die Erfassung von  $I_0$  als auch von  $I$ , da die Extinktion, die proportional zur Konzentration ist, vom Verhältnis dieser beiden Größen abhängt (siehe Formel 1). Die Empfindlichkeit einer fluorimetrischen Methode kann durch Erhöhung von  $I_0$  oder durch weitere Verstärkung des Fluoreszenzsignals verbessert werden. Aufgrund der Hintergrundfluoreszenz und der Signale aufgrund von Streuung ist das Fluoreszenzsignal in Wirklichkeit nicht null, wenn die Konzentration des Analyten null ist. Im Gegensatz zur Spektralphotometrie ergibt sich bei Zunahme von  $I_0$  eine entsprechende Änderung von  $P$ , weshalb man scheitert, die Extinktion  $A$  zu bestimmen. Daher besitzen fluorimetrische Methoden generell Nachweisgrenzen, die ein bis drei Größenordnungen besser sind als die der entsprechenden spektralphotometrischen Verfahren. Außerdem haben fluorimetrische Verfahren normalerweise einen größeren linearen dynamischen Bereich als die entsprechenden Absorptionmethoden. Damit sind die Kalibrierkurven oft in einem Bereich linear, der kurz oberhalb der Nachweisgrenze beginnt und bis zu einem Punkt reicht, an dem Absorption und damit der Einfluss des primären inneren Filters maßgebend werden. Die erhöhte Selektivität im Vergleich zu den Absorptionmethoden kommt dadurch zustande, dass sowohl die Anregungs- als auch die Emissionswellenlängen variiert werden können. Andererseits ist die Reproduzierbarkeit fluorimetrischer Verfahren schlechter als die der spektralphotometrischen Verfahren, da durch Begleitsubstanzen und Partikel in der Probe zusätzliche Fluoreszenz und Streuung aber auch Fluoreszenzlöschung auftreten kann.<sup>66</sup>

Neben der Emission von Fluorophoren kann aber auch ihre Fluoreszenzlöschung zur Analyse herangezogen werden. Die Fluoreszenzlöschung – auch Quenchen genannt – wird durch andere Moleküle verursacht. Sie resultiert aus einem nicht strahlenden Energietransfer von einer angeregten Spezies auf andere Moleküle und wird durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben, vgl. Formel 8. Dabei ist  $K_q$  die Stern-Volmer-(Quenching)-Konstante,  $[Q]$  die Konzentration des Quenchers,  $F_0$  die Fluoreszenzintensität vor und  $F$  die Fluoreszenzintensität nach der Löschung.

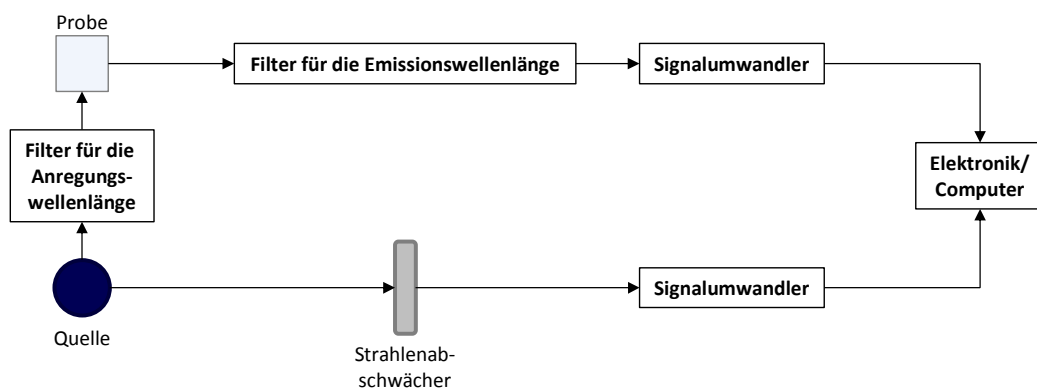
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \cdot [Q]$$

**Formel 8:** Stern-Volmer-Gleichung

Trägt man  $\frac{F_0}{F}$  in Abhängigkeit von  $[Q]$  auf, so erhält man die Stern-Volmer-Konstante  $K_q$  aus der Steigung der Geraden, die ein Maß für die Quenchstärke des Fluoreszenzlöschers darstellt. Der Achsenabschnitt der Auftragung ist dabei eins.

Die Fluoreszenzlöschung kann entweder dynamisch, durch Kontakt zwischen Fluorophor und Quencher, oder statisch sein. Die dynamische Löschung ist von der Diffusionsgeschwindigkeit der beiden Partner zueinander abhängig, im Gegensatz dazu bilden bei der statischen Fluoreszenzlöschung der Quencher und der Fluorophor einen Komplex im Grundzustand. Sowohl die dynamische als auch die statische Fluoreszenzlöschung lässt sich mit der Stern-Volmer-Gleichung beschreiben, wobei bei der statischen Löschung die Stern-Volmer-Konstante  $K_q$  die Bildungskonstante des Fluorophor-Quencher-Komplexes darstellt. Eine dritte Art der Fluoreszenzlöschung ist die Förster-Quenchung. Bei dieser kommt es ohne Kollision zwischen den Molekülen zu einer Energieübertragung, die durch Dipol-Dipol-Kopplung zwischen den beiden Spezies entsteht. Hierbei ist die Abhängigkeit der Löschung von der Quencherkonzentration kompliziert und kann nicht mit der Stern-Volmer-Gleichung beschrieben werden.<sup>66</sup>

Der Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers ist in Abbildung 20 schematisch dargestellt. Die Strahlung der Lichtquelle wird in zwei Strahlen geteilt (Doppelstrahl-optik), um Fluktuationen und Veränderungen der Strahlungsleistung auszugleichen.



**Abbildung 20:** Komponenten eines Fluorimeters. In Anlehnung an D. A. Skoog<sup>66</sup>

Nach dem Passieren eines Selektors (Monochromator oder Filter) tritt die ausgewählte Anregungswellenlänge des oberen Probestrahls auf die Probe. Hierbei wird zur Minimierung von Streuung die Fluoreszenzstrahlung im rechten Winkel zum anregenden Strahl beobachtet. Nach dem Durchqueren eines weiteren Selektors, der die Fluoreszenzemission isoliert, trifft die Strahlung auf einen Multiplier und wird zur Messung in ein elektrisches Signal umgewandelt. Der untere Referenzstrahl durchquert einen Strahlenabschwächer, wo er um den Faktor 100 abgeschwächt wird, tritt auf einen zweiten Photomultiplier und wird in ein elektrisches Referenzsignal umgewandelt. Aus dem Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzemission zu der Anregungsquelle wird aus den verarbeiteten elektrischen Signalen, ein Spektrum erzeugt.<sup>66</sup>

Metall-Nanopartikel können die Fluoreszenz eines Fluorophors entweder verstärken oder löschen. Wie bereits in Kapitel 4.7 erwähnt, weisen Edelmetall-Nanopartikel außerordentliche elektromagnetische Eigenschaften auf, die durch die resonante Wechselwirkung von Licht und den kollektiven Schwingungen ihrer Leitungselektronen – den Oberflächenplasmonen – zustande kommen. Diese Oberflächenplasmonenresonanz bildet ein elektromagnetisches Feld, das sogenannte Plasmonenfeld.<sup>89</sup> Befindet sich ein Nanopartikel mit einem starken Plasmonenfeld in der Nähe eines Fluorophors, so interagieren die Elektronen des Fluorophors, die für die Anregung sowie Emission zuständig sind, mit diesem Plasmonenfeld und es kommt zur Löschung oder Verstärkung der Fluoreszenz des Fluorophors. Das Plasmonenfeld kann die Anregungszerfallsrate des Fluorophors erhöhen und eine Verstärkung der Fluoreszenzemission bewirken oder durch die Dipol-Energie um die Partikel herum die Quantenausbeute des Fluorophors reduzieren, was zu einer Fluoreszenzlöschung führt. Die Änderung der Fluoreszenz wird durch die Stärke des erzeugten Plasmonenfeldes bestimmt. Diese hängt vom Metalltyp, der Größe, der Oberflächenmodifizierung des Nanopartikels sowie von der Wellenlänge des einfallenden Lichts und von der Entfernung des Fluorophors zum Nanopartikel ab.<sup>90</sup> Dabei spielt die Entfernung eine entscheidende Rolle. *Dulkeith et al.* haben bei ihren Untersuchungen festgestellt, dass Molekülabstände von 1-2 nm, die durch Alkylketten  $(\text{CH}_2)_n$  eingeführt werden können, zur Fluoreszenzlöschung von 99,8 % führen. Für  $n = 16$ , was einem Abstand von 3,6 nm entspricht, konnten sie eine Löschung von 92 % messen. Für  $n \geq 20$  müssen zur Vergrößerung des Abstands DNA-Einzelstränge eingesetzt werden, da solch lange Kohlenstoffketten zu „knicken“ beginnen. Für  $\text{DNA}_8$  (8 Basenpaare, Abstand 4,34 nm) und  $\text{DNA}_{43}$  (43 Basenpaare, Abstand

19,4 nm) konnte *Dulkeith* Fluoreszenzlöschungen von 95,8 und 53,8 % feststellen.<sup>91,92</sup> Eine Verstärkung der Fluoreszenz kann nur bei einer Entfernung von ungefähr 10 nm beobachtet werden und nur mit Fluorophoren, die im nahen Infrarotbereich absorbieren z.B. mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cypat.<sup>90</sup>

Somit sind Edelmetall-Nanopartikel überwiegend sehr starke Fluoreszenzlöcher und können nur unter bestimmten Bedingungen zur Fluoreszenzverstärkung herangezogen werden.

## 5 Experimenteller Teil

Dieses Kapitel beinhaltet die in dieser Arbeit eingesetzten Materialien und Methoden. Zuerst werden die Versuchsdurchführungen für die Bildung von Nanopartikeln in natürlichen Gewässern beschrieben und anschließend die Versuchsbeschreibungen für die Größentrennung von Edelmetall-Nanopartikel mittels Gelelektrophorese aufgeführt. Dabei wird ausführlich auf die Synthesen der Reagenzien und Lösungen sowie auf die angewandten analytischen Verfahren eingegangen.

### 5.1 Allgemein

Alle Experimente werden entsprechend den spurenanalytischen Arbeitsmethoden durchgeführt. Die Glasgefäße werden vor der Benutzung dreifach mit verdünnter  $\text{HNO}_3$  gespült, anschließend 4 h mit konz.  $\text{HNO}_3$  ausgedämpft, drei Mal mit Reinstwasser (UPW, engl.: *ultra pure water*) gespült und verschlossen in einer partikelfreien Umgebung aufbewahrt. Nach Kontakt mit Goldlösungen werden die Gefäße zusätzlich 24 h mit Königswasser vorbehandelt. Alle benutzten Reagenzien und Gebrauchsgegenstände werden auf Kontaminationen durch das jeweilige Metall überprüft. Sofern nichts angegeben ist, wurden keine Blindwerte gefunden.

### 5.2 Synthese von Citrat-stabilisierten Silber-Nanopartikeln

Die Silber-Nanopartikelsynthese erfolgt nach einer in der Arbeitsgruppe von Prof. Schuster, TU München entwickelten Methode, die sich an die von *Haiss et al.*<sup>93</sup> ausgearbeitete Methode anlehnt. Zur Synthese von 50 mL der Silber-Nanopartikelsuspension werden 42 mL UPW mit 6 mL Zitronensäure (1 Gew.-%) versetzt und 10 min bei RT gerührt. Nach Zugabe von 1 mL Silber-Standardlösung ( $\text{AgNO}_3$  in 0.5 M  $\text{HNO}_3$ , 1000 mg/L) und weiteren 10 min Rühren erfolgt rasch die Zugabe von 1 mL Natriumborhydridlösung, in der 0,15 g Natriumborhydrid in 2 mL Zitronensäure (1 Gew.-%) gelöst sind. Das Reaktionsgemisch wird weitere 10 min gerührt. Die so synthetisierte Nanopartikelsuspension wird mittels Dialyse von nicht reduzierten  $\text{Ag}^+$  und nichtumgesetzten Edukten getrennt. Dazu wird ein Dialyseschlauch (Ausschlussgrenze 3500 Da) eingesetzt, der für 30 min in UPW eingelegt und anschließend an einem Ende mit einer Dialyseklammer verschlossen wird. Der einseitig verschlossene Schlauch wird mit der

synthetisierten Ag-Nanopartikelsuspension befüllt, an dem anderen Ende mit einer zweiten Klammer verschlossen und in ein Becherglas mit 1 L UPW gegeben. Dort wird die Lösung unter Rühren bei RT unter Lichtausschluss für 48 h dialysiert, wobei nach 24 h das UPW erneuert wird. Nach der Dialyse wird die Nanopartikelsuspension bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt aufbewahrt.

### **5.3 Cloud Point Extraktion**

Für die CPE werden 40 mL Probe in einem Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit 400 µL 1 M NaOAc-Lösung, 100 µL 1,25 M Essigsäure, 1 mL einer gesättigten EDTA-Lösung und 1 mL einer 10 Gew.-% TX-114 (alle Lösungen in UPW) versetzt. Nach kräftigem Durchmischen der Probe wird diese für 45 min in einem Wasserbad bei 45 °C erwärmt. Im Anschluss daran wird zur Beschleunigung der Phasenseparation die Probe bei 5500 rpm 12 min zentrifugiert und anschließend 3 min in einem Eisbad abgekühlt. Nach dem Abdekantieren des wässrigen Überstands steht der Analyt in der Tensidphase für die Messung zur Verfügung.

### **5.4 ET-AAS Messung zur Konzentrationsbestimmung von Silber**

Die Silberkonzentration wird mittels ET-AAS bestimmt. Für die AAS-Messung wird ein AAnalyst 800 AAS Spektrometer (Perkin Elmer, Waltham, USA) mit einem transversal beheizbaren THGA 800 Graphitrohr verwendet. Als Inertgas dient Argon (99,996 %). Strahlungsquelle ist eine Silberhohlkathodenlampe (Photron, Victoria, Australien) mit einer Betriebsstromstärke von 10 mA. Die Messung wird bei einer Messwellenlänge von 328,1 nm durchgeführt. Alle Proben werden dreifach gemessen. Um Störungen des Messsignals durch Lichtstreuung und unspezifische Absorption zu beheben, wird die Zeeman-Untergrundkorrektur angewendet.

Die Bestimmung der Silberkonzentration in der in Kapitel 5.2 synthetisierten Suspension erfolgt nach dem in Tabelle 1 aufgeführten Graphitofen-Temperaturprogramm. Die Kalibrierung wird mit einer Silbernitratstandardlösung ( $\text{AgNO}_3$  in 0,5 M  $\text{HNO}_3$ , 1000 mg/L) durchgeführt. Aus der Standardlösung wird durch entsprechende Verdünnung eine Kalibrierreihe mit den Konzentrationen 1 µg/L, 2 µg/L und 6 µg/L hergestellt. Die Probe selbst wird vor der Messung entsprechend verdünnt. Zur Stabilisierung der Ionen werden die Kalibrier- und Probenlösungen mit 1,4 M Salpetersäure angesäuert.

**Tabelle 1:** Graphitofen-Temperaturprogramm für die Konzentrationsbestimmung der synthetisierten Silber-Nanopartikel. Die Messung erfolgt jeweils während des Atomisierungsschritts.

<b>Prozess</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Aufheizzeit [s]</b>	<b>Haltezeit [s]</b>	<b>Argon-Fluss [mL·min<sup>-1</sup>]</b>
<b>Trocknen 1</b>	110	1	30	250
<b>Trocknen 2</b>	130	15	30	250
<b>Pyrolyse</b>	800	10	20	250
<b>Atomisierung</b>	1700	0	5	0
<b>Ausheizen</b>	2450	1	3	250

Zur Bestimmung der Silberkonzentration in der Tensidphase wird diese vor der Messung mit 100 µl Ethanol versetzt und in ein Autosampler-Probengefäß überführt. 20 µL dieser Probe werden vollautomatisch in den Graphitrohrföfen der ET-AAS überführt und gemessen. In Tabelle 2 ist das Temperaturprogramm dargestellt, welches zur Bestimmung der Silber-Nanopartikelkonzentration verwendet wird.

**Tabelle 2:** Graphitofen-Temperaturprogramme für die Messung der Tensid-Phase nach der CPE von Silber-Nanopartikeln. Die Messung erfolgte jeweils während des Atomisierungsschritts.

<b>Prozess</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Aufheizzeit [s]</b>	<b>Haltezeit [s]</b>	<b>Argon-Fluss [mL·min<sup>-1</sup>]</b>
<b>Trocknen 1</b>	80	5	20	250
<b>Trocknen 2</b>	130	10	20	250
<b>Pyrolyse</b>	600	20	20	250
<b>Kühl-Schritt</b>	300	1	5	250
<b>Atomisierung</b>	1800	0	5	0
<b>Ausheizen</b>	2450	1	3	250

Die Kalibrierung erfolgt mit der synthetisierten Nanopartikelsuspension bekannter Konzentration (aus Kapitel 5.2). Aus dieser Stammlösung werden Verdünnungen mit UPW



im Bereich der erwarteten Analytkonzentration hergestellt. Die Endverdünnung der Kalibrierlösungen erfolgt auf ein Volumen von 40 mL in einem Zentrifugenröhrchen. Zu den Lösungen werden die CPE-Reagenzien (entsprechend Abschnitt 5.3) zugefügt und die CPE durchgeführt.

Nach der CPE erfolgt die ET-AAS Messung der Tensidphase wie oben beschrieben. Zur Auswertung wird die Signalintensität der Kalibrierlösung gegen den Silber-Nanopartikelgehalt in der Probe aufgetragen. Nach Aufstellen einer Regressionsgerade (siehe Anhang) kann die Ag-NP-Konzentration der Probe bestimmt werden.

## **5.5 Natürliche Silber-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat ohne Zugabe von Reduktionsmittel**

Die Bildung von Silber-Nanopartikeln aus Silbernitrat ohne Zugabe eines Reduktionsmittels wird in Abhängigkeit von der Silbernitratkonzentration, Inkubationszeit und -Temperatur untersucht. Um pH-Einflüsse zu vermeiden und den pH-Wert konstant zu halten wird ein 2,5 M NaOAc-Puffer (pH = 5) aus NaOAc und Essigsäure verwendet.

Dazu werden 40 mL UPW in ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 1 mL eines 2.5 M NaOAc-Puffers versetzt. Zu dieser Lösung wird eine bestimmte Konzentration einer Silberstandardlösung ( $\text{AgNO}_3$ , 100  $\mu\text{g/L}$  in 1,4 M  $\text{HNO}_3$ ) zugegeben, um eine  $\text{AgNO}_3$ -Konzentration von 150 ng/L, 100 ng/L, 50 ng/L und 20 ng/L im Zentrifugenröhrchen zu erreichen. Für die zeitabhängige Messung werden die Proben für 1 h, 2 h, 4 h und 24 h bei 23 °C (RT) im Dunkeln inkubiert. Um die Temperaturabhängigkeit zu untersuchen werden die Proben bei 7 °C (im Kühlschrank), 23 °C (RT), 45 °C und 60 °C (im Wasserbad) 1h im Dunkeln inkubiert. Jede Probe wird dreimal angesetzt. Zum Zeitpunkt Null und nach der Inkubation werden zu den Proben die CPE-Reagenzien (siehe Kapitel 5.3) zugegeben. Nach der CPE wird der Nanopartikelgehalt der Tensidphase mit der ET-AAS bestimmt (siehe Kapitel 5.4). Die Kalibrierlösungen werden wie in Kapitel 5.4 beschrieben hergestellt, wobei die Endverdünnung der Kalibrierlösungen auf ein Volumen von 41 mL (40 mL UPW und 1 mL 2,5 M NaOAc-Puffer) erfolgt.

## **5.6 Silber-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat und NOM mit 2,5 M NaOAc-Puffer**

Die Ag-NP-Bildung aus  $\text{AgNO}_3$  mit NOM wird mit zwei verschiedenen NOM-Referenzmaterialien, Suwannee River- (SR-) und Nordic Reservoir- (NR-) NOM untersucht. Analysiert wird der Einfluss der NOM-Konzentration, der Inkubationszeit und der Temperatur auf die Ag-NP-Bildung.

Dazu werden 40 mL einer 20 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L oder 0 mg/L der jeweiligen NOM-Lösung in ein Polypropylen (PP)-Zentrifugenröhrchen gegeben, mit 1 mL eines 2,5 M NaOAc-Puffers und mit 150 ng/L  $\text{AgNO}_3$  ( $\text{AgNO}_3$ , 100  $\mu\text{g/L}$  in 1,4 M  $\text{HNO}_3$ ) versetzt. Die so hergestellten Proben werden für die zeitabhängige Messung 1 h, 2 h, 4 h und 24 h bei 23 °C (RT) im Dunkeln inkubiert. Um die Temperaturabhängigkeit zu untersuchen, werden die Proben bei 7 °C (im Kühlschrank), 23 °C (RT), 45 °C und 60 °C (im Wasserbad) 1 h im Dunkeln aufbewahrt. Jede Probe wird dreimal angesetzt. Zum Zeitpunkt Null und nach der Inkubation werden zu den Proben die CPE-Reagenzien (siehe Kapitel 5.3) zugegeben. Nach der CPE, wird der Nanopartikelgehalt der Tensidphase mit der ET-AAS bestimmt (siehe Kapitel 5.4). Die Kalibrierlösungen werden wie in Kapitel 5.4 beschrieben hergestellt, wobei die Endverdünnung der Kalibrierlösungen auf ein Volumen von 41 mL (40 mL UPW und 1 mL 2,5 M NaOAc-Puffer) erfolgt.

## **5.7 Adsorption von Nanopartikeln und Ionen an die Polypropylen-Gefäßwand des Reaktionsgefäßes**

Da in vorherigen Untersuchungen (siehe Kapitel 5.5 und 5.6) unter Verwendung des 2,5 M NaOAc-Puffers (Essigsäure/Acetat-Puffer) eine erhöhte Silberkonzentrationsabnahme festgestellt werden konnte, wird die Adsorption von Silber-Nanopartikeln, Silber-Ionen und Silbersulfid-Nanopartikeln an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes in einer 62,5 mM NaOAc-Puffer-Lösung (unter Zugabe von 2,5 M NaOAc-Puffer) untersucht. Des Weiteren wird diese mit der Adsorption der Silber-Nanopartikel und Ionen an die Gefäßwand des Reaktionsgefäßes ohne Zugabe von Puffer (in UPW) und mit der Adsorption an die Gefäßwand bei Zugabe einer 2,5 M NaOAc-Lösung (in einer 62,5 mM NaOAc-Lösung) verglichen. Diese Adsorptionsversuche werden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und -temperatur durchgeführt. Des Weiteren wird der Einfluss verschiedener Additive, wie NOM und EDTA auf die Adsorption von Ag-NP, -

Ionen und Ag<sub>2</sub>S-NP an die Gefäßwand nach 24 h Inkubation bei verschiedenen Inkubationstemperaturen nach Zugabe des 2,5 M NaOAc-Puffers untersucht.

### **5.7.1 Untersuchungen zur Adsorption von Silber-Ionen und -Nanopartikeln an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes**

Es wird die Adsorption von Silber-Nanopartikeln an die Gefäßwand nach Zugabe eines 2,5 M NaOAc-Puffers, einer 2,5 M NaOAc-Lösung und in UPW untersucht und mit der Adsorption von Silber-Ionen an die Gefäßwand des Reaktionsgefäßes bei Zugabe eines 2,5 M NaOAc-Puffer und ohne Puffer verglichen. Diese Adsorptionsversuche werden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und -temperatur durchgeführt.

Für die Untersuchung der Adsorption von Nanopartikeln an die Gefäßwand des Reaktionsgefäßes werden 40 mL UPW in ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (A) gegeben und je nach Ansatz entweder mit 1 mL eines 2,5 M NaOAc-Puffers, einer 2,5 M NaOAc-Lösung oder UPW versetzt. Zu dieser Lösung werden 328 µL der Ag-NP-Suspension (aus Kapitel 5.2) zugegeben, um eine Ag-NP-Konzentration von 600 ng/L im Zentrifugenröhrchen zu erreichen. Anschließend werden die Proben 1 h, 2 h, 4 h und 24 h bei 7 °C (im Kühlschrank), 23 °C (RT), 45 °C und 60 °C (im Wasserbad) im Dunkeln inkubiert. Jede Probe wird dreimal angesetzt. Nach der Inkubation werden die Proben aus Röhrchen (A) in ein neues Zentrifugenröhrchen (B) überführt. Aus (B) werden 10 mL entnommen und in ein drittes Zentrifugenröhrchen (C) gegeben, welches mit 30 mL UPW und je nach Ansatz mit 1 mL 2,5 M NaOAc-Puffer, NaOAc-Lösung oder UPW gefüllt ist. Zu (C) werden die CPE-Reagenzien (siehe Kapitel 5.3) zugegeben. Nach der CPE, wird der Nanopartikelgehalt der Tensidphase mit der ET-AAS bestimmt (siehe Kapitel 5.4). Die Kalibrierlösungen werden wie in Kapitel 5.4 beschrieben hergestellt, wobei die Endverdünnung der Kalibrierlösungen auf ein Volumen von 41 mL (40 mL UPW und je nach Ansatz 1 mL 2,5 M NaOAc-Puffer, NaOAc-Lösung oder UPW) erfolgt. Die leeren Röhrchen (A) werden mit 40 mL UPW gewaschen und mit 10 mL eines 1:10 verdünnten Königswassers versetzt. Nach 24 h Inkubation wird der Silbergehalt der Proben mit der ET-AAS nach Kapitel 5.4 bestimmt. Die zugehörigen Kalibrierlösungen werden 1:10 mit Königswasser angesäuert.

Für die Untersuchung der Adsorption von Ionen an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes werden 40 mL UPW in ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (D) gegeben und je

nach Ansatz entweder mit 1 mL eines 2.5 M NaOAc-Puffers oder mit 1 mL UPW versetzt. Zu dieser Lösung werden 246  $\mu\text{L}$  einer Silbernitrat-Standardlösung (100  $\mu\text{g/L}$   $\text{AgNO}_3$  in 0,14 M  $\text{HNO}_3$ ) zugegeben, um eine  $\text{AgNO}_3$ -Konzentration von 600 ng/L im Zentrifugenröhrchen zu erreichen. Anschließend werden die Proben 1 h, 4 h und 24 h bei 7 °C (im Kühlschrank), 23 °C (RT), 45 °C und 60 °C (im Wasserbad) im Dunkeln inkubiert. Jede Probe wird dreimal angesetzt. Nach der Inkubation werden die Proben verworfen. Die leeren Röhrchen (D) werden mit 40 mL UPW gewaschen und mit 10 mL eines 1:10 verdünnten Königswassers versetzt. Nach 24 h Inkubation wird der Silbergehalt der Proben mit der ET-AAS wie in Kapitel 5.4 beschrieben bestimmt, wobei die zugehörigen Kalibrierlösungen 1:10 mit Königswasser angesäuert werden.

### **5.7.2 Synthese von silbersulfidbeschichteten Silber-Nanopartikeln ( $\text{Ag}_2\text{S-NP}$ )**

Zur Herstellung von  $\text{Ag}_2\text{S-NP}$  werden 10 mL einer Citrat-stabilisierten Ag-NP-Suspension (aus Kapitel 5.2) mit 200  $\mu\text{L}$  einer 0,01 M Natriumsulfid-Lösung versetzt. Diese Reaktionslösung wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die so synthetisierte Nanopartikelsuspension wird mittels Dialyse (vgl. Kapitel 5.2) gereinigt und anschließend wird die Ag-Konzentration dieser Suspension wie in Kapitel 5.4 beschrieben bestimmt.

### **5.7.3 Untersuchungen zur Adsorption von Silbersulfid-Nanopartikeln an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes**

40 mL UPW werden in ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (E) gegeben und mit 1 mL eines 2.5 M NaOAc-Puffers versetzt. Zu dieser Lösung wird eine bestimmte Konzentration einer Silbersulfid-Nanopartikelsuspension (aus Kapitel 5.7.2) zugegeben, um eine NP-Konzentration von 600 ng/L im Zentrifugenröhrchen zu erreichen. Anschließend werden die Proben 24 h bei 7 °C (im Kühlschrank), 23 °C (RT), 45 °C und 60 °C (im Wasserbad) im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben aus Röhrchen (E) in ein neues Röhrchen (F) überführt. Aus (F) werden 10 mL entnommen und in ein drittes Zentrifugenröhrchen (G) gegeben, welches mit 30 mL UPW und 1 mL 2,5 M NaOAc-Puffer gefüllt ist. Zu (G) werden die CPE-Reagenzien (siehe Kapitel 5.3) zugegeben. Nach der CPE, wird der Nanopartikelgehalt der Tensidphase mit der ET-AAS bestimmt (siehe Kapitel 5.4). Die Kalibrierlösungen werden wie in Kapitel 5.4 beschrieben hergestellt, wobei die Endverdünnung der Kalibrierlösungen auf ein

Volumen von 41 mL (40 mL UPW und 1 mL 2,5 M NaOAc-Puffer) erfolgt. Mit den leeren Röhrrchen (E) wird analog Kapitel 5.7.1 verfahren.

#### **5.7.4 Adsorption von Silber-Nanopartikeln und Silbersulfid-Nanopartikeln an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes in einer 0,1 mg/L SR-NOM-Lösung mit 2,5 M NaOAc-Puffer**

40 mL einer 0,1 mg/L SR-NOM-Lösung werden in ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (H) gegeben und mit 1 mL eines 2,5 M NaOAc-Puffers versetzt. Zu dieser Lösung wird je nach Ansatz entweder eine bestimmte Konzentration einer Silber-Nanopartikel-suspension (aus Kapitel 5.2) oder einer Silbersulfid-Nanopartikelsuspension (aus Kapitel 5.7.2) zugegeben, um eine NP-Konzentration von 600 ng/L im Zentrifugenröhrchen zu erreichen. Anschließend werden die Proben für 24 h bei 7 °C (im Kühlschrankschrank), 23 °C (RT), 45 °C und 60 °C (im Wasserbad) im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben verworfen. Mit den leeren Röhrrchen (H) wird analog Kapitel 5.7.1 verfahren.

#### **5.7.5 Adsorption von Silber-Nanopartikeln und -Ionen an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes bei Zugabe von EDTA mit 2,5 M NaOAc-Puffer**

40 mL UPW werden in ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 1 mL eines 2,5 M NaOAc-Puffers und 1 mL einer gesättigten EDTA-Lösung versetzt. Zu dieser Lösung wird je nach Ansatz eine bestimmte Konzentration einer Silber-Nanopartikelsuspension (I) (aus Kapitel 5.2) oder einer Silbernitratlösung (K) (aus Kapitel 5.7.1) zugegeben, um eine Silberkonzentration von 600 ng/L im Zentrifugenröhrchen zu erreichen. Anschließend werden die Proben (I und K) für 24 h bei 7 °C (im Kühlschrankschrank), 23 °C (RT), 45 °C und 60 °C (im Wasserbad) im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben im Falle des NP-Ansatzes aus Röhrchen (I) in ein neues Röhrchen (L) überführt. Im Falle der Ionen wird die Probe verworfen. Aus (L) werden 10 mL entnommen und in ein drittes Zentrifugenröhrchen (M) gegeben, welches mit 30 mL UPW und 1 mL des 2,5 M NaOAc-Puffer gefüllt ist. Zu (M) werden die CPE-Reagenzien (siehe 5.3) zugegeben. Nach der CPE, wird der Nanopartikelgehalt der Tensidphase mit der ET-AAS (siehe Kapitel 5.4) bestimmt. Die Kalibrierlösungen wer-

den wie in Kapitel 5.4 beschrieben hergestellt, wobei die Endverdünnung der Kalibrierlösungen auf ein Volumen von 41 mL (40 mL UPW und 1 mL 2,5 M NaOAc-Puffer) erfolgt. Mit den leeren Röhrchen (K) wird analog Kapitel 5.7.1 verfahren.

## **5.8 Silber-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat und SR-NOM**

Die Ag-NP-Bildung wird mittels Reduktion von Silbernitrat mit SR-NOM ohne Zugabe des 2,5 M NaOAc-Puffers untersucht. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird kurz vor der CPE durch Zugabe von 0,1 M  $\text{NH}_3$  auf pH = 5 angehoben. Es wird die NOM-,  $\text{AgNO}_3$ -Konzentrationsabhängigkeit, der Lichteinfluss sowie die Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Ag-NP-Bildung untersucht.

### **5.8.1 Herstellung der SR-NOM-Lösungen**

20 mg SR-NOM werden in 1 L UPW gelöst. Aus dieser Stocklösung werden eine 1 mg/L NOM-Lösung und eine 5 mg/L-NOM-Lösung hergestellt. Die 0,1 mg/L NOM-Lösung wird aus der 1 mg/L NOM-Lösung erzeugt.

### **5.8.2 TOC-Messung der NOM-Stock-Lösung**

Der TOC-Gehalt der NOM-Stocklösung wird mit Hilfe des *TOC-L* Analysators bestimmt. Dazu wird ein Probenprogramm über die Bedienoberfläche eingestellt, welches aus folgenden vier Schritten besteht: Spülen, Kalibrierung, Messung und erneutes Spülen.

- Für den Spülschritt werden die TOC-Gefäße mit UPW befüllt.
- Zur Kalibrierung wird eine 1000 mg/L Kaliumhydrogenphthalat-Standardlösung hergestellt. Dazu werden 2,125 g Kaliumhydrogenphthalat in 1 L UPW gelöst. Aus dieser werden weitere Standardlösungen mit 100 mg/L und 10 mg/L Kaliumhydrogenphthalat angesetzt. Die Kalibrierung erfolgt vollautomatisch, hierzu werden die TOC-Gefäße mit einer Kalibrierlösung eines bestimmten Kohlenstoffgehalts befüllt. Der TOC-Analysator verdünnt diese Kalibrierlösungen vollautomatisch und führt sie in die Messeinheit ein. Dabei muss darauf geachtet werden, dass nur eine maximale Verdünnung von 1:50 möglich ist, weshalb die Kalibrierlösungen vorher durch manuelles Verdünnen entsprechend angepasst werden müssen.

- Für die Messung der NOM-Stocklösung wird diese in das TOC-Gefäß gegeben. Die Messung erfolgt nach dem in Kapitel 4.4 beschriebenem Prinzip, wobei die Entfernung des anorganischen Kohlenstoffs mit Salzsäure und synthetischer Luft (79,5 % N<sub>2</sub> und 20,5 % O<sub>2</sub>) erfolgt.
- Nach der Messung wird erneut mit UPW gespült, um mögliche Kontaminationen zu beseitigen.

### 5.8.3 Herstellung der Proben für die Untersuchung der Ag-NP-Bildung aus AgNO<sub>3</sub> und NOM

40 mL einer (je nach Ansatz) 5 mg/L, 1 mg/L oder 0,1 mg/L NOM-Lösung werden in ein PP-Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend werden zu jeder Probe je nach Ansatz 150 ng/L, 100 ng/L oder 50 ng/L AgNO<sub>3</sub> (AgNO<sub>3</sub>, 100 µg/L in 0,14 M HNO<sub>3</sub>) zugegeben und die Proben werden 1 h, 4 h und 24 h bei 7 °C (im Kühlschrank), 23 °C (RT), 45 °C und 60 °C (im Wasserbad) im Dunkeln inkubiert.

Zur Untersuchung des Lichteinflusses werden zu 40 mL einer 0,1 mg/L NOM-Lösung in einem Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 100 ng/L AgNO<sub>3</sub> (AgNO<sub>3</sub>, 100 µg/L in 0,14 M HNO<sub>3</sub>) zugegeben. Die eine Hälfte der Proben wird 1 h, 4 h und 24 h bei 23 °C im Tageslicht und die andere Hälfte im Dunkeln inkubiert. Jede Probe wird dreimal angesetzt. Nach der Inkubation erfolgt die Zugabe von 50 µL einer 0,1 M NH<sub>3</sub>-Lösung und der CPE-Reagenzien (siehe Kapitel 5.3). Nach der CPE, wird der Nanopartikelgehalt der Tensidphase mit der ET-AAS bestimmt (siehe Kapitel 5.4). Die Kalibrierlösungen werden wie in Kapitel 5.4 beschrieben hergestellt.

## 5.9 Silbersulfid-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat, Natriumsulfid und SR-NOM

Zuerst wird der Einfluss der Schwefelkonzentration (durch Zugabe verschiedener Konzentrationen Na<sub>2</sub>S) auf die Ag<sub>2</sub>S-NP-Bildung aus AgNO<sub>3</sub> in Abhängigkeit von der Zeit (bei 60 °C, im Dunkeln) untersucht. Anschließend wird die Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Ag<sub>2</sub>S-NP-Bildung aus AgNO<sub>3</sub> unter Zugabe von 4 mM Na<sub>2</sub>S in einer 0,1 mg/L NOM-Lösung ermittelt.

Für die Untersuchung des Schwefeleinflusses werden zu 40 mL einer 0,1 mg/L NOM-Lösung in einem PP-Zentrifugenröhrchen verschiedene Na<sub>2</sub>S Konzentrationen (0,4 µM, 4 µM, 40 µM, 400 µM und 4 mM) und 150 ng/L AgNO<sub>3</sub> (AgNO<sub>3</sub>, 100 µg/L in 0,14 M

HNO<sub>3</sub>) zugegeben. Die Proben werden 1 h, 4 h und 24 h bei 60 °C im Wasserbad, im Dunkeln inkubiert.

Zur Untersuchung der Temperatur- und Zeitabhängigkeit werden zu 40 mL einer 0,1 mg/L NOM-Lösung in einem Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 800 µL einer 0,2 M Na<sub>2</sub>S-Lösung (in UPW) und 150 ng/L AgNO<sub>3</sub> (AgNO<sub>3</sub>, 100 µg/L in 0,14 M HNO<sub>3</sub>) zugegeben. Die Proben werden 1 h, 4 h und 24 h bei 7 °C (im Kühlschrank), 23 °C (RT), 45 °C und 60 °C (im Wasserbad) im Dunkeln inkubiert.

Jede Probe wird dreimal angesetzt. Nach der Inkubation erfolgt die Zugabe von 50 µL einer 0,1 M NH<sub>3</sub>-Lösung und der CPE-Reagenzien (siehe Kapitel 5.3). Nach der CPE, wird der Nanopartikelgehalt der Tensidphase mit der ET-AAS bestimmt (siehe Kapitel 5.4). Als Blank dienen 40 mL UPW. Die Kalibrierlösungen werden wie in Kapitel 5.4 beschrieben hergestellt.

### **5.10 Ionenfreisetzung aus Citrat-stabilisierten Ag-Nanopartikeln**

40 mL UPW oder je nach Ansatz 40 mL einer 0,1 mg/L NOM-Lösung werden in einem PP-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Zu dieser Lösung werden 150 ng/L Ag-NP (aus Kapitel 5.2) hinzugegeben. Anschließend werden die Proben 1 h, 4 h und 24 h bei 7 °C (im Kühlschrank), 23 °C (RT), 45 °C und 60 °C (im Wasserbad) im Dunkeln inkubiert. Jede Probe wird dreimal angesetzt. Nach der Inkubation erfolgt die Zugabe von 50 µL einer 0,1 M NH<sub>3</sub>-Lösung und der CPE-Reagenzien (siehe Kapitel 5.3). Nach der CPE, wird der Nanopartikelgehalt der Tensidphase mit der ET-AAS bestimmt (siehe Kapitel 5.4). Die Kalibrierlösungen werden wie in Kapitel 5.4 beschrieben hergestellt.

### **5.11 Größenbestimmung der Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP mittels SP-ICP-MS**

Für die SP-ICP-MS-Messung wird ein 7700x ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit einem ASX-520 Autosampler (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet. Die Messung der Probe erfolgt vollautomatisch, mit einer Pumpgeschwindigkeit der Peristaltikpumpe von 0.325 mL/min ( $\pm 4 \cdot 10^{-4}$ ) und einer Messzeit des Detektors von 3.0 Millisekunden. Die Dauer einer Messung beträgt dabei 1 min und ergibt 20.000 Messpunkte je Probe. Jede Messung erfolgt drei Mal. Weitere Messbedingungen für die Größenbestimmung sind Tabelle 3 zu entnehmen.



**Tabelle 3:** ICP-MS Systemparameter für die Messung von Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP im Einzelpartikel Modus

<b>Stabilisierungszeit</b>	1 min
<b>Helium Modus</b>	aus
<b>Spülschritt Nr. 1</b>	HNO <sub>3</sub> (1 %) + HCl (5 %)
<b>Spülschritt Nr. 2</b>	HNO <sub>3</sub> (1 %)
<b>Spülschritt Nr. 3</b>	UPW
<b>m/z-Verhältnis für Ag</b>	107 u e <sup>-1</sup>

Um Kontaminationen während der Messung zu vermeiden, befindet sich der Autosampler in einer Laminar Flow-Box *LFB-457 MP610E* (Max Petek, Radolfzell).

#### **5.11.1 Probenvorbereitung für die Größenbestimmung der Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP mittels SP-ICP-MS**

Die Proben werden nach Kapitel 5.8.3 und 5.9 hergestellt. Nach der CPE werden zu der Tensidphase 500 µL Ethanol und 9 mL UPW zugegeben. Nach leichtem Schütteln wird die Probe in den Autosampler gestellt.

#### **5.11.2 Kalibrierung für die Größenbestimmung der Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP mittels SP-ICP-MS**

Zur Bestimmung der Transporteffizienz, einem Faktor, der die Anzahl der Partikel angibt, die tatsächlich den Detektor erreichen, wird eine 30 nm Au-NP-Suspension (Postnova, Landsberg am Lech) mit einer Konzentration von 55 ng/L im SP-ICP-MS Modus gemessen. Da dieser Faktor für alle Metall-NP nahezu identisch ist, kann eine Kalibrierung mit sphärischen Au-NP durchgeführt werden, weil diese in einer besseren Größenverteilung als Ag-NP erhalten werden können und besser stabilisiert sind. Die Kalibrierung auf die Partikelgröße erfolgt ebenfalls mit dieser Au-NP-Suspension. Jeder detektierte Au-NP liefert ein Signal, dabei ist die Intensität der Signale abhängig von der Partikelgröße. Da die Signalintensität jedoch elementspezifisch ist, wird eine weitere Kalibrierung mit einer ionischen Ag-Standardlösung (AgNO<sub>3</sub> in 0,5 M HNO<sub>3</sub>, 1 µg/L) durchgeführt, um die Elementsensitivität zu ermitteln. Dazu wird die ionische Lösung im SP-ICP-MS Modus gemessen und aus der Messzeit sowie der Konzentration wird die Elementsensitivität bestimmt.

### 5.11.3 Auswertung der ermittelten Daten zur Größenbestimmung der Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP mittels SP-ICP-MS

Für die Auswertung der ermittelten Daten wird eine von dem *National Institute of Food Safety in the Netherlands* (RIKILT) zur Verfügung gestellte Excel-Arbeitsmappe verwendet, in welche die gemessenen Parameter eingegeben werden. Die Größenberechnung setzt voraus, dass die Partikel sphärisch sind und dass die gebildeten Partikel Ag-NP sind.

## 5.12 Zeta-Potential

Für die qualitative Charakterisierung der Oberflächenladung der Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP wird ein *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien) verwendet. Zur Bestimmung des Zeta-Potentials werden 0,5 mL der jeweiligen dialysierten NP-Suspension (vgl. Kapitel 5.2 und 5.7.2) in 9,5 mL HCl gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung, der ca. 1,5 beträgt wird in 0,7 Schritten mittels (0,1 M; 0,2 M; 0,5 M) NaOH erhöht und das jeweilige Zeta-Potential bei diesem pH-Wert wird gemessen. Das Zeta-Potential wird bei jedem pH-Wert dreifach bestimmt, wobei eine Bestimmung 50 Mal wiederholt wird.

## 5.13 Nanopartikelsynthese für die Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese werden Nanopartikelsuspensionen mit einer Konzentration im oberen mg/L-Bereich benötigt. Diese werden wie folgt hergestellt:

### 5.13.1 Gold-Nanopartikelsynthese

Die Gold-NP-Synthese erfolgt nach *Frens et al.*<sup>94</sup> Es werden zwei verschiedene NP-Suspensionen mit den Größen 25 und 41 nm hergestellt. Dazu werden 50 mL UPW mit einem bestimmten Volumen, je nach gewünschter NP-Konzentration einer HAuCl<sub>4</sub>-Lösung (1,77 Gew.-%) versetzt und zum Sieden erhitzt. Für die Synthese der 25 nm großen Au-NP werden zu der Lösung unter ständigem Rühren schnell, in einem Satz 1,5 mL einer 1 Gew.-% Natriumcitrat-Lösung und für die Synthese der 41 nm großen Partikel 1 mL der 1 Gew.-% Natriumcitrat-Lösung zugegeben. Die Lösung wird zuerst farblos, dann schwarz blau und färbt sich anschließend tiefrot. Bei Zugabe von 562 µL

einer 1,77 Gew.-% HAuCl<sub>4</sub>-Lösung erhält man mit dieser Synthese Nanopartikel mit einer Konzentration von ca. 150 mg/L.

### 5.13.2 Silber-Nanopartikelsynthese

Die Silber-Nanopartikelsynthese erfolgt nach Kapitel 5.2. Die synthetisierten Citrat-stabilisierten NP werden nicht dialysiert, sondern in mehreren Fraktionen bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen. Die NP-Fractionen werden anschließend in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und im Ultraschallbad suspendiert.

### 5.13.3 Palladium-Nanopartikelsynthese

Die Palladium-NP werden nach einer Methode, welche in der Arbeitsgruppe von Prof. Schuster, TU München entwickelt wurde synthetisiert. Dazu werden 150 mg NaBH<sub>4</sub> in 2 mL einer 1 Gew.-% Zitronensäurelösung in UPW gelöst und 30 Minuten unter Gasentwicklung in einem Eisbad gekühlt. In einem Erlenmeyerkolben werden 46 mL UPW mit 3 mL einer 1 Gew.-% Zitronensäurelösung versetzt und für 10 Minuten gerührt. Im Anschluss werden 500 µL Palladium-Standardlösung (Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in 0.5 M HNO<sub>3</sub>, 1000 mg/L) zugegeben. Nach 10 min Rühren werden in den Erlenmeyerkolben zügig 500 µL der zuvor hergestellten NaBH<sub>4</sub>-Zitronensäurelösung gegeben. Die Lösung färbt sich zuerst gelb-orange und anschließend grau. Nach weiteren 10 min Rühren bei RT wird die so hergestellte Partikelsuspension für drei Stunden bei 0 °C ins Ultraschallbad gestellt.

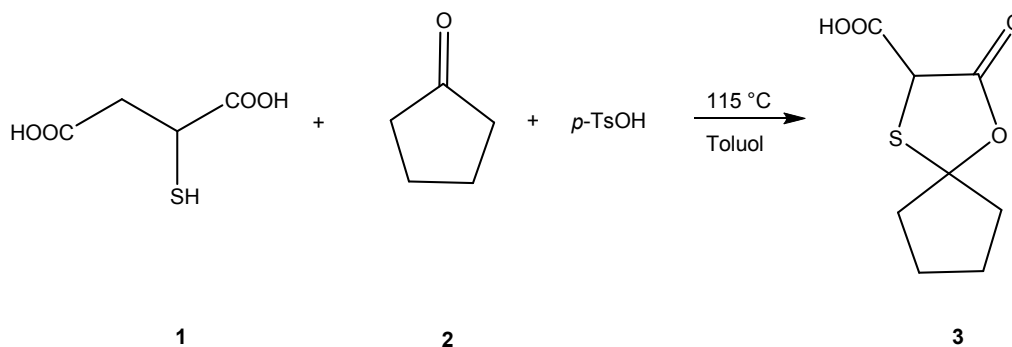
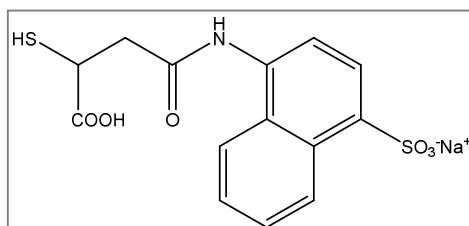
Alle synthetisierten NP-Suspensionen werden unter Lichtausschluss aufbewahrt.

## 5.14 Synthese fluoreszierender Liganden für die Gelelektrophorese

Die Synthese fluoreszierender Liganden erfolgt durch Bindung der Liganden 11-Mercaptoundecansäure (MUA, engl.: *mercaptoundecanoic acid*), Mercaptonbernsteinsäure (MSA, engl.: *mercaptosuccinic acid*) oder 16-Mercaptohexadecansäure (MHDA, engl.: *16-mercaptohexadecanoic acid*) an einen Fluoreszenzfarbstoff. Die Synthese erfolgt in drei Schritten. Zuerst wird die Mercaptogruppe mit einer Schutzgruppe versehen, anschließend folgt die Bindung des Farbstoffs an den Liganden durch eine

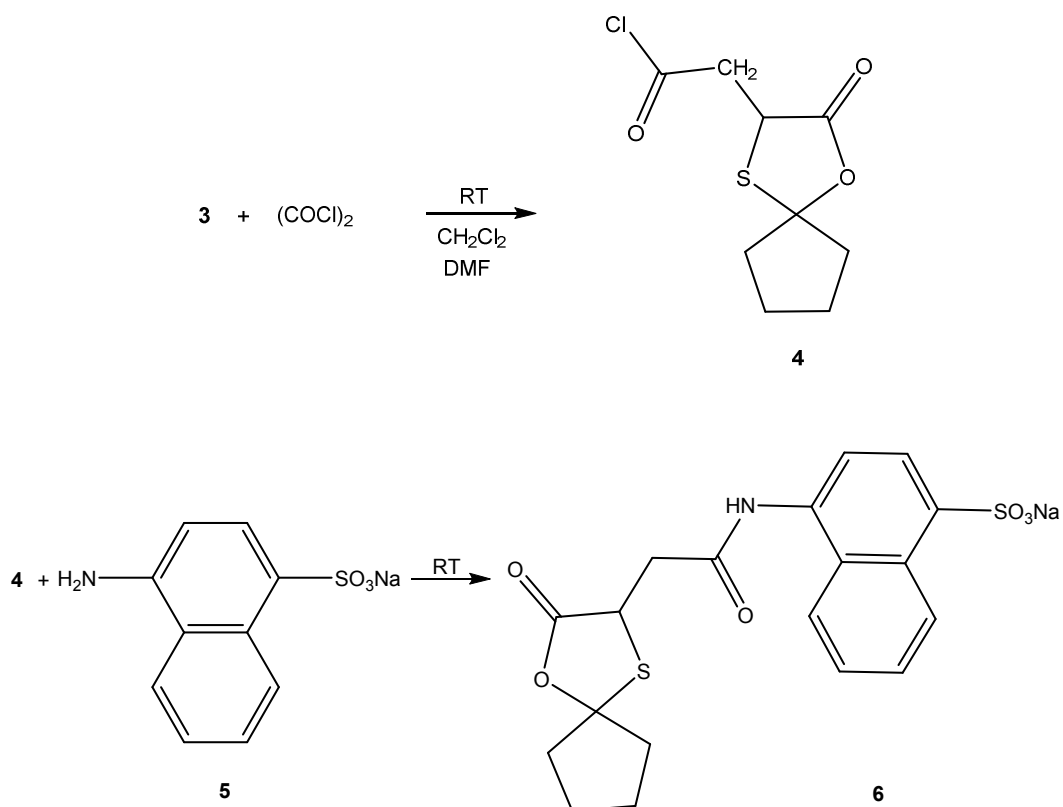
Peptidbindung. Danach erfolgt die Entschützung der Mercaptogruppe. Bei der Synthese des Perylen-Liganden wird 2-aminoethan-1-thiol an den Perylen-Farbstoff angebunden (siehe Kapitel 5.14.6.)

### 5.14.1 Synthese von Natrium 4-(3-carboxy-3-mercaptopropanamido)naphthalene-1-sulfonat (FL-1)

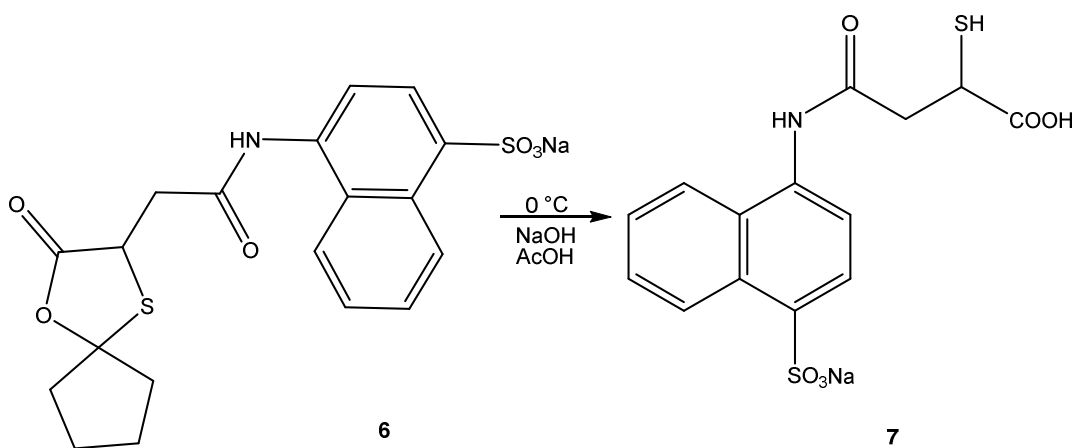


2-Oxo-1-oxa-4-thiaspiro[4.4]nonan-3-Carboxylsäure **3** wird nach *Dose et al.* synthetisiert.<sup>95</sup> Zu einer Lösung aus MSA **1** (1 g, 6,66 mmol) in Toluol (15 mL) werden Cyclopentanon **2** (690  $\mu$ L, 8 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäure (10 mg, 0,08 mmol) zugegeben. Die Mischung wird unter Rückfluss 8 h gekocht. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (30 mL) gelöst. Die wässrige Phase wird zwei Mal mit Dichlormethan (20 mL) gewaschen, mit konz. HCl auf einen pH-Wert von 2 angesäuert und drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Man erhält **3** als farbloses Pulver (0,89 g, 3,86 mmol, 58 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 1,47 (m, 4H); 1,78 (m, 2H); 1,96 (m, 2H); 2,84 (dd, 1H); 3,26 (dd, 1H); 4,38 (dd, 1H); 8,71 (s, 1H).



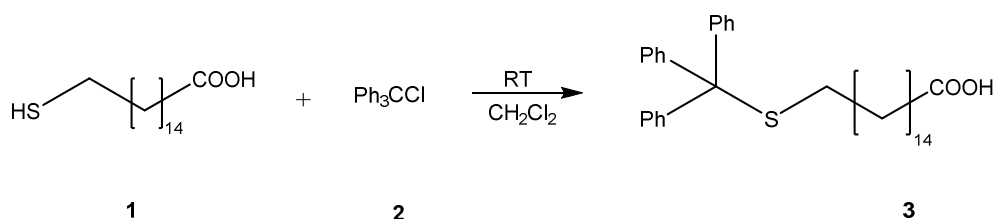
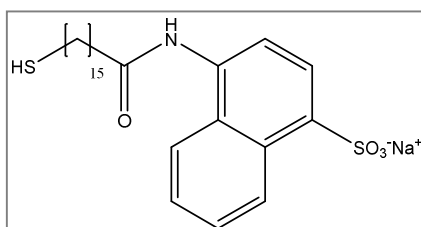
Der Fluoreszenzfarbstoff wird in Anlehnung an *Cheng et al.* angebunden.<sup>96</sup> **3** (0,210 g, 0,91 mmol) wird zusammen mit dem Oxalylchlorid (156  $\mu$ L, 1,82 mmol) und einigen Tropfen DMF in Dichlormethan (20 mL) gelöst und die Reaktionsmischung 5 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum, erhält man **4** als oranges Pulver. Dieses wird in trockenem Aceton (10 mL) gelöst, zu einer Lösung von 4-aminonaphthalin-1-sulfonsäure **5** (0,223 g, 0,91 mmol) in heißem MeOH (10 mL) hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum erhält man Natrium 4-(2-(2-oxo-1-oxa-4-thiaspiro[4.4]nonan-3-yl)acetamido)naphthalen-1-sulfonat **6** als farbloses Pulver (0,80 g, 1,75 mmol, 96 %).



Die Entschützung der Mercaptogruppe erfolgt in Anlehnung an *Gustavson et al.*<sup>97</sup> Zu einer Lösung von **6** (0,458 g, 1 mmol) in Aceton (5 mL) wird unter Rühren in einem Eisbad tropfenweise 1 M NaOH (2,5 mL) zugegeben. Das Eisbad wird entfernt und die Mischung eine Stunde bei RT gerührt. Man erhält 4-(3-carboxy-3-mercaptopropo- namido)naphthalene-1-sulfonat **7** als farblose, fluoreszierende Flüssigkeit.

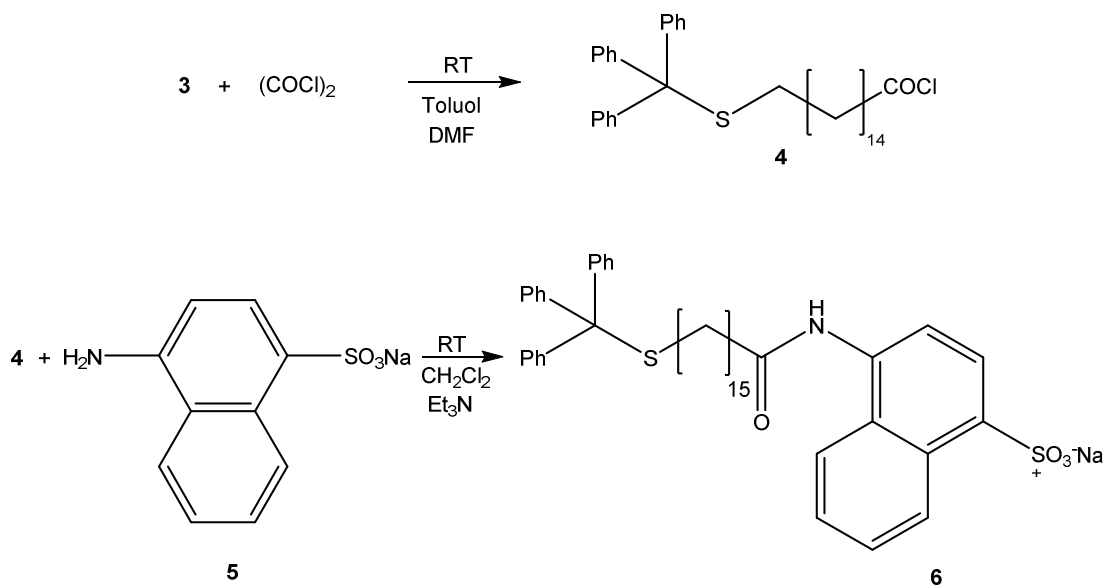
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 5,13 (s, 1H); 5,32 (d, 2H); 5,76 (d, 1H); 9,26 (d, 1H); 10,01 (t, 1H); 10,13 (t, 1H); 10,36 (d, 1H); 10,43 (d, 1H); 11,01 (d, 1H).

#### 5.14.2 Synthese von Natrium 4-(16-(tritylthio)hexadecanamido)naphthalen-1-sulfonat (FL-2)

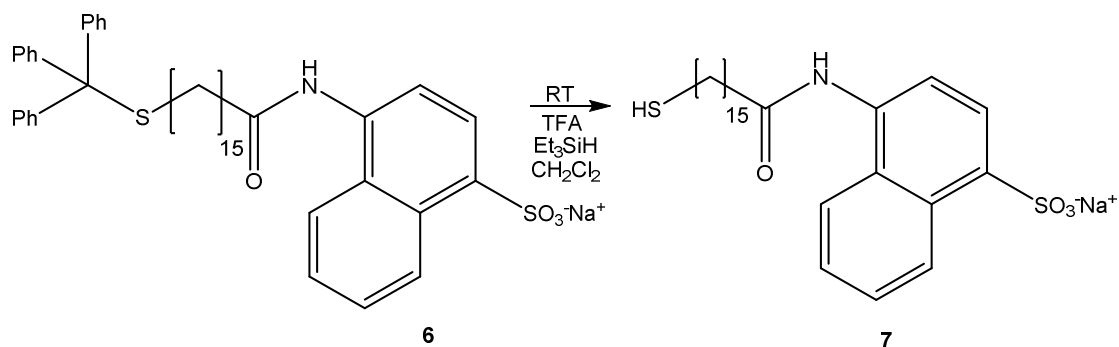


Die Synthese von 16-(tritylthio)hexadecanonsäure **3** erfolgt in Anlehnung an *Kupihar et al.*<sup>98</sup>. Zu MHDA **1** (0,5 g, 1,73 mmol) in Dichlormethan (40 mL) wird tropfenweise Tritylchlorid **2** (0,628 g, 2,25 mmol), gelöst in Dichlormethan bei RT hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird diese mit zweimal mit H<sub>2</sub>O (40 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (40 mL) gewaschen und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum und anschließender Säulenchromatographie auf einer Kieselgelsäule (Ethylacetat : Hexan = 1:4) erhält man **3** als farbloses Pulver (0,478g, 0,9 mmol, 52 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0,9-1,87 (m, 26H); 2,14 (t, 2H); 2,87 (t, 2H); 7,27-7,47 (m, 15H).



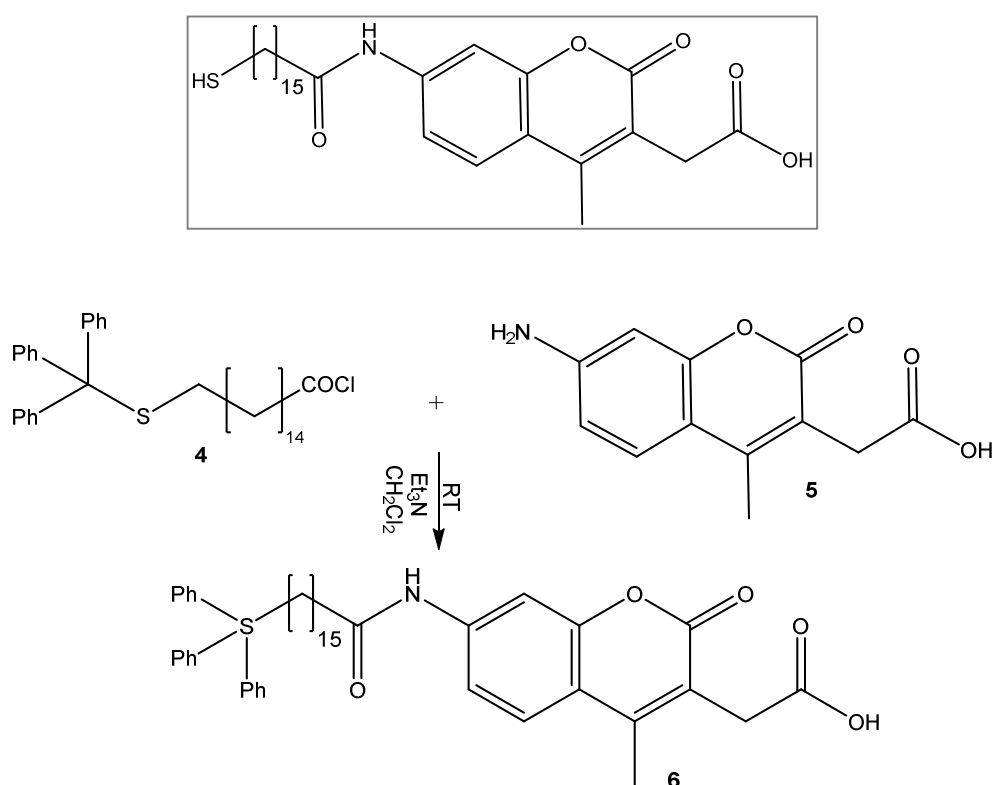
Zu **3** (0,1 g, 0,19 mmol) in Toluol (20 mL) werden Oxalylchlorid (24  $\mu\text{L}$ , 0,57 mmol) und ein Tropfen DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 12 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum, erhält man **4** als oranges Pulver. Dieses wird in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) gelöst, zu einer Lösung von 4-aminonaphthalin-1-sulfonsäure **5** (0,021 g, 0,09 mmol) in heißem MeOH (5 mL) und Triethylamin (47  $\mu\text{L}$ , 0,34 mmol) hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum erhält man Natrium 4-(16-(tritylthio)hexadecanamido)naphthalen-1-sulfonat **6** als farbloses Pulver (0,15 g, 0,19 mmol, 34 %).



Die Entschützung der Mercaptogruppe erfolgt in Anlehnung an *Kazikowski et al.*<sup>99</sup> Zu einer Lösung von **6** (0,15 g, 0,19 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) wird Trifluoressigsäure (TFA, engl.: *Trifluoroacetic acid*) (1 mL, 12,9 mmol) und anschließend Triethylsilan (158  $\mu\text{L}$ , 0,99 mmol) zugegeben. Die Mischung wird 3 h bei RT gerührt. Anschließend wird eine gesättigte  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung zugegeben und die Suspension weitere 30 min gerührt. Die wässrige Phase wird von der organischen Phase abgetrennt. Die

wässrige, fluoreszierende Phase enthält 4-(3-carboxy-3-mercaptopropanamido)naphthalene-1-sulfonat **7**.

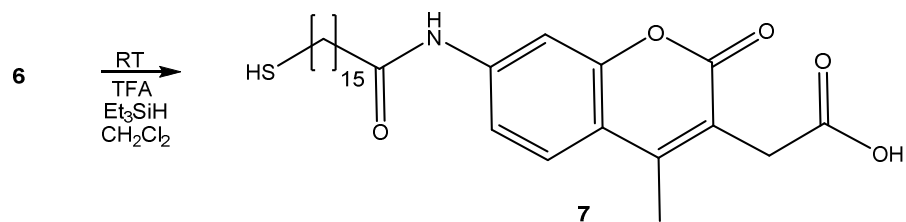
### 5.14.3 Synthese von 2-(7-(16-mercaptohexadecanamido)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (FL-3)



16-(tritylthio)hexadecanonsäure und der aktivierte Ester **4** wird nach 5.14.2 synthetisiert. Zu **4** (0,180 g, 0,33 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) wird Aminomethylcoumarin **5** (0,025 g, 0,11 mmol) und Triethylamin (60  $\mu\text{L}$ , 0,44 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum erhält man Natrium 4-(16-(tritylthio)hexadecanamido)naphthalen-1-sulfonat **6** als rötliches Pulver (0,16 g, 0,21 mmol, 49 %).

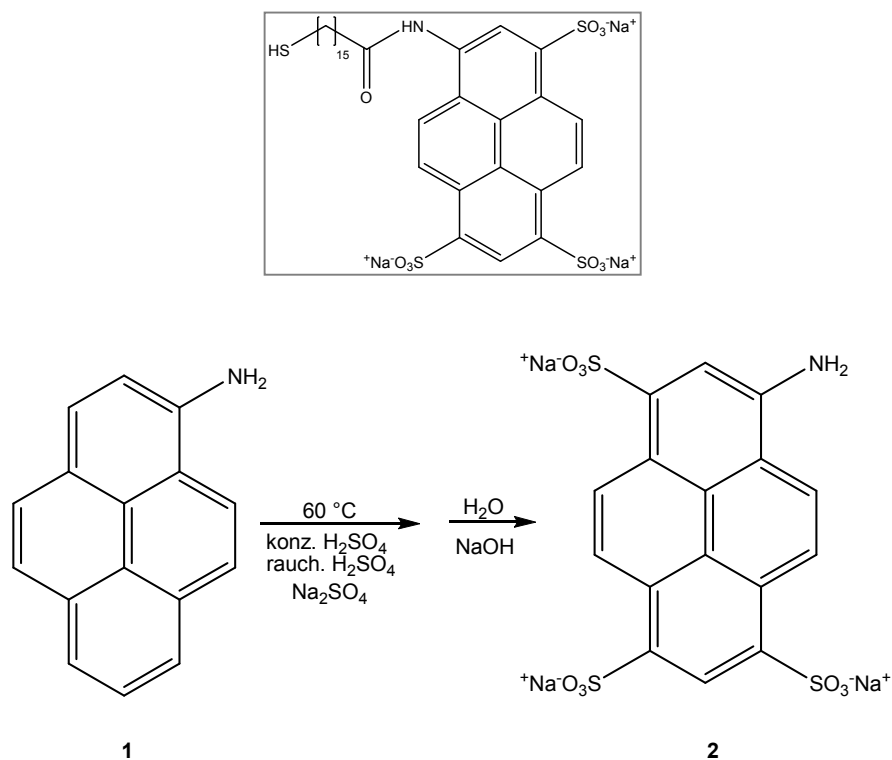
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,0\text{-}1,5$  (m, 26H); 2,06 (t, 2H); 2,07 (t, 2H); 2,4 (m, 3H); 3,07 (m, 2H); 7,18-7,94 (m, 18H); 9,48 (s, 1H, -NH); 12,1 (s, 1H, -OH).





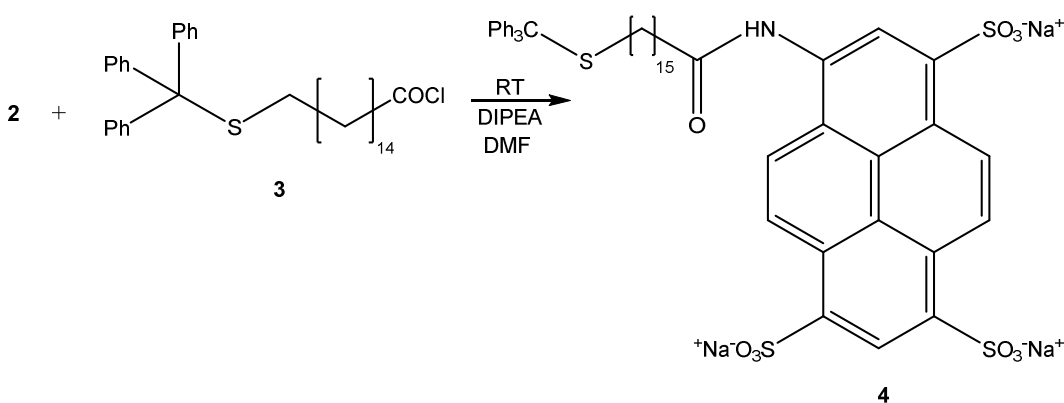
Die Trityl-Schutzgruppe wird wie in Kapitel 5.14.2 beschrieben entfernt. Zu einer Lösung von **6** (0,16 g, 0,21 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (33 mL) werden TFA (1,62 mL, 21 mmol) und anschließend Triethylsilan (171  $\mu\text{L}$ , 1,1 mmol) zugegeben. Die Mischung wird 3 h bei RT gerührt. Anschließend wird eine gesättigte  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (25 mL) zugegeben und die Suspension weitere 30 min gerührt. Die wässrige Phase wird von der organischen Phase abgetrennt und mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum erhält man 2-(7-(16-mercaptohexadecanamido)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure **7** als rosa Pulver (0,270 g, 0,53 mmol, 48 %).

#### 5.14.4 Synthese von 8-(16-mercaptohexadecanamido)pyren-1,3,6-trisulfonat (FL-4)



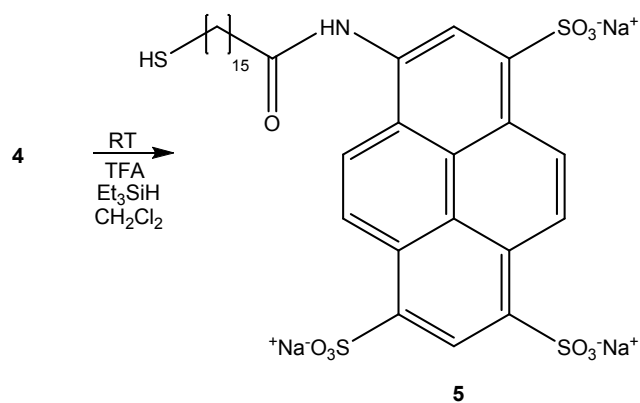
Natrium 8-aminopyren-1,3,6-trisulfonat (APTS) **2** wird nach *Sharrett et al.* synthetisiert.<sup>100</sup> In einen ausgeheizten 100 mL Rundkolben mit einem Trockenrohr (gefüllt mit CaSO<sub>4</sub> und NaOH-Plätzchen) wird Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,13 g, 8 mmol) und konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mL) gegeben. Zu dieser Lösung wird Aminopyren **1** (0,434 g, 2 mmol) und rauchende H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6 mL, 20 %) zugefügt und die Reaktionsmischung wird 30 h bei 60 °C unter Rühren erhitzt. Anschließend wird die Mischung vorsichtig in 50 mL Wasser gegossen und mit 50 % NaOH neutralisiert. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in MeOH im Ultraschallbad gelöst. Die sich nicht in MeOH lösenden Salze werden abfiltriert. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum erhält man **2** als braungrünes Pulver (1 g, 1,91 mmol, 95 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 7,93 (s, 1H); 8,2 (d, 1H); 8,52 (s, 1H); 8,6 (d, 1H); 8,85 (d, 1H); 8,89 (d, 1H).



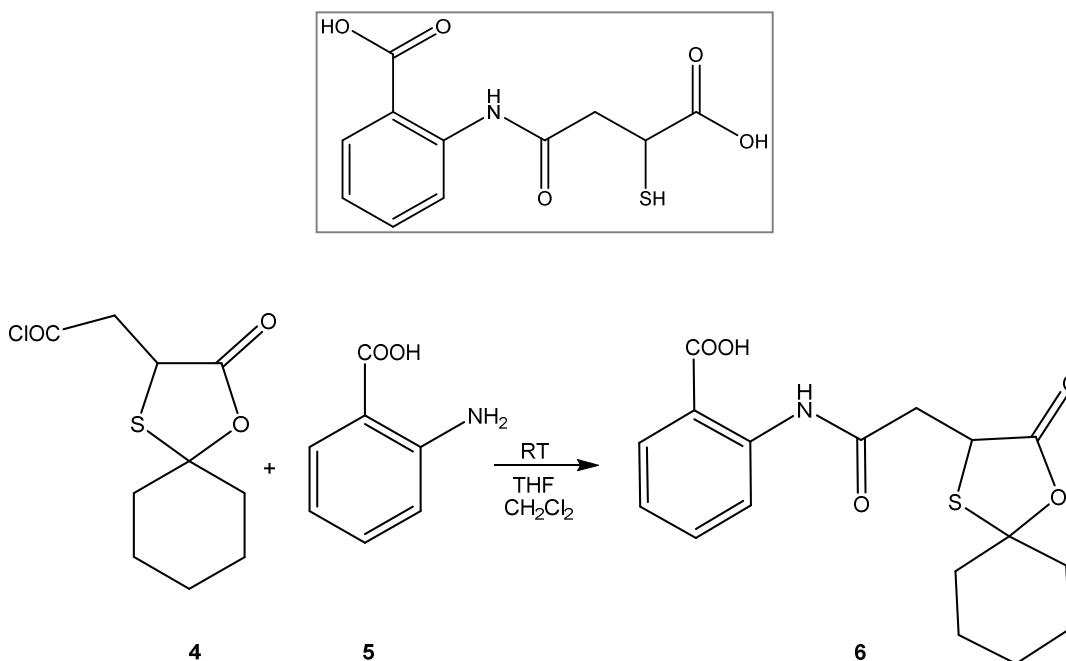
Für die Synthese von 16-(tritylthio)hexadecanonsäure und des aktivierten Esters **3** sei auf Kapitel 5.14.2 verwiesen. Natrium 8-aminopyren-1,3,6-trisulfonat **2** (0,127 g, 0,24 mmol) wird in DMF (12,5 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wird Diisopropylethylamin (DIPEA) (826 µL, 4,8 mmol) und der aktivierte Ester **3** (0,2 g, 0,36 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung 12 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und man erhält 8-(16-(tritylthio)hexadecanamido)pyren-1,3,6-trisulfonat **4** als grünes Pulver (0,240 g, 0,027 mmol, 75 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 0,8-1,27 (m, 16 H); 2,57 (t, 2H); 2,76 (t, 2H); 7,16-7,3 (m, 15 H); 7,51 (d, 1H); 7,94 (d, 1H); 8,2 (d, 1H); 8,52 (s, 1H); 8,6 (d, 1H).

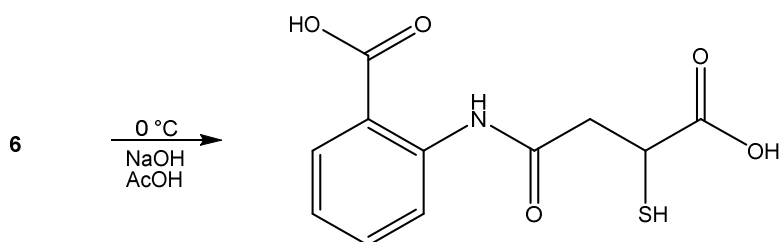


Die Entfernung der Schutzgruppe erfolgt wie in Kapitel 5.14.2 beschrieben. Zu einer Lösung von **4** (0,1 g, 0,11 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (17 mL) werden TFA (821  $\mu\text{L}$ , 11 mmol) und anschließend Triethylsilan (85  $\mu\text{L}$ , 0,53 mmol) zugegeben. Die Mischung wird 3 h bei RT gerührt. Anschließend wird eine gesättigte  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (12,3 mL) zugegeben und die Suspension weitere 30 min gerührt. Die Phasen werden separiert, die wässrige Phase, die 8-(16-mercaptohexadecanamido)pyren-1,3,6-trisulfonat **5** als gelb-grüne, fluoreszierende Lösung enthält, wird aufgehoben.

#### 5.14.5 Synthese von 2-(3-carboxy-3-mercaptopropanamido)benzoesäure (FL-5)



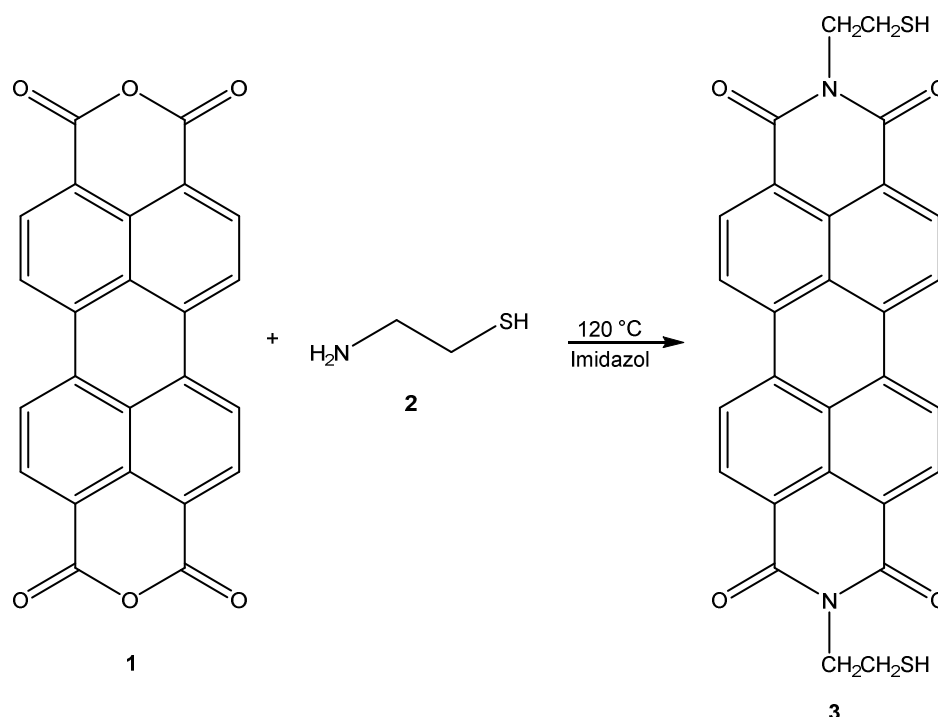
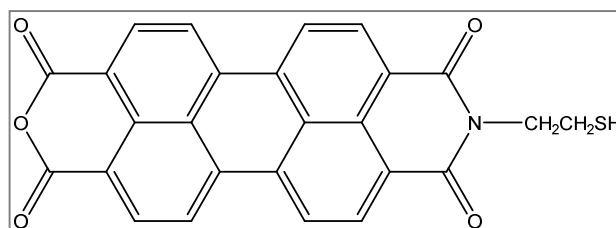
Die Synthese der 2-Oxo-1-oxa-4-thiaspiro[4.4]nonan-3-Carboxylsäure und deren Ester **4** ist in Kapitel 5.14.1 beschrieben. Der Ester **4** (0,890 g, 3,9 mmol) wird in Dichlormethan (10 mL) gelöst, zu einer Lösung von 2-Aminobenzoesäure **5** (0,274 g, 2 mmol) in THF (10 mL) hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum erhält man 2-(2-(2-oxo-1-oxa-4-thiaspiro[4.5]decan-3-yl)acetamido)benzoesäure **6** als farbloses Pulver (0,72 g, 2 mmol, 50 %).



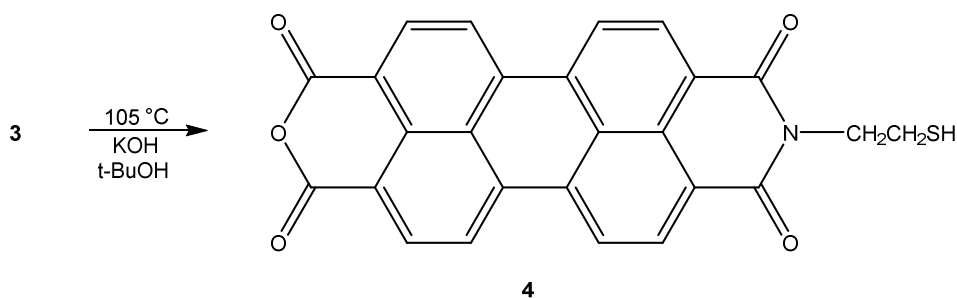
Das Entschützen der Mercaptogruppe erfolgt analog Kapitel 5.14.1. Zu einer Lösung von **6** (0,350 g, 1 mmol) in Aceton (5 mL) wird unter Rühren in einem Eisbad tropfenweise 1 M NaOH (2,5 mL) zugegeben. Das Eisbad wird entfernt und die Mischung eine Stunde bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels, erhält man 2-(3-carboxy-3-mercaptopropanamido)benzoesäure **7**.

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 2,4-2,9 (m, 2H); 3,55-3,71 (m, 1H); 7,07 (t, 1H); 7,41 (t, 1H); 7,79 (dd, 1H); 8,11 (dd, 1H).

### 5.14.6 Synthese von 9-(2-mercaptoethyl)-1H-isochromeno[6',5',4':10,5,6]anthra[2,1,9-def]isoquinolin-1,3,8,10(9H)-tetraon (FL-6)



Die Synthese erfolgt in Anlehnung an *Xu et al.* Zu Perylen-3,4,9,10-tetracarbonsäure-dianhydrid **1** (0,31 g, 0,78 mmol) werden 2-Aminoethan-1-thiol **2** (0,78 g, 10 mmol) und 6 g Imidazol zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 3 h bei 120 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen werden zu diesem Gemisch 100 mL EtOH und 300 mL 2 M HCl zugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei RT gerührt, anschließend filtriert und mit UPW so lange gewaschen bis der pH-Wert der Waschlösung neutral ist. Nach Trocknen im Trockenschrank bei 95 °C erhält man 2,9-bis(2-mercaptoethyl)anthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']diisoquinolin-1,3,8,10(2H,9H)-tetraon **3** als violettes Pulver (0,37 g, 0,72 mmol, 93 %).



Eine Suspension von **3** (0,2 g, 0,39 mmol) und KOH (0,55 g, 8,3 mmol) in *t*-BuOH (20 mL) wird 3 h bei 105 °C unter Rückfluss erhitzt und anschließend bei RT 12 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 70 mL 10 % HCl versetzt, der Niederschlag filtriert und so lange mit UPW gewaschen bis der pH-Wert der Waschlösung neutral ist. Nach Trocknen im Trockenschrank bei 95 °C erhält man 9-(2-mercaptoethyl)-1H-isochromeno[6',5',4':10,5,6]anthra[2,1,9-def]isoquinolin-1,3,8,10(9H)-tetraon **4** als dunkelrotes Pulver (0,066 g, 0,15 mmol, 38 %).

### 5.15 Laufpuffersynthese für die Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese werden zwei verschiedene Laufpuffer verwendet. Der TBE-Puffer und der TAE-Puffer. Für die Herstellung des 5 x TBE-Puffers werden 54 g TRIS, 27,5 g Borsäure und 3,5 g EDTA in 1 L UPW gelöst.

Für die Synthese des 5 x TAE-Puffers werden 24,2 g TRIS, 1,875 g EDTA und 5,71 mL konz. Essigsäure in 1 L UPW gelöst. Anschließend erhält man durch Verdünnung des 5 x Puffers mit UPW die gewünschte Puffer-Konzentration.

### 5.16 Funktionalisierung der Nanopartikelsuspensionen mit einem Liganden

Die Nanopartikel werden für die Trennung mittels Gelelektrophorese mit verschiedenen Liganden funktionalisiert. Da die Reaktionen langsam unter vergleichsweise milden Bedingungen ablaufen, werden sie auf einem Schütteltisch VF2 (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.) bei Drehzahlen von 120 bis 170 rpm durchgeführt.

### **5.16.1 Funktionalisierung der Gold-NP mit MUA**

Die Gold-NP werden nach der Methode von *Xu et al.*<sup>59</sup> funktionalisiert. Dazu werden 100 mL einer 100 mg/L Gold-Nanopartikelsuspension (aus Kapitel 5.13.1) mit konz. NaOH auf einen pH-Wert von 8,4 gebracht. Anschließend werden 2 mg MUA zugegeben und die Suspension wird über Nacht geschüttelt.

### **5.16.2 Funktionalisierung der Gold-NP mit MHDA, MUA und MSA**

Für die Untersuchung der Größentrennung der Gold-NP mit verschiedenen Liganden werden diese ähnlich wie in Kapitel 5.16.1 beschrieben funktionalisiert. Dazu werden 20 mL der NP-Suspension mit einem Tropfen 1 M NaOH und einigen Krümeln des jeweiligen Liganden versetzt. Die Suspension wird 1 h geschüttelt.

### **5.16.3 Funktionalisierung mit Natrium 4-(3-carboxy-3-mercaptopropionamido)naphthalene-1-sulfonat (siehe Kapitel 5.14.1)**

10 mL der jeweiligen Au-NP-Suspension (25 nm oder 41 nm) werden mit einem Tropfen 1 M NaOH und anschließend mit 100 µL einer 1:10 Verdünnung (in UPW) der Ligandenlösung (aus Kapitel 5.14.1) versetzt. Die Suspension wird 1 h geschüttelt.

### **5.16.4 Funktionalisierung mit Natrium 4-(16-(tritylthio)hexadecanamido)naphthalen-1-sulfonat (siehe Kapitel 5.14.2)**

9,5 mL der Au-NP-Suspension (25 nm oder 41 nm) werden mit einem Tropfen 1 M NaOH und anschließend mit 500 µL einer 1:10 Verdünnung (in UPW) der Ligandenlösung (aus Kapitel 5.14.2) versetzt. Die Suspension wird 1 h geschüttelt.

### **5.16.5 Funktionalisierung mit 2-(7-(16-mercaptohexadecanamido)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (siehe Kapitel 5.14.3)**

10 mL der entsprechenden Au-NP-Suspension (25 nm oder 41 nm) werden mit einem Tropfen 1 M NaOH und anschließend mit 50 µL einer 1:10 Verdünnung (in UPW) der Ligandenlösung (aus Kapitel 5.14.3) versetzt. Die Suspension wird 1 h geschüttelt.

#### **5.16.6 Funktionalisierung mit 8-(16-mercaptohexadecanamido)pyren-1,3,6-trisulfonat (siehe Kapitel 5.14.4)**

10 mL der Au-NP-Suspension (25 nm oder 41 nm) werden mit einem Tropfen 1 M NaOH und anschließend mit 100 µL der Ligandenlösung (aus Kapitel 5.14.4) versetzt. Die Suspension wird 1 h geschüttelt.

#### **5.16.7 Funktionalisierung mit 9-(2-mercaptoethyl)-1H-iso-chromeno [6',5',4':10,5,6]anthra[2,1,9-def]isoquinolin-1,3,8,10(9H)-tetraon (siehe Kapitel 5.14.6)**

1 mg des Liganden aus Kapitel 5.14.6 wird in 5 mL DMSO gelöst und 1:10 mit UPW verdünnt. Von dieser Lösung werden 2 mL zu 10 mL der Au-NP-Suspension (25 nm oder 41 nm) mit einem Tropfen 1 M NaOH dazu gegeben. Die Suspension wird 1 h geschüttelt.

### **5.17 Trennung der Nanopartikel mittels Gelelektrophorese**

Für die Elektrophorese wird ein Gel mit 0,5 - 2 Gew.-% Agarose hergestellt. Dafür werden 100 mL des jeweiligen Puffers in gewünschter Konzentration (0,5 - 5 x) zusammen mit der Agarose bis zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 70 °C wird diese langsam in die Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wird die Gelkammer in das Elektrophorese-Gerät gelegt und mit dem Laufpuffer derselben Konzentration übergossen. 450 µL der funktionalisierten Edelmetall-Nanopartikelsuspension werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit 50 µL Glycerin vermischt. Anschließend werden für die horizontale Gelelektrophorese 40 µL dieser Probe und für die vertikale Gelelektrophorese 15 µL der Probe in eine Tasche des Gels pipettiert. Nach Einstellung der gewünschten Analysenzeit und Spannung erfolgt die Gelelektrophorese.



## 5.18 Untersuchung der Fluoreszenzlöschung

Für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren wird ein Fluorimeter *LS50B* (Perkin Elmer, Waltham, USA) verwendet. In Tabelle 4 sind die verwendeten Parameter angegeben.

**Tabelle 4:** Parameter für die Messung der Fluoreszenzintensität im Fluorimeter

Farbstoff	Anregungswellenlänge in nm	Farbstoffkonzentration
Natriumnaphthionat (NN)	317	13,6 µg/L in UPW
APTS	425	2 µg/L in UPW
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	470	0,02 µM in 0,01 M Phosphatpuffer, pH = 8

Zur Messung der Fluoreszenz wird eine Quarz-Küvette mit einer optischen Weglänge von 1 cm verwendet. Für die Fluoreszenzmessungen wird zu einer Farbstofflösung (2 mL) der oben genannten Konzentration (vgl. Tabelle 4) eine definierte Konzentration an NP oder Ionen zugegeben, damit der Gehalt an NP oder Ionen einer bestimmten Konzentration in der Küvette (0-1 mg/L) entspricht. Nach kurzem Schütteln wird die Fluoreszenzintensität bei der jeweiligen Anregungswellenlänge (siehe Tabelle 4) gemessen.

Zur Herstellung des Phosphatpuffers ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pH = 8 werden eine 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung sowie eine 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung in UPW hergestellt. Diese werden im Volumenverhältnis  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (5,3 : 94,7) gemischt. Der so erhaltene 0,1 M Phosphatpuffer wird 1:10 mit UPW auf eine Endkonzentration von 0,01 mol/L verdünnt.

Es werden für die Untersuchungen sowohl die selbst synthetisierten Au-, Ag- und Pd-NP (siehe Kapitel 5.13.1, 5.2 und 5.13.3) verwendet als auch kommerziell erworbene Au- und Ag-NP definierter Größe (BBI Solutions, Cardiff, UK). Die Metallkonzentration aller NP-Lösungen wird mittels ET-AAS bestimmt. Für die Silberkonzentrationsbestimmung der Ag-NP-Suspension sei an dieser Stelle auf Kapitel 5.4 verwiesen.

### 5.18.1 Bestimmung der Gold- und Pd-NP-Konzentration mittels ET-AAS

Die Bestimmung der Gold- und Palladiumkonzentration der jeweiligen NP-Suspension erfolgt ähnlich wie in Kapitel 5.4 beschrieben. Strahlungsquellen sind eine Gold- bzw. Palladiumhohlkathodenlampe (Photron, Victoria, Australien) mit einer Betriebsstromstärke von 10 mA für Gold und 30 mA für Pd. Die Messung wird bei einer Messwellenlänge von 242,8 nm für Gold und bei einer Messwellenlänge von 247,6 nm für Palladium durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgt im Falle der Au-NP mit einer Tetrachloridogoldsäurestandardlösung ( $\text{H}(\text{AuCl}_4)$  in 2 M HCl, 1000 mg/L) und im Falle der Pd-NP mit einer Palladiumnitratlösung ( $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  in 0,5 M  $\text{HNO}_3$ , 1000 mg/L). Aus der Standardlösung wird durch entsprechende Verdünnung eine Kalibrierreihe mit den Konzentrationen 1  $\mu\text{g/L}$ , 2  $\mu\text{g/L}$  und 6  $\mu\text{g/L}$  hergestellt. Die Probe selbst wird vor der Messung entsprechend verdünnt. Zur Stabilisierung der Ionen werden die Kalibrier- und Probenlösungen im Falle von Au mit 1,4 M Königswasser und im Falle von Pd mit 1,4 M Salpetersäure angesäuert. Das jeweilige Temperaturprogramm für die Konzentrationsbestimmung von Gold bzw. Palladium mit der ET-AAS ist den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen.

**Tabelle 5:** Graphitofen-Temperaturprogramm für die Konzentrationsbestimmung von Gold-Nanopartikeln. Die Messung erfolgt jeweils während des Atomisierungsschritts.

Prozess	Temperatur [°C]	Aufheizzeit [s]	Haltezeit [s]	Argon-Fluss [mL·min <sup>-1</sup> ]
Trocknen 1	110	1	30	250
Trocknen 2	130	15	30	250
Pyrolyse	800	10	20	250
Atomisierung	1800	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

**Tabelle 6:** Graphitofen-Temperaturprogramm für die Konzentrationsbestimmung der synthetisierten Palladium-Nanopartikel. Die Messung erfolgt jeweils während des Atomisierungsschritts.

Prozess	Temperatur [°C]	Aufheizzeit [s]	Haltezeit [s]	Argon-Fluss [mL·min <sup>-1</sup> ]
Trocknen 1	110	1	30	250
Trocknen 2	130	15	30	250
Pyrolyse	900	10	20	250
Atomisierung	2200	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

### 5.18.2 Konzentrationsbestimmung von monodispersen 20 nm Ag-NP mit Hilfe der Fluoreszenzlöschung von FITC

**Fluoreszenzlöschung:** Zu 2 mL einer FITC-Lösung (0,02 µM für die Bestimmung im Bereich 1-10 µg/L und 1 nM für die Bestimmung im Bereich 10-100 ng/L, in 0,01 M Phosphat-puffer, pH = 8) in einer Quarzküvette wird ein definiertes Volumen von 100 µL (oder 150 µL) einer Ag-NP-Suspension (20 nm) zugegeben. Die Fluoreszenzintensität wird sowohl vor als auch nach der Zugabe von Ag-NP gemessen.

**ET-AAS-Messung:** Zu 40 mL UPW werden 2 mL (oder 3 mL) der oben verwendeten Ag-NP-Suspension (20 nm) und die CPE-Reagenzien hinzugegeben. Nach der CPE (siehe Kapitel 5.3) erfolgt die ET-AAS-Messung wie in Kapitel 5.4 beschrieben.

### 5.18.3 Funktionalisierung der Au-NP mit FITC

Die Funktionalisierung erfolgt in Anlehnung an *Hormozi-Nezhad et al.*<sup>101</sup> Zu 4,5 mL einer Citrat-stabilisierten Gold-NP-Suspension werden 0,5 mL einer 0,25 mM FITC-Lösung (in 0,01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH = 8) zugegeben. Die Mischung wird 2 h geschüttelt. Anschließend wird 1 mL der hergestellten FITC-Au-NP bei 14000 rpm, 15 min zentrifugiert, der Überstand wird entfernt und der Rückstand wird in 1 mL 0,01 M Phosphatpuffer gelöst. Nach erneutem Zentrifugieren der Lösung wird der Überstand entfernt und der Rückstand in 1 mL UPW gelöst.

#### **5.18.4 Optimierung der MSA-Konzentration und der Inkubationszeit**

Zur Optimierung der MSA-Konzentration und der Inkubationszeit werden 1,5 mL der nach Abschnitt 5.18.3 hergestellten Au-NP-FITC-Lösung mit 0,5 mL Phosphatpuffer und 3 mL UPW verdünnt. Diese NP-Suspension wird mit einem definierten Volumen an MSA-Lösung (1 g/L) versetzt damit die Endkonzentration an MSA in der Küvette 91, 167, 231, 286 und 333 mg/L beträgt. Die Proben mit den verschiedenen MSA-Konzentrationen werden auf dem Schütteltisch inkubiert. Nach 0, 1, 4, 24, 25, 45 und 141 h wird die Fluoreszenzintensität am Fluorimeter gemessen.

#### **5.19 Erhöhung der Absorption durch N-719**

Die UV-VIS-Untersuchungen werden mit einem Spektrometer *Lambda 35* (Perkin Elmer, Waltham, USA) durchgeführt. Dazu werden 0,5 mL NP (funktionalisiert und nicht funktionalisiert) mit 1 mL UPW versetzt. Diese Lösung wird in eine Küvette gegeben und das Absorptionsspektrum wird aufgenommen.

##### **5.19.1 Funktionalisierung der Edelmetall-NP mit N-719**

Die Funktionalisierung erfolgt in Anlehnung an *Zedler et al.*<sup>102</sup> 950  $\mu$ L NP werden mit 50  $\mu$ L N-719 (20  $\mu$ M) versetzt und 2 h geschüttelt.

Zur Funktionalisierung der Au-NP werden zu 5 mL Au-NP-Suspension paar Krümel des N-719-Pulvers zugegeben. Die Mischung wird 1 h geschüttelt.

#### **5.20 Untersuchungen mit Bovine serum albumin (BSA)**

##### **5.20.1 Funktionalisierung der NP mit BSA**

Zur Funktionalisierung werden 900  $\mu$ L NP-Suspension in ein Schnappdeckelglas gegeben und mit 450  $\mu$ L Phosphatpuffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), pH = 7,4 und 150  $\mu$ L BSA-Lösung (800 mg/L in Phosphatpuffer, pH = 7,4) versetzt. Diese Reaktionsmischung wird 2 h geschüttelt.

Zur Herstellung des Phosphatpuffers ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pH = 7,4 werden eine 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung sowie eine 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung in UPW hergestellt. Diese werden im Volumenverhältnis  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (19:81) gemischt. Der so erhaltene

0,1 M Phosphatpuffer wird 1:10 mit UPW auf eine Endkonzentration von 0,01 mol/L verdünnt.

### **5.20.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R250**

Nach der Gelelektrophorese wird das Gel mit einer Fixierlösung bestehend aus 40 % UPW, 50 % MeOH und 10 % Eisessig versetzt. Das Gel wird 30 min in dieser Fixierlösung aufbewahrt. Anschließend wird diese entfernt und das Gel mit einer Färbelösung übergossen, aus 40 % UPW, 50 % MeOH, 10 % Eisessig und 0,25 Gew.-% Coomassie Brilliant Blau R250. Nach 2 - 4 h gießt man die Färbelösung ab und ersetzt diese durch eine Entfärbelösung, die aus 5 % MeOH, 7,5 % Eisessig und 87,5 % UPW besteht. Das Gel wird in der Entfärbelösung 6 - 24 h auf dem Schütteltisch bei 100 rpm geschüttelt.

## **5.21 Atomspektrometrische Untersuchungen**

### **5.21.1 Herstellung des Au-NP-Agarose Gels**

Die Herstellung des Au-NP-Gels erfolgt ähnlich wie in Kapitel 5.17 beschrieben. 1 g Agarose wird in 95 mL TAE-Puffer und 5 mL 25 nm Au-NP-Suspension (117,9 mg/L) unter Sieden gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 70 °C wird diese Lösung langsam in die Gelkammer gegossen. Nach Erstarren erhält man ein Au-NP-Agarosegel mit einer Gold-Konzentration von 5,895 mg/L.

### **5.21.2 Bestimmung der Gold-Konzentration im Au-NP-Agarose Gel**

Aus dem in Kapitel 5.21.1 hergestellten Au-NP-Agarose Gel werden drei 1 cm<sup>2</sup> große Gelstücke herausgeschnitten. Jedes Stück wird gewogen, in ein 10 mL Messkolben überführt und mit 5 mL einer 1,4 M Königswasser-Lösung versetzt. Anschließend werden die Messkolben für 10 min in ein 80 °C warmes Wasserbad gestellt. Nach Auflösen des Gels wird der Messkolben mit 1,4 M Königswasser auf 10 mL aufgefüllt. Die Au-Konzentration in dieser Lösung wird mittels ET-AAS wie in Kapitel 5.18.1 beschrieben bestimmt.

### **5.21.3 Wiederfindung der Au-NP-Fractionen nach erfolgter Gelelektrophorese**

Für die Wiederfindungsversuche werden die Au-NP (25 nm und/oder 41 nm) mit MUA funktionalisiert. Anschließend werden 450  $\mu\text{L}$  der funktionalisierten NP mit 50  $\mu\text{L}$  Glycerin in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt und 15  $\mu\text{L}$  dieser Lösung werden auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgt in der vertikalen Gelelektrophoresekammer bei 150 V, 20 min. Nach der Gelelektrophorese wird die entsprechende Gelfraktion ausgeschnitten, in 10 mL einer Königswasserlösung (1:10) gelöst und die Au-Konzentration der Lösung mittels ET-AAS bestimmt (siehe Kapitel 5.18.1).

### **Funktionalisierung für die Wiederfindung der 25 nm und 41 nm Gold-NP**

Dazu werden zu 2 mL einer Gold-NP-Suspension ( $c = \text{ca. } 120 \text{ mg/L}$ ) 1 mL Phosphatpuffer  $\text{pH} = 7,4$  (für die Herstellung des Puffers sei hier auf Kapitel 5.20.1 verwiesen) und 0,5 mL MUA-Lösung (0,36 mg/L) hinzugegeben. Diese Mischung wird 2 h geschüttelt.

### **Funktionalisierung für die Wiederfindung verschieden konzentrierter Au-NP**

Eine 41 nm Au-NP-Suspension ( $c = 117,9 \text{ mg/L}$ ) wird wie bereits oben beschrieben funktionalisiert und 1:10 bzw. 1:100 mit UPW verdünnt. Nach Mischen mit Glycerin werden die so hergestellten Proben auf das Gel aufgetragen.

### **Funktionalisierung einer 1:100 Verdünnung der Au-NP-Suspension**

Zu 9,9 mL UPW werden 0,1 mL Au-NP-Suspension (41 nm,  $c = 117,9 \text{ mg/L}$ ) hinzugegeben. Davon wird 1 mL entnommen und mit 0,5 mL MUA-Lösung (0,36 mg/L) versetzt. Diese Reaktionsmischung wird 1 h geschüttelt. Nach Mischen mit Glycerin wird die so hergestellte Probe auf das Gel aufgetragen.

### **5.21.4 Wiederfindung der Ag-NP-Fractionen nach erfolgter Gelelektrophorese**

Für die Wiederfindungsversuche werden die Ag-NP mit MSA funktionalisiert. Anschließend werden 450  $\mu\text{L}$  der funktionalisierten NP mit 50  $\mu\text{L}$  Glycerin in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt und 15  $\mu\text{L}$  dieser Lösung werden auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgt in der vertikalen Gelelektrophoresekammer bei 150 V, 20 min.

Nach der Gelelektrophorese wird die entsprechende Gelfraktion ausgeschnitten, in 10 mL einer 1,4 M Königswasserlösung gelöst (wie in Kapitel 5.21.2 beschrieben) und die Ag-Konzentration der Lösung mittels ET-AAS bestimmt (siehe Kapitel 5.4).

### **Funktionalisierung mit MSA**

Zu 1 mL Ag-NP-Suspension definierter Konzentration werden 0,5 mL MSA-Lösung (3 g/L) zugegeben und das Reaktionsgemisch wird 1 h geschüttelt.

### **Ermittlung der optimalen MSA-Konzentration zur Funktionalisierung**

Zu 1 mL Ag-NP-Suspension (1,6 mg/L) werden verschiedene Mengen an MSA-Lösung (3 g/L) zugegeben (1-0,00001 mL). Bei kleinen Volumenzugaben wird die MSA-Lösung entsprechend verdünnt. Das Reaktionsgemisch wird 1 h geschüttelt.

### **Funktionalisierung kommerziell erworbener, monodisperser Ag-NP**

Zuerst wird die Ag-Konzentration der Lösungen bestimmt, zur Durchführung sei hier auf Kapitel 5.4 verwiesen. Da die gemessene Silber-Konzentration in den Nanopartikel-Suspensionen 7,5 bzw. 6,8 mg/L beträgt, werden diese Suspensionen 1:5 verdünnt. 1 mL dieser Verdünnung wird mit 100 µL einer 30 mg/L MSA-Lösung versetzt und 1 h geschüttelt.

## 6 Bildung von Nanopartikeln in natürlichen Gewässern

Dieses Kapitel beschreibt die Untersuchungen mittels CPE zur natürlichen Bildung von Ag-NP aus  $\text{AgNO}_3$  (als Ag-Ionen-Quelle) ohne Reduktionsmittel und mit NOM sowie die  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP-Bildung aus  $\text{AgNO}_3$  mit NOM und  $\text{Na}_2\text{S}$  (als Sulfid-Quelle). Die CPE bildet dabei den Grundstein für diese Untersuchungen, als einfaches Verfahren zur Abtrennung der Edelmetall-Ionen sowie Anreicherung und Extraktion von Edelmetall-Nanopartikeln. Durch Kopplung der CPE an die ET-AAS kann die verbleibende Matrix effektiv eliminiert werden und der Edelmetall-Nanopartikelgehalt der Probe selektiv und nachweisstark bestimmt werden. Durch Kombination der CPE und der Größenfraktionierung mittels SP-ICP-MS kann die Größenverteilung der gebildeten Ag- und  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP bestimmt werden. Damit ist die CPE mit ihrer breiten Anwendbarkeit eine elegante Methode zur Untersuchung der Bildung von Edelmetall-Nanopartikeln aus Edelmetall-Ionen und macht diese überhaupt erst möglich.

Die Studien dienen dazu, aufzuklären, wie sich Ag-NP in natürlichen Gewässern verhalten bezüglich ihrer Konzentration, Größe und Transformation. Außerdem soll geklärt werden, welcher Anteil der Ag-NP in der Umwelt anthropogenen Ursprungs ist und welcher Anteil dieser natürlich, unter anderem durch Reduktion mit NOM gebildet werden kann.

Da im Ultrapurenbereich Adsorptionseffekte an Gefäßwände eine wichtige Rolle spielen, werden diese gesondert untersucht.

### 6.1 Hintergrund und Aufgabenstellung

Es ist wenig über die Herkunft von Silber-Nanopartikeln, über ihre natürliche Bildung, ihre Größe, ihren Transport sowie ihre Transformation in der Umwelt bekannt. Sobald anthropogene Silber-Ionen und -NP in die Umwelt gelangen, werden sie transformiert. Es wird angenommen, dass die Sulfidierung neben der Oxidation und Regenerierung die wohl wahrscheinlichste Transformation darstellt, nicht zuletzt wegen des erheblich hohen Gehalts von reaktivem Schwefel in natürlichen Gewässern. In Kläranlagen, wo die Sulfidkonzentration besonders hoch ist, wurde bereits nachgewiesen, dass  $\text{Ag}_2\text{S}$  die dominierende Ag-Substanz im Klärschlamm ist.<sup>47,48</sup> Wegen der hohen Stabilität von Silbersulfid und Silbersulfid-NP kann die Ionenfreisetzung sowie die damit verbundene Regenerierung unterbunden werden. Auch konnte gezeigt werden, dass  $\text{Ag}_2\text{S}$ -

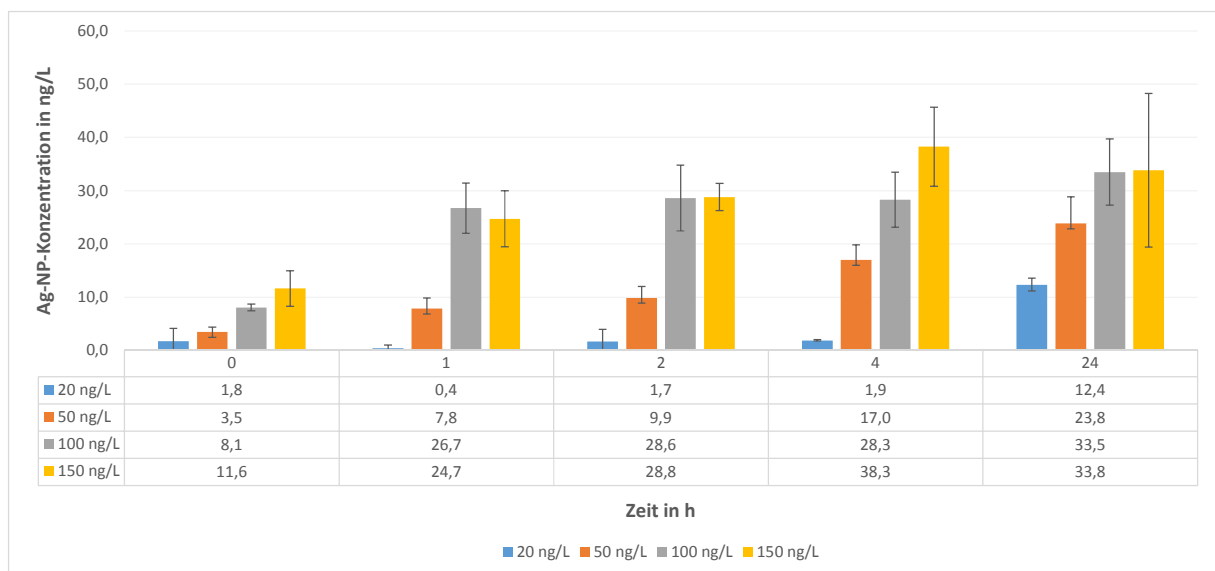


NP bei weitem weniger toxisch sind als Ag-NP. Das liegt vor allem daran, dass sie nahezu keine Ionen freisetzen.<sup>18</sup> Deswegen ist es wichtig, die natürliche Bildung von Nanopartikeln in Abhängigkeit von der Zeit sowie anderen wichtigen Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur, Ag-Ionen-, Sulfid- und NOM-Konzentration zu untersuchen und ihre Größe zu studieren, um ihr Umweltverhalten sowie ihre Bioverfügbarkeit in natürlichen Gewässern abzuschätzen. Des Weiteren konnte bislang noch nicht geklärt werden, welcher Anteil der Nanopartikel in der Umwelt nicht anthropogenen Ursprungs ist; dies wäre wichtig zu wissen, um abzuschätzen, wie die gemessene anthropogene Ag-NP-Konzentration durch diesen natürlichen Anteil beeinflusst und eventuell verfälscht wird. Da NOM als gängiges Reduktionsmittel für die Reduktion von Silber-Ionen zu Silber-Nanopartikeln bekannt ist, in natürlichen Gewässern ubiquitär und als zertifiziertes Material kommerziell erhältlich ist, soll es für die Untersuchungen herangezogen werden. Es gibt nur einige wenige Studien zur NOM-induzierten Bildung von Ag-NP aus Ag<sup>+</sup> die aber realitätsferne Ag<sup>+</sup>-Konzentrationen im mg/L-Bereich und damit ein nicht der Realität entsprechendes Ag<sup>+</sup>/NOM Verhältnis betrachten. Außerdem werden teilweise hohe Temperaturen und NOM-Konzentrationen sowie Strahlung bei diesen Untersuchungen eingesetzt. Diese Bedingungen, die so in den natürlichen Gewässern nicht existieren, verfälschen damit die Sicht auf das Verhalten der NP in der Umwelt. Deswegen lassen sich solche Studien nur eingeschränkt für diese umweltrelevanten Fragestellungen heranziehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bildung von Nanopartikeln aus Silbernitrat im ng/L-Bereich in Abhängigkeit von der Zeit, Temperatur und der AgNO<sub>3</sub>-Konzentration (als Ag-Ionen-Quelle) zu untersuchen. Des Weiteren soll die NOM-induzierte Bildung von Nanopartikeln in Abhängigkeit von der AgNO<sub>3</sub>-, Schwefel-, NOM-Konzentration, Zeit, Temperatur und dem Lichteinfluss studiert werden. Dabei soll auch in Abhängigkeit von der Zeit und Temperatur die Größe der durch NOM gebildeten Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP bestimmt werden. Da wie bereits in Kapitel 6 erwähnt bei der Ultrapurenanalytik Adsorptionseffekte eine wichtige Rolle spielen, soll die Adsorption von Ag- bzw. Ag<sub>2</sub>S-NP und Ag-Ionen an die PP-Gefäßwand untersucht werden sowie die Ionenfreisetzung aus Citrat-stabilisierten Ag-NP.

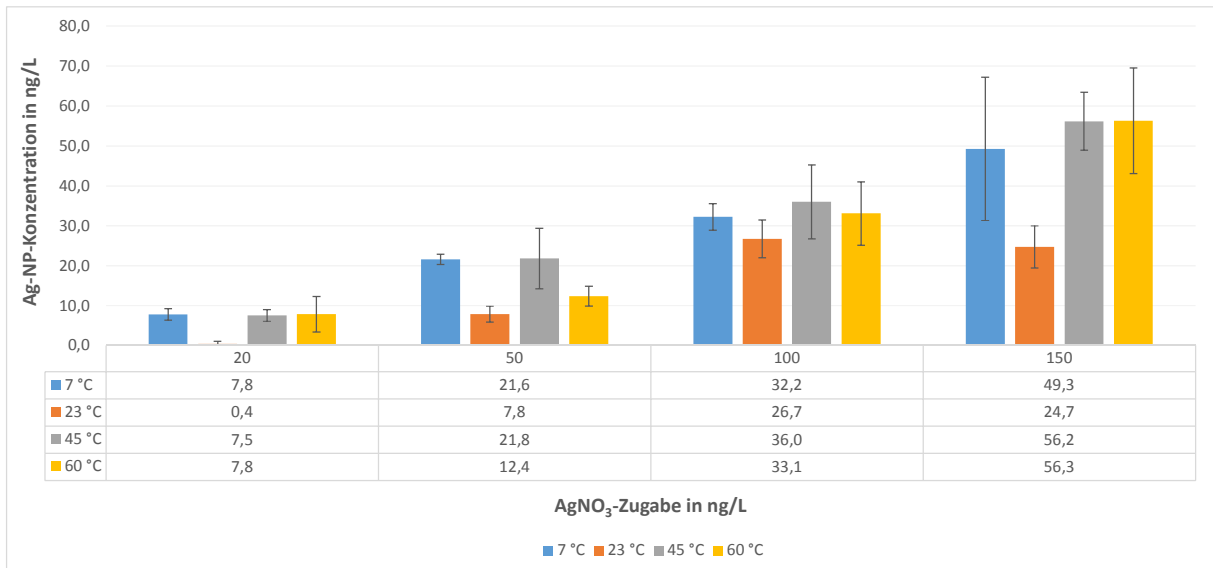
## 6.2 Natürliche Silber-Nanopartikelbildung ohne Reduktionsmittel

Gibt man eine mit  $\text{HNO}_3$  angesäuerte  $\text{AgNO}_3$ -Lösung in UPW, so bilden sich bei RT sofort Ag-NP. Betrachtet man die zeitabhängige Nanopartikelbildung bei 23 °C (RT) in Abbildung 21 so stellt man fest, dass die Nanopartikelbildung vom Zeitpunkt Null zum Zeitpunkt 24 h zunimmt. Jedoch ändert sich im Laufe der Inkubationszeit die Konzentration an gebildeten Ag-NP ständig, wobei es zu einer Konzentrationsabnahme und wieder zu einer Konzentrationszunahme kommt. Durch diese Konzentrationsschwankungen, die sich auch in den hohen Standardabweichungen bemerkbar machen, lässt sich bei der Silbernanopartikelbildung keine lineare Zeitabhängigkeit feststellen.



**Abbildung 21:** Einfluss von Zeit und  $\text{AgNO}_3$ -Konzentration auf die Bildung von Ag-NP ( $T = 23\text{ °C}$ ). Die Standardabweichung ist als schwarzer Balken dargestellt.

Mit zunehmender Silbernitrat-Konzentration werden zu allen Zeitpunkten bei 23 °C mehr Silber-Nanopartikel gebildet, mit Ausnahme der Ag-NP-Bildung nach 1 h Inkubation bei Zugabe von 150 ng/L  $\text{AgNO}_3$ , welche aber auf Grund der hohen Standardabweichung vernachlässigt werden kann. Da bei Zugabe von 100 ng/L und 150 ng/L  $\text{AgNO}_3$  eine ähnliche Ag-NP-Konzentration gebildet wird (vgl. Abbildung 21 graue und gelbe Balken), kann man keine lineare Abhängigkeit von der  $\text{AgNO}_3$ -Konzentration bei 23 °C feststellen. Betrachtet man die Ag-NP-Bildung nach 1 h bei verschiedenen Temperaturen in Abbildung 22, ist deutlich zu sehen, dass bei zunehmender  $\text{AgNO}_3$  Zugabe die Ag-NP-Bildung steigt.



**Abbildung 22:** Einfluss von Temperatur und AgNO<sub>3</sub>-Konzentration auf die Bildung von Ag-NP (Inkubationszeit = 1h). Die Standardabweichung ist als schwarzer Balken dargestellt.

Aus Abbildung 22 lässt sich nach einer Stunde Inkubation bei den jeweiligen Temperaturen keine Temperaturabhängigkeit ermitteln, da bei 7 °C mehr Ag-NP gebildet werden als bei 23 °C. Es fällt auf, dass bei 23 °C (oranger Balken) die Ag-NP-Bildung am geringsten ist, wobei bei den anderen Temperaturen 7 °C, 45 °C und 60 °C ungefähr die gleiche Konzentration an Ag-NP gemessen wird; dabei reagiert ein Drittel der zugegebenen Ag-Ionen (aus AgNO<sub>3</sub>) zu Ag-NP. Auffällig sind die hohen Standardabweichungen der Messwerte (siehe Abbildungen 21 und 22). Letztere sowie das Fehlen der Linearität können verschiedene Gründe haben. Entweder können sie durch Adsorption der Partikel oder der Ionen an die Polypropylen-Gefäßwand erklärt werden oder durch Aggregation der Partikel, die wegen der hohen Natrium- und Essigsäurekonzentration im Puffer auftreten kann. Eine weitere Ursache könnte die Wiederauflösung der Ag-NP zu Ag-Ionen sein und die anschließende Regenerierung. Es ist bekannt, dass mit zunehmender Ionenstärke in der Lösung die Nanopartikel-Aggregation zunimmt.<sup>38</sup> Dabei führen bivalente Kationen zu einer stärkeren Aggregation als monovalente. Die Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek- (DLVO) Theorie zur Stabilität kolloidaler Systeme besagt, dass Partikel von einer elektrostatischen Doppelschicht umgeben sind und dass das Gleichgewicht zwischen den anziehenden Van-der-Waals-Kräften und den abstoßenden elektrostatischen Kräften die Stabilität der Kolloidsuspension bestimmt. Die Höhe der elektrischen Ladung im Inneren der Partikel und

der Durchmesser der elektrostatischen Doppelschicht hängen dabei von den Eigenschaften der Lösung wie dem pH-Wert, der Ionenstärke und der Valenz der Elektrolyt-Ionen ab.<sup>103</sup> Bilden sich aus den Ag-NP Aggregate, so können diese wahrscheinlich mit der CPE-Methode nicht mehr vollständig erfasst werden; dadurch kommt es zu einer Abnahme der Ag-NP-Konzentration. Da die Aggregation mit der Zeit und Temperatur zunimmt<sup>104</sup>, treten die Konzentrationsschwankungen verstärkt nach 24 h und bei hohen Temperaturen auf (vgl. Abbildung 21 und 22). Auch die Adsorption an Oberflächen ist temperatur-, pH-Wert- und zeitabhängig. *Struempfer et al.* haben festgestellt, dass die Adsorption an Oberflächen mit abnehmender Ag-Konzentration, zunehmendem pH-Wert, zunehmender Konzentration an gelösten Salzen und Lichteinstrahlung zunimmt.<sup>105</sup> Da die Ag-NP-Konzentration jedoch mit der Zeit nicht nur abnimmt, sondern nach 4 h wieder steigt, lassen sich die Konzentrationsschwankungen nicht allein auf die Adsorption des Silbers an die Gefäßwand und Aggregation der Ag-NP zurückführen, sondern können besser durch die Ag-Ionen-Freisetzung aus Ag-NP und ihre Neubildung erklärt werden. *Liu et al.* haben gezeigt, dass die Ionenfreisetzung mit der Zeit und Temperatur zunimmt<sup>44</sup> und *Glover* konnte feststellen, dass die NP-Neubildung ebenfalls mit der Zeit steigt.<sup>42</sup> Daraus resultiert eine zeit- und temperaturabhängige Reduktion von Ag-Ionen zu Ag-Nanopartikeln, eine Ag-Ionen-Freisetzung aus den gebildeten Ag-NP und wiederum eine Reduktion der freigesetzten Ag-Ionen zu Ag-NP. Die Konzentrationsschwankungen und das Fehlen der Linearität in den Abbildungen 21 und 22 lassen sich somit durch Aggregation, Adsorption an die Gefäßwand und Oxidation und Regenerierung der Ag-NP erklären. Wahrscheinlich finden alle drei Vorgänge gleichzeitig statt. Auch das Fehlen der Temperaturabhängigkeit kann durch diese drei Vorgänge erklärt werden. Da bei höheren Temperaturen mehr Ionen freigesetzt werden, mehr Ag-NP oder -Ionen an die Gefäßwand adsorbieren und mehr -NP aggregieren, ist die Ag-NP-Bildung zwar vielleicht temperaturabhängig, jedoch kann man diesen Trend nicht erkennen, da durch die oben genannten Konkurrenzvorgänge bei allen Temperaturen annähernd die gleiche Ag-NP-Konzentration gebildet wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die natürliche Silber-Nanopartikelbildung in wässriger Lösung ohne Zugabe eines Reduktionsmittels bei kleinen Ag-Ionen-Kon-

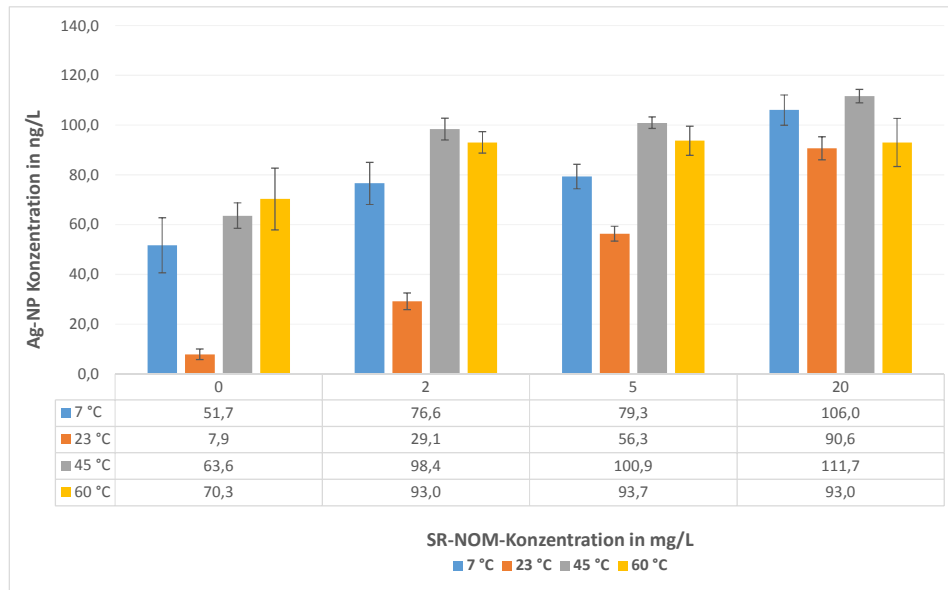
zentrationen im unteren und mittleren ng/L-Bereich weder temperatur- noch zeitabhängig ist, sondern durch Vorgänge wie Aggregation, Adsorption an die Gefäßwand, Oxidation und Regenerierung bestimmt wird.

### **6.3 Silber-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat und NOM mit 2,5 M NaOAc-Puffer (Essigsäure/Acetat-Puffer)**

Zuerst werden die Ergebnisse der SR-NOM- und später die der NR-NOM-induzierten Nanopartikelbildung diskutiert; dabei wird auf deren Abhängigkeit von der NOM-Konzentration, der Temperatur und der Zeit eingegangen. Anschließend wird die NOM-induzierte Ag-NP-Bildung abhängig vom Reduktionsmittel mit der ohne Reduktionsmittel (siehe Kapitel 6.2) verglichen.

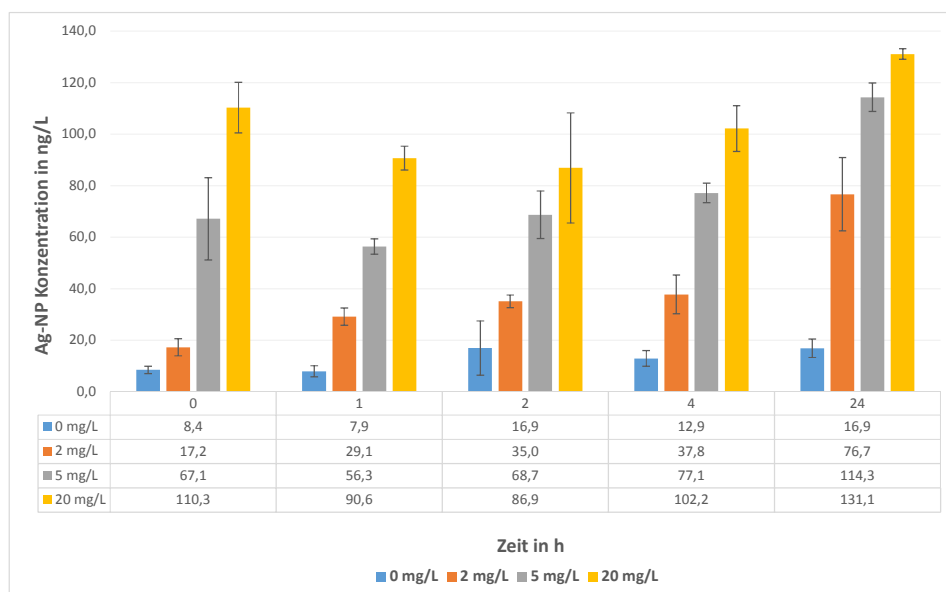
#### **6.3.1 Reduktion mit SR-NOM**

In Abbildung 23 ist die Ag-NP-Bildung gegen die SR-NOM-Konzentration bei Zugabe von 150 ng/L AgNO<sub>3</sub> (als Ag-Ionen-Quelle) aufgetragen. Es wird deutlich, dass bei steigendem NOM-Gehalt in der Lösung die Ag-NP-Bildung grundsätzlich zunimmt, mit Ausnahme der Untersuchungen bei 60 °C, wo die Konzentration an gebildeten Ag-NP in einer 2, 5 und 20 mg/L NOM-Lösung gleich ist. Die SR-NOM-induzierte Ag-NP-Bildung ist nicht temperaturabhängig, da bei 7 °C und 45 °C mehr Ag-NP gebildet werden als bei 23 °C und 60 °C. Bei 45 °C (graue Balken in Abbildung 23) wird die höchste Ag-NP-Konzentration gemessen. Betrachtet man die zeitabhängige Ag-NP-Bildung bei RT in Abhängigkeit von der SR-NOM-Konzentration in Abbildung 24, so stellt man fest, dass die Ag-NP-Konzentration mit der NOM-Konzentration zunimmt, jedoch lässt sich keine Linearität ermitteln. Mit Zunahme der Inkubationszeit entstehen ebenfalls grundsätzlich mehr Ag-NP. Eine Ausnahme stellt der Zeitpunkt Null dar, der die gemessene Ag-NP-Konzentration gleich nach Zugabe von 150 ng/L AgNO<sub>3</sub> beschreibt.



**Abbildung 23:** Einfluss von Temperatur und SR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP (Inkubationszeit = 1 h,  $c(\text{AgNO}_3) = 150 \text{ ng/L}$ ).

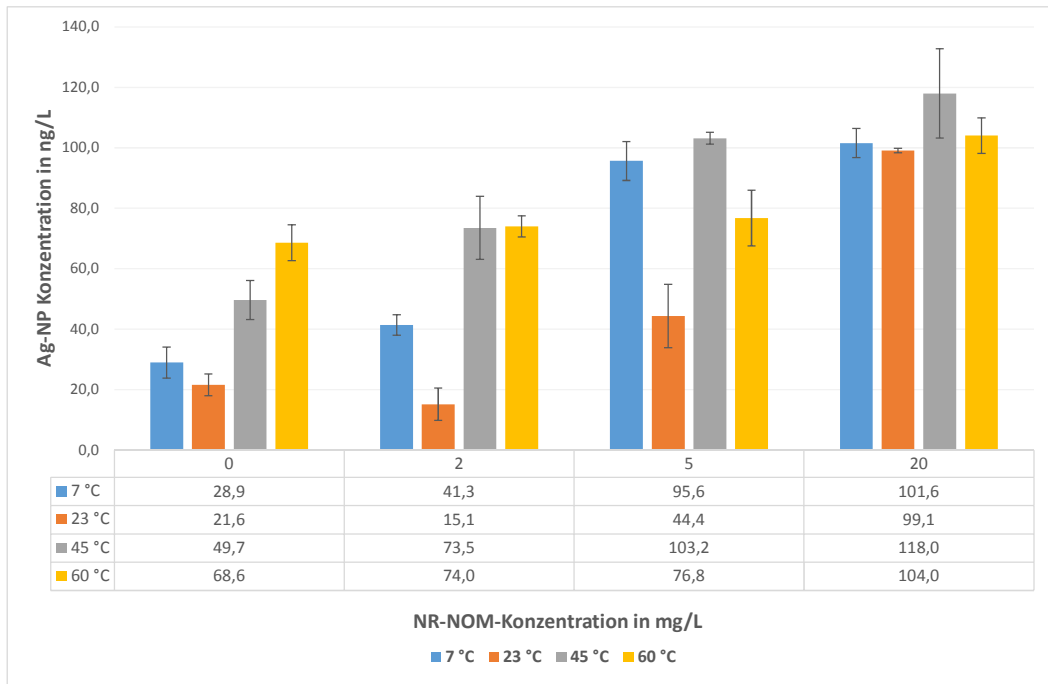
Zu diesem Zeitpunkt bilden sich je nach SR-NOM-Gehalt in der Probe bis zu 110,3 ng/L Ag-NP. Das bedeutet, dass 73 % der Ag-Ionen (aus  $\text{AgNO}_3$ ) in der Lösung zu Ag-NP reagieren. Diese Ag-NP-Konzentration nimmt besonders bei hohen NOM-Konzentrationen mit der Inkubationszeit zuerst ab und steigt nach 24 h auf 131,1 ng/L (nahezu 87 %) an (vgl. Abbildung 24, 20 mg/L SR-NOM, gelber Balken).



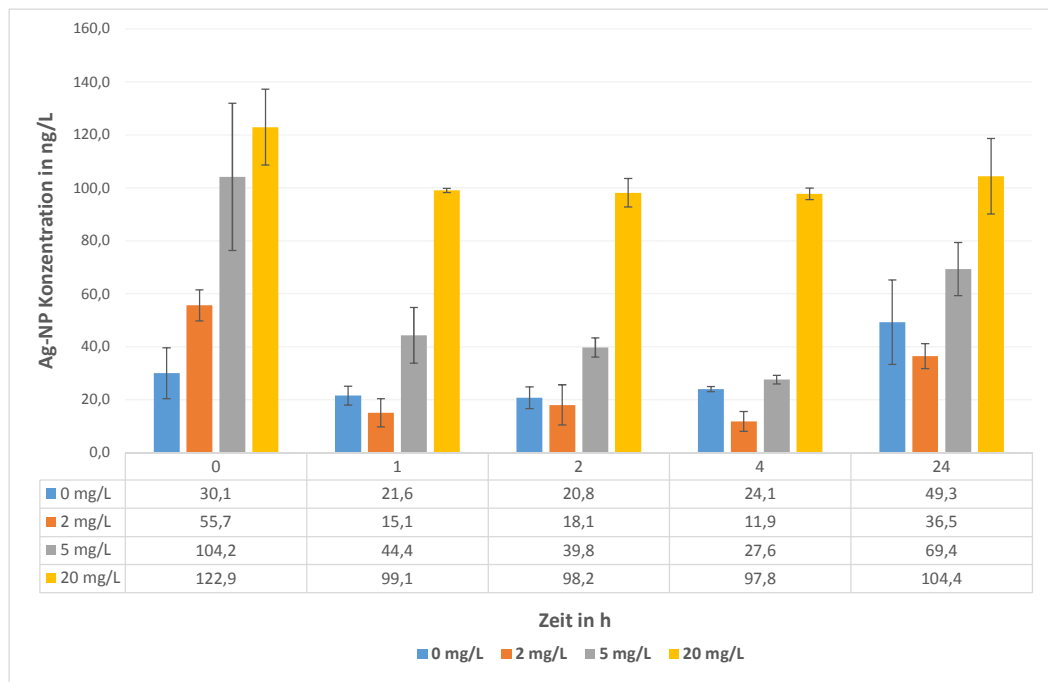
**Abbildung 24:** Einfluss von Zeit und SR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP ( $T = 23 \text{ °C}$ ,  $c(\text{AgNO}_3) = 150 \text{ ng/L}$ ).

### 6.3.2 Reduktion mit NR-NOM

Bei der Reduktion mit NR-NOM erhält man ähnliche Ag-NP-Konzentrationen wie bei der SR-NOM-induzierten Bildung. Auch hier ist die Ag-NP-Konzentration der Proben bei 7 °C höher als bei 23 °C. Mit zunehmendem NOM-Gehalt in der Lösung (5 und 20 mg/L) kann man beobachten, dass die Ag-NP-Konzentration bei 45 °C höher ist als bei 60°C. Es ist keine Temperaturabhängigkeit erkennbar (vgl. Abbildung 25). Mit steigender NOM-Konzentration werden mehr Ag-NP gebildet, jedoch lässt sich kein linearer Zusammenhang erkennen. Bei 20 mg/L NR-NOM in der Lösung ist die gebildete Nanopartikelkonzentration bei allen Reaktionstemperaturen ähnlich und beträgt 98 – 123 ng/L. Bezogen auf die Silbernitrat-Zugabe reagieren 66 - 82 % der Ag-Ionen (aus AgNO<sub>3</sub>) zu Ag-NP (vgl. Abbildung 26 gelbe Balken). Im Vergleich dazu beträgt die Ag-NP-Konzentration bei der SR-NOM-Reduktion (vgl. Kapitel 6.3.1, Abbildung 24) in einer 20 mg/L NOM Lösung 87 – 131 ng/L. D.h. bezogen auf die AgNO<sub>3</sub>-Zugabe reagieren 58 - 87 % der Ag<sup>+</sup> zu Ag-NP. Somit ist das NR-NOM etwas reaktiver als das SR-NOM. Bei der zeitabhängigen Ag-NP-Bildung in Abbildung 26 kann man mit Zunahme der NR-NOM-Konzentration genauso eine erhöhte Bildung an Ag-NP beobachten. Jedoch nimmt wie bei der SR-NOM induzierten Bildung auch bei der NR-NOM induzierten Bildung die Ag-NP-Konzentration im Laufe der Zeit mal ab und mal zu. Dieser Effekt tritt beim NR-NOM stärker auf als beim SR-NOM. Auffällig ist, dass zum Zeitpunkt Null die höchste Ag-NP-Konzentration gebildet wird (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 25:** Einfluss von Temperatur und NR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP (Inkubationszeit = 1 h,  $c(\text{AgNO}_3) = 150 \text{ ng/L}$ ).



**Abbildung 26:** Einfluss von Zeit und NR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP ( $T = 23 \text{ °C}$ ,  $c(\text{AgNO}_3) = 150 \text{ ng/L}$ ).



Vergleicht man die NOM-induzierte Ag-NP-Bildung mit der ohne Reduktionsmittel, so stellt man fest, dass ohne NOM viel weniger Ag-NP gebildet werden. Ansonsten zeigt die Bildung denselben Trend.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ag-NP-Bildung aus AgNO<sub>3</sub> (als Ag-Ionen-Quelle) nicht temperaturabhängig ist. Bei 23 °C ist die Ag-NP-Bildung am geringsten. Mit steigender NOM-Konzentration nimmt zwar die Ag-NP-Bildung zu, jedoch ohne einen linearen Zusammenhang; dabei wirkt NR-NOM stärker reduzierend im Vgl. zu SR-NOM. Mit steigender Inkubationszeit kommt es zur einer alternierenden Zu- und Abnahme der Ag-NP-Konzentration in der Lösung. Dies sowie das Fehlen der Temperaturabhängigkeit und der NOM-Konzentrationsabhängigkeit deuten darauf hin, dass auch die NOM-induzierte Ag-NP-Bildung von Vorgängen wie Aggregation, Adsorption an die Gefäßwand, Oxidation und Regenerierung der Ag-NP bestimmt wird. Deswegen soll im nächsten Kapitel die Adsorption von Ag-NP und -Ionen an die PP-Gefäßwand untersucht werden.

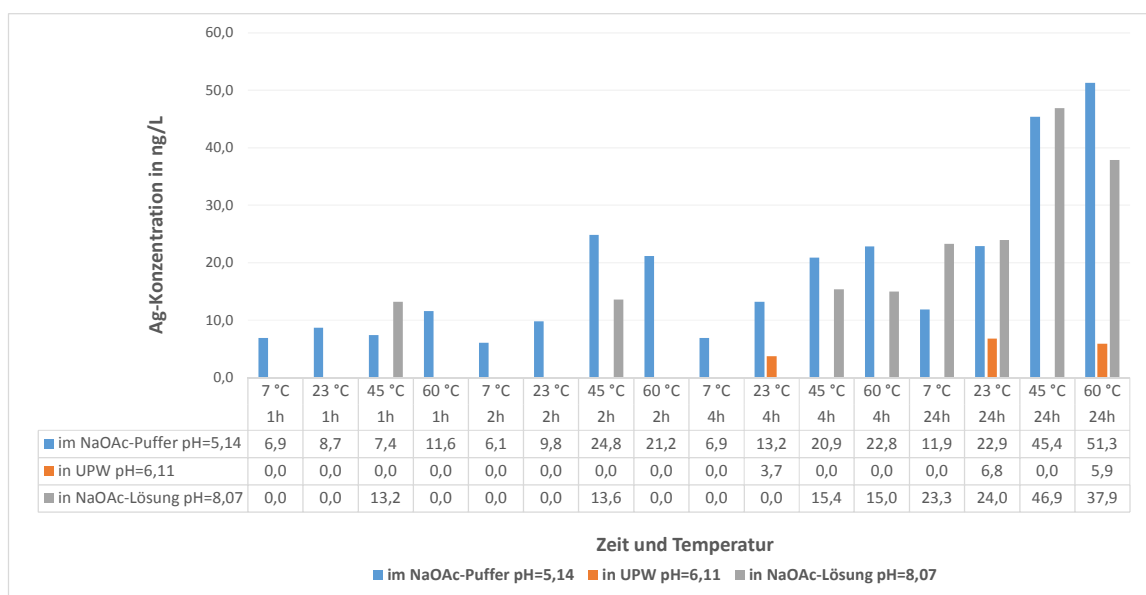
## **6.4 Adsorption von Ag-Nanopartikeln und -Ionen an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes**

Da bei vorherigen Untersuchungen (siehe Kapitel 6.2 und 6.3) mit steigender Inkubationszeit eine alternierende Zu- und Abnahme der Ag-NP-Konzentration in der Lösung beobachtet werden konnte, soll in diesem Kapitel überprüft werden, ob der Grund für diese Konzentrationsabnahme die Adsorption der Ag-NP oder -Ionen an die PP-Wand der Reaktionsgefäße ist. Zuerst wird die Adsorption von Ag-NP und -Ionen an die Wand der Reaktionsgefäße untersucht und anschließend werden die Ergebnisse dieser Untersuchung mit denen von der Adsorption der Ag<sub>2</sub>S-NP an die Gefäßwand verglichen. Außerdem wird die Adsorption der Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP an die PP-Wand der Probengefäße unter dem Einfluss verschiedener Additive, wie NOM und EDTA diskutiert.

### **6.4.1 Untersuchung der Adsorption von Ag-NP und -Ionen an die Gefäßwand**

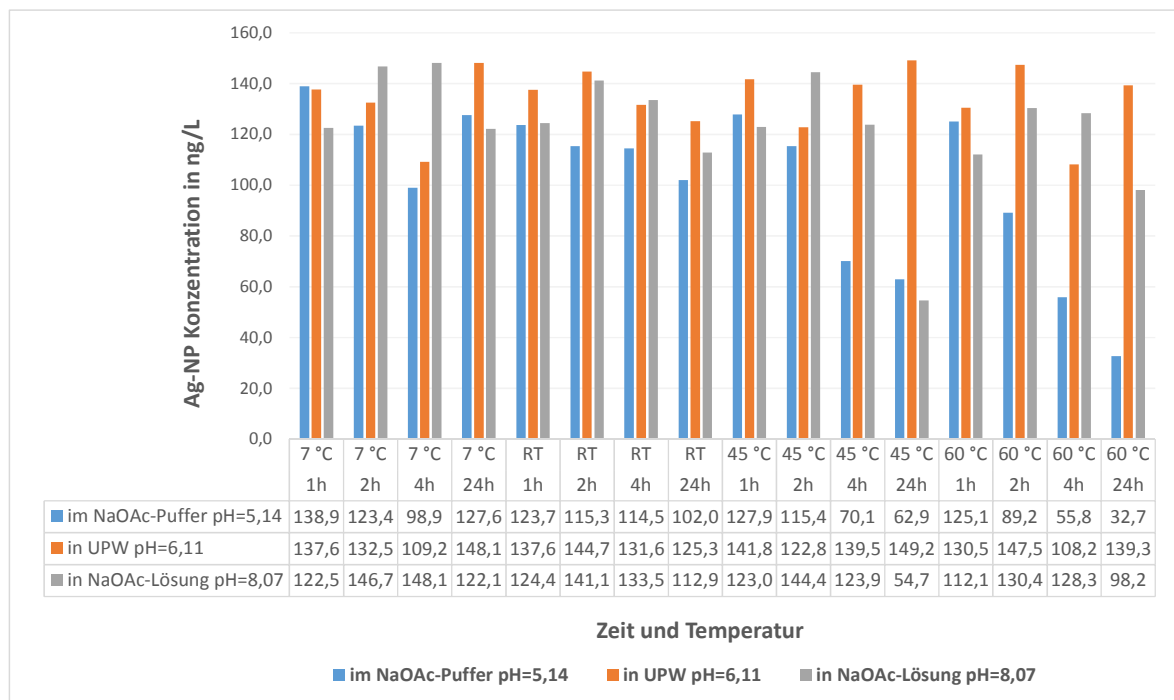
Da die vorherigen Untersuchungen in einer hoch konzentrierten NaOAc-Puffer-Lösung (c = 62,5 mM) durchgeführt wurden, um trotz der Zugabe einer HNO<sub>3</sub>-stabilisierten AgNO<sub>3</sub>-Lösung einen bei der Analyse der Ag-NP für die CPE benötigten, konstanten

pH-Wert von fünf der Reaktionslösung zu gewährleisten, wird die Adsorption der Ag-NP an die Gefäßwand in einer UPW-, 62,5 mM NaOAc-Puffer- und 62,5 mM NaOAc-Lösung untersucht. Die Bestimmung der Metall-Konzentration, der an die Gefäßwand adsorbierten Ag-NP erfolgte wie in Kapitel 5.7 beschrieben. In Abbildung 27 ist die Ag-Konzentration, der an die Gefäßwand adsorbierten Ag-NP in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und -temperatur aufgetragen. Die stärkste Adsorption an die Gefäßwand lässt sich in der NaOAc-Puffer-Lösung, pH = 5,14 beobachten (siehe blaue Balken, Abbildung 27), gefolgt von der in der NaOAc-Lösung, pH = 8,07 (graue Balken, Abbildung 27). In UPW, pH = 6,11 findet nahezu keine Adsorption der Ag-NP an die Gefäßwand statt (orange Balken, Abbildung 27). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Adsorption von Ag-NP an die Gefäßwand in sehr salzhaltigen Lösungen, wie den hier verwendeten nicht vom pH-Wert abhängig ist, sondern davon abhängt ob, wieviel und welche Salze in der Lösung vorhanden sind. Der NaOAc-Gehalt beträgt in der verwendeten NaOAc-(Puffer)-Lösung 5 g/L. In der NaOAc-Puffer-Lösung (pH-Wert = 5,14) wird die stärkste Adsorption an die Gefäßwand gemessen, diese beträgt 4 - 34 % bezogen auf die Ag-NP-Konzentration in der Reaktionslösung und ist zeit- und temperaturabhängig (siehe blaue Balken, Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Einfluss verschiedener Lösungen auf die Adsorption von Ag-NP an die PP-Wand der Proengefäße.

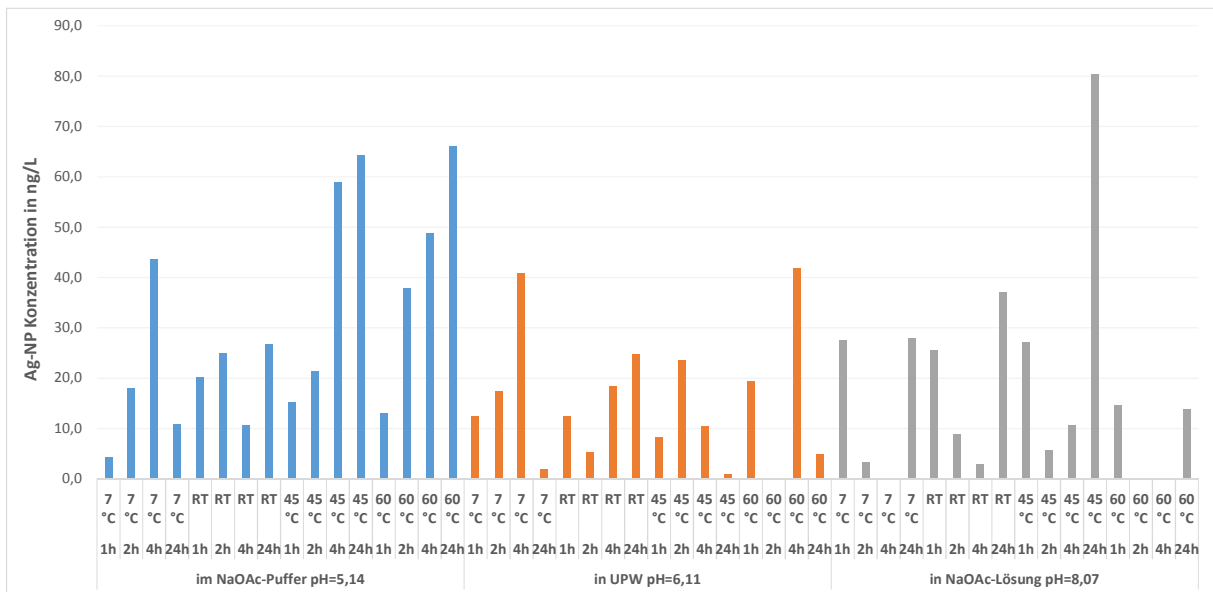
Betrachtet man den nicht an die Gefäßwand adsorbierten Ag-NP-Rest in der Lösung (siehe Abbildung 28) so wird deutlich, dass die gemessenen Ag-NP-Konzentrationen aus Abbildung 27 und 28 nicht miteinander korrelieren. Obwohl bei 7 °C nach 4h keine Adsorption an die Gefäßwand in der UPW-Lösung auftritt (vgl. Abbildung 27), sinkt der Ag-NP-Gehalt um 40 ng/L (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Nicht an die Gefäßwand adsorbierte Ag-NP-Konzentration in unterschiedlichen Lösungen.

Somit lässt sich ein großer Teil der Nanopartikel nicht wiederfinden, dieser ist in Abbildung 29 dargestellt. Diese Ag-NP-Konzentration in Abbildung 29 ergibt sich durch Subtraktion der wiedergefundenen Ag-NP-Konzentration (an die Gefäßwand adsorbierter und noch in der Lösung vorhandener Ag-NP-Gehalt) von der eingesetzten Ag-NP-Konzentration (150 ng/L). Dieser nicht wiedergefundene Ag-NP-Anteil ist wahrscheinlich zu Ionen oxidiert worden oder aggregiert. Man kann jedoch davon ausgehen, dass in UPW keine Aggregation der Ag-NP stattfindet. Da sich jedoch auch in UPW bei 7 °C nach 4 h Inkubation fast ein Drittel der zugegebenen Ag-NP nicht wiederfinden lässt, kann man davon ausgehen, dass dieser Anteil der Ag-NP zu Ionen oxidiert ist. Die hohe nicht wiedergefundene Ag-NP-Konzentration in der NaOAc-Puffer-Lösung lässt

sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass sowohl ein Großteil der Ag-NP zu Ionen oxidiert als auch in der salzhaltigen Lösung aggregiert.

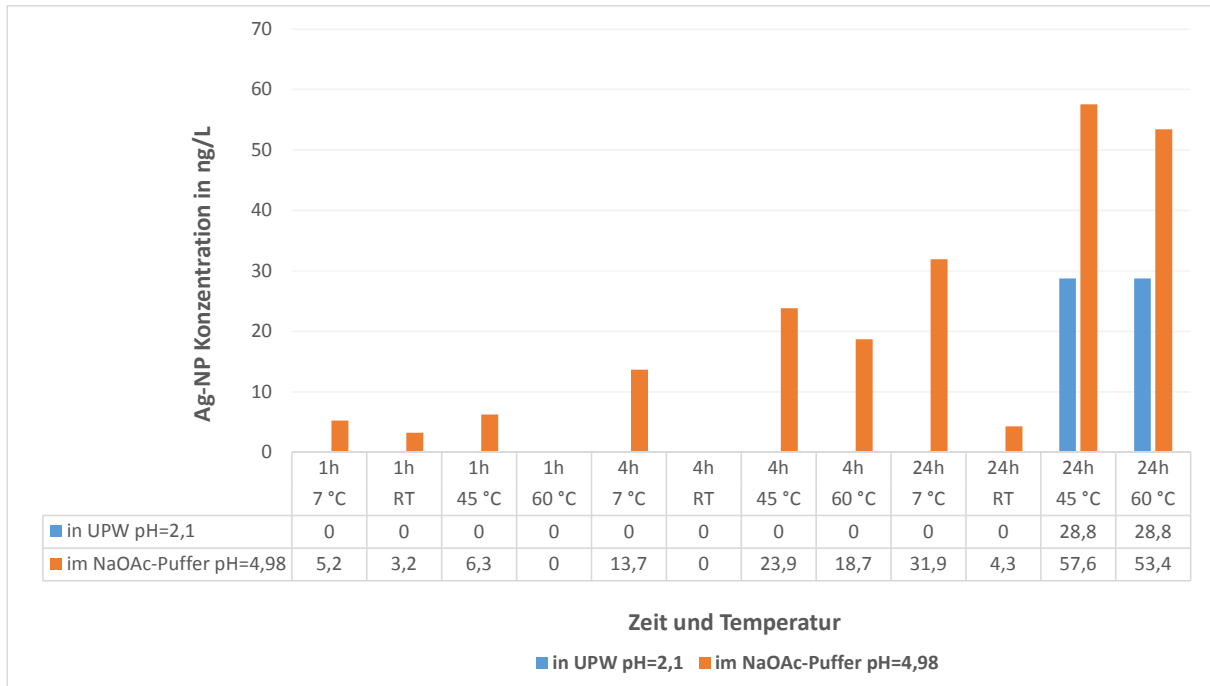


**Abbildung 29:** Nicht wiedergefundener Ag-NP-Rest. (Berechnet aus eingesetzter Ag-NP-Konzentration und gefundener Ag-NP-Konzentration).

Wie Abbildung 27 verdeutlicht, findet die stärkste Adsorption der Ag-NP an die Gefäßwand in einer NaOAc-Puffer-Lösung und die geringste in UPW statt. Desweiteren wurden die vorherigen Untersuchungen zur Bildung der Ag-NP aus  $\text{AgNO}_3$  in einer NaOAc-Puffer-Lösung durchgeführt (vgl. Kapitel 6.2 und 6.3). Aus diesen Gründen wurde zur Vereinfachung die Versuchsreihe für den Vergleich der Adsorption der Ag-NP und -Ionen an die Gefäßwand nur in der NaOAc-Puffer-Lösung und in UPW durchgeführt.

Vergleicht man die Adsorption der Ag-Ionen an die Gefäßwand in Abbildung 30 mit der von Nanopartikeln in Abbildung 27, so stellt man fest, dass die Ag-Ionen stärker an die Gefäßwand adsorbieren. In UPW macht sich die Adsorption der Ag-Ionen an die Gefäßwand erst nach 24 h bei Temperaturen von 45 °C und 60 °C bemerkbar. Dabei beträgt die Konzentration, der an die Gefäßwand adsorbierten Ag-Ionen 28,8 ng/L, im Vgl. dazu adsorbieren nur 5,9 ng/L Ag-NP nach 24 h Inkubation bei 60 °C an die Gefäßwand. Auch in der NaOAc-Puffer-Lösung adsorbieren nach 24 h Inkubation bei 45 °C 57,6 ng/L Ag-Ionen an die Gefäßwand, wobei in derselben Lösung bei derselben Temperatur nur 45,4 ng/L Ag-NP an die Gefäßwand adsorbieren.

Die Adsorption der Ionen an die Gefäßwand ist pH-Wert- und zeitabhängig. In der UPW-Lösung lässt sich außerdem ergänzend eine Temperaturabhängigkeit beobachten, da in dieser nur nach 24 h bei 45 °C und 60 °C eine Adsorption der Ag-Ionen an die Gefäßwand auftritt.



**Abbildung 30:** Adsorption der Ag-Ionen an die PP-Wand der Probengefäße in UPW und in einer 62,5 mM NaOAc-Puffer-Lösung.

Es kann zusammengefasst werden, dass die Adsorption von Ag-Ionen im Gegensatz zu der von -Nanopartikeln an die Gefäßwand, wie auch *Struempfer et al.* belegen konnten, pH-, temperatur- und zeitabhängig ist. Sie tritt verstärkt bei hohen pH-Werten, hohen Temperaturen und bei längerer Zeiteinwirkung auf.<sup>105</sup> Der Konzentrationsrückgang in der Ag-NP-Lösung kann jedoch nicht nur mit der Adsorption von Nanopartikeln an die Gefäßwand erklärt werden, sondern kommt durch weitere Vorgänge, die sich in der Reaktionslösung abspielen, zustande. In sehr salzhaltigen Lösungen ist neben der Ionenbildung, die Aggregation der wohl wahrscheinlichste Vorgang. In UPW, wo man die Aggregation der Ag-NP ausschließen kann, lässt sich die Ag-NP-Konzentrationsabnahme durch Ag-Ionen-Bildung erklären. Werden Ionen aus Nano-

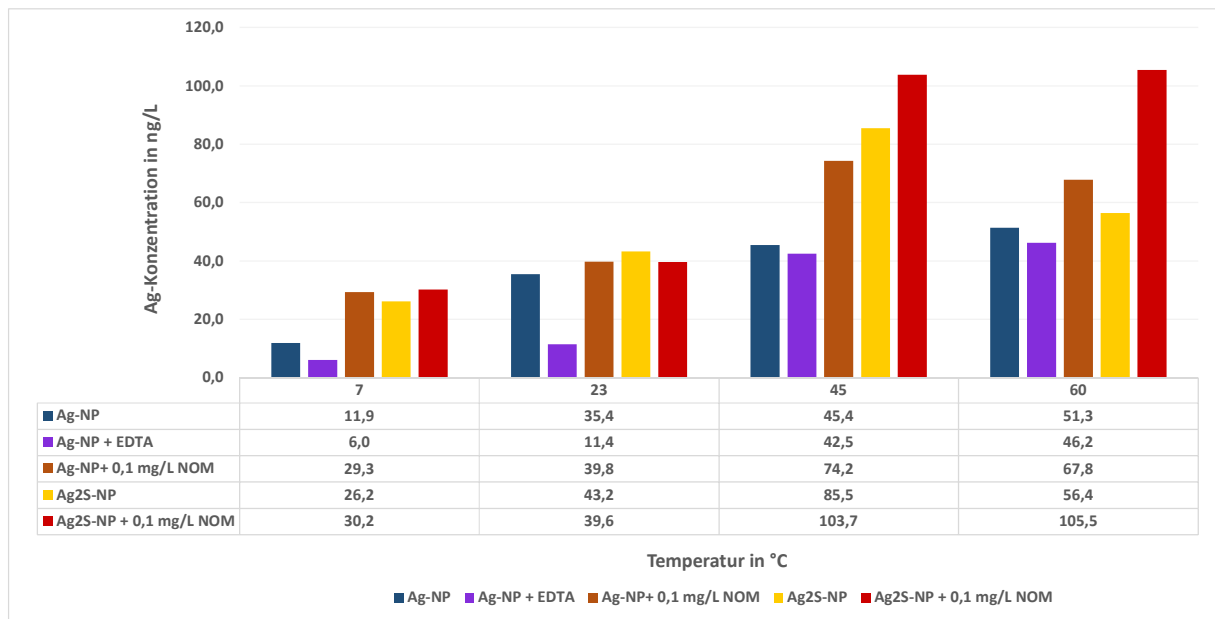
partikeln freigesetzt, so neigen diese wahrscheinlich stärker zur Adsorption an die Gefäßwand als Nanopartikel, somit sollte durch diesen Vorgang die Adsorption an die Gefäßwand zunehmen und durch die Neubildung von Nanopartikeln abnehmen.

Die Adsorption an die Gefäßwand scheint jedoch der vernachlässigbarste Vorgang unter den drei Konkurrenzreaktionen zur Ag-NP-Bildung zu sein, da dieser Beitrag verglichen mit den anderen beiden (siehe Abbildung 29) am geringsten ist.

#### **6.4.2 Einfluss von NOM und EDTA auf die Adsorption von Ag-NP, Ag-Ionen und Ag<sub>2</sub>S-NP an die PP-Wand des Reaktionsgefäßes**

Da Ag<sub>2</sub>S-NP für ihre Stabilität und ihr niedriges Löslichkeitsprodukt bekannt sind, wird ihre Adsorption an die Gefäßwand untersucht und mit der von Ag-Ionen und -NP verglichen. Dazu werden die Untersuchungen in einer 62,5 mM NaOAc-Puffer-Lösung (Essigsäure/Acetat-Puffer) und bei 24 h Inkubation durchgeführt, da unter diesen Bedingungen Ag am stärksten an die Gefäßwand adsorbiert (siehe Kapitel 6.4.1). Zum Vergleich der Oberflächenladung der Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP wird ihr Zeta-Potential gemessen. Da NOM als Stabilisierung-Reagenz für Ag-NP gegenüber der Aggregation dieser bei hohen Salzkonzentrationen bekannt ist, soll der NOM-Einfluss auf die Adsorption der untersuchten Spezies an die Gefäßwand studiert werden.<sup>38</sup> Dabei soll eine 0,1 mg/L NOM-Lösung verwendet werden, da dieser NOM-Gehalt der natürlichen NOM-Konzentration im Oberflächenwasser entspricht. Außerdem gilt es die Frage zu klären, ob die Adsorption von Ag-Nanopartikeln an die Gefäßwand durch die freigesetzten Ionen oder durch die Partikel selbst verursacht wird; deswegen sollen durch Zugabe einer gesättigten EDTA-Lösung die freigesetzten Ag-Ionen komplexiert werden.

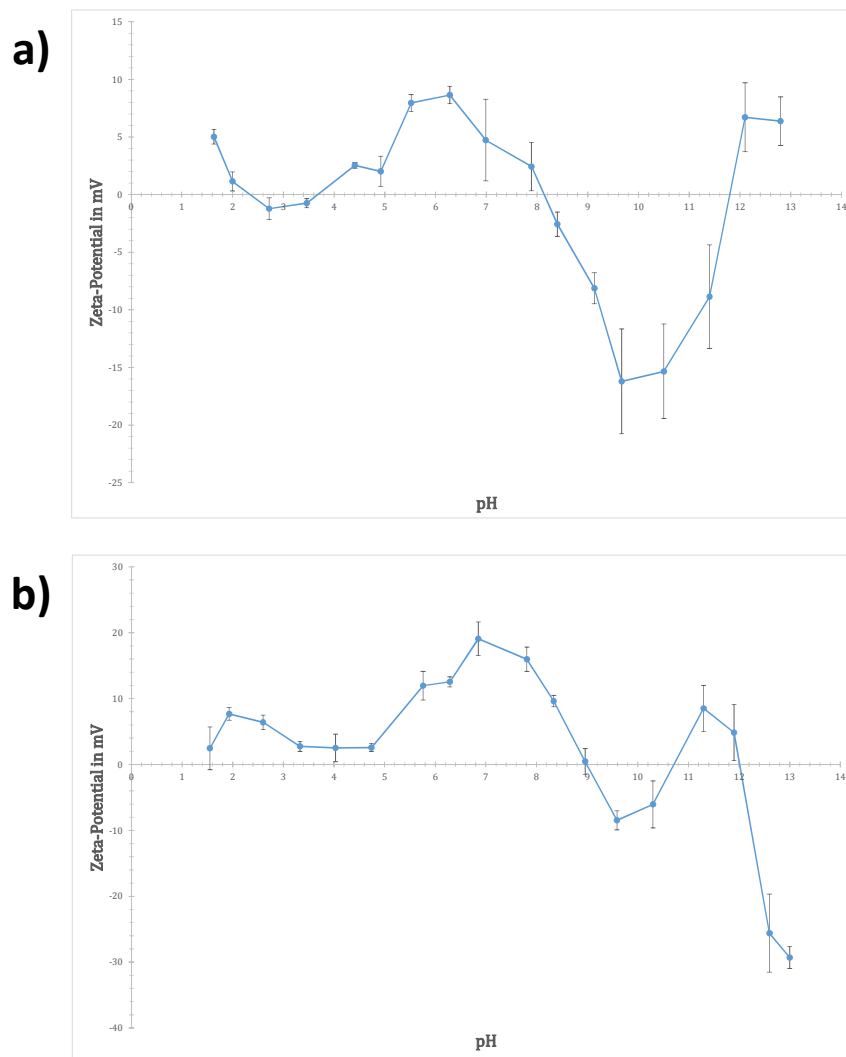
In Abbildung 31 ist die Adsorption von Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP an die Gefäßwand in unterschiedlichen Lösungen in Abhängigkeit von der Temperatur graphisch dargestellt. Vergleicht man diese für die einzelnen Reaktionsansätze miteinander, so kann man in Abbildung 31 erkennen, dass die Ag<sub>2</sub>S-NP (gelbe Balken) stärker an die Gefäßwand adsorbieren als die Ag-NP (blaue Balken) und dass die Adsorption verstärkt in einer 0,1 mg/L NOM-Lösung stattfindet (braune und rote Balken).



**Abbildung 31:** Adsorption von Nanopartikeln an die PP-Wand der Probengefäße nach 24 h Inkubation, bei Zugabe eines 2,5 M NaOAc-Puffers.

EDTA kann die Adsorption an die Gefäßwand zwar nicht unterbinden, minimiert diese jedoch (lila Balken). Auch im Falle der Ag-Ionen führt die Zugabe von EDTA zu einer Abnahme der Adsorption an die PP-Wand der Probengefäße (siehe Abbildung 33 hellgrüne und dunkelgrüne Balken). Dort sieht man nochmal deutlich, dass die Ag-Ionen stärker an die Gefäßwand adsorbieren als die Ag-NP (vgl. hellgrüne und blaue Balken). Besonders bei hohen Temperaturen scheint EDTA gegen die Adsorption der Ionen an die PP-Wand der Probengefäße zu schützen.

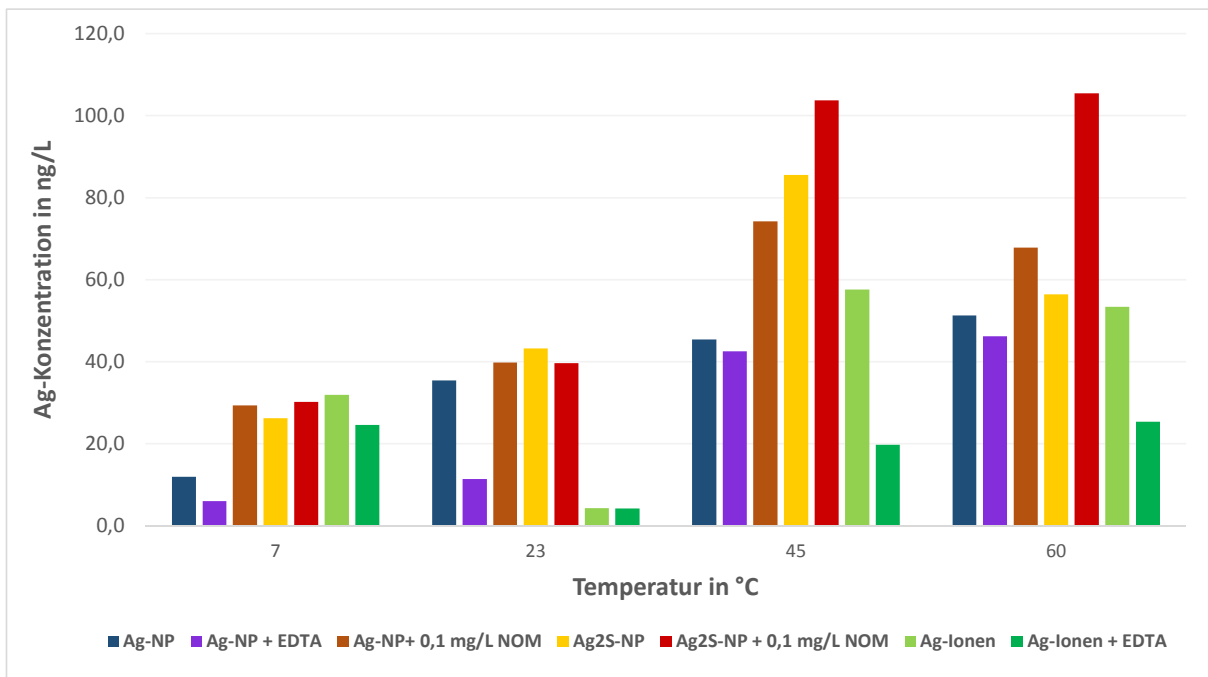
Da die Adsorption an die Gefäßwand maßgeblich von der Oberfläche der Partikel bestimmt wird, adsorbieren die Partikel, deren Oberfläche im Vergleich zu ihrem Volumen viel größer ist (spezifischen Oberfläche) stärker an die Gefäßwand. Durch das NOM in der Lösung bilden sich NOM-stabilisierte Ag-NP. Dieses NOM-Coating führt zu einer stärkeren Adsorption an die Gefäßwand, da das NOM zahlreiche funktionelle Gruppen besitzt, die zur Anhaftung an die Gefäßwand führen können. Auch die Ag<sub>2</sub>S-NP besitzen im Vergleich zu den Ag-NP ein anderes Oberflächenverhalten. Das zeigt auch die Zeta-Potential-Bestimmung der Partikel in der Abbildung 32. Das Ag<sub>2</sub>S-Coating an der Ag-NP-Oberfläche besteht vermutlich nicht aus reinem Ag<sub>2</sub>S, sondern auch aus Silberpolysulfid. Dabei bilden die Schwefelatome untereinander kettenartige Strukturen durch Disulfidbrücken aus. Diese Polysulfide absorbieren demnach stärker an Oberflächen.



**Abbildung 32:** Zeta-Potential in Abhängigkeit vom pH-Wert der a) Ag-NP und b) Ag<sub>2</sub>S-NP.

Durch die Addition von EDTA kann die Adsorption an die Gefäßwand nicht vollständig unterbunden werden, weil entweder die Ag-EDTA-Komplexe ebenfalls an die PP-Wand der Probengefäße adsorbieren, oder weil die Adsorption an die Gefäßwand nicht nur durch die Ag-Ionen, sondern durch beide, Ionen und Partikel, bestimmt wird. Das sieht man vor allem am Beispiel der Ag-Ionen in Abbildung 33: Bei hohen Temperaturen wird die Konzentration an Ag<sup>+</sup>, die an die Gefäßwand adsorbiert, durch Zugabe von EDTA nahezu halbiert (siehe grüne Balken). Im Gegensatz dazu lässt sich bei den Ag-NP dieser Effekt nicht beobachten (blaue und lila Balken). Würden nur die freigesetzten Ag-Ionen an die Gefäßwand adsorbieren, so müsste man denselben Zusammenhang sowohl bei den Ag-Ionen als auch bei den Ag-NP beobachten.





**Abbildung 33:** Adsorption von Nanopartikeln und Ionen an die PP-Wand der Probengefäße nach 24 h Inkubation, bei Zugabe eines 2,5 M NaOAc-Puffers.

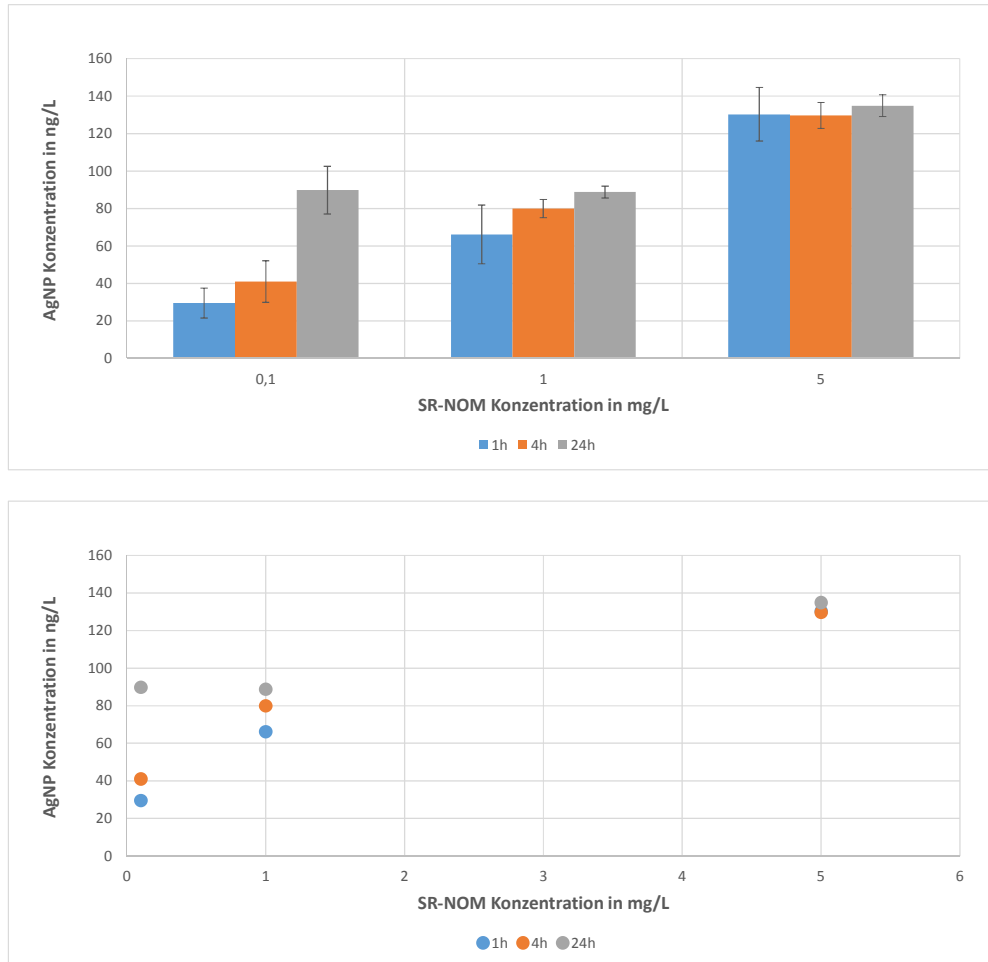
Die Tatsache, dass Ag<sub>2</sub>S-NP stärker an die Gefäßwand adsorbieren, deutet darauf hin, dass die Ag<sub>2</sub>S-NP in den natürlichen Gewässern wahrscheinlich durch Wechselwirkung und Bindung ihrer Polysulfidgruppen mit der Biomasse, wie z.B. Huminstoffe und NOM in diese eingelagert werden, mit ihr absinken und damit überwiegend im Sediment vorhanden sind. Diese Vermutung könnte auch erklären, wieso trotz hohem Gehalt an natürlich gebildeten Ag-Nanopartikeln nur ein geringer NP-Gehalt von einigen ng/L an anthropogenen Ag-NP in natürlichen Gewässern gefunden wird.<sup>114</sup>

## 6.5 Silber-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat und SR-NOM

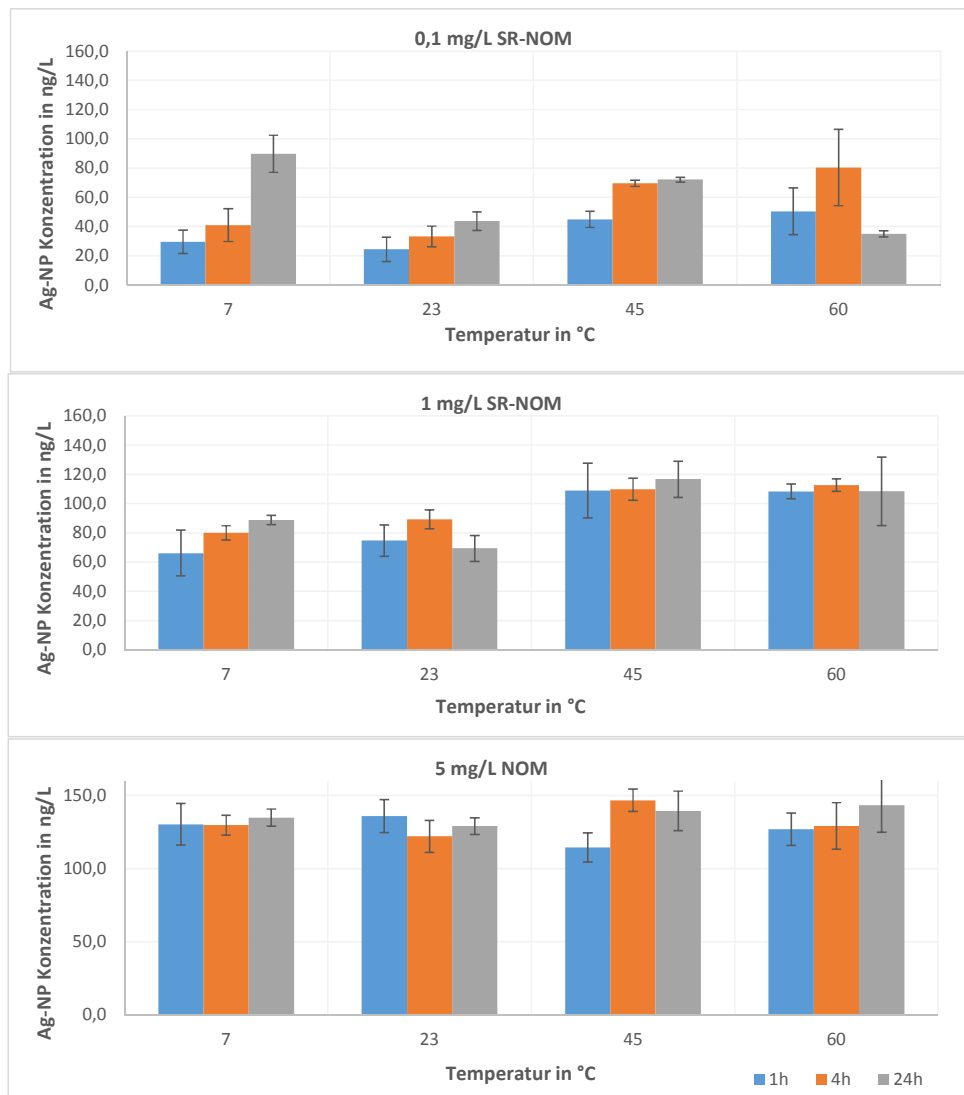
Damit die Adsorption an die Gefäßwand und die Aggregation der Ag-NP vernachlässigt werden kann, werden weitere Untersuchungen in einer UPW-Lösung durchgeführt. Nach der Inkubation wird der pH-Wert der Lösung durch NH<sub>3</sub> angehoben und anschließend werden die CPE-Reagenzien hinzugegeben.

Betrachtet man die Ag-NP-Bildung in Abhängigkeit von der NOM-Konzentration bei 7 °C in Abbildung 34, so wird deutlich, dass mit zunehmendem NOM-Gehalt in der Lösung die Ag-NP-Bildung zunimmt. Jedoch lässt sich kein linearer oder sonstiger Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen ermitteln. Schaut man sich die Ag-NP-

Bildung bei verschiedenen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen an (siehe Abbildung 35), so kann man auch keine Temperatur- und Zeitabhängigkeit, vor allem bei hohen Temperaturen und niedrigen NOM-Konzentrationen beobachten.



**Abbildung 34:** Einfluss von Zeit und SR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP ( $T = 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $c(\text{AgNO}_3) = 150\text{ ng/L}$ ).

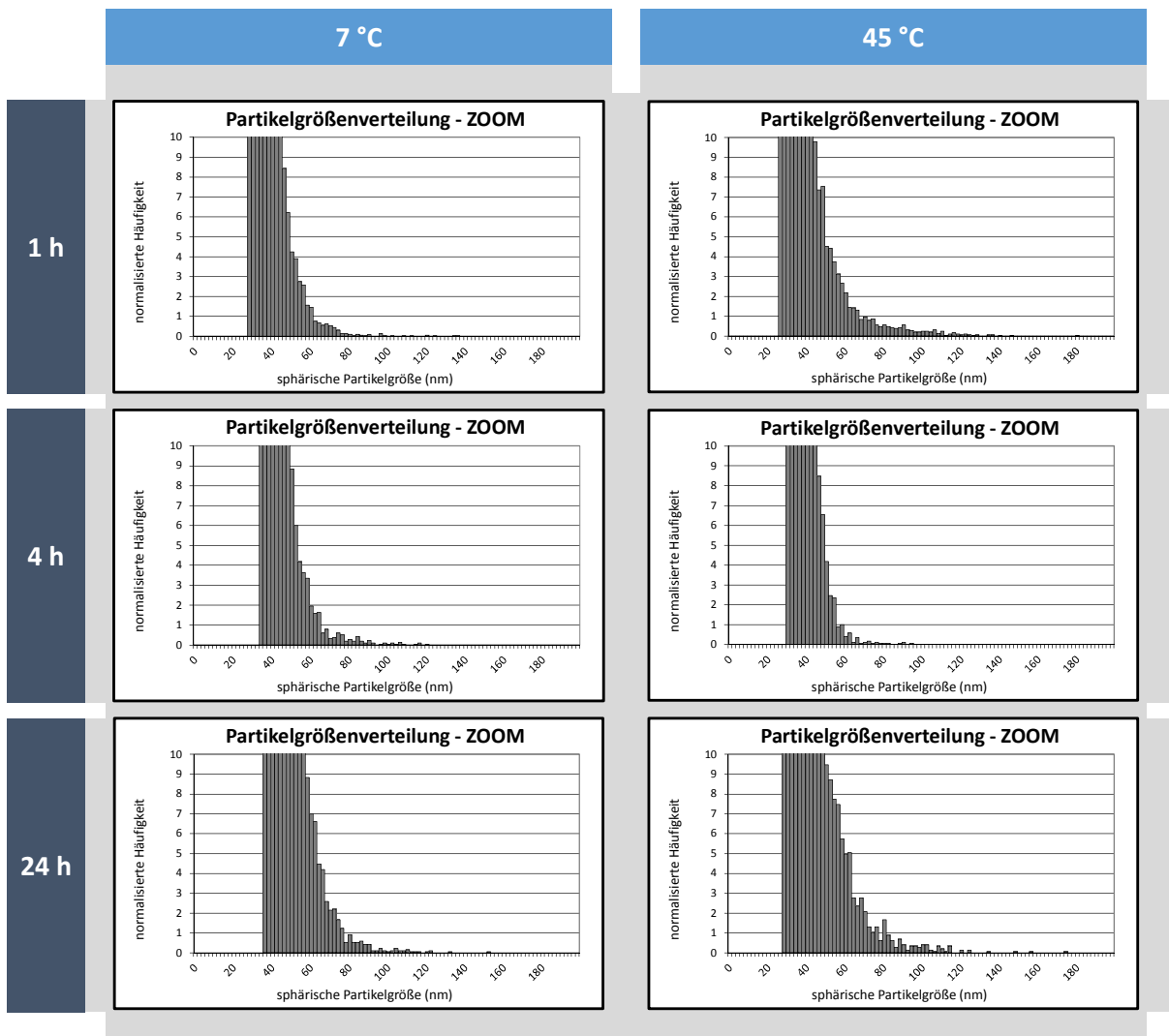


**Abbildung 35:** Einfluss von Zeit, Temperatur und SR-NOM Konzentration auf die Bildung von Ag-NP ( $c(\text{AgNO}_3) = 150 \text{ ng/L}$ ).

Es wird jedoch deutlich, dass ein erheblicher Anteil der zugegebenen Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) zu Ag-NP reagiert. Während bei 0,1 mg/L NOM in der Lösung bis zu 60 % der Ag-Ionen zu -NP reagieren, steigt dieser prozentuale Anteil auf fast 78 % in einer 1 mg/L NOM-Lösung. In einer 5 mg/L NOM-Lösung liegen kaum noch Ionen in der Lösung vor.

Man kann wieder eine zeitabhängige Ag-NP-Konzentrationszunahme und -abnahme, vor allem bei hohen Temperaturen und niedrigen NOM-Konzentrationen beobachten, die auf die Ag-Ionenfreisetzung und -Nanopartikelneubildung zurückzuführen ist. Diese findet nach *Liu und Glover et al.* bevorzugt bei hohen Temperaturen, niedrigen NOM-Konzentrationen, längerer Zeiteinwirkung und in wässrigen Lösungen statt.<sup>42,44</sup>

Des Weiteren wurde die Partikelgrößenverteilung der gebildeten Ag-NP bei Zugabe von 150 ng/L Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) in Abhängigkeit der Temperatur (bei 7 °C und 45 °C) und Zeit in einer 0,1 mg/L NOM-Lösung untersucht. Die Ergebnisse der SP-ICP-MS-Messung in Abbildung 36 zeigen deutlich, dass sich die Partikelgröße der Ag-NP mit der Zeit und Temperatur in der NOM-Lösung ändert.

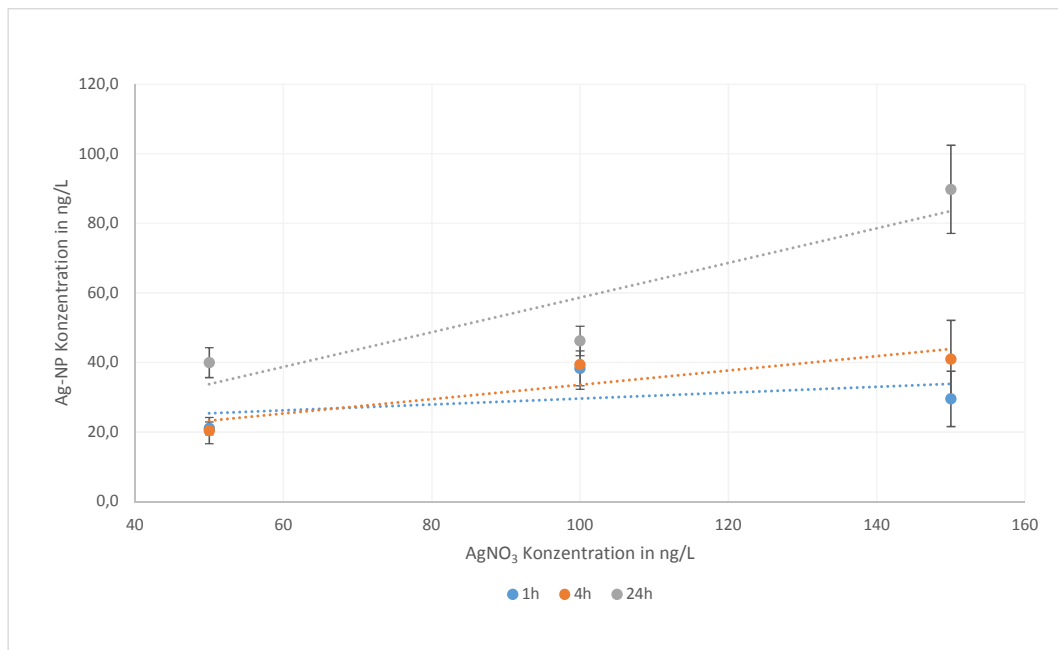


**Abbildung 36:** SP-ICP-MS-Messung der Partikelgrößenverteilung der durch NOM gebildeten Ag-NP bei 7 °C und 45 °C. Nach 1 h Inkubation, 4 h Inkubation und 24 h Inkubation.

Sowohl bei 7 °C als auch bei 45 °C entstehen Ag-NP mit einer breiten Größenverteilung. Betrachtet man die zeitabhängige Bildung bei 7 °C, so stellt man fest, dass bei 4 h Inkubation (im Vergleich zur 1 h Inkubation) ein Teil der Partikel größer wird; dies macht sich dadurch bemerkbar, dass die normalisierte Häufigkeit bei 70 nm abnimmt

und bei 80 nm zunimmt. Ein anderer Teil der Partikel löst sich wiederum auf; das kann man daran erkennen, dass die Größenverteilung schmäler wird, obwohl sich mehr größere Partikel bilden. Nach 24 h ist wiederum die Größenverteilung breiter, wobei im Vergleich zu 4 h deutlich mehr 70 und 80 nm große Partikel vorhanden sind. Derselbe Zusammenhang lässt sich auch bei Inkubation unter 45 °C ableiten. Mit der Inkubationszeit reifen die Nanopartikel zu größeren Partikeln heran, wobei sich nach einer Stunde Inkubation ein Teil der Partikel auflöst, um neue Partikel nach 24 h zu bilden. Nach 24 h sind bei 45 °C Partikel aller Größen bis zu 175 nm vorhanden. Vergleicht man die Partikelgrößen der 7 °C und 45 °C Proben miteinander, so stellt man fest, dass sich bei 45 °C verstärkt größere Partikel bilden und die Größenverteilung viel breiter ist. Da jedoch mit der SP-ICP-MS nur Partikel  $\geq 10$  nm detektiert werden können, kann man aus Abbildung 36 nicht auf die reale Größenverteilung in der Probe schließen. Deswegen kann man nicht eindeutig sagen, welche Partikel sich verstärkt auflösen, die kleineren oder die größeren.

Die weiteren Untersuchungen zur NOM-induzierten Ag-NP-Bildung werden bei 7 °C durchgeführt, da bei dieser Temperatur die Ionenfreisetzung deutlich minimiert ist. Außerdem sollen die Untersuchungen in einer 0,1 mg/L NOM-Lösung durchgeführt werden, da diese NOM-Konzentration, dem von Grundwasser entspricht.

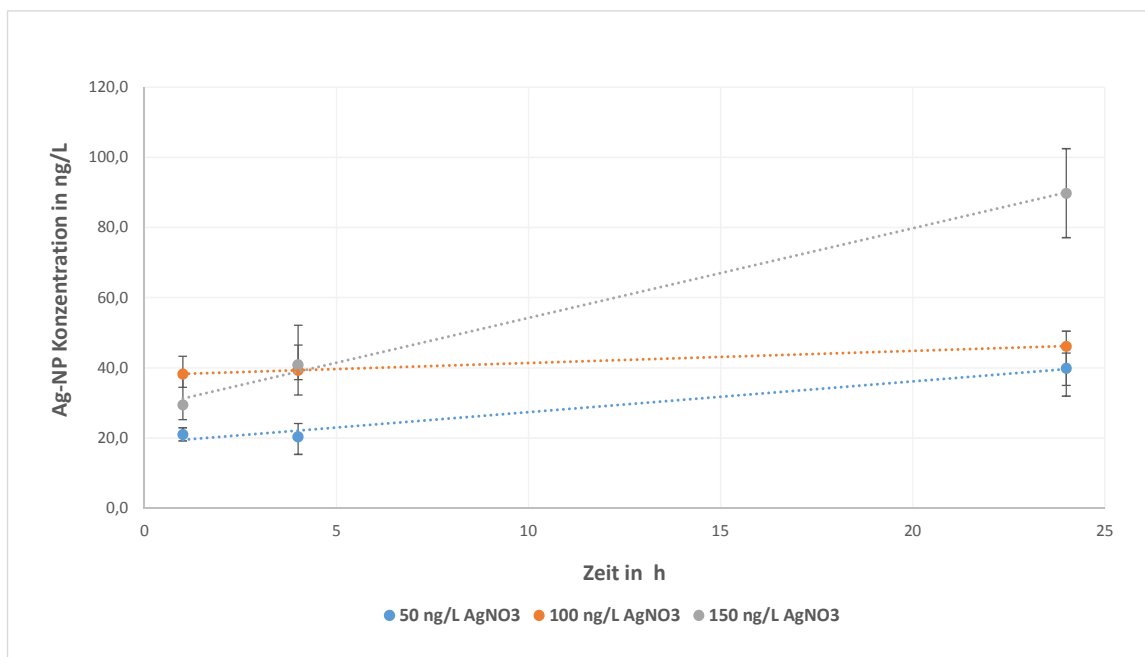


**Abbildung 37:** Einfluss der AgNO<sub>3</sub>-Konz. auf die Bildung von Ag-NP (T =7 °C, c(NOM) = 0,1 mg/L).

Aus Abbildung 37 kann man entnehmen, dass mit zunehmender Ag-Ionen-Zugabe (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) mehr Ag-NP gebildet werden.

Diese Ag-Ionen-Konzentrationsabhängigkeit wird im Laufe der Inkubationszeit immer deutlicher: Während nach 1 h Inkubation (blaue gepunktete Linie) kein großer Unterschied zwischen der Konzentration an gebildeten Ag-NP bei verschiedenen Ag-Ionen-Konzentrationen zu sehen ist, steigt er im Laufe der Inkubation und ist nach 24 h (graue gepunktete Linie) klar ersichtlich, jedoch ohne einen linearen Zusammenhang. Somit deutet Abbildung 37 eine Ag-Ionen-Konzentrationsabhängigkeit der Ag-NP-Bildung bei 7 °C und einer NOM-Konzentration von 0,1 mg/L an.

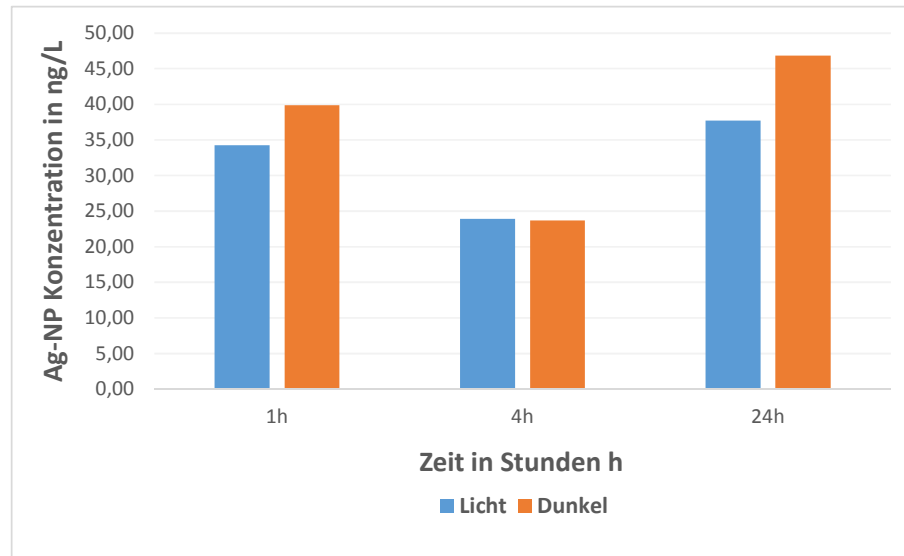
Schaut man sich die Zeitabhängigkeit der Ag-NP-Bildung bei verschiedenen Ag-Ionen-Konzentrationen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) in Abbildung 38 an, so stellt man fest, dass diese nur bei Zugabe von 50 (blaue gepunktete Linie) und 150 ng/L (graue gepunktete Linie)  $\text{AgNO}_3$  besteht. Bei 100 ng/L  $\text{AgNO}_3$  (orange gepunktete Linie) werden zwar mit der Zeit etwas mehr Ag-NP gebildet, jedoch ohne merklichen Anstieg.



**Abbildung 38:** Einfluss der Zeit und  $\text{AgNO}_3$ -Konzentration auf die Bildung von Ag-NP ( $T = 7$  °C,  $c(\text{NOM}) = 0,1$  mg/L).

Weiterhin wurde der Lichteinfluss untersucht. Betrachtet man diesen in Abbildung 39, so stellt man fest, dass sich eine ähnliche Ag-NP-Konzentration sowohl im Dunkeln als auch bei Lichteinwirkung bildet. Die Reduktion im Dunkeln findet sogar verstärkt

statt. Anders als von *Yin* und *Hou et al.* angenommen ist die NOM-induzierte Ag-NP-Bildung somit nicht lichtinduziert, sondern findet bei niedrigen Ag-Konzentrationen bevorzugt im Dunkeln statt.<sup>1,40,41,106</sup>



**Abbildung 39:** Einfluss der Lichteinwirkung auf die Bildung von Ag-NP ( $T = 23\text{ °C}$ ,  $c(\text{NOM}) = 0,1\text{ mg/L}$ ,  $c(\text{AgNO}_3) = 100\text{ ng/L}$ )

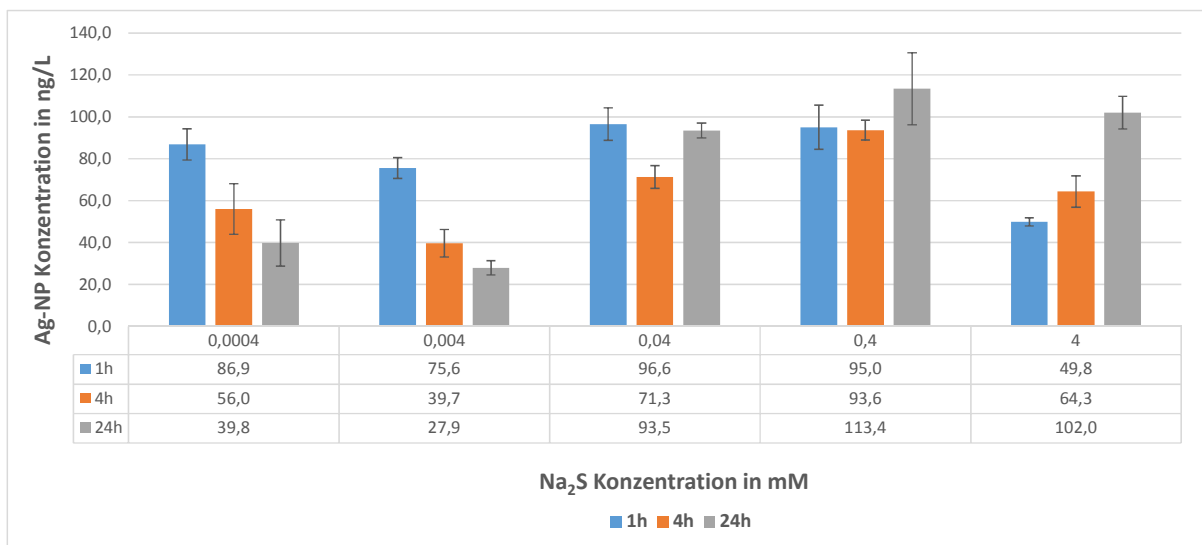
Die bei  $7\text{ °C}$  erhaltenen Ergebnisse machen deutlich, dass auch bei sehr niedrigen Temperaturen die Ag-Ionenfreisetzung und -Nanopartikelneubildung nicht unterbunden werden kann und die NOM-induzierte Ag-NP Bildung deutlich von diesen Konkurrenzreaktionen beeinflusst wird. Deswegen kann kein deutlicher linearer Zusammenhang zwischen den untersuchten Größen gefunden werden, da die Konkurrenzreaktionen von denselben Größen beeinflusst werden. Somit führt die Zugabe von NOM zu einer Ag-Ionen-Lösung (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) zu einer dynamischen und zeitabhängigen Ag-NP-Bildung, Ionenfreisetzung und erneuter Ag-NP-Neubildung aus den freigesetzten Silber-Ionen. Dies machen auch die Untersuchungen zur Größe der gebildeten Ag-NP deutlich. Auch hier lässt sich die dynamische Freisetzung und Neubildung beobachten. Die Größenverteilung variiert mit der Inkubationszeit und der Temperatur.

## 6.6 Silbersulfid-Nanopartikelbildung aus Silbernitrat, Natriumsulfid und SR-NOM

Um die Ionenfreisetzung nahezu vollständig zu unterbinden, soll die  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP-Bildung aus Silbernitrat und NOM durch Zugabe von Natriumsulfid untersucht werden. Da  $\text{Ag}_2\text{S}$

für seine geringe Löslichkeit bekannt ist, sollten die  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP nach Bildung nahezu keine Ionen freisetzen und keine neuen NP bilden. Zuerst soll der Schwefeleinfluss auf die  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP-Bildung bei  $60\text{ }^\circ\text{C}$  und  $0,1\text{ mg/L}$  NOM bei Zugabe von  $150\text{ ng/L}$  Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) untersucht werden.

In Abbildung 40 ist die  $\text{Na}_2\text{S}$ -Konzentration in der Probe gegen die gebildete Ag-NP-Konzentration aufgetragen, wobei dieser NP-Gehalt sowohl aus  $\text{Ag}_2\text{S}$ - als auch aus Ag-NP bestehen kann.



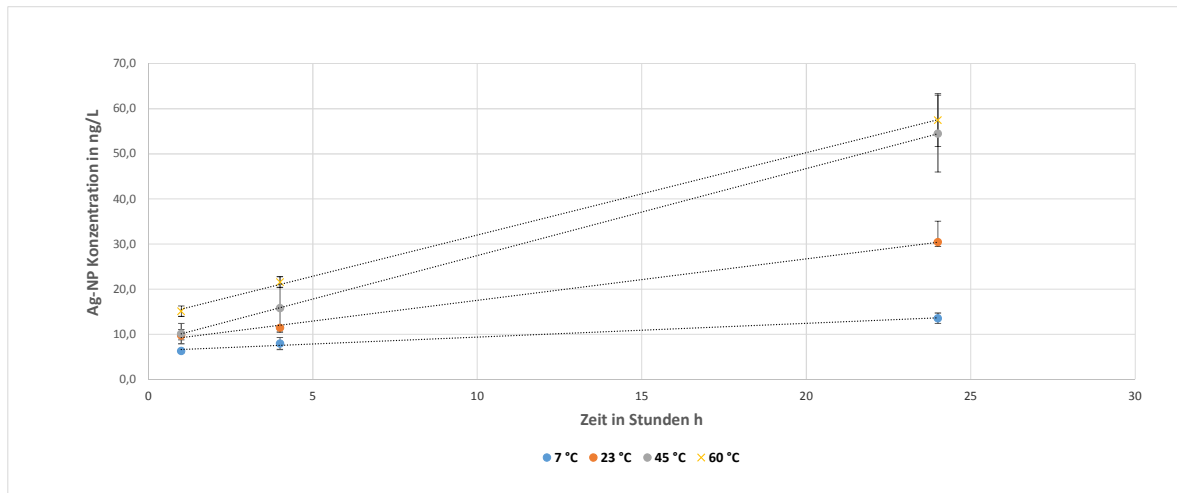
**Abbildung 40:** Einfluss von Natriumsulfid auf die  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP-Bildung ( $T = 60\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{NOM}) = 0,1\text{ mg/L}$ ).

Es wird deutlich, dass es durch zunehmenden Schwefelgehalt in der Probe zu einer zeitabhängigen  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP-Bildung kommt. Bei  $0,4\text{ }\mu\text{M}$  und  $4\text{ }\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}$  im Reaktionsgefäß nimmt die Ag-NP-Konzentration im Laufe der Inkubationszeit ab; dies lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass der Sulfidgehalt in der Probe nicht ausreicht, um alle Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) in  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP zu überführen. Ein Großteil der Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) reagiert zu Ag-NP, welche wiederum Ionen frei setzen. Ein  $\text{Na}_2\text{S}$ -Gehalt von  $40\text{ }\mu\text{M}$  und  $400\text{ }\mu\text{M}$  in Probe führt zu einer Abnahme der NP-Konzentration nach 4h Inkubation und zu einer Zunahme der NP-Konzentration nach 24 h. Dies deutet darauf hin, dass schon deutlich mehr Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) zu  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP umgesetzt werden, ein Teil der Ionen wird jedoch noch zu Ag-NP reduziert, aus denen Ionen freigesetzt werden, die wiederum NP bilden. Bei einer Natriumsulfidkonzentration von  $4\text{ mM}$  in der Reaktionslösung nimmt die Ag-NP Bildung mit der Zeit deutlich zu. Bei dieser  $\text{Na}_2\text{S}$ -Konzentration sind wahrscheinlich alle NP  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP.



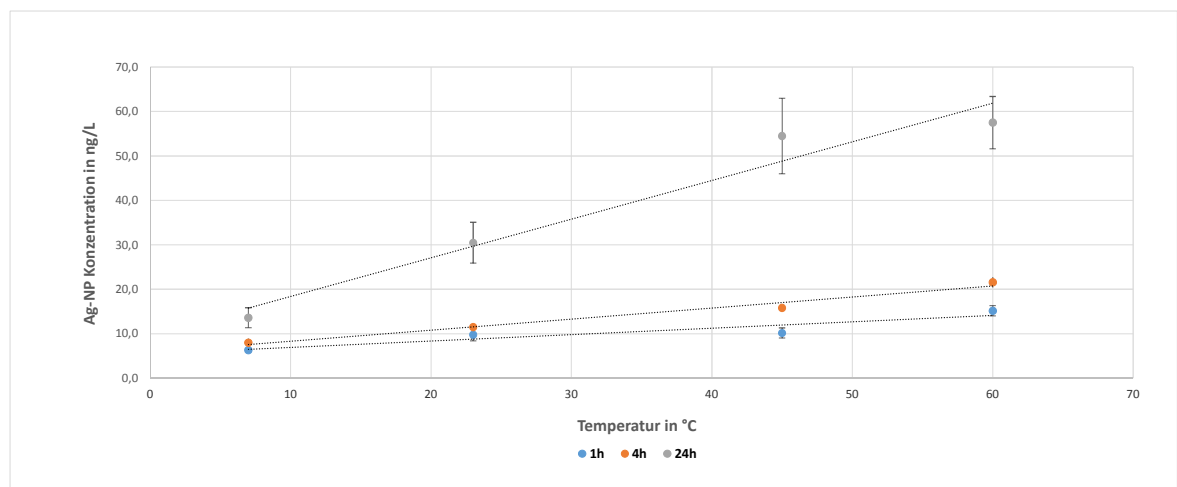
Da diese sich schlecht lösen, wird die Ag-Ionenfreisetzung und damit auch die Ag-NP-Neubildung nahezu vollständig unterbunden. Da dies die benötigte Konzentration an  $\text{Na}_2\text{S}$  ist, um alle Ag-Ionen zu  $\text{Ag}_2\text{S-NP}$  umzusetzen, wird die Zeit- und Temperaturabhängigkeit mit einer  $\text{Na}_2\text{S}$ -Konzentration von 4 mM in der Probe untersucht.

Schaut man sich die zeitabhängige  $\text{Ag}_2\text{S-NP}$ -Bildung in Abbildung 41 an, so sieht man eine deutliche lineare Zeit- und Temperaturabhängigkeit.



**Abbildung 41:** Einfluss von Zeit auf die  $\text{Ag}_2\text{S-NP}$ -Bildung ( $c(\text{AgNO}_3) = 150 \text{ ng/L}$ ,  $c(\text{NOM}) = 0,1 \text{ mg/L}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{S}) = 4 \text{ mM}$ ).

Mit Zunahme der Zeit und Temperatur werden immer mehr  $\text{Ag}_2\text{S-NP}$  gebildet. Besser lässt sich die Temperaturabhängigkeit in Abbildung 42 betrachten.



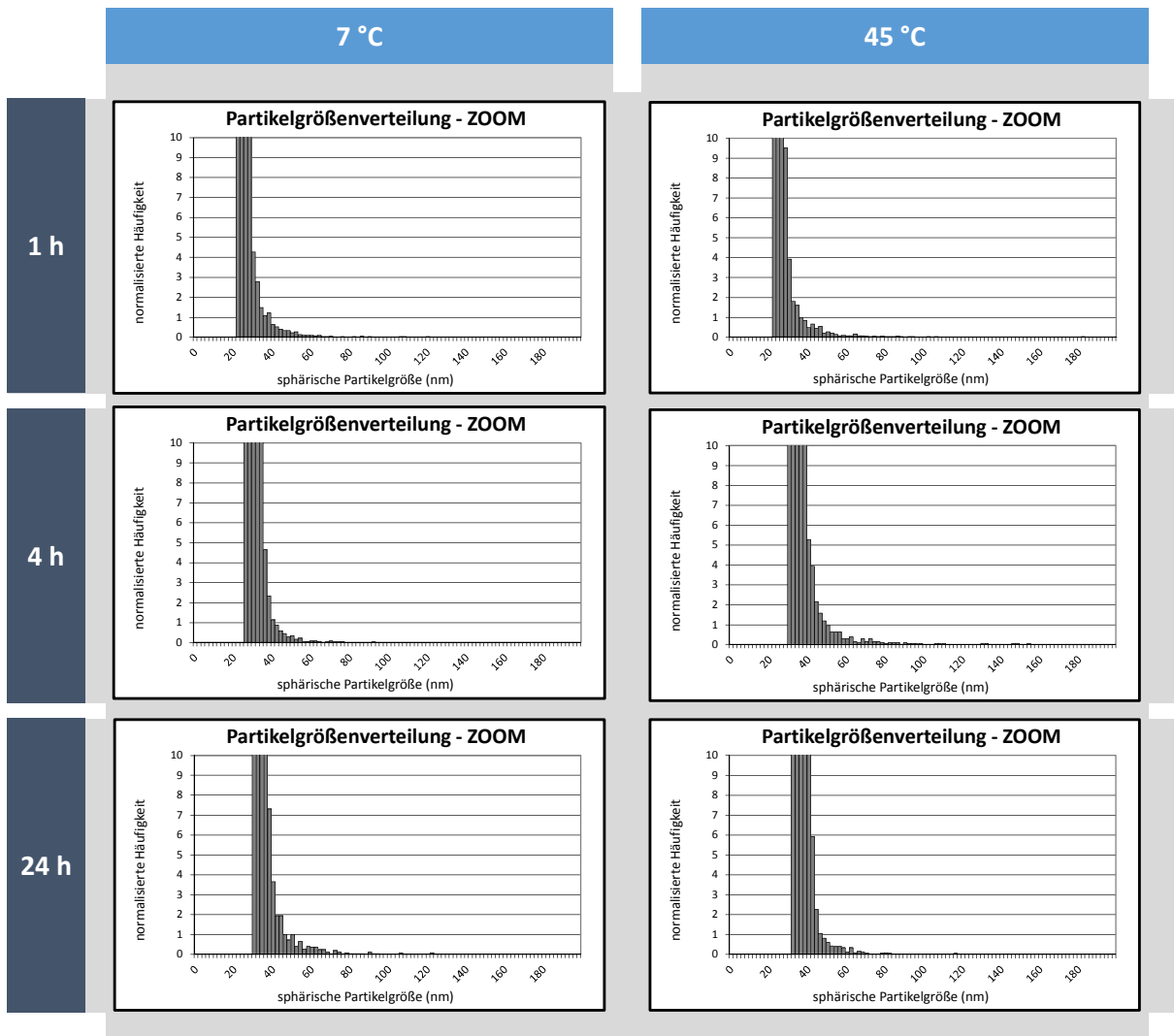
**Abbildung 42:** Einfluss von Temperatur auf die  $\text{Ag}_2\text{S-NP}$ -Bildung ( $c(\text{AgNO}_3) = 150 \text{ ng/L}$ ,  $c(\text{NOM}) = 0,1 \text{ mg/L}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{S}) = 4 \text{ mM}$ ).

Mit zunehmender Inkubationstemperatur werden mehr Ag<sub>2</sub>S-NP gebildet. Auch die Temperaturabhängigkeit ist linear. Vergleicht man die gebildete Ag<sub>2</sub>S-NP- und die Ag-NP-Konzentration (Kapitel 6.5) in einer 0,1 mg/L NOM-Lösung, bei Zugabe von 150 ng/L AgNO<sub>3</sub>, nach 24 h Inkubation, so wird aus Tabelle 7 deutlich, dass viel weniger NP bei Zugabe von Na<sub>2</sub>S gebildet werden. Der Konzentrationsunterschied ist vor allem bei 7 °C enorm hoch. Das könnte daran liegen, dass die Ag<sub>2</sub>S-NP-Bildung eine kinetisch langsam ablaufende Reaktion ist, die mehr Aktivierungsenergie und längere Reaktionszeit benötigt.

**Tabelle 7:** Vergleich zwischen der gebildeten Konzentration an NP ohne und mit 4 mM Na<sub>2</sub>S nach 24 h Inkubation nach Zugabe von 0,1 mg/L NOM und 150 ng/L AgNO<sub>3</sub> bei verschiedenen Temperaturen.

<b>Temperatur</b>	<b>Ag<sub>2</sub>S-NP-Konz. (4 mM Na<sub>2</sub>S)</b>	<b>Ag-NP-Konz.</b>
<b>7 °C</b>	13,6	89,7
<b>23 °C</b>	30,5	43,7
<b>45 °C</b>	54,5	72,1
<b>60 °C</b>	57,5	35,0

Betrachtet man die Größenverteilung der gebildeten Ag<sub>2</sub>S-NP bei Zugabe von 150 ng/L AgNO<sub>3</sub> und 4 mM Na<sub>2</sub>S in Abhängigkeit der Temperatur (bei 7 °C und 45 °C) und Zeit in einer 0,1 mg/L NOM-Lösung in Abbildung 43, so wird deutlich, dass diese sehr viel schmaler ist als bei den Ag-NP (vgl. Kapitel 6.5, Abbildung 36). Nach 1 h Inkubation werden sowohl bei 7 °C als auch bei 45 °C Partikel einer ähnlichen Größe gebildet (vgl. Abbildung 43). Mit Zunahme der Inkubationszeit entstehen größere Partikel und die Größenverteilung wird etwas breiter, jedoch ist diese Änderung minimal. Bei 45 °C bilden sich nach 4 und 24 h Stunden Inkubation etwas größere Partikel als bei 7 °C.

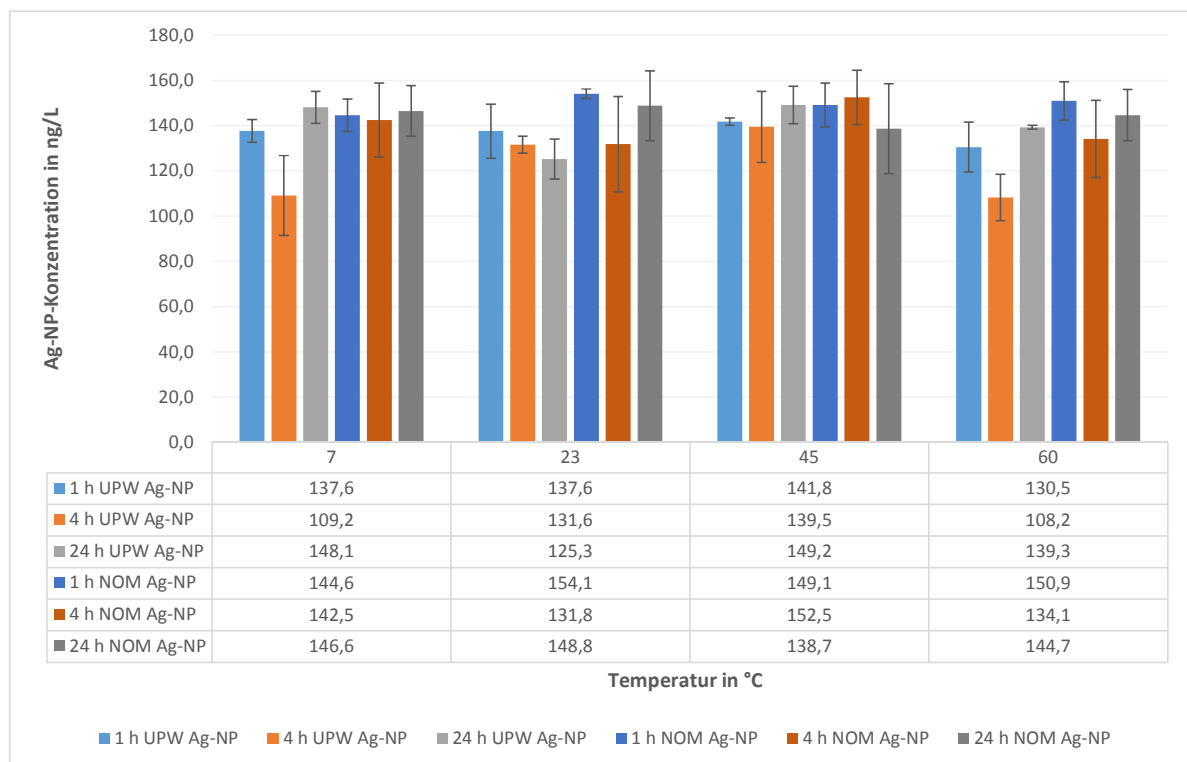


**Abbildung 43:** SP-ICP-MS-Messung der Partikelgrößenverteilung der durch NOM gebildeten  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP bei 7 °C und 45 °C. Nach 1 h Inkubation, 4 h Inkubation und 24 h Inkubation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Schwefelzugabe (in Form von  $\text{Na}_2\text{S}$ )  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP gebildet werden, deren Löslichkeitsprodukt so niedrig ist, dass es zu keiner Freisetzung von Ag-Ionen mehr kommt, dadurch ergibt sich eine Zeit- und Temperaturabhängigkeit der  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP-Bildung durch NOM. Dabei reagieren die Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) in der Lösung erst bei einer Sulfidkonzentration  $\geq 4$  mM vollständig zu  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP, bei niedrigeren Schwefelkonzentrationen (in Form von  $\text{Na}_2\text{S}$ ) werden sowohl Ag- als auch  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP gebildet. Die gebildeten  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP zeigen eine schmale Größenverteilung, wobei die NP-Größe mit der Zeit und Temperatur nur geringfügig zunimmt.

## 6.7 Ionenfreisetzung aus Citrat-stabilisierten Ag-NP

Des Weiteren wird die Ionenfreisetzung aus Citrat-stabilisierten Nanopartikeln untersucht. Dazu werden 150 ng/L dieser in UPW und in eine 0,1 mg/L NOM-Lösung gegeben und deren Konzentration nach verschiedenen Inkubationszeiten und -temperaturen gemessen. Diese Konzentration ist in Abbildung 44 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgetragen. Es wird deutlich, dass die Citrat-stabilisierten Ag-NP in UPW Ionen freisetzen (vgl. Abbildung 44 orange Balken, nach 4h Inkubation in UPW bei den verschiedenen Inkubationstemperaturen), in einer 0,1 mg/L NOM-Lösung jedoch keine Ionenfreisetzung mehr zeigen. Die Ionenfreisetzung der Citrat-stabilisierten Ag-NP ist jedoch deutlich geringer als bei den durch NOM reduzierten Ag-NP (siehe Kapitel 6.5).



**Abbildung 44:** Ionenfreisetzung aus Citrat-stabilisierten Ag-NP abhängig von der Inkubationslösung, -temperatur und -zeit.

Die Stabilisierung der Nanopartikel führt zu einer geringeren Ionenfreisetzung, wobei NOM ebenfalls stabilisiert. Bereits geringe NOM-Konzentrationen von 0,1 mg/L führen zu einer Inhibition der Ionenfreisetzung bei Citrat-stabilisierten Ag-NP. Somit unterbindet eine doppelte Stabilisierung der Ag-NP die Ionenfreisetzung vollständig.

## 6.8 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Bildung von Nanopartikeln in natürlichen Gewässern

Es wurde die natürliche Bildung von Ag-NP ohne Zusatz eines Reduktionsmittels, die NOM-induzierte Reduktion von Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) mit NR- und SR-NOM, die Ionenfreisetzung von Citrat-stabilisierten Ag-NP und die Adsorption der Ag-NP an die Gefäßwand der Reaktionsgefäße im ng/L-Bereich untersucht. Man konnte feststellen, dass ein Drittel der hinzugegebenen Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) in Wasser auch ohne Zugabe eines Reduktionsmittels zu Nanopartikeln reagiert. Bei Zugabe eines natürlichen Reduktionsmittels wie NR- oder SR-NOM wird diese Bildung enorm verstärkt. Bereits bei 0,1 mg/L NOM in der Lösung reagieren 60 % der Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) zu Ag-NP, in einer 1 mg/L NOM-Lösung sind es fast 78 % und in einer 5 mg/L NOM-Lösung liegen kaum noch Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) in der Lösung vor. Die Ag-NP-Bildung ist weder temperatur- noch zeitabhängig. Es deutet sich jedoch sowohl eine Zeitabhängigkeit, als auch eine NOM- und Ag-Ionen-Konzentrationsabhängigkeit ab, da eine längere Inkubationszeit sowie höhere Konzentrationen an NOM und Ag-Ionen (in Form von  $\text{AgNO}_3$ ) grundsätzlich zu einer erhöhten Ag-NP-Bildung führen, jedoch ohne einen linearen Zusammenhang. Die Ag-NP-Bildung im ng/L-Bereich ist ein dynamischer Prozess aus Ag-NP-Bildung, Ag-Ionenfreisetzung und erneuter Ag-NP-Regenerierung, der von Faktoren wie: Größe der Partikel, pH-Wert der Lösung, Temperatur, Zeit sowie dem Sauerstoff-, Schwefel- und NOM-Gehalt der Probe abhängig ist. Die Ag-Ionenfreisetzung findet bevorzugt bei kleinen pH-Werten, hohen Temperaturen, längerer Zeiteinwirkung, bei kleinen Partikeln und in sauerstoffgesättigten Lösungen statt, wohingegen die Ag-NP-Bildung verstärkt bei hohen pH-Werten, niedrigen Temperaturen und Inkubationszeiten, bei Zugabe von NOM und Schwefel und in wässriger Lösung zu beobachten ist. Da diese Konkurrenzprozesse von den gleichen Größen bestimmt werden, kann man keine Linearität der Ag-NP-Bildung in Abhängigkeit von diesen Größen erkennen. Gibt man Schwefel in Form von  $\text{Na}_2\text{S}$  zu den Reaktionslösungen mit NOM hinzu, so bilden sich  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP. Diese besitzen ein sehr niedriges Löslichkeitsprodukt und setzen nahezu keine Ionen frei, dadurch wird die Ionenfreisetzung und die Nanopartikel-Regenerierung unterbunden und es resultiert eine lineare Zeit- und Temperaturabhängigkeit der  $\text{Ag}_2\text{S}$ -NP-Bildung durch NOM. Die dynamische Ag-NP-Bildung, Ag-Ionenfreisetzung und Ag-NP-Regenerierung ist

jedoch keineswegs ein Kreislauf, sondern vielmehr eine Abfolge ständiger Ionenfreisetzungen und Regenerierungen, da immer wieder Ag-NP verschiedener Größen gebildet werden. Dies wird auch bei der Partikelgrößenverteilung deutlich. Die Größenverteilung der Ag-NP unterscheidet sich dabei enorm von der der Ag<sub>2</sub>S-NP. Die Ag-NP werden mit einer viel breiteren Größenverteilung als die Ag<sub>2</sub>S-NP gebildet. Außerdem kann man bei der Ag-NP-Bildung in Abhängigkeit von der Zeit eine dynamische Zu- und Abnahme bestimmter Partikelgrößen beobachten. Im Unterschied dazu kann man bei den Ag<sub>2</sub>S-NP lediglich eine zeit- und temperaturabhängige Größenzunahme erkennen.

Bei den Untersuchungen zur Adsorption der Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP an die Gefäßwand konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Salzen zu einer starken Adsorption von Ag-NP an die Gefäßwand führt. Man konnte jedoch auch feststellen, dass die Adsorption an die Gefäßwand verglichen mit der Oxidation und Aggregation von Ag-NP, die neben dieser auftreten, am wenigsten zur Konzentrationsabnahme beiträgt. Interessant ist auch, dass Ag<sub>2</sub>S-NP stärker an die PP-Wand der Probengefäße adsorbieren als Ag-NP und die Zugabe von NOM zu einer stärkeren Adsorption der NP an die Reaktionsgefäßwand führt. Das deutet darauf hin, dass die Ag<sub>2</sub>S-NP in den natürlichen Gewässern in die Biomasse eingelagert werden und überwiegend im Sediment vorhanden sind. Dies kann der Grund dafür sein, dass trotz hohem Gehalt an natürlich gebildeten Nanopartikeln nur ein geringer NP-Gehalt im unteren ng/L-Bereich an Ag-NP in natürlichen Gewässern, wie z.B. in der Isar-Loisach Einmündung, zwischen Wolfratshausen und Icking gefunden wird.<sup>114</sup>

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Citrat-stabilisierte Ag-NP weniger Ionen freisetzen, als die durch die NOM-Reduktion erhaltenen Ag-NP. Auch konnte gezeigt werden, dass dabei schon 0,1 mg/L NOM zu einer doppelten Stabilisierung der Citrat-stabilisierten Partikel führen und die Ionenfreisetzung vollständig unterbinden.

## **7 Größenseparation von Nanopartikeln mit der Gelelektrophorese**

In diesem Kapitel wird die Entwicklung eines Verfahrens zur Größentrennung von Nanopartikeln mittels Gelelektrophorese beschrieben. Das Verfahren soll optimiert und die Nachweisgrenze der Methode soll durch Fluoreszenztechniken, Verstärkung der Absorption, Anfärben oder durch Kopplung an atomspektrometrische Methoden verbessert werden.

### **7.1 Hintergrund und Aufgabenstellung**

Aufgrund der möglichen schädlichen Wirkung von NP und ihrem vermehrten Einsatz in Konsumprodukten bedarf es zur Sicherung unserer Gesundheits- und Lebensgrundlage der Untersuchung von NP sowie ihrer Folgen auf den Mensch und die Umwelt. Für dieses Umweltmonitoring stellen nachweisstarke, routinefähige und kostengünstige Analysemethoden eine Grundlage dar. Vor allem die Größe der NP spielt bei deren Analyse eine entscheidende Rolle, da die Toxizität der NP maßgeblich von deren Größe bestimmt wird. Wie bereits in Kapitel 3.3 erwähnt, sind die bisher bekannten Methoden zur Größenfraktionierung meistens zeitaufwendig, schwierig in der Handhabung und kostspielig.

Die Gelelektrophorese stellt dabei eine schnelle, kostengünstige, einfache und damit routinefähige alternative Analysemethode zur Größenbestimmung von Nanopartikeln dar. Jedoch ist ihre Nachweisgrenze ein limitierender Faktor bei der Analyse von Umweltproben, weswegen sie in dieser Arbeit so weit wie möglich herabgesetzt werden soll. Die Weiterentwicklung eines solch simplen Analyseverfahrens würde das Umweltmonitoring deutlich voranbringen.

In den folgenden Kapiteln wird die Trennung von Metall-Nanopartikeln mittels Gelelektrophorese beschrieben. Dabei wird der Einfluss verschiedener Liganden auf die Trennung und Detektion analysiert sowie verschiedene Detektionsmethoden untersucht und entwickelt. Zuletzt wird die Kopplung der Gelelektrophorese an die ET-AAS betrachtet.

## 7.2 Trennung von Gold-Nanopartikeln mittels Gelelektrophorese

Zuerst wird die Größentrennung zweier Gold-Nanopartikelsuspensionen unterschiedlicher Größe mit dem Ligand MUA durch Änderung der Gelelektrophorese-Parameter optimiert. Anschließend wird der Einfluss verschiedener Liganden auf die Gold-NP-Trennung untersucht.

### 7.2.1 Größentrennung von Gold-Nanopartikeln mit 11-Mercaptoundecansäure

Die Größentrennung zweier Gold-Nanopartikelsuspensionen mit den Größen 25 und 41 nm wird mit MUA als Ligand in einer horizontalen Gelelektrophorese-Kammer untersucht. Dabei soll die Trennung durch Änderung verschiedener Parameter wie Spannung, Gelkonzentration, Pufferkonzentration und Laufzeit optimiert werden.

#### Spannungsabhängigkeit

Um den Einfluss der Spannung auf die Größentrennung zu untersuchen, wird diese bei konstanten Bedingungen (1,0 Gew.-% Agarosegel; 1 x TBE Puffer; pH = 8,6) und zwei verschiedenen Laufzeiten von  $t_1 = 30$  min und  $t_2 = 60$  min variiert. Wie aus Tabelle 8 deutlich wird, erreicht man durch das Anlegen einer höheren Spannung eine längere Laufstrecke der Partikel, wobei kleinere Partikel weiter im Gel wandern als größere.

**Tabelle 8:** Abhängigkeit der Laufstrecke der Gold-NP im Gel von der angelegten Gleichspannung bei einer Laufzeit von  $t_1 = 30$  min.

Spannung in V	Laufstrecke 25 nm Gold-NP in cm	Laufstrecke 41 nm Gold-NP in cm	Abstand der Banden voneinander in cm	Bandenbreite in mm
150	3,2	2,8	0,4	3,0
200	1,7	1,4	0,3	3,0
250	2,5	2,0	0,5	4,0
300	3,8	3,4	0,4	4,0

Bei einer Laufzeit von 30 min ändert sich durch Änderung der Spannung der Abstand der Banden voneinander nur minimal. Die beste Trennung wird bei Anlegen von 250 V erreicht, wobei durch Erhöhung der Spannung die Bandenbreite generell immer größer



wird. Eine Ausnahme stellt die Trennung bei 150 V dar; bei dieser sind die Laufstrecke und der Bandenabstand den Ergebnissen bei 250 V sehr ähnlich. Mit längerer Laufzeit wandern die Partikel weiter im Gel (vgl. Tabelle 9). Bei einer Laufzeit von 60 min wird die Größentrennung mit steigender Spannung deutlich verbessert und erreicht ihr Maximum bei 250 V.

**Tabelle 9:** Abhängigkeit der Laufstrecke der Gold-NP im Gel von der angelegten Gleichspannung bei einer Laufzeit von  $t_1 = 60$  min

<b>Spannung in V</b>	<b>Laufstrecke 25 nm Gold-NP in cm</b>	<b>Laufstrecke 41 nm Gold-NP in cm</b>	<b>Abstand der Banden voneinander in cm</b>	<b>Bandenbreite in mm</b>
<b>150</b>	3,6	3,3	0,3	3,5
<b>200</b>	5,7	5,0	0,7	3,0
<b>250</b>	6,9	4,9	2,0	9,0
<b>300</b>	9,5	8,0	1,5	10,0

Somit kann man durch Anlegen einer Spannung von 250 V eine gute Separierung der Gold-NP mit einem Abstand von 2 cm der Banden voneinander erreichen, wobei jedoch die Bandenbreite mit Erhöhung der Laufzeit und Spannung immer weiter zunimmt (vgl. Tabelle 8 und 9).

### **Gelkonzentration**

Für die Untersuchung des Einflusses der Gelkonzentration auf die Gelelektrophorese wird letztere bei verschiedenen Gelkonzentrationen unter konstanten Bedingungen durchgeführt (1 x TBE Puffer; pH = 8,6;  $t = 60$  min;  $U = 150$  V). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Wie man dieser entnehmen kann, nimmt die Laufstrecke mit zunehmender Gelkonzentration ab, da die Gelporen mit zunehmender Gelkonzentration immer kleiner werden und dadurch die Diffusion der Partikel durch das Gel erschwert wird. Bei Betrachtung der Trennleistung in Abhängigkeit von der Gelkonzentration wird die beste Trennung in einem 1,0 Gew.-% Agarosegel erzielt, daher werden die weiteren elektrophoretischen Trennungen bei dieser Gelkonzentration durchgeführt.

**Tabelle 10:** Abhängigkeit der Laufstrecke der Gold-NP im Gel von der Gelkonzentration.

<b>Gelkonzentration in Gew.-%</b>	<b>Laufstrecke 25 nm Gold-NP in cm</b>	<b>Laufstrecke 41 nm Gold-NP in cm</b>	<b>Abstand der Banden voneinander in cm</b>	<b>Bandenbreite in mm</b>
<b>0,5</b>	6,4	6,2	0,2	2,0
<b>1,0</b>	4,4	3,5	1,1	3,0
<b>1,5</b>	3,4	3,2	0,2	6,0
<b>2,0</b>	2,7	2,2	0,5	7,0

### **Pufferkonzentration**

Um den Einfluss der Pufferstärke auf die Größentrennung zu untersuchen, wird die Konzentration des TBE-Puffers bei konstanten Bedingungen variiert (1,0 Gew.-% Agarosegel; U = 150 V; t<sub>2</sub> = 60 min; pH = 8,6).

Wie man Tabelle 11 entnehmen kann, hat die Pufferkonzentration keinen großen Einfluss auf die Laufstrecke der Partikel, wobei die beste Trennung bei einer Konzentration von 1 x TBE-Puffer erreicht wird.

**Tabelle 11:** Abhängigkeit der Laufstrecke der Gold-NP im Gel von der Pufferkonzentration.

<b>Pufferkonzentration in x TBE</b>	<b>Laufstrecke 25 nm Gold-NP in cm</b>	<b>Laufstrecke 41 nm Gold-NP in cm</b>	<b>Abstand der Banden voneinander in cm</b>	<b>Bandenbreite in mm</b>
<b>0,50</b>	4,3	3,9	0,4	4,0
<b>0,75</b>	4,2	3,7	0,5	4,0
<b>1,00</b>	4,4	3,5	0,9	4,0
<b>1,25</b>	4,6	4,2	0,4	4,0
<b>1,50</b>	4,4	3,9	0,5	5,0

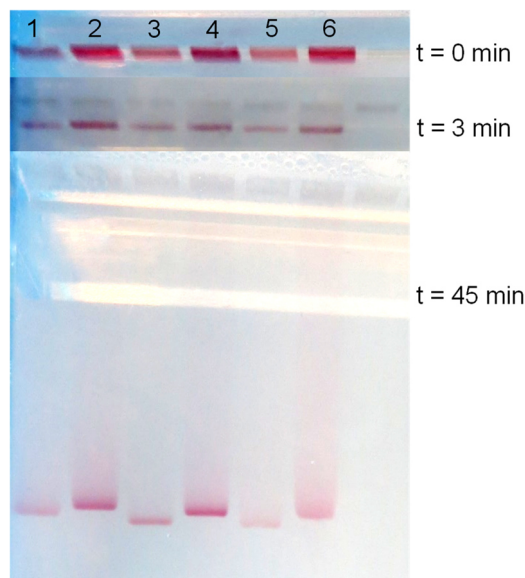
Ein Nachteil der hohen Pufferkonzentration ist die Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit, welche zur elektrolytischen Zersetzung des Puffers sowie zu einer erheblichen Wärmeentwicklung und einer damit verbundenen Erhöhung der Bandenbreite führt.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die angelegte Gleichspannung sowie die Laufzeit den größten Einfluss auf die Auftrennung und die Laufstrecke haben. Bei 150 V und 250 V wird die beste Trennung erreicht, wobei eine längere Laufzeit zu einer besseren Trennung, jedoch auch zu einer größeren Bandenbreite führt.

Höhere Gelkonzentrationen führen zu kürzeren Lauflängen, wobei die optimalste Agarosekonzentration im Gel 1,0 Gew.-% beträgt. Die Pufferkonzentration hat keinen großen Einfluss auf die Trennung, wobei die beste Separation mit 1 x TBE-Puffer erreicht wird.

### 7.2.2 Trennung der Gold-Nanopartikel in Abhängigkeit vom Liganden

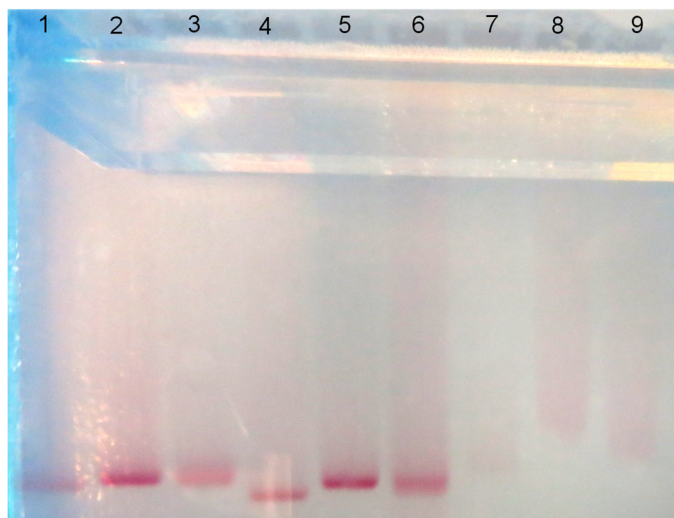
Die Größentrennung zweier Gold-Nanopartikelsuspensionen mit den Größen 25 und 41 nm wird mit den Liganden MSA, MUA und MHDA in einer horizontalen Gelelektrophorese-Kammer untersucht. Dabei soll ermittelt werden, welcher Ligand zur besten Trennung mittels Gelelektrophorese führt und somit für diese am besten geeignet ist. Die Untersuchungen werden bei einer Agarose-Gelkonzentration von 1,0 Gew.-%, einer Spannung von 150 V und einer Zeitdauer von 45 oder 60 min durchgeführt.



**Abbildung 45:** Größentrennung zweier Au-NP-Suspensionen mit verschiedenen Liganden nach unterschiedlichen Zeitpunkten. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 25 nm + MHDA, 2) 41 nm + MHDA, 3) 25 nm + MUA, 4) 41 nm + MUA, 5) 25 nm + MSA, 6) 41 nm + MSA.

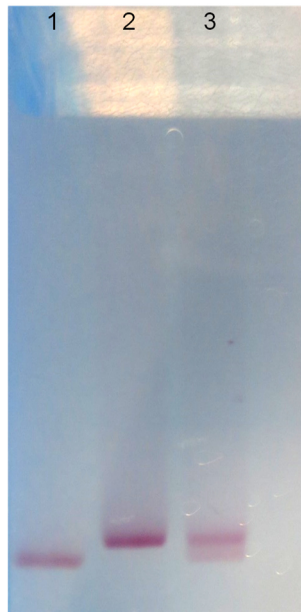
Wie man Abbildung 45 entnehmen kann, laufen die kleineren NP (25 nm; Bande 1,3 und 5) schneller als die größeren (41 nm; Bande 2,4 und 6). Der Abstand der Banden, der 25 nm und 41 nm Gold-NP voneinander ist unabhängig vom Ligand sehr ähnlich, wobei dieser bei den MHDA funktionalisierten Partikeln etwas geringer ist. Bei den mit MSA funktionalisierten NP sind die Banden nach 45 min Laufzeit am schlechtesten zu erkennen, da diese bei der Wanderung im elektrischen Feld Schlieren bilden.

Mischt man die 25 nm und 41 nm Gold-NP (1:1) miteinander und funktionalisiert sie mit dem jeweiligen Liganden, so deutet sich nach einer Laufzeit von 45 min eine Trennung an. In Abbildung 46 sind die monodispersen Suspensionen und die NP-Mischungen aufgetragen. Man kann deutlich erkennen, dass sich die NP am besten mit dem Liganden MUA trennen lassen (vgl. Abbildung 46; Bande 4,5,6). Die Trennung mit MSA funktioniert am schlechtesten, da diese Banden nach einer Laufzeit von 45 min nur schwer im Gel zu erkennen sind (vgl. Abbildung 46; Banden 7-9).



**Abbildung 46:** Größentrennung zweier Au-NP-Suspensionen einzeln und als Mischung mit verschiedenen Liganden nach 45 min. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 25 nm + MHDA, 2) 41 nm + MHDA, 3) Mix + MHDA, 4) 25 nm + MUA, 5) 41 nm + MUA, 6) Mix + MUA, 7) 25 nm + MSA, 8) 41 nm + MSA, 9) Mix + MSA

Nach einer Laufzeit von 60 min sieht man bei den MUA-funktionalisierten Au-NP ganz deutlich eine Aufspaltung in zwei Komponenten, vgl. Bande 3 in Abbildung 47.



**Abbildung 47:** Größentrennung einer MUA-funktionalisierten Au-NP-Mischung. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 25 nm + MUA, 2) 41 nm + MUA, 3) Mix + MUA.

Diese beiden Komponenten entsprechen den 25 nm und den 41 nm Gold-NP und befinden sich auf der Höhe von Bande 1 und 2.

In diesem Kapitel wurde die Trennung zweier Gold-NP-Suspensionen mittels Gelelektrophorese untersucht und optimiert. Es lässt sich zusammenfassen, dass die Trennung der funktionalisierten Partikel bei Funktionalisierung mit dem Liganden MUA am besten funktioniert. Somit lässt sich eine Mischung aus zwei unterschiedlich großen MUA-funktionalisierten Gold-NP-Suspensionen mit der Gelelektrophorese trennen. Diese Trennung erfolgt nach einer Laufzeit von 60 min, bei einer Spannung von 150 V in einem 1 Gew.-% Agarosegel und mit einem 1 x TAE oder TBE-Puffer.

### 7.3 Untersuchungen zur Verbesserung der Nachweisgrenze bei der Gelelektrophorese

In diesem Kapitel werden verschiedene Verfahren zur Visualisierung und Bestimmung der Partikelbanden im Agarosegel untersucht. Die Untersuchungen dienen dazu, die Größe von Partikelmischungen niedriger Konzentrationen sowie von Edelmetall-NP mit einer schwachen Absorption – wie z.B. Pd – mit der Gelelektrophorese zu bestimmen. Außerdem wird getestet, ob man durch Fluoreszenzlöschung die Größe der NP und ihre Konzentration bestimmen kann.

### 7.3.1 Fluoreszenztechniken

Da die Fluoreszenz eine bekannte und sehr sensitive Nachweisttechnik ist, sollen in diesem Kapitel Edelmetall-Nanopartikelsuspensionen mit fluoreszierenden Liganden funktionalisiert und im Gel aufgetrennt werden. Durch die hohe Empfindlichkeit der Fluoreszenz sollen somit auch niedrig konzentrierte Nanopartikelsuspensionen sowie Edelmetall-NP mit einer schwachen Absorption (z.B. Pd) in der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Außerdem soll untersucht werden, ob durch Fluoreszenzlöschung die Partikelgröße und die Konzentration der Nanopartikel ermittelt werden kann und es soll getestet werden, welche Faktoren die Fluoreszenzlöschung beeinflussen. Weiterhin soll ermittelt werden, ob sich durch Ligandensubstitution die Fluoreszenz zurückgewinnen lässt und ob man eine mit Fluoreszenzligand funktionalisierte NP-Suspension im Agarosegel durch Fluoreszenzrückgewinnung detektieren kann.

#### Direkte Bestimmung durch Fluoreszenz

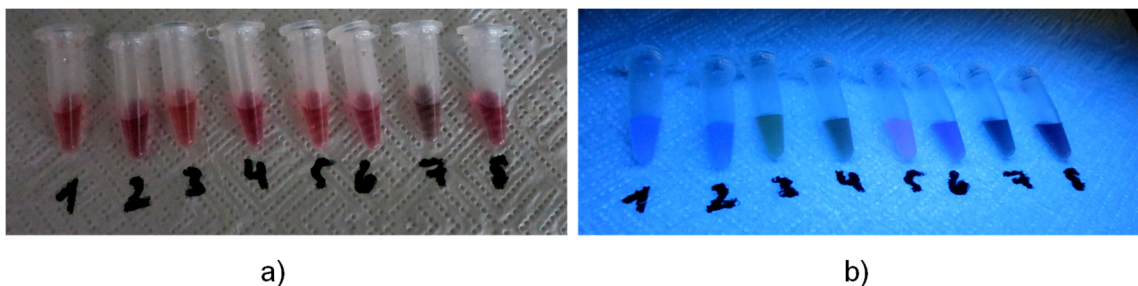
Für die Fluoreszenzdetektion der Au-NP im Agarosegel werden die in Tabelle 12 genannten Liganden verwendet, deren Synthese in den Kapiteln 5.14.1 - 5.14.4 beschrieben ist.

**Tabelle 12:** Verwendete Fluoreszenzliganden zur Fluoreszenzdetektion im Agarose-Gel

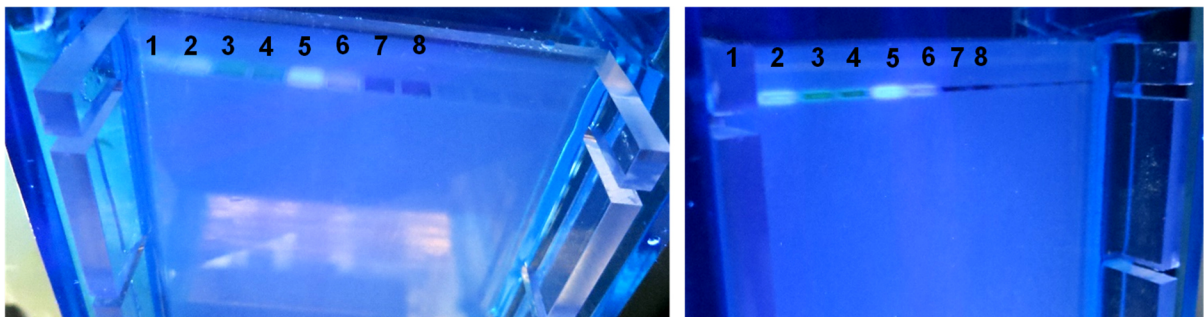
Fluoreszenzligand	Abkürzung
4-(3-carboxy-3-mercaptopropionamido)naphthalene-1-sulfonat	FL-1
Natrium 4-(16-(tritylthio)hexadecanamido)naphthalen-1-sulfonat	FL-2
2-(7-(16-mercaptophexadecanamido)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure	FL-3
8-(16-mercaptophexadecanamido)pyren-1,3,6-trisulfonat	FL-4

Aufgrund der langen Liganden-Namen werden diese zur besseren Übersichtlichkeit mit FL bezeichnet und durchnummeriert. Die mit den Fluoreszenzliganden FL-1, FL-2, FL-3 und FL-4 funktionalisierten Au-NP-Suspensionen (25 und 41 nm) werden mittels Gelelektrophorese untersucht. Da der Fluoreszenzligand 2-(3-carboxy-3-mercaptopropanamido)benzoesäure (FL-5), dessen Synthese in Kapitel 5.14.5 beschrieben ist nur sehr schwach fluoresziert, wird dieser nicht für die weiteren Versuche herangezogen. Die Gelelektrophorese wird bei 150 V und einer Laufzeit von 30 min durchgeführt, wobei diese nach 20 min unterbrochen und ein Foto vom Zwischenergebnis gemacht wird (vgl. Abbildung 50 und 51). Die Abbildungen 48 und 49 sollen verdeutlichen, dass die Fluoreszenzliganden in den Goldlösungen und im Gel fluoreszieren.

Dabei fluoreszieren die mit dem Ligand FL-3 funktionalisierten Au-NP in Bande 7 und 8 nur sehr schwach. Wahrscheinlich kommt die schwache Fluoreszenz dadurch zustande, dass der Ligand in den Proben 7 und 8 in einer um die Hälfte kleineren Konzentration als z.B. in den Proben 1 und 2 vorliegt. Die Zugabe einer höheren Konzentration des Liganden ist nicht möglich, da dies zu einer Aggregation der Au-NP führt.

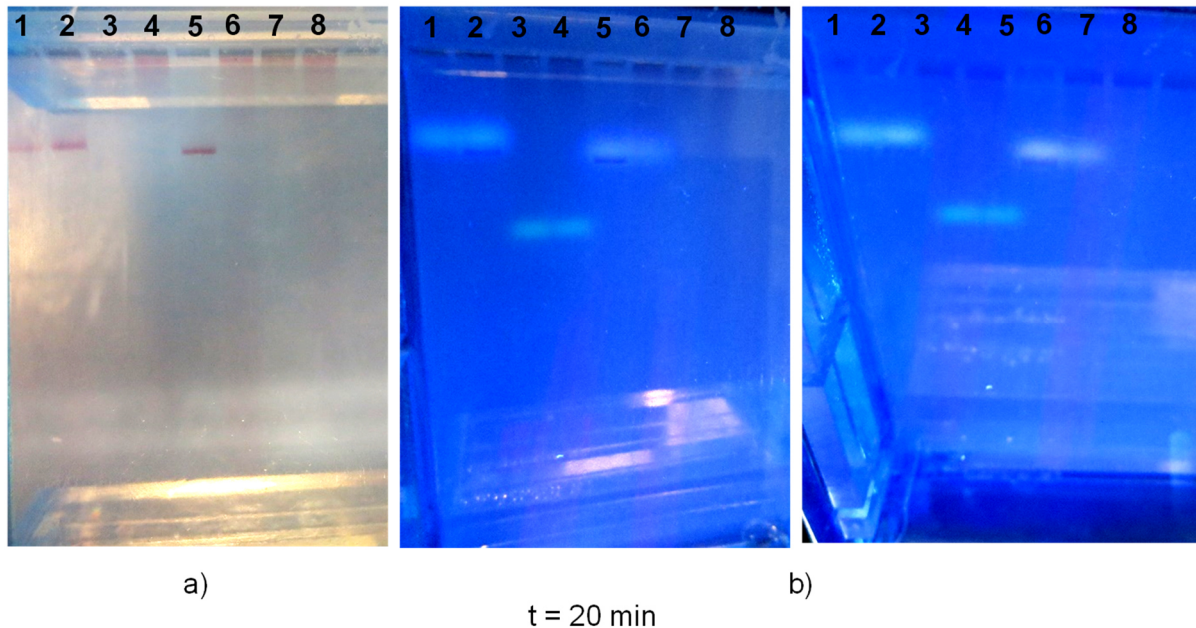


**Abbildung 48:** Mit Fluoreszenzliganden funktionalisierte Au-NP: 1) 25 nm + FL-2, 2) 41 nm + FL-2, 3) 25 nm + FL-4, 4) 41 nm + FL-4, 5) 25 nm + FL-1, 6) 41 nm + FL-1, 7) 25 nm + FL-3, 8) 41 nm+FL-3. Bei Tageslicht a) und unter der UV-Lampe 366 nm b).



**Abbildung 49:** Gel mit Fluoreszenzliganden funktionalisierten Au-NP unter der UV-Lampe 366 nm. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 25 nm + FL-2, 2) 41 nm + FL-2, 3) 25 nm + FL-4, 4) 41 nm + FL-4, 5) 25 nm + FL-1, 6) 41 nm + FL-1, 7) 25 nm + FL-3, 8) 41 nm+FL-3.

Nach einer Laufzeit von 20 min kann man in Abbildung 50 a) erkennen, dass nur die Banden 1, 2 und 5 als eine schmale Fraktion im Gel laufen. Die Banden 3, 4 und 6 bis 8 wandern zwar aus der Geltasche heraus, bilden aber Schlieren. Diese Schlieren deuten darauf hin, dass die Partikel entweder im Gel aggregieren oder dass der Ligand unzureichend gebunden wurde, da die Konzentration an Ligand zu niedrig war oder die Funktionalisierungszeit zu kurz gewählt wurde.

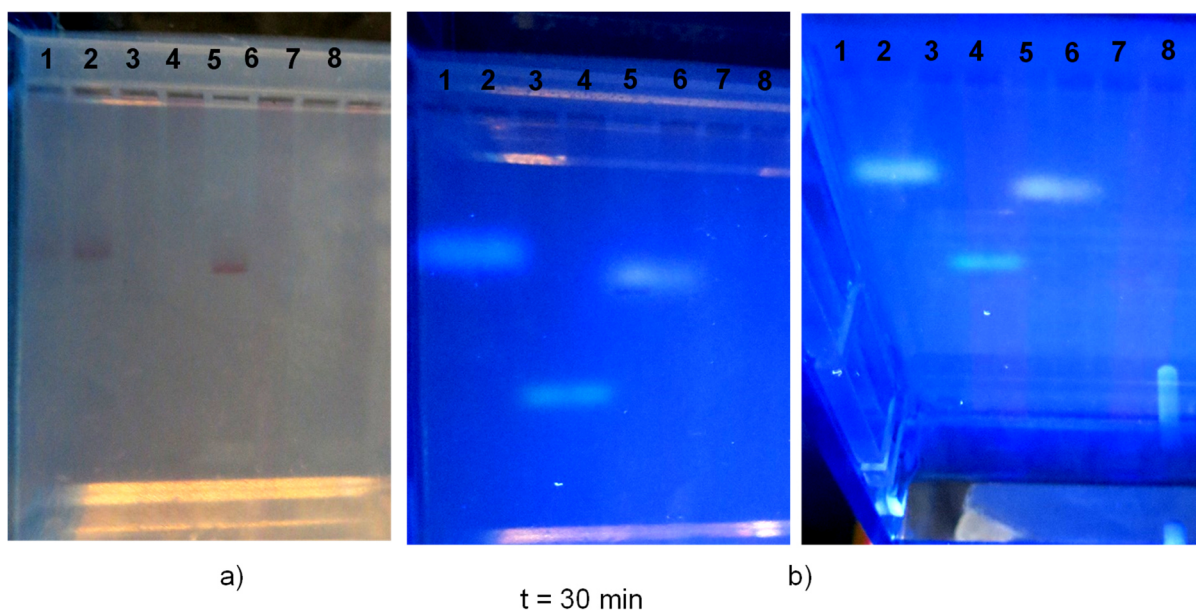


**Abbildung 50:** Gelelektrophorese mit Fluoreszenzliganden funktionalisierter Au-NP, Laufzeit = 20 min, bei a) Tageslicht und b) unter der UV-Lampe 366 nm. Auftragung siehe Abbildung 49.

Vergleicht man die Abbildungen 50 a) und b) miteinander, so stellt man fest, dass die Banden 1, 2 und 5 nicht fluoreszieren. Die Fluoreszenz, die in den Banden 1 bis 6 sichtbar ist, kommt durch den Überschuss an Ligand in den Proben 1 bis 6 zustande. Dieser wandert im Falle der Banden 3 und 4 schneller als die Partikel und im Falle von 1, 2, 5 und 6 etwas langsamer als diese. Da die Partikel während ihrer Wanderung durch das Gel Schlieren bilden, die abhängig vom Liganden stärker oder schwächer auftreten (siehe Abbildung 50, Banden 1 bis 8), müssten diese Schlieren ebenfalls fluoreszieren. Das Fehlen dieser Fluoreszenz deutet darauf hin, dass die Fluoreszenz des Liganden wie vermutet durch Bindung an die Au-NP gelöscht wird und die Restfluoreszenz durch den Überschuss an Ligand in der Probe zustande kommt. Lässt man



die Gelelektrophorese weitere 10 min laufen, so verdeutlichen die Ergebnisse in Abbildung 51, dass die Fluoreszenz des Liganden durch die Au-NP gelöscht wird. Die fluoreszierenden Fraktionen in den Banden 1 und 2 in Abbildung 51 b) sind auf gleicher Höhe im Vergleich zu den Fraktionen der Banden 1 und 2 in Abbildung 51 a), die unterschiedlich weit im Gel wandern. Das stützt die Annahme, dass die Fluoreszenz allein durch den Rest an Ligand in der Probe zustande kommt, der zu den Proben immer im Überschuss hinzugegeben wird.

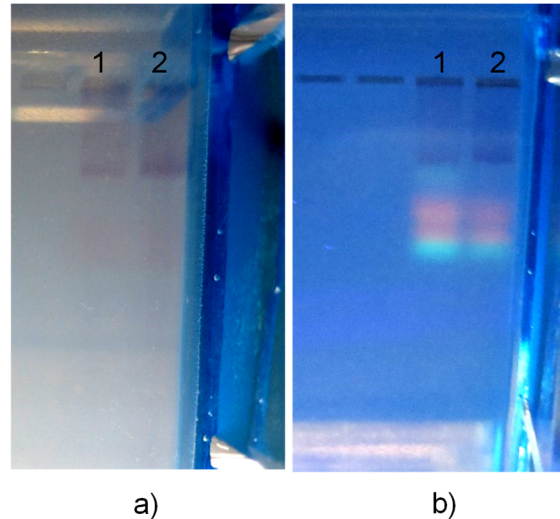


**Abbildung 51:** Gelelektrophorese mit Fluoreszenzliganden funktionalisierter Au-NP, Laufzeit = 30 min, bei a) Tageslicht und b) unter der UV-Lampe 366 nm. Auftragung siehe Abbildung 49.

Des Weiteren werden die Au-NP mit dem Fluoreszenzliganden 9-(2-mercaptoethyl)-1H-iso-chromeno[6',5',4':10,5,6]anthra[2,1,9-def]isoquinolin-1,3,8,10(9H)-tetraon (FL-6), dessen Synthese in Kapitel 5.14.6 beschrieben ist funktionalisiert. Dieser Fluoreszenzligand besitzt eine Fluoreszenzquantenausbeute nahe eins und ist als Hochleistungsfluoreszenzfarbstoff bekannt.<sup>107</sup> Es wird angenommen, dass die Fluoreszenz dieses Liganden wegen seiner hohen Quantenausbeute nicht so stark von den Nanopartikeln gelöscht wird und dass er zur Detektion bei der NP-Größentrennung mittels Gelelektrophorese verwendet werden kann.

In Abbildung 52 ist das Gel nach der Gelelektrophorese abgebildet. Es ist deutlich erkennbar, dass auch die Fluoreszenz des Liganden FL-6 von den Au-NP gelöscht

wird. Die roten Fraktionen in Abbildung 52 a) fluoreszieren nicht in b). Aus Abbildung 52 b) wird deutlich, dass der freie Ligand, welcher im Überschuss vorliegt, schneller wandert als die mit diesem Liganden funktionalisierten NP.



**Abbildung 52:** Gelelektrophorese mit FL-6 funktionalisierten Au-NP, bei Tageslicht a) und unter der UV-Lampe 366 nm b), nach 15 min Laufzeit. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 25 nm + FL-6, 2) 41 nm + FL-6.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Edelmetall-NP, wie bereits angenommen, sehr starke Fluoreszenzlöscher sind und auch die Fluoreszenz der Farbstoffe und Farbstoffliganden mit sehr hoher Fluoreszenzquantenausbeute bedingungslos löschen. Da die Nachweisgrenze der Gelelektrophorese zur Größenbestimmung der NP nicht durch Fluoreszenz verbessert werden kann, soll die Löschung der Fluoreszenzfarbstoffe und Fluoreszenzfarbstoffliganden zur Größenbestimmung von Edelmetall-Nanopartikeln herangezogen werden.

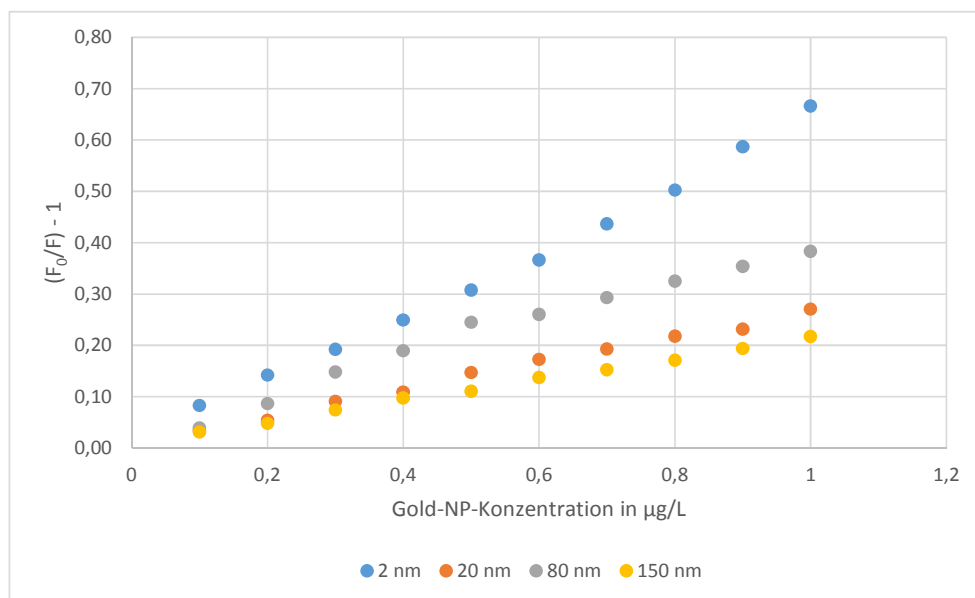
### **Indirekte Bestimmung durch Fluoreszenzlöschung**

In diesem Kapitel wird die Löschung der Fluoreszenzfarbstoffe NN, APTS und FITC durch Edelmetallnanopartikel sowie Edelmetall-Ionen untersucht. Es soll bestimmt werden, ob die Löschung der Fluoreszenz der Farbstoffe vom Element, der Form des Metalls (ionisch oder partikulär), dem Coating und der Partikelgröße abhängig ist und ob sich diese Faktoren durch Fluoreszenzlöschung ermitteln lassen. Außerdem soll

untersucht werden, ob man durch Fluoreszenzlöschung eines Fluoreszenzfarbstoffs die Konzentration einer Nanopartikelsuspension bestimmen kann.

### ***Einfluss der Größe von Au-NP auf die Fluoreszenzlöschung von NN***

Zuerst wird der Einfluss der Nanopartikelgröße auf die Löschung der Fluoreszenz von NN untersucht. Dazu werden 0,1-1 mg/L Au-NP verschiedener Größen zu einer NN-Lösung gegeben. In Abbildung 53 ist die Au-NP-Konzentration (0,1 - 1 mg/L) gegen  $(F_0/F) - 1$  aufgetragen. Dabei ist  $F_0$  die Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzfarbstoffs vor der Zugabe des Metalls und  $F$  die Intensität nach der Zugabe.



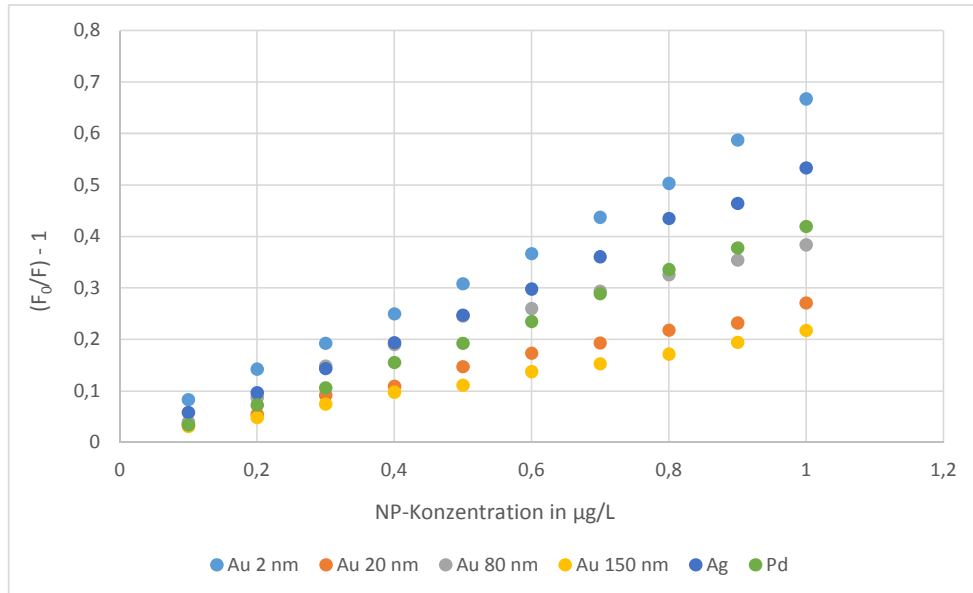
**Abbildung 53:** Löschung der Fluoreszenz von NN durch Au-NP verschiedener Größen.

Der Abbildung 53 kann man entnehmen, dass die 2 nm Au-NP die stärkste Fluoreszenzlöschung verursachen, gefolgt von den 80, 20 und 150 nm Au-NP. Somit ist die Löschung der Fluoreszenz von NN durch Au-NP zwar von der Größe dieser abhängig, jedoch besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und der Stärke der Löschung, da die 2 und 80 nm Au-NP stärker die Fluoreszenz löschen als die 20 und 150 nm Au-NP.

### ***Einfluss der Partikelart auf die Fluoreszenzlöschung von NN***

Des Weiteren wird der Einfluss der NP-Art auf die Löschung der Fluoreszenz von NN untersucht. Betrachtet man Abbildung 54, so kann man feststellen, dass die Ag- und

Pd-NP stärkere Löscher der Fluoreszenz des NN-Farbstoffs sind als die Au-NP. Lediglich sehr kleine Au-NP sind zu einer stärkeren Löschung der Fluoreszenz fähig, welche die von Ag- und Pd-NP übersteigt.

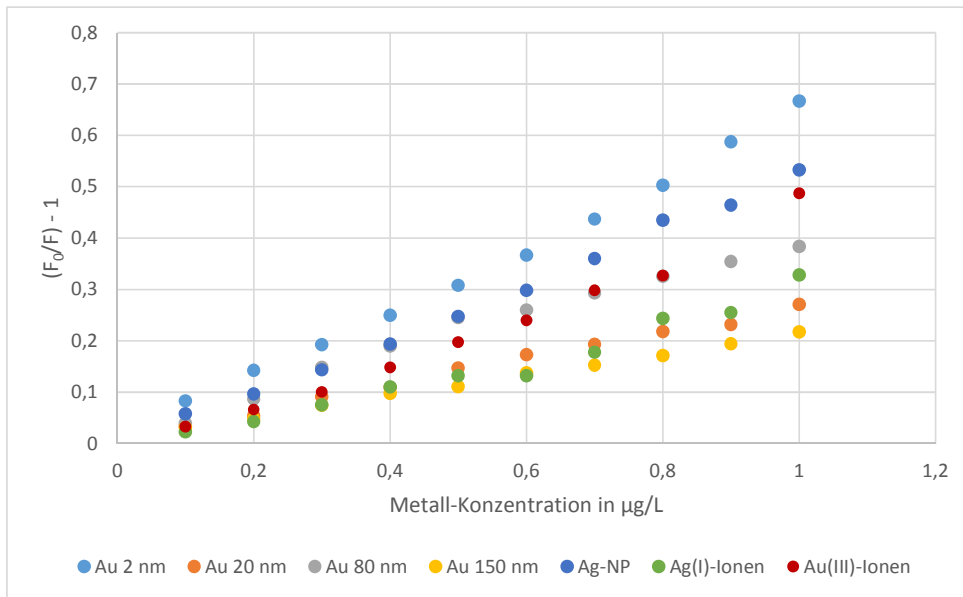


**Abbildung 54:** Löschung der Fluoreszenz von NN durch Au-NP verschiedener Größen, sowie Ag- und Pd-NP.

Da die synthetisierten Ag- und Pd-NP in einer Größe  $> 2$  nm synthetisiert werden, ist davon auszugehen, dass Ag-NP die Fluoreszenz von NN am stärksten löschen, gefolgt von den Pd- und Au-NP.

### ***Einfluss der Metallform auf die Fluoreszenzlöschung von NN***

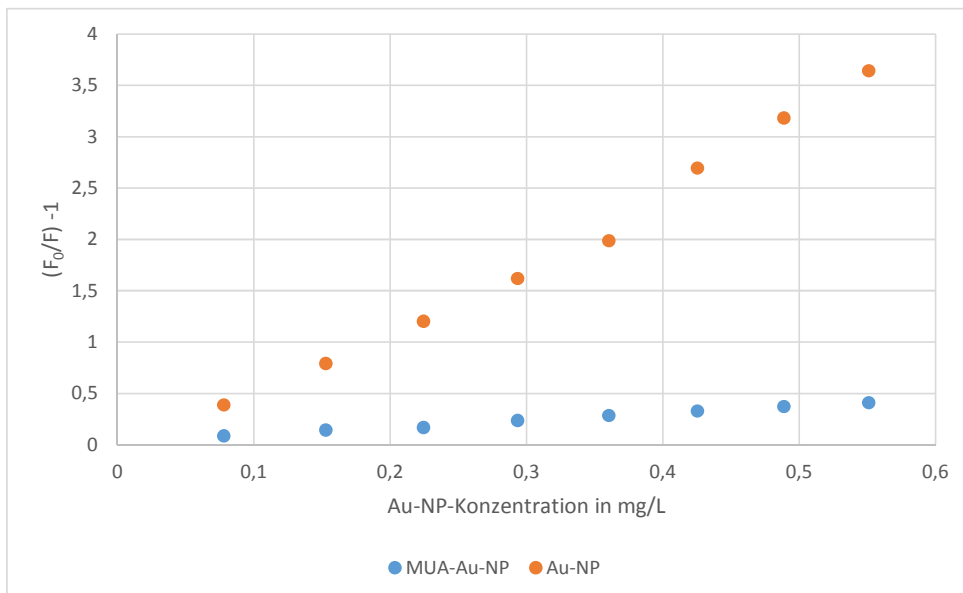
Des Weiteren wird der Einfluss der Metallform von Au und Ag (ionisch oder partikulär) auf die Löschung der Fluoreszenz des Farbstoffs NN untersucht. Wie man in Abbildung 55 sehen kann, führen sowohl die Nanopartikel als auch die Ionen zu einer starken Fluoreszenzlöschung. Im Falle von Silber löscht die nanopartikuläre Form die Fluoreszenz von NN stärker als die ionische Form. Beim Gold ist es genau umgekehrt, dort führen die Au-Ionen zu einer stärkeren Löschung der Fluoreszenz als die Nanopartikel. Dabei bilden wieder die 2 nm großen Au-NP eine Ausnahme, welche zur stärksten Fluoreszenzlöschung von NN führen. Somit ist die Fluoreszenzlöschung zwar von der Metallform abhängig, diese Abhängigkeit ist jedoch für jede Metallart unterschiedlich und kann nicht generalisiert werden.



**Abbildung 55:** Löschung der Fluoreszenz von Natriumnaphthionat durch Au- und Ag-NP verschiedener Größen, sowie durch Au- und Ag-Ionen

### ***Einfluss des Liganden MUA auf die Fluoreszenzlöschung von NN***

Weiterhin wird der Einfluss des Liganden MUA auf die Löschung der Fluoreszenz von NN durch Gold-NP untersucht.

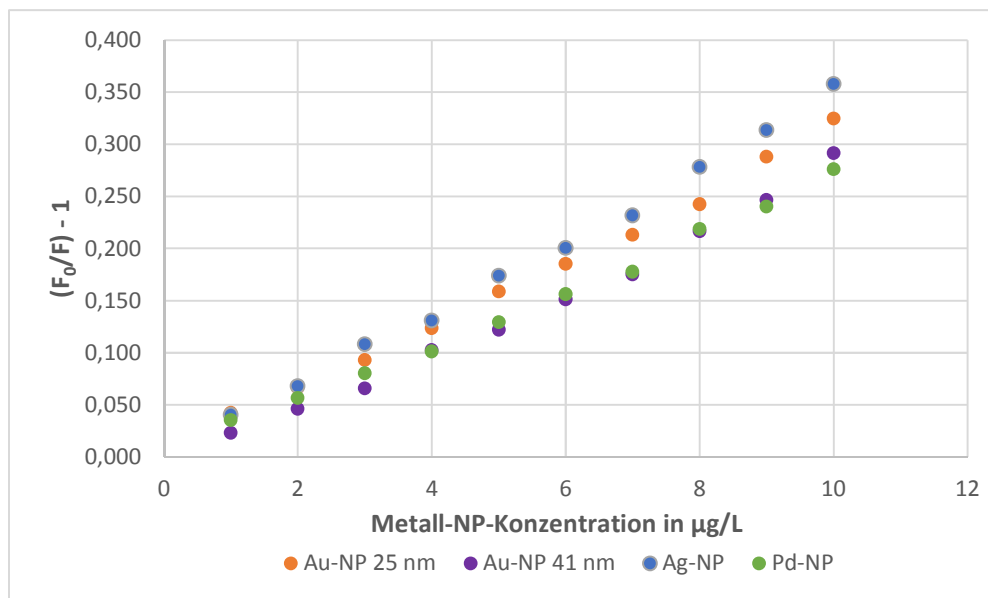


**Abbildung 56:** Einfluss von MUA auf die Fluoreszenzlöschung von Natriumnaphthionat

Dazu werden Citrat-stabilisierte und MUA-stabilisierte Gold-NP-Suspensionen zu einer NN-Lösung gegeben. Wie man der Abbildung 56 entnehmen kann, führen die MUA-stabilisierten Au-NP im Vergleich zu den Citrat-stabilisierten zu einer minimalen Fluoreszenzlöschung. Wahrscheinlich wird durch den Ligand MUA das Plasmonenfeld der NP so abgeschirmt, dass die Elektronen des Fluorophors mit diesem nicht interagieren können. Daraus resultiert eine deutlich schwächere Löschung der Fluoreszenz des Fluorophors.

**Einfluss der Partikelgröße und -art auf die Fluoreszenzlöschung von FITC**

Der Einfluss der Edelmetall-NP wird an einem weiteren Fluorophor, dem FITC untersucht. Wie man Abbildung 57 entnehmen kann, nimmt die Fluoreszenzlöschung mit steigendem Nanopartikelgehalt zu. Ag-NP löschen am stärksten die Fluoreszenz, gefolgt von den 25 nm Gold-NP. Die Pd- und 41 nm Au-NP führen zu einer ähnlichen, jedoch schwächeren Fluoreszenzlöschung. Anders als beim NN (vgl. S.138) kann bei den Gold-NP ein linearer Zusammenhang zwischen NP-Größe und Fluoreszenzlöschung beobachtet werden. Die kleineren Au-NP (25 nm) führen hier zu einer stärkeren Fluoreszenzlöschung als die größeren Au-NP (41 nm).



**Abbildung 57:** Fluoreszenzlöschung von FITC durch verschiedene NP

## Fluoreszenzlöschung verschiedener Farbstoffe durch 20 nm Au-NP

Es wird die Löschung der Fluoreszenz von drei verschiedenen Farbstoffen durch Zugabe von 0,1-1,0 µg/L Au-NP (20 nm) untersucht und die Auswirkung der NP-Zugabe auf die Fluoreszenz der Farbstoffe ermittelt. Es werden die Farbstoffe APTS, NN und FITC untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 58 dargestellt. Wie man dieser entnehmen kann, wird die Fluoreszenz von NN am stärksten gelöscht, gefolgt von FITC und APTS.

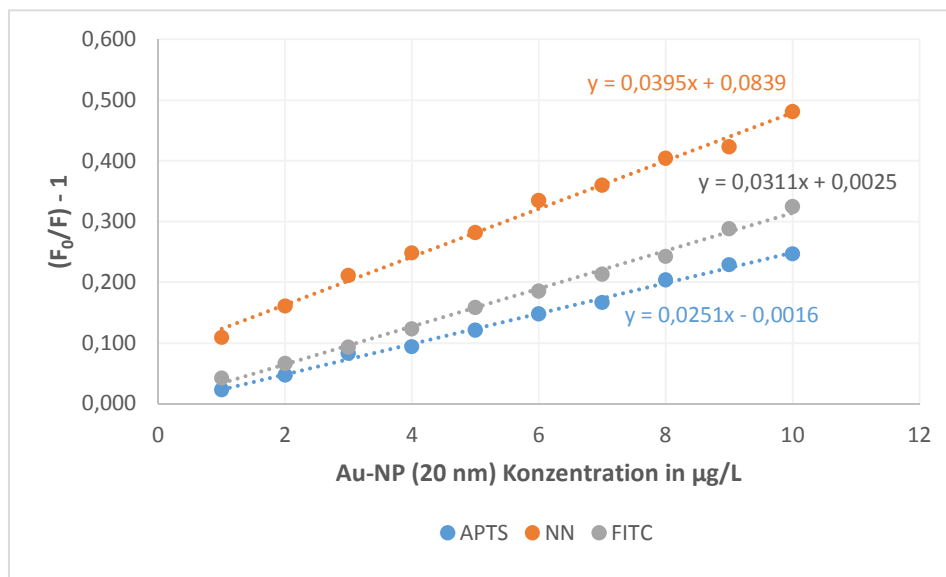
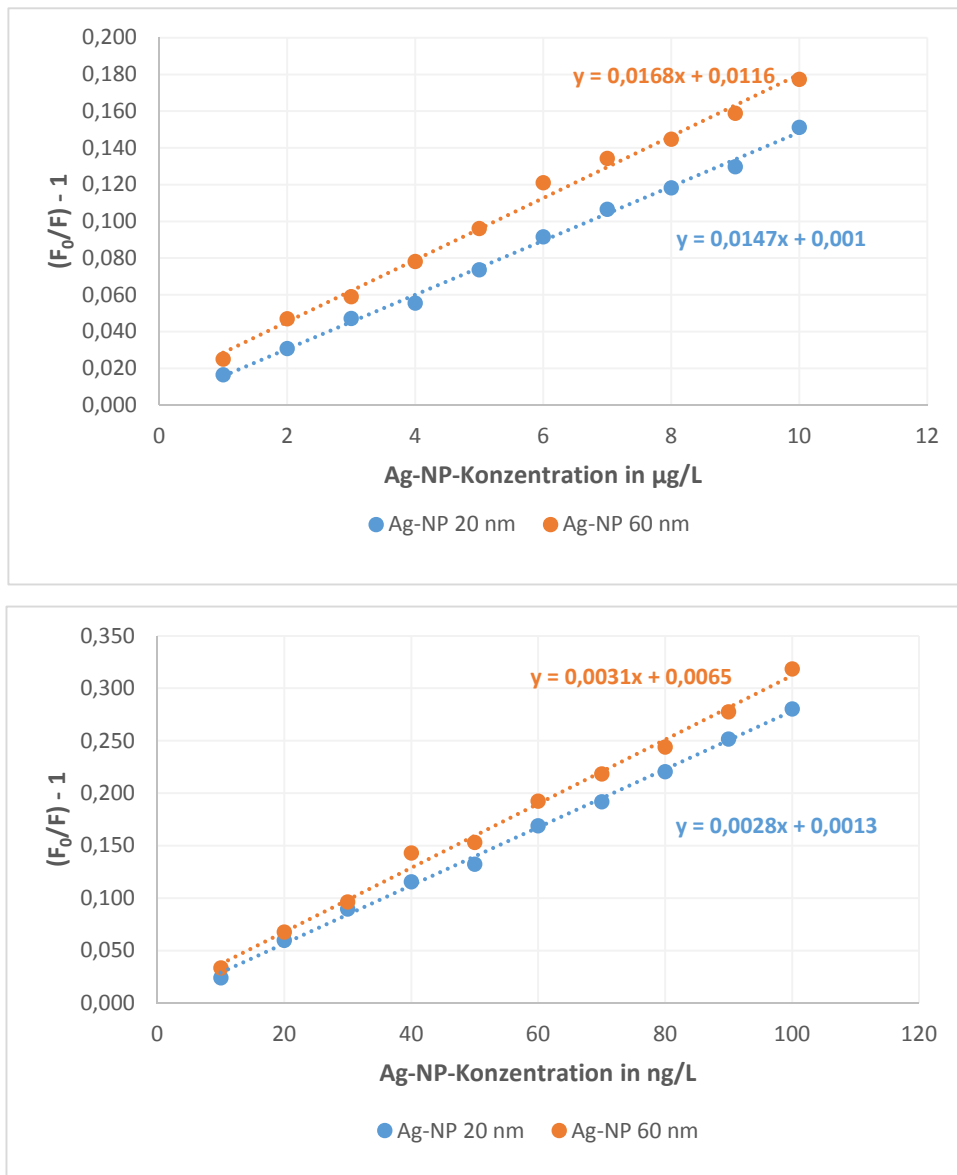


Abbildung 58: Fluoreszenzlöschung von APTS, NN und FITC durch Au-NP (20 nm)

Daraus lässt sich ableiten, dass die Fluoreszenz des Fluorophors stark durch die NP gelöscht wird, unabhängig davon, ob er eine Bindestelle für die NP besitzt oder nicht. Bei den in Abbildung 58 untersuchten Fluoreszenzfarbstoffen ist FITC der einzige Farbstoff, der eine direkte Bindestelle für Edelmetall-NP besitzt. Zieht man zur Erklärung die Fluoreszenzquantenausbeute heran, so wird klar, dass die Fluoreszenz der Fluoreszenzfarbstoffe mit der niedrigsten Quantenausbeute am stärksten durch die NP gelöscht wird. Wie jedoch aus Kapitel „Bestimmung durch Fluoreszenz“ deutlich wurde, wird auch die Fluoreszenz der Farbstoffe mit sehr hohen Quantenausbeuten, wie der Perylenfarbstoffe, von den NP gelöscht.

## Fluoreszenzlöschung von FITC durch Ag-NP verschiedener Größen

Des Weiteren wird die Löschung der Floreszenz von FITC durch 20 und 60 nm große Ag-NP untersucht. Dazu wurden die NP-Suspensionen zuvor zur Entfernung von Ag-Ionen dialysiert. Die Fluoreszenzlöschung wird sowohl durch die Zugabe von 1-10 µg/L, als auch durch die Zugabe von 10-100 ng/L Ag-NP ermittelt. Abbildung 59 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.



**Abbildung 59:** Fluoreszenzlöschung von FITC durch Ag-NP verschiedener Größen

Es ist deutlich sichtbar, dass die größeren Ag-NP (60 nm) zu einer stärkeren Fluoreszenzlöschung führen als die kleineren (20 nm), anders als die Au-NP, vgl. Abbildung



57. Die Fluoreszenzlöschung von FITC wird maßgeblich von der Ag-Konzentration beeinflusst, wobei auch sehr kleine Silberkonzentrationen von 10 - 100 ng/L zu einer starken Löschung der Fluoreszenz führen. Es resultiert eine lineare Ag-NP-Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzlöschung.

### ***Konzentrationsbestimmung von monodispersen 20 nm Ag-NP mit Hilfe der Fluoreszenzlöschung von FITC***

Da zwischen der Fluoreszenzlöschung und der Konzentration des Löschers, in diesem Fall der Ag-NP-Konzentration, ein linearer Zusammenhang besteht, wird ferner überprüft, ob die Fluoreszenzlöschung von FITC zur Konzentrationsbestimmung von Ag-NP benutzt werden kann. Zuerst soll untersucht werden, ob die durch Fluoreszenzlöschung ermittelte Konzentration mit der bei diesen Versuchen eingesetzten Ag-NP-Konzentration übereinstimmt. Des Weiteren soll die Ag-NP-Konzentration mit der ET-AAS bestimmt und mit der bei den Fluoreszenzversuchen eingesetzten sowie mit der durch Fluoreszenzlöschung experimentell ermittelten Ag-NP-Konzentration verglichen werden.

Gibt man zu 2 mL einer 0,02 µM FITC-Lösung ein bekanntes Volumen  $V_1$  (z.B. 100 µL oder 150 µL) einer bekannten Konzentration  $c_1$  (74 µg/L) einer Ag-NP-Suspension (20 nm) zu, so kann man die Ag-Konzentration in der FITC-Lösung nach Formel 9 berechnen. Dabei ist  $V_2 = 2 \text{ mL} + V_1$ .

$$c_2 = \frac{c_1 * V_1}{V_2}$$

**Formel 9:** Verdünnungsformel zur Bestimmung der Ag-NP-Konzentration

Erstellt man eine Kalibrierreihe (siehe Abbildung 59), so lässt sich aus der Geradengleichung und den gemessenen Werten für  $F_0$  und  $F$  die Ag-NP-Konzentration nach Formel 10 ermitteln. Dabei ist  $m$  die Steigung der Kalibriergeraden und  $b$  der y-Achsenabschnitt.

$$x = \frac{\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) + m}{b}$$

**Formel 10:** Formel zur Bestimmung der Ag-NP-Konzentration durch Fluoreszenzlöschung

In Tabelle 13 sind die durch die Formeln 9 und 10 erhaltenen Werte einander gegenübergestellt.

**Tabelle 13:** Gegenüberstellung der zugegebenen und durch Fluoreszenzlöschung ermittelten Ag-NP-Konzentration. Mit  $y = 0,0151x - 0,0016$ .

<b>F<sub>0</sub></b>	<b>F</b>	<b>(F<sub>0</sub>/F) - 1</b>	<b>eingesetzte Ag-NP Konzentration in µg/L</b>	<b>Durch Fluoreszenzlöschung ermittelte Ag-NP Konzentration in µg/L</b>
<b>999.999</b>	955.276	0,0468	3,52	3,21
<b>977.780</b>	926.569	0,0553	3,52	3,77
<b>977.780</b>	908.112	0,0767	5,16	5,19

Wie man der Tabelle 13 entnehmen kann, lässt sich die Ag-NP-Konzentration durch Fluoreszenzlöschung ziemlich genau im unteren µg/L-Konzentrationsbereich bestimmen. Deswegen wird untersucht, ob die Ag-NP-Konzentration auch im ng/L-Bereich durch Fluoreszenzlöschung bestimmt werden kann. Außerdem wird die Ag-NP-Konzentration mit Hilfe der CPE und ET-AAS bestimmt und mit der durch die Fluoreszenzlöschung bestimmten sowie mit der eingesetzten Konzentration verglichen, siehe Tabelle 14.

**Tabelle 14:** Gegenüberstellung der zugegebenen, durch Fluoreszenzlöschung und durch ET-AAS-Messung ermittelten Ag-NP-Konzentration. Mit  $y = 0,0028x - 0,0013$ , vgl. Abbildung 59.

<b>F<sub>0</sub></b>	<b>F</b>	<b>(F<sub>0</sub>/F) - 1</b>	<b>eingesetzte Ag-NP Konzentration in ng/L</b>	<b>Durch Fluoreszenzlöschung ermittelte Ag-NP Konzentration in ng/L</b>	<b>Mit der ET-AAS ermittelte Ag-NP-Konzentration in ng/L</b>
<b>266.046</b>	254.573	0,0451	17,00	15,63	18,87
<b>265.469</b>	251.026	0,0575	17,00	20,08	18,87

Es wird deutlich, dass die mit der ET-AAS und durch Fluoreszenzlöschung gemessenen Konzentrationen sehr ähnlich sind und der eingesetzten Nanopartikelkonzentration in der Probe entsprechen. Demnach eignet sich die Fluoreszenzlöschung sehr gut zur Konzentrationsbestimmung von Silbernanopartikeln.

Durch ihre Sensitivität kann man sogar Lösungen mit Konzentrationen im unteren ng/L-Bereich bestimmen. Die Methode kann jedoch nur zur Konzentrationsbestimmung monodisperser Lösungen oder polydisperser Lösungen gleicher Zusammen verwendet werden, da die Fluoreszenzlöschung von der Größe der Partikel abhängig ist. Außerdem darf die Probe nur eine NP-Art enthalten und muss frei von weiteren Substanzen wie z.B. Ionen sein, da diese ebenfalls zur Fluoreszenzlöschung führen. Da sehr viele Stoffe existieren, die zur Fluoreszenzlöschung in der Lage sind, ist diese Methode nur bedingt anwendbar. Sie könnte jedoch bei der Herstellung von Nanopartikeln zur Produktkontrolle verwendet werden.

### **Rückgewinnung der Fluoreszenz durch Ligandensubstitution**

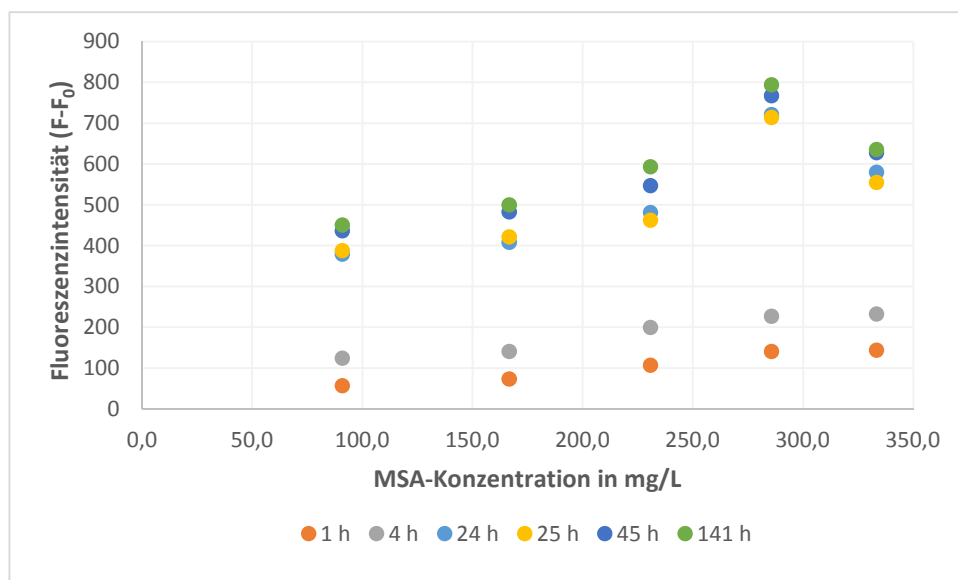
Da Edelmetall-NP zu einer starken Fluoreszenzlöschung führen, wird untersucht, ob sich durch Austausch des Fluoreszenz-Liganden durch einen anderen Liganden die Fluoreszenz des Fluorophors zurückgewinnen lässt. Solche Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)-Untersuchungen sind in der Literatur bekannt<sup>108,109</sup> Durch die extrem hohen Extinktionskoeffizienten der Au-NP kommt es zum FRET und damit zur Fluoreszenzlöschung des bindenden Fluorophors. Die Zugabe eines Liganden, welcher eine höhere Affinität zu Au-NP besitzt, z.B. ein Ligand mit einer freien Thiolgruppe, bewirkt ein Ablösen der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle von der Nanopartikeloberfläche und damit eine Fluoreszenzrückgewinnung.<sup>101,109</sup>

Das primäre Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen ist: festzustellen, ob die NP nach erfolgter Gelelektrophorese durch Zugabe eines nicht-fluoreszierenden Liganden im Agarosegel an diesen binden und somit die Fluorophormoleküle freisetzen können. Ist dies der Fall, so kann die Fluoreszenz des freigelassenen Fluorophors an der Stelle im Gel detektiert werden, an der sich die NP befinden, wodurch die Nachweisgrenze der Gelelektrophorese verbessert werden kann.

Aufgrund bestehender Untersuchungen zur Ligandensubstitution von FITC, wird dieser Fluorophor für die Untersuchungen herangezogen.<sup>101</sup> Der zweite Ligand ist MSA, der aufgrund seiner freien Thiolgruppe eine höhere Affinität zu Au-NP als FITC besitzt. Zuerst wird fluorimetrisch untersucht, ob MSA zur Freisetzung des Liganden FITC führt. Weiterhin soll die Freisetzung optimiert und fluorimetrisch verfolgt werden. Dazu werden Au-NP mit FITC funktionalisiert und anschließend mit MSA versetzt. Die Fluoreszenzintensität wird am Fluorimeter gemessen.

### **Optimierung der MSA-Konzentration und der Inkubationszeit**

In Abbildung 60 ist die Ligandensubstitution in Abhängigkeit von der MSA-Konzentration und der Inkubationsdauer dargestellt.



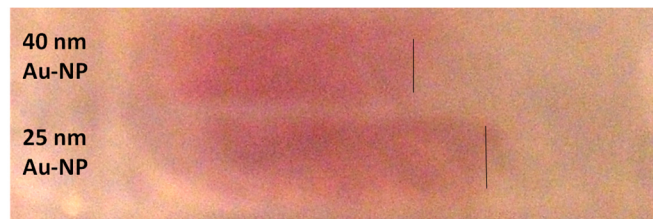
**Abbildung 60:** Ligandensubstitution in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der MSA-Konzentration

Es wird deutlich, dass die höchste Fluoreszenzintensität von FITC bei Zugabe von 286 mg/L MSA zu den FITC-funktionalisierten Au-NP und nach 141 h Inkubation mit dieser MSA-Lösung erreicht wird. Eine höhere MSA-Konzentration führt dagegen zu einem Fluoreszenzintensitätsabfall.

### **Gelelektrophorese und Ligandensubstitution**

Unter Anwendung der ermittelten, optimierten Bedingungen wird die Gelelektrophorese mit 25 nm und 41 nm funktionalisierten FITC-Au-NP-Proben 20 min bei einer

Spannung von 150 V durchgeführt. Anschließend wird das Gel in einer 286 mg/L MSA-Lösung auf einem Schütteltisch bei 50 rpm geschüttelt. In Abbildung 61 ist zu sehen, dass die kleineren funktionalisierten Nanopartikel schneller laufen als die größeren, jedoch sind bei beiden Proben keine scharfen Banden erkennbar.



**Abbildung 61:** Gelelektrophorese der 25 und 41 nm FITC funktionalisierter Au-NP

Das kommt wahrscheinlich durch ein partielles Ablösen der Farbstoffmoleküle bei der Zentrifugation während der Aufreinigung zustande. Dadurch ist die Oberfläche der Nanopartikel unterschiedlich stark mit FITC-Molekülen besetzt, was wiederum zu einem uneinheitlichen Laufverhalten im Gel führt. Unter der UV-Lampe ist keine Fluoreszenz erkennbar.

Nach der Inkubation mit der MSA-Lösung lässt sich nach 24 h und nach 141 h unter der UV-Lampe (366 nm) keine Fluoreszenz beobachten. Wahrscheinlich kann der Ligandenaustausch im Gel nicht stattfinden, weil das MSA nicht oder schlecht in das Gel hineindiffundieren kann oder weil die Partikel mit dem Gel so fest verankert sind, dass im Gel kein Ligandenaustausch stattfindet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Nachweisgrenze der Gelelektrophorese für die Nanopartikeltrennung sowohl direkt durch Fluoreszenzliganden als auch indirekt durch Fluoreszenzlöschung und Rückgewinnung der Fluoreszenz der Farbstoffe und Farbstoffliganden nicht verbessert werden kann. Auch die Fluoreszenz der Farbstoffe mit sehr hohen Quantenausbeuten nahe dem Wert 1 wird durch die Edelmetallnanopartikel gelöscht. Die Fluoreszenzlöschung ist abhängig von der Metallform (ionisch oder partikulär), der Nanopartikelgröße, -art und vom Coating. Die stärkste Fluoreszenzlöschung zeigen Fluorophore mit niedrigen Quantenausbeuten, wobei die Löschung der Fluoreszenz nicht davon abhängt, ob der Fluorophor eine Bindestelle für die NP besitzt. Durch die lineare Abhängigkeit der NP-Konzentration von der Fluo-

reszenzlöschung des Farbstoffs FITC kann die NP-Konzentration unbekannter monodisperser Proben bis in den ng/L-Bereich bestimmt werden, vorausgesetzt, es sind keine weiteren Stoffe in der Probe vorhanden, die ebenfalls zu einer Fluoreszenzlöschung führen. Deswegen kann diese Methode nur zur Produktkontrolle bei der NP-Herstellung verwendet werden. Der Einfluss der Partikelgröße auf die Löschung der Fluoreszenz kann nicht verallgemeinert werden, denn es zeigt sich je nach Fluoreszenzfarbstoff und Partikelart ein unterschiedlicher Sachverhalt. Somit kann die Fluoreszenzlöschung nicht zur Größenbestimmung von Edelmetall-NP herangezogen werden. Die Rückgewinnung der Fluoreszenz durch die Ligandensubstitution mit MSA ist zwar in Lösung möglich, lässt sich jedoch nicht in die NP-Größentrennung mit der Gelelektrophorese implementieren.

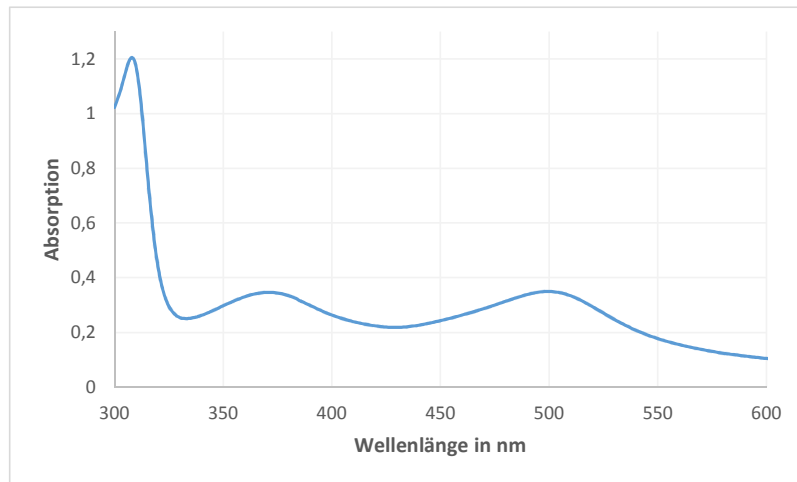
### **7.3.2 Absorption**

Die Absorption ist eine verbreitete Methode bei der Gelelektrophorese zur Charakterisierung von Proteinen und DNA. Diese Charakterisierungsmethode soll zur Verbesserung der Nachweisgrenze der NP-Größentrennung mittels Gelelektrophorese angewandt werden. Die Untersuchungen werden mit dem Photosensibilisator Ditetraethylammonium *cis*-bis(isothiocyanato)bis(2,2'-bipyridyl-4,4' dicarboxylato)ruthenium(II) (N-719) durchgeführt, der zu einer Erhöhung der Absorption von Nanopartikeln führen soll und als Farbstoff-Ligand für die Edelmetall-NP bei der Gelelektrophorese verwendet werden kann. Außerdem sollen die NP mit dem Protein Bovine serum albumin (BSA) funktionalisiert und durch Bindung eines Proteinfarbstoffs an das BSA detektiert werden. Das Protein wird über ein freies Schwefelatom an der Oberfläche des Edelmetall-NP gebunden. Die Detektion des BSA-Edelmetall-NP erfolgt mittels der Coomassie Brilliant Blau Färbung. Dieser Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und bewirkt so eine unspezifische Färbung von Proteinen.

#### **Erhöhung der Absorption durch N-719**

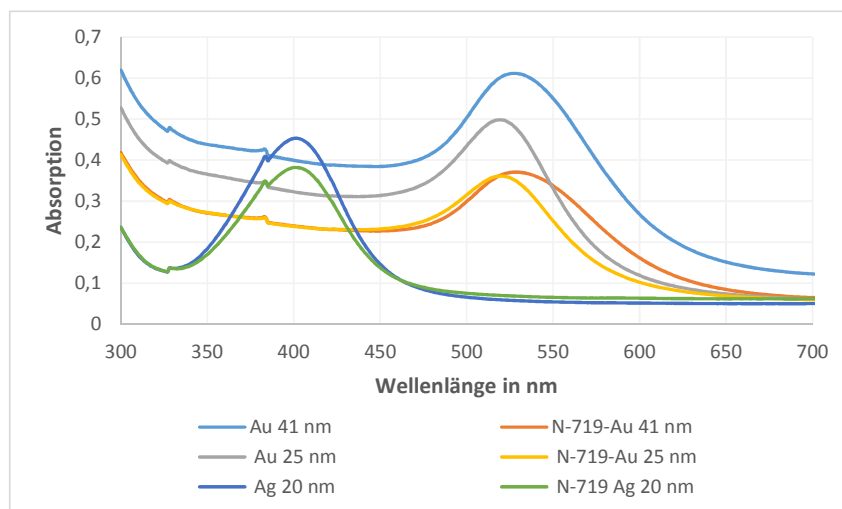
Zuerst wird die Absorption von N-719 sowie von N-719 funktionalisierten 25 und 41 nm Au- und 20 nm Ag-NP am UV-VIS-Spektrometer gemessen und mit der von nicht funktionalisierten Au- und Ag-NP verglichen.

In Abbildung 62 ist das Absorptionsspektrum von N-719 dargestellt. Wie man diesem entnehmen kann, zeigt N-719 eine breite Absorption über den ganzen sichtbaren Bereich mit drei Absorptionsmaxima bei 310, 371 und 500 nm.



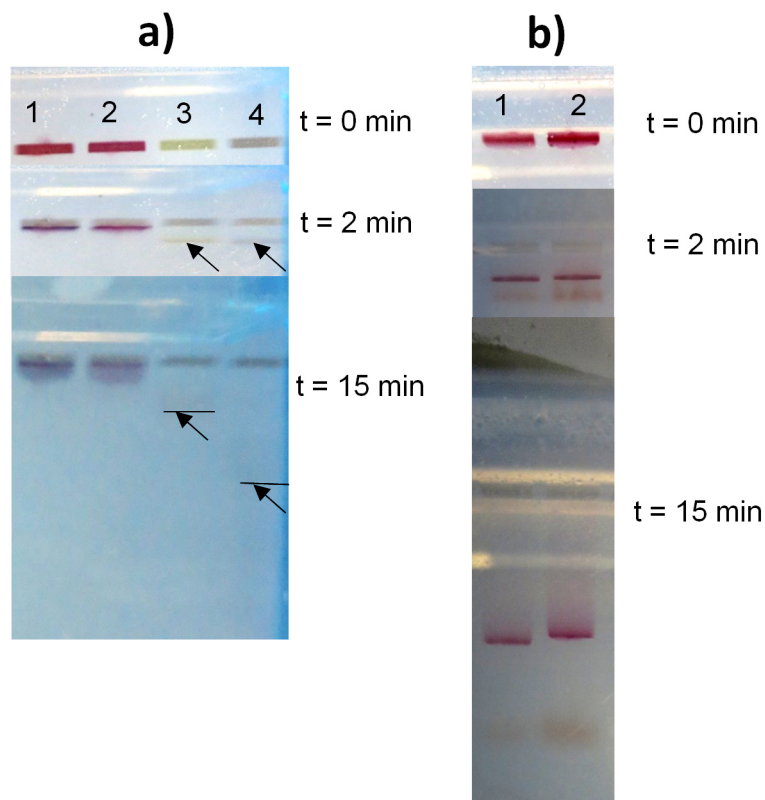
**Abbildung 62:** Absorptionsspektrum von N-719 in UPW

In Abbildung 63 ist die Absorption von N-719 funktionalisierten und nicht funktionalisierten NP aufgetragen. Man kann entgegen der gemachten Annahmen deutlich erkennen, dass die Absorption mit der Funktionalisierung abnimmt. Durch die Funktionalisierung ändert sich auch das Absorptionsmaximum, welches zu höheren Wellenlängen hin verschoben wird. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums bei der Funktionalisierung kann durch die Wechselwirkung des Ligandenfeldes mit der Oberflächen-Elektronenwolke der NP erklärt werden.<sup>102</sup>



**Abbildung 63:** Absorptionsspektrum N-719-funktionalisierter Au- und Ag-NP

Nach Funktionalisierung der Au-(25 und 41 nm), Ag-(25 nm) und Pd-Partikel mit N-719 werden diese mittels Gelelektrophorese untersucht. Die Gelelektrophorese wird 15 min bei 150 V durchgeführt. Es werden drei Fotos zu verschiedenen Zeitpunkten der Gelelektrophorese gemacht ( $t = 0$  min vor der Gelelektrophorese,  $t=2$  min und  $t=15$  min). Diese Bilder sind in Abbildung 64 dargestellt.



**Abbildung 64:** Gelelektrophorese N-719-funktionalisierter NP-Suspensionen nach unterschiedlichen Zeitpunkten. Von links nach rechts wurden aufgetragen: a) 1) 25 nm Au-N-719-NP, 2) 41 nm Au-N-719-NP, 3) 20 nm Ag-N-719-NP, 4) Pd-N-719-NP; b) 1) 25 nm Au-N-719-NP, 2) 41 nm Au-N-719-NP.

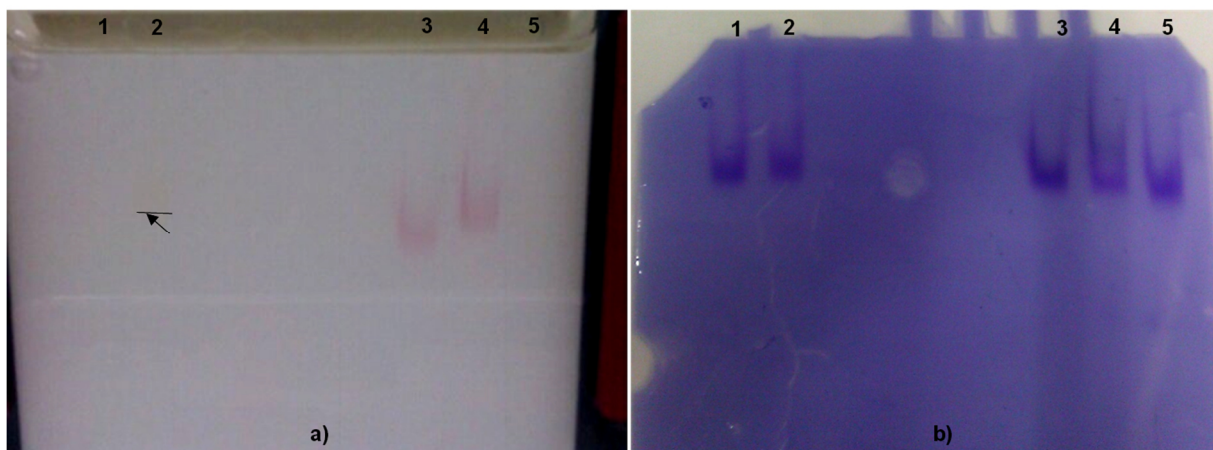
Wie man der Abbildung a) entnehmen kann, wandern die Ag- und Pd-N-719-NP in einer schmalen Fraktion. Nach 15 min Gelelektrophorese sind die Ag- und Pd-N-719-NP im Gel nur schwer erkennbar und auf dem Foto in Abbildung 64 a) kaum sichtbar. Man kann erkennen, dass die Pd-Partikel viel weiter im Gel wandern, da diese kleiner als die 20 nm Ag-N-719-NP sind. Die Au-N-719-NP verbleiben in der Geltasche, was entweder durch die Aggregation der Partikel oder durch unvollständige Funktionalisierung der Partikel mit dem N-719-Liganden erklärt werden kann. Deswegen werden die Au-NP mit einer höheren Konzentration an N-719 funktionalisiert, das Ergebnis der



Gelelektrophorese kann man b) entnehmen. Aus b) wird deutlich, dass bei ausreichender Ligandkonzentration die Au-NP in einer schmalen Fraktion im Gel wandern. Es ist ebenfalls deutlich zu sehen, dass der freie Ligand N-719, der im Überschuss hinzugegeben wird, weiter im Gel wandert als die NP. Die Detektion der Partikelfractionen im Gel erfolgt durch die Eigenfärbung der Partikel und kann nicht durch Funktionalisierung mit N-719 verbessert werden. Wie man bereits aus den UV-VIS-Ergebnissen folgern kann, führt die Funktionalisierung mit N-719 nicht zu einer Erhöhung, sondern zu einer Erniedrigung der Absorption.

### Detektion durch BSA

Die BSA-funktionalisierten Edelmetall-NP werden 20 min bei 150 V mittels vertikaler Gelelektrophorese getrennt. In Abbildung 65 sind die Ergebnisse der Auftrennung dargestellt.



**Abbildung 65:** Gelelektrophorese BSA-funktionalisierter NP-Suspensionen a) vor Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R250 b) nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R250. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) BSA, 2) Ag-BSA-NP, 3) 25 nm Au-BSA-NP, 4) 41 nm Au-BSA-NP, 5) Pd-BSA-NP.

Betrachtet man die Abbildung 65 a), so kann man sehen, dass die 25 nm Au-BSA-NP (Bande 3) schneller laufen als die 41 nm Au-BSA-NP (Bande 4). In Bande 2 kann man einen Gelbschimmer der Ag-BSA-NP erkennen, aus dem deutlich wird, dass diese langsamer laufen als die Au-BSA-NP. Betrachtet man das angefärbte Gel in b), so

stellt man fest, dass die Banden 3 und 4 nicht mit denen in a) übereinstimmen. Vielmehr kann man in b) erkennen, dass alle Banden auf einer Höhe liegen. Da Bande 1 dem freien BSA entspricht, lässt sich daraus folgern, dass ein Überschuss an freiem BSA in der Probe vorhanden ist, welches durch die Commassie-Färbung angefärbt wird. Das an die NP gebundene BSA lässt sich mit Hilfe der Färbung nicht detektieren. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die Bindestellen am BSA für den Farbstoff (die basischen Seitenketten der Aminosäuren) von den NP besetzt bzw. abgeschirmt werden und dieser sich deswegen nicht anlagern kann. Ein weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Konzentration von dem an den NP gebundenem BSA die Nachweisgrenze der Commassie-R250-Färbung von 0,1 µg Protein pro Bande nicht erreicht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch Funktionalisierung der Edelmetall-NP mit dem Liganden N-719 keine Absorptionserhöhung erreicht werden kann. Jedoch kann N-719 als Ligand zur Größentrennung bei der Gelelektrophorese verwendet werden, da die Partikel in einer schmalen Fraktion wandern. Auch BSA kann als Ligand bei der Größentrennung von NP mittels Gelelektrophorese verwendet werden, jedoch lässt sich auch durch Funktionalisierung mit BSA die Nachweisgrenze der Gelelektrophorese nicht verbessern, da die Detektion der aufgetrennten NP durch die Commassie-Färbung nicht möglich ist.

### **7.3.3 Atomspektrometrische Untersuchungen**

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Nachweisgrenze der Gelelektrophorese ist die Kopplung dieser mit einer nachweisstarken elementanalytischen Technik, wie z.B. der ET-AAS. Dazu sollen die mit einem Liganden funktionalisierten NP-Suspensionen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Durch einen Marker hoher Konzentration, der aus einem NP-Gemisch verschiedener Größen besteht und bei jeder Auftrennung mitläuft, könnten die einzelnen Gelfraktionen lokalisiert werden. Anschließend sollen die Gel-Fraktionen ausgeschnitten, in einer säurehaltigen Lösung gelöst und die Metallkonzentration der einzelnen Fraktionen mit der ET-AAS bestimmt werden. Auch eine vorherige Extraktion und Anreicherung der aufgelösten Gelfraktion mittels CPE ist denkbar, dazu könnte man das Gel in einer wässrigen Lösung ohne Zusatz von Säure lösen. Diese Methode soll in diesem Kapitel entwickelt werden.

Zuerst wird als Vorversuch ein Gel aus Gold-NP hergestellt, aus diesem werden Gelstücke herausgeschnitten, gelöst und die Goldkonzentration dieser Lösung mittels ET-AAS bestimmt. Anschließend werden mit einem Ligand funktionalisierte Au- und Ag-NP verschiedener Größen und Konzentrationen mit Hilfe der vertikalen Gelelektrophorese getrennt und die Edelmetallkonzentration mit der ET-AAS gemessen. Dabei werden die Parameter der Gelelektrophorese wie Ligandkonzentration, Inkubationszeit der NP mit dem Liganden, Spannung, Gelkonzentration und Laufpufferkonzentration variiert, um eine optimale Trennung und Bestimmung zu erreichen.

### Vorversuch

In diesem Vorversuch soll untersucht werden, ob man mit Hilfe der ET-AAS die NP-Konzentration im Gel durch Ausschneiden der Gelstücke bestimmen kann. Dazu wird ein Gel aus Gold-NP bekannter Konzentration (5,895 mg/L) hergestellt. Drei Gelstücke werden aus dem Gel herausgeschnitten, gewogen, in 10 mL einer 1:10 verdünnten Königswasser-Lösung gelöst und die Au-Konzentration in der Lösung mittels ET-AAS bestimmt. Aus den Ergebnissen in Tabelle 15 wird deutlich, dass die maximale Abweichung 0,03 % beträgt.

**Tabelle 15:** Bestimmung der Au-Konzentration im Au-NP-Agarose Gel.

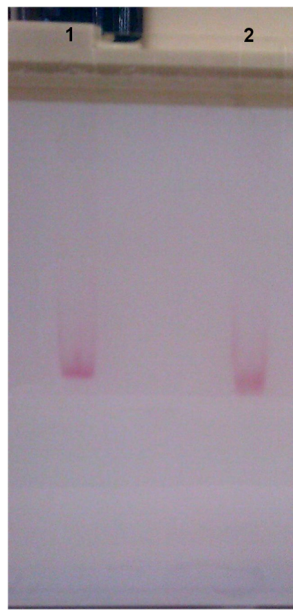
<b>Au-Konz. im Gel</b>	<b>mit ET-AAS bestimmte Au-Konz. im Gel</b>	<b>prozentuale Abweichung der Konz.</b>
142,6 µg/L	138,2 µg/L	0,030 %
129,7 µg/L	130 µg/L	0,002 %
172,1 µg/L	168,8 µg/L	0,019 %

Damit kann die NP-Konzentration im Gel durch Ausschneiden der Gel-Fractionen mittels ET-AAS bestimmt werden.

### Wiederfindung der Au-NP-Fractionen nach erfolgter Gelelektrophorese

Für die Wiederfindungsversuche werden MUA-funktionalisierte Au-NP-Suspensionen (25 nm und 41 nm) in der vertikalen Gelelektrophoresekammer bei 150 V, 20 min getrennt (siehe Kapitel 5.21.3). Das Ergebnis kann in Abbildung 66 betrachtet werden.

Anschließend wird die gesamte Bande ausgeschnitten in 10 mL einer Königswasserlösung (1:10) gelöst und die Au-Konzentration der Lösung mittels ET-AAS bestimmt. Außerdem wird für den direkten Vergleich die Au-Konzentration der aufgetragenen Lösungen gemessen. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der ET-AAS-Messungen gegenübergestellt.



**Abbildung 66:** Vertikale Gelelektrophorese MSA-funktionalisierter Au-NP-Suspensionen. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 41 nm Au-NP, 2) 25 nm Au-NP.

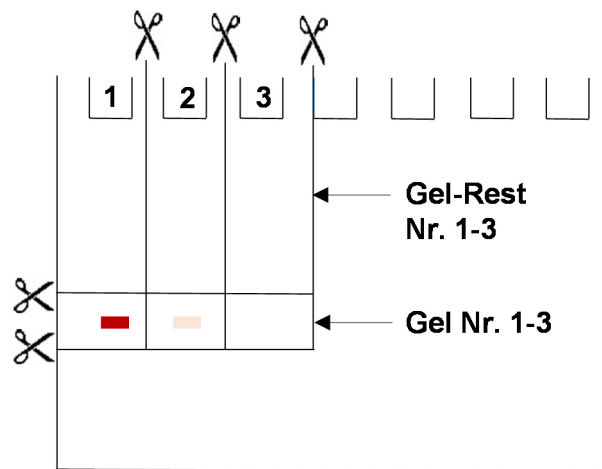
Man kann in Abbildung 66 ganz deutlich erkennen, dass die Nanopartikel größenabhängig unterschiedlich weit im Gel wandern. Damit kann die vertikale Gelelektrophorese ebenfalls zur Größenbestimmung von Edelmetall-NP verwendet werden.

**Tabelle 16:** Wiederfindung der Gold-NP im Agarosegel

<b>Au-NP-Suspension</b>	<b>Au-Konz. der aufgetragenen NP-Lösung</b>	<b>mit ET-AAS bestimmte Au-Konz. im Gel</b>	<b>Wiederfindung</b>
<b>25 nm</b>	101,6 µg/L	98,56 µg/L	97 %
<b>41 nm</b>	78,0 µg/L	68,73 µg/L	88 %

Vergleicht man die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung in Tabelle 16, so liegen die Wiederfindungswerte für die NP-Suspensionen zwischen 97 und 88 %. Diese Ergebnisse liefern eine gute Basis für weitere Untersuchungen.

Als nächstes wird die Konzentration der Au-NP-Suspensionen variiert. Es werden drei gleiche Au-NP-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen untersucht und auf das Gel aufgetragen, wobei die zweite Lösung eine 1:10 Verdünnung der Originallösung und die dritte eine 1:100 Verdünnung dieser ist. Das Gel wird nach erfolgter Gelelektrophorese (150 V, 20 min) nach folgendem Schema geschnitten, siehe Abbildung 67.



**Abbildung 67:** Schnittschema des Agarosegels nach der Gelelektrophorese. Von links nach rechts wurden aufgetragen: 1) 41 nm MUA-Au-NP, 2) 1:10 Verdünnung von 1), 3) 1:100 Verdünnung von 1).

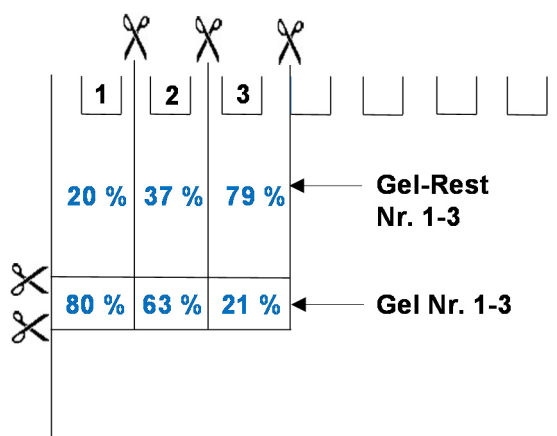
Somit erhält man 6 Fraktionen: Gel-Rest 1-3 und Gel 1-3. Die Au-Konzentrationen dieser Fraktionen, die Au-Konzentration der aufgetragenen Au-NP-Lösungen und die Wiederfindung dieser sind in Tabelle 17 dargestellt.

Die Wiederfindung der NP, bezogen auf die Gesamtkonzentration im Gel, ist dieser Tabelle und der schematischen Abbildung 68 zu entnehmen.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Wiederfindung der aufgetragenen Nanopartikel im Gel nur 66-76 % beträgt. Das kann damit erklärt werden, dass ein Teil der Au-NP-Suspension, die in die Geltasche gegeben wird, aus dieser in den Laufpuffer diffundiert. Außerdem kann man der Tabelle 17 und der Abbildung 68 entnehmen, dass die NP abhängig von ihrer Konzentration ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen.

**Tabelle 17:** Wiederfindung unterschiedlich konzentrierter Gold-NP-Fractionen im Agarosegel

Gel-Fraktio- nen	Au-Konz. der aufge- tragenen NP-Lösung	mit ET-AAS bestimmte Au-Konz. im Gel	Wiederfindung bezogen auf die zugege- bene Au-Konz.	Wiederfindung bezogen auf die gemessene Au- Gesamtkonz.
<b>Gel 1</b>	111,9 µg/L	67,91 µg/L	60,7 %	80 %
<b>Gel-Rest 1</b>	111,9 µg/L	16,96 µg/L	15,2 %	20 %
<b>Gel 1 gesamt</b>	111,9 µg/L	84,87 µg/L	75,8 %	100 %
<b>Gel 2</b>	12,69 µg/L	5,25 µg/L	41,4 %	63 %
<b>Gel-Rest 2</b>	12,69 µg/L	3,13 µg/L	24,7 %	37 %
<b>Gel 2 gesamt</b>	12,69 µg/L	8,38 µg/L	66,0 %	100 %
<b>Gel 3</b>	1,24 µg/L	0,2 µg/L	16,1 %	21 %
<b>Gel-Rest 3</b>	1,24 µg/L	0,74 µg/L	59,7 %	79 %
<b>Gel 3 gesamt</b>	1,24 µg/L	0,94 µg/L	75,8 %	100 %

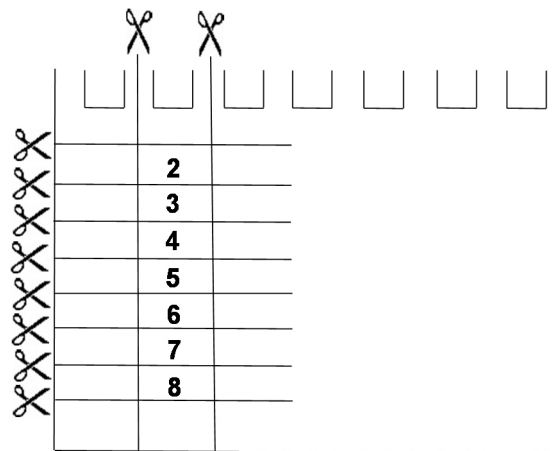


**Abbildung 68:** Schematische Darstellung der Wiederfindung bezogen auf die gemessene Au-Gesamtkonzentration im Gel.

Je niedriger die Konzentration der Au-NP-Lösung ist, desto langsamer wandern die Partikel durchs Gel. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die Konzentration an Ligand in der Lösung auf Grund der Verdünnung zu niedrig ist. Dadurch sind die Partikel nicht

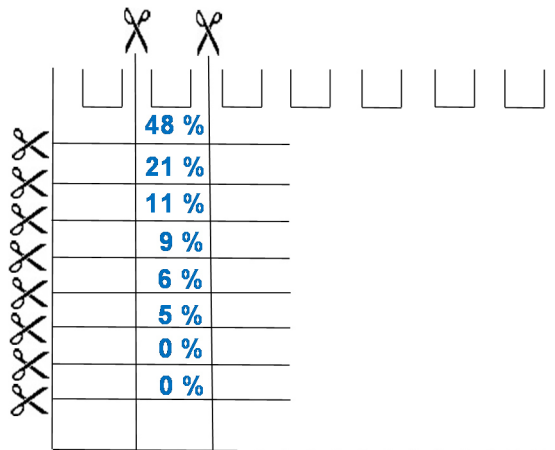
ausreichend mit dem Ligand funktionalisiert und bleiben entweder zum Großteil in der Gel-Tasche liegen oder bilden einen Schmierfilm im Gel.

Deswegen wird der Versuch mit der gleichen Konzentration an Ligand in der 1:100 Verdünnung der Originallösung (41 nm MUA-Au-NP-Lösung) wiederholt (siehe Kapitel 5.21.3). Da die Laufstrecke der Originallösung 4 cm beträgt, wird das Gel nach der Gelelektrophorese in acht 0,5 cm große Stücke geschnitten. Das Schnittschema ist in Abbildung 69 dargestellt. Jedes der Gelstücke wird in 1:10 verdünntem Königswasser gelöst und die Au-Konzentration dieser Lösungen mit der ET-AAS gemessen.



**Abbildung 69:** Schnittschema des Agarosegels nach Gelelektrophorese. Aufgetragen wurde eine 41 nm MUA-Au-NP-Lösung (1:100 Verdünnung).

Die Ergebnisse sind schematisch in Abbildung 70 dargestellt. Wie man dieser entnehmen kann, bleibt fast die Hälfte der Partikel in der Geltasche hängen. Die andere Hälfte wandert langsam im Gel und zieht Schlieren, wobei die Laufstrecke der Originallösung von 4 cm nicht erreicht wird. In der 1:100 Verdünnung lässt sich nach einer Laufstrecke von 3 cm kein Au mehr detektieren.



**Abbildung 70:** Schematische Darstellung der Wiederfindung bezogen auf die gemessene Au-Gesamtkonzentration im Gel.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch bei ausreichender Benetzung der Goldpartikel mit dem Liganden, die elektrophoretische Mobilität der Gold-NP von ihrer Konzentration bestimmt wird. Ein möglicher Grund für diesen Effekt könnte sein, dass durch das hohe Ligand-zu-NP-Konzentrationsverhältnis ein Großteil der Au-NP aggregiert. Das würde erklären, warum nahezu 50 % der Au-NP in der Geltasche verbleiben. Weitere Ursachen könnten eine zu niedrige Spannung oder eine viel zu hohe Laufpufferkonzentration für die niedrige Nanopartikelkonzentration sein. Da Ag-NP robuster gegen hohe Ligandkonzentrationen sind und die Emission dieser in die Umwelt deutlich größer ist als die der Au-NP, sollen diese weiter untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollen die oben genannten möglichen Störfaktoren wie Spannung und Pufferkonzentration untersucht werden.

### **Wiederfindung der Ag-NP-Fractionen nach erfolgter Gelelektrophorese**

Untersucht werden Ag-NP-Suspensionen zweier verschiedener Konzentrationen 16 und 1,6 mg/L. Diese werden mit MSA-funktionalisiert und in der vertikalen Gelelektrophoresekammer bei 150 V 20 min getrennt. Da die Laufstrecke der mit MSA funktionalisierten 16 mg/L Ag-NP 2 cm beträgt, werden pro Bande vier Gelstücke von jeweils 0,5 cm Länge herausgeschnitten und untersucht. Dabei wird wie bereits oben beschrieben verfahren. Das Schnittmuster und die Ergebnisse der Untersuchung sind schematisch in Abbildung 71 dargestellt.







**Tabelle 20:** Laufverhalten der Ag-NP in Abhängigkeit von der Spannung.

<b>Spannung</b>	<b>Ag-NP</b>	<b>Fraktion 1</b>	<b>Fraktion 2</b>	<b>Fraktion 3</b>
<b>150 V</b>	20 nm	40 %	43 %	17 %
<b>200 V</b>	20 nm	34 %	40 %	26 %
<b>150 V</b>	60 nm	92 %	8 %	-
<b>200 V</b>	60 nm	85 %	15 %	-

Wie man Tabelle 20 entnehmen kann, wird bei einer höheren Spannung (200 V) eine bessere Trennung erreicht. Um eine noch bessere Auftrennung zu erreichen, müssen jedoch weitere Parameter variiert werden.

Durch Herabsetzen der Gelkonzentration nimmt die Größe der Gelporen zu. Somit können vor allem die großen Partikel besser und weiter im Gel wandern. Die beste Trennung kann in einem 0,5 Gew.-% Gel erreicht werden (vgl. Tabelle 21). Bei dieser Gelkonzentration bleibt der geringste Anteil der 60 nm Ag-NP in der Geltasche zurück.

**Tabelle 21:** Laufverhalten der Ag-NP in Abhängigkeit von der Gelkonzentration bei 200 V.

<b>Gel-konz. in Gew.-%</b>	<b>Ag-NP</b>	<b>Fraktion 1</b>	<b>Fraktion 2</b>	<b>Fraktion 3</b>	<b>Fraktion 4</b>	<b>Fraktion 5</b>	<b>Fraktion 6</b>
<b>1</b>	20 nm	40 %	43 %	17 %			
<b>0,75</b>	20 nm	15 %	26 %	27 %	27 %	5 %	-
<b>0,5</b>	20 nm	15 %	19 %	17 %	23 %	23 %	2,5 %
<b>1</b>	60 nm	85 %	15 %	-	-	-	-
<b>0,75</b>	60 nm	55,8 %	37 %	7 %	-	-	-
<b>0,5</b>	60 nm	36 %	36 %	25 %	3 %	-	-

Als letztes wird das Laufverhalten der 60 nm Ag-NP in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration untersucht. Aus Tabelle 22 kann man entnehmen, dass mit höherer Pufferkonzentration die Ag-NP sowohl langsamer im Gel wandern als auch durch die hohe Pufferkonzentration aggregieren und damit in der Geltasche zurückbleiben.

**Tabelle 22:** Laufverhalten der Ag-NP in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration in 0,5 Gew.-% Gel, bei 200 V.

<b>Pufferkonzentration</b>	<b>Ag-NP</b>	<b>Fraktion 1</b>	<b>Fraktion 2</b>	<b>Fraktion 3</b>
<b>1 × TAE</b>	60 nm	36 %	36 %	25 %
<b>2,5 × TAE</b>	60 nm	62 %	36 %	2 %
<b>5 × TAE</b>	60 nm	61 %	37 %	2 %

Die beste Trennung der Ag-NP wird bei 200 V in einem 0,5 Gew.-% Agarosegel und mit einem 1 × TAE-Puffer erreicht. Jedoch sind die Ergebnisse der Trennung nicht zufriedenstellend, da die Partikel beim Laufen einen Schmierfilm im Gel bilden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine elementanalytische Bestimmung der Edelmetall-NP im Agarosegel mit der ET-AAS möglich ist. Jedoch kann die Nachweisgrenze (NWG) der Gelelektrophorese durch Kopplung an die ET-AAS nur bis in den unteren mg/L Bereich verbessert werden. Das größte Problem stellt die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität der Au- und Ag-NP in Abhängigkeit von ihrer Konzentration dar. Höher konzentrierte NP-Suspensionen wandern schneller im Gel als weniger konzentrierte. Dadurch kann kein Marker höherer Konzentration zur Detektion der NP-Fraktionen verwendet werden. Ebenfalls scheint die Wiederfindung der verschiedenen NP-Größen in einem NP-Gemisch durch den Schmierfilm der Nanopartikel im Gel nicht möglich. Trotz zahlreicher Variationen unterschiedlicher Parameter konnte die NWG der Gelelektrophorese durch Kopplung an die ET-AAS nur geringfügig verbessert werden.

#### **7.4 Zusammenfassende Beschreibung der Größenseparation von Nanopartikeln mittels Gelelektrophorese**

Es wurde ein Verfahren zur Größentrennung von Nanopartikeln mittels Gelelektrophorese entwickelt. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Detektionsmethoden zur Verbesserung der Nachweisgrenze untersucht. Diese beruhen auf den Prinzipien der Fluoreszenzdetektion, Absorptionsverstärkung, bioanalytischen Techniken (durch Funktionalisierung der Edelmetall-NP mit dem Protein BSA) und der Kopplung an atomspektrometrische Methoden.

Ein Gemisch aus 25 und 41 nm Gold-NP mit der Konzentration 62 mg/L lässt sich durch Funktionalisierung mit dem Ligand MUA bei einer Spannung von 150 V in einem 1,0 Gew.-% Agarosegel mit einem 1 x TAE oder TBE-Puffer in 60 min trennen. Durch Funktionalisierung der NP mit Fluoreszenzliganden konnte die Nachweisgrenze der Gelelektrophorese nicht verbessert werden, da auch die Fluoreszenz der Liganden mit sehr hohen Quantenausbeuten (von nahezu eins) von den NP gelöscht wird. Durch die Fluoreszenzlöschung kann die Nanopartikelgröße nicht ermittelt werden, da diese von vielen anderen Faktoren wie Metallform, Metallart und Coating der Partikel abhängt. Je nach Fluoreszenzfarbstoff und Metallart zeigen die unterschiedlich großen NP ein anderes Löschverhalten, wobei mal kleinere NP stärker die Fluoreszenz löschen, mal größere.

Die Fluoreszenzlöschung kann allerdings zur Konzentrationsbestimmung monodisperser NP verwendet werden. Dabei kann die NP-Konzentration einer unbekannt monodispersen Probe bis in den ng/L-Bereich bestimmt werden. Deswegen könnte diese Methode bei der Produktkontrolle in der Nanopartikelherstellung Anwendung finden. Durch Ligandensubstitution von FITC mit MUA kann die Fluoreszenz eines FITC-NP-Gemisches zurückgewonnen werden, jedoch lässt sich diese Methode nicht auf das Agarosegel übertragen, da die NP entweder so fest im Gel verankert sind, dass kein Ligandenaustausch in diesem stattfindet oder das MSA nur schlecht bis gar nicht in das Gel hineindiffundiert.

Der Ligand N-719, der als Hochleistungsfarbstoff bekannt ist, eignet sich zur Größenbestimmung von Nanopartikeln mittels Gelelektrophorese, führt aber nicht wie angenommen zur Absorptionzunahme, sondern zu einer Absorptionsabnahme.

Durch Funktionalisierung mit dem Protein BSA lassen sich Edelmetall-NP mittels Gelelektrophorese gut trennen, jedoch kann man schwach absorbierende Edelmetall-NP, wie z.B. Pd nicht durch Anfärben des Proteins BSA mit Coomassie Brilliant Blau R250 detektieren. Durch den Farbstoff lässt sich nur das freie BSA, nicht jedoch das an der NP-Oberfläche gebundene BSA anfärben.

Entweder werden die Bindestellen des Proteins BSA von den Nanopartikeln so abgeschirmt, dass der Farbstoff nicht mit diesen reagieren kann oder die an den NP gebundene BSA-Konzentration liegt unter der Detektionsgrenze des Farbstoffs von 0,1 µg Protein pro Bande.

Durch die Kopplung der Gelelektrophorese an die ET-AAS kann die Nachweisgrenze der Gelelektrophorese bis in den unteren mg/L-Bereich gesenkt werden. Eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenze ist nicht möglich, da die NP abhängig von ihrer Konzentration ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen. NP kleinerer Konzentration wandern langsamer im Gel als NP höherer Konzentration. Außerdem bilden die NP bei der Wanderung im Gel Schlieren mit abnehmender NP-Konzentration.

Somit kann die Gelelektrophorese zur Größenbestimmung von Edelmetall-Nanopartikeln bis zu einer Konzentration von ca. 50 mg/L verwendet werden. Durch atomspektrische Kopplung können auch NP-Suspensionen im unteren mg/L-Bereich getrennt werden, jedoch ist eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenze der Gelelektrophorese durch die in dieser Arbeit untersuchten Detektionsmethoden nicht möglich.

## 8 Zusammenfassung

Die steigende Produktion von Konsumprodukten, die Edelmetall-NP enthalten und die potentielle Toxizität der NP erfordern ein flächendeckendes Umweltmonitoring. Da die Toxizität der Edelmetall-Nanopartikel von ihrer Größe, Konzentration und ihrem Coating maßgeblich beeinflusst wird, ist es wichtig, diese Faktoren sowie das Verhalten der Edelmetall-NP in der Umwelt zu untersuchen und zu bestimmen. Da zurzeit keine einfachen, routinefähigen und vor allem kostengünstigen Verfahren zur Größenbestimmung von Edelmetall-NP existieren, ist die Entwicklung eines solchen Verfahrens zwingend erforderlich.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Bildung von Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP im wässrigen Medium und damit die Abschätzung des Verhaltens dieser NP in der aquatischen Umwelt. Es sollte dabei auch die Frage geklärt werden, inwiefern die gemessene Ag-NP-Konzentration in Fluss- und Seewasser auf anthropogenen oder natürlich gebildeten Ag-NP beruht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung der Gelelektrophorese zur Größenbestimmung von Edelmetall-NP.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die natürliche Ag- und Ag<sub>2</sub>S-NP-Bildung untersucht. Dabei wurde auf die Adsorption dieser Partikel an die Gefäßwand der Reaktionsgefäße sowie auf die Ionenfreisetzung der aus NOM gebildeten und Citrat-stabilisierten Ag-NP eingegangen, um das Verhalten von Ag-NP in der Umwelt abzuschätzen.

Man konnte feststellen, dass die Ag-NP-Bildung im ng/L-Bereich ein dynamischer Prozess aus Ag-NP-Bildung, Ag-Ionenfreisetzung und Ag-NP-Regenerierung ist, wobei Partikel mit einer breiten Größenverteilung gebildet werden. Im Laufe der Zeit ändert sich die Größe dieser Partikel, indem sich einige Partikelgrößen auflösen und andere Partikelgrößen neu gebildet werden. Sobald Ag-Ionen in Kontakt mit Wasser kommen, wird ein Drittel dieser zu Ag-NP reduziert. Diese Bildung wird enorm verstärkt, wenn im Wasser ein natürliches Reduktionsmittel wie NR- oder SR-NOM vorhanden ist. Bereits bei 0,1 mg/L NOM in der Lösung reagieren 60 % der Ag-Ionen zu Ag-NP. Die Ag-Ionenfreisetzung findet dabei bevorzugt bei kleinen pH-Werten, hohen Temperaturen, längerer Zeiteinwirkung und in sauerstoffgesättigten Lösungen statt, wohingegen die Ag-NP-Bildung verstärkt bei hohen pH-Werten, niedrigen Temperaturen und Inkubationszeiten, bei Zugabe von NOM sowie in wässriger Lösung zu beobachten ist. Da

diese beiden Konkurrenzprozesse von den gleichen Größen bestimmt werden, kann man keine Linearität der Ag-NP-Bildung in Abhängigkeit von der Temperatur, der Zeit und der NOM-Konzentration erkennen.

Die Ag<sub>2</sub>S-NP-Bildung ist dagegen temperatur- und zeitabhängig. Aufgrund des niedrigen Löslichkeitsprodukts des Ag<sub>2</sub>S werden nahezu keine Ionen frei gesetzt und es resultiert eine lineare Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Ag<sub>2</sub>S-NP-Bildung durch NOM. Dies wird auch bei der Größenbestimmung von durch NOM gebildeten Ag<sub>2</sub>S-NP deutlich. Die NP werden mit einer viel schmaleren Größenverteilung als die Ag-NP gebildet, wobei sie mit zunehmender Temperatur und Zeit zu größeren NP heranreifen. Jedoch ist dieser zeit- und temperaturabhängige Unterschied bei der Größenverteilung der gebildeten Ag<sub>2</sub>S-NP minimal.

Die Zugabe von Salzen führt zu einer starken Adsorption der NP an die PP-Wand der Probengefäße, wobei Ag<sub>2</sub>S-NP stärker an die Gefäßwand adsorbieren als Ag-NP. Durch den Zusatz von NOM wird diese Adsorption an die Gefäßwand weiter verstärkt. Außerdem konnte beobachtet werden, dass Citrat-stabilisierte Ag-NP weniger Ionen freisetzen als die durch die NOM-Reduktion erhaltenen Ag-NP. Gibt man jedoch 0,1 mg/L NOM zu den Citrat-stabilisierten NP hinzu, so werden diese doppelt stabilisiert und die Ionenfreisetzung kann vollständig unterbunden werden.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wird ein wichtiger Beitrag zur Ermittlung des Verhaltens von Nanopartikel in der Umwelt sowie zur Risikoabschätzung geleistet. Man kann davon ausgehen, dass natürliche und anthropogene Ag-NP in der aquatischen Umwelt durch den Schwefelgehalt im Grund-, Fluss- und Seewasser zu Ag<sub>2</sub>S-NP reagieren. Durch das niedrige Löslichkeitsprodukt dieser Partikel werden sie nicht weiter transformiert, sondern in die Biomasse eingelagert und landen letztendlich in den Sedimenten. Aus diesem Grund wird trotz des hohen Gehaltes an natürlich gebildeten Nanopartikeln nur ein geringer NP-Gehalt im unteren ng/L-Bereich an Ag-NP in natürlichen Gewässern, wie z.B. in der Isar-Loisach Einmündung, zwischen Wolfratshausen und Icking gefunden.<sup>114</sup> Aufgrund der ziemlich niedrigen Toxizität von Ag<sub>2</sub>S-NP im Vergleich zu Ag-NP und ihrer niedrigen Konzentrationen im Fluss- und Seewasser stellen Ag-NP wahrscheinlich keine Gefahr für die Umwelt und den Menschen dar.



Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Verfahren zur Größenbestimmung von Edelmetall-NP mittels Gelelektrophorese entwickelt und zur Verbesserung ihrer Nachweisgrenze wurden verschiedene Detektionsmethoden untersucht. Durch Optimierung dieses Verfahrens konnte ein Gold-NP-Gemisch aus 25 und 41 nm Gold-NP mit der Konzentration 62 mg/L durch Funktionalisierung mit dem Ligand MUA bei einer Spannung von 150 V in einem 1,0 Gew.-% Agarosegel mit einem 1 x TAE oder TBE-Puffer in 60 min getrennt werden. Durch die Kopplung der Gelelektrophorese an die ET-AAS konnte deren Nachweisgrenze um den Faktor 5 verbessert werden. Die Größenbestimmung von Nanopartikeln mittels Gelelektrophorese wurde anhand von vielen (nicht aus der Literatur bekannten) Liganden untersucht, wie mit den selbst synthetisierten Fluoreszenzliganden (FL-1, FL-2, FL-3, FL-4 und FL-6), N-719, FITC und mit dem Protein BSA. Diese Liganden haben sich bei der Größenbestimmung bewährt, führten jedoch nicht zu einer Verbesserung der Nachweisgrenze. Die Funktionalisierung der NP mit Fluoreszenzliganden (auch mit sehr hohen Quantenausbeuten) führte zu einer Fluoreszenzlöschung des Fluorophors, welche von der Metallform, Metallart, dem Coating und der Größe der Partikel abhängig ist. Durch die Fluoreszenzlöschung von FITC konnte die Konzentration einer unbekannt monodispersen NP-Suspension bis in den ng/L-Bereich bestimmt werden. Die Ligandensubstitution von FITC mit MUA führte zu einer Fluoreszenzerhöhung des FITC-NP-Gemisches, jedoch konnte diese Rückgewinnung im Agarosegel nicht beobachtet werden. Somit kann die Gelelektrophorese zur Größenbestimmung von Edelmetall-Nanopartikeln bis zu einer Konzentration von ca. 10 mg/L verwendet werden. Eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenze der Gelelektrophorese ist durch die in dieser Arbeit untersuchten Detektionsmethoden nicht möglich.

Zwar kann die hier vorgestellte Methode mit ihrer Nachweisgrenze im mg/L-Bereich die teuren und aufwendigen Größenfraktionierungstechniken für Umweltproben nicht ersetzen, jedoch kann sie zur Produktkontrolle in der Nanopartikelproduktion als Routinetechnik verwendet werden. Auch die Fluoreszenzlöschung kann bei der Produktionskontrolle von monodispersen NP-Suspensionen als schnelle und einfache Methode zur Konzentrationsbestimmung dieser herangezogen werden. Somit können die hier vorgestellten Methoden in Zukunft einen wichtigen Beitrag zu der Produktkontroll-Analytik leisten.

## 9 Anhang

### 9.1 Statistische Grundlagen

Die in dieser Arbeit aufgeführten statistischen Grundlagen beruhen auf *K. Doerffel, J.C. Miller und H. Günzler et.al.*<sup>110, 111,112,113,</sup>

#### 9.1.1 Mittelwert und Standardabweichung

Liegen von einer Stichprobe  $n$  Einzelmesswerte  $x_1, x_2 \dots x_n$  (allgemein mit  $x_i$  bezeichnet) vor, so kann man das arithmetische Mittel  $\bar{x}$ , auch Mittelwert genannt der einzelnen Messwerte nach der Formel 11 berechnen. Dabei ist  $n$  die Anzahl der Messwerte.<sup>110</sup>

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

**Formel 11:** Mittelwert

Die Standardabweichung  $s$  gibt an wie stark die Einzelwerte um den Mittelwert streuen. Sie wird nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

**Formel 12:** Standardabweichung

#### 9.1.2 Ermittlung der Verfahrenskenndaten aus der Kalibrierfunktion

Bei der Durchführung einer Kalibrierung erhält man  $N$  Wertepaare  $(x_i, y_i)$ . Dabei ist einem Konzentrationswert  $x_i$  ein Messwert  $y_i$  zugeordnet.  $N$  entspricht dabei der Gesamtzahl aller Messungen für die Kalibriergerade. Trägt man diese Wertepaare graphisch auf so erhält man nach linearer Regression die Steigung  $b$  nach Formel 13 und den Achsenabschnitt  $a$  nach Formel 14, mit  $x_i = i$ -ter Konzentrationswert der Kalibriergeraden und  $y_i = i$ -ter Einzelmesswert der Kalibriergeraden.

$$b = \frac{N \sum_{i=1}^N (x_i y_i) - \sum_{i=1}^N x_i \sum_{i=1}^N y_i}{N \sum_{i=1}^N x_i^2 - (\sum_{i=1}^N x_i)^2}$$

**Formel 13:** Steigung der Kalibriergeraden

$$a = \frac{\sum_{i=1}^N y_i - b \sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

**Formel 14:** Achsenabschnitt der Kalibriergeraden

Die Genauigkeit der Kalibrierung wird durch die Reststandardabweichung  $s_y$  nach Formel 15 berechnet, die ein Maß für die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade darstellt.

$$s_y = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

**Formel 15:** Reststandardabweichung der Kalibriergeraden

Dabei ist  $\hat{y}_i$  der aus der Regressionsgeraden berechnete i-te Messwert. Aus  $s_y$  kann die Verfahrensstandardabweichung  $s_{x0}$  nach Formel 16 berechnet werden.

$$s_{x0} = \frac{s_y}{b}$$

**Formel 16:** Verfahrensstandardabweichung

Die Unsicherheit einer Kalibrierfunktion wird als Vertrauensbereich bezeichnet und ergibt sich nach Formel 17.

$$VB = \sqrt{2 F(P; f_1; f_2)} \cdot s_y \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

**Formel 17:** Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion

Dabei ist  $F(P; f_1; f_2)$  der Tabellenwert des F-Tests der t-Verteilung mit der statistischen Sicherheit  $P$ ,  $f_1 = 2$  und  $f_2 = N-2$ .

Das Prognoseintervall PI gibt die Unsicherheit einer zukünftigen unbekanntem Probe an, dabei fließen die geforderte statistische Sicherheit P(95 %) und die Anzahl der Wiederholungsmessungen in das Quantil der t-Verteilung mit ein, siehe Formel 18.

$$PI(x) = \pm t_{P,N-2} \frac{s_y}{b} \sqrt{\frac{1}{N_p} + \frac{1}{N} + \frac{(y_{N_p} - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

**Formel 18:** Prognoseintervall der Kalibrierfunktion

Mit t dem Quantil der t-Verteilung,  $N_p$  der Anzahl der Mehrfachmessungen einer zukünftigen Probe,  $y_{N_p}$  dem Mittelwert aus den Einzelmessungen einer Probe,  $\bar{y}$  dem Mittelwert der Einzelmesswerte  $y_i$  und  $\bar{x}$  dem Mittelwert der Konzentrationswerte des Kalibrierexperiments.

Eine Angabe über die kleinstmögliche, mit statistischer Sicherheit noch messbare Konzentration liefert die Nachweisgrenze (NWG). Für diese gilt nach der Formel 19:

$$NWG = 2 \cdot t_{P,N-2} \cdot \frac{s_y}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N_p} + \frac{1}{N} + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

**Formel 19:** Nachweisgrenze der zugrunde liegenden Methode

$y_c$  stellt dabei einen Hilfwert zur Berechnung der Nachweisgrenze dar, der nach Formel 20 berechnet wird.

$$y_c = a + t_{P,N-2} \cdot s_y \sqrt{\frac{1}{N_p} + \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

**Formel 20:** Hilfwert zur Berechnung der Nachweisgrenze

## 9.2 Verwendete Geräte und Materialien

### 9.2.1 Verwendete Geräte

Atomabsorptionsspektrometer *4100ZL* mit transversal beheiztem Graphitrohrföfen *THGA* und Autosampler *AS 71* (PerkinElmer Bodenseewerk, Überlingen)

Atomabsorptionsspektrometer *AAnalyst 800* mit transversal beheiztem Graphitrohrföfen *THGA 800* und Autosampler *AS 800* (PerkinElmer Bodenseewerk, Überlingen)

Beheiztes Wasserbad *Ecoline RE 306* (LAUDA, Lauda-Königshofen)

Beheiztes Wasserbad *W 600* (Mettler, Schwabach)

Feinwaagen *BP 310S* und *BL 150S* (Sartorius, Göttingen)

Fluorimeter *LS50B* (Perkin Elmer, Waltham, USA)

Heizrührer *Ikamag RCT* (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)

Heizschrank *U 40* (Mettler, Schwabach)

Hohlkathodenlampen *Typ P921C* (Gold), *P951C* (Silber) und *P939* (Palladium) (Photon, Narre Warren, Australien)

ICP-MS *7700x* und Autosampler *ASX-520* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Kühlschrank *SANTO* (AEG, Nürnberg)

Laminar Flow-Box *LFB-457 MP610E* (Max Petek, Radolfzell)

Partikelfreie Lagerbox *5000NV* (Captair, Düsseldorf)

pH-Meter *CG818* (Schott Geräte, Hofheim a. Ts.)

Pipette 10 mL (Thermo SCIENTIFIC, Waltham)

Pipette 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg)

Pipette 10-100  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg)

Pipette 5 mL (VWR, Darmstadt)

Quarzglas Ausdämpfapparatur (H. Kürner Analysetechnik, Rosenheim)

Reinstwasseranlagen *Direct-Q UV3* (Millipore, Billerica, USA)

Rotationsverdampfer Rotavapor RE 111 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Schweiz)

Schütteltisch *VF2* (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)

TOC-Analysator *TOC-L* (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Ultraschallbad *Branson 1200* (Branson Ultrasoni, Danbury, USA)

UV/Vis Spektrophotometer *Lambda 35* (PerkinElmer, Shelton, USA)

Vertex *VF2* (Janke & Kunkel, Staufen)

Zentrifuge *Biofuge 15* (Heraeus Sepatech, Hanau)

Zentrifuge Z 206 A (Hermle Labortechnik, Wehingen)

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien)

### 9.2.2 Verwendete Verbrauchsmittel

AAS Probengefäße, 1,2 mL, aus Polypropylen (PerkinElmer Singapore Ltd., Singapur)

Dialysemembran-Schlauch ZelluTrans, nominaler MWCO: 3.500 Da, aus recycelter Cellulose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Maßkolben, 2, 5, 10, 25 mL aus Duran®-Glas (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt)

Mikroreaktionsgefäße, 1,5 mL, mit Schnappdeckel, aus Polypropylen (VWR International GmbH, Art.Nr.: 7805-00)

UV/Vis Einmalküvetten, halbmikro, aus Poly(methylmethacrylat), (VWR International GmbH, Darmstadt, Art.Nr. 634-0678)

Zentrifugenröhrchen, 50 mL, mit Schraubdeckel, aus Polypropylen (VWR, Darmstadt)

### 9.2.3 Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
11-Mercapto-undecansäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
16-Mercapto-hexadecansäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
1-Aminopyren	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
2-Aminobenzoessäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
2-Aminomethan-1-thiol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
7-Amino-4-methyl-3-coumarinyl-essigsäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
7-Mercapto-4-methylcumarin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Aceton	Merk, Darmstadt
Agarose	Amresco, Solon, USA
Ag-NP, 20 nm und 60 nm	BBI Solutions, Cardiff, UK
Ammoniak	Merk, Darmstadt
Au-NP, 2, 20, 40, 80 und 150 nm	BBI Solutions, Cardiff, UK
Au-NP, 30 nm	Postnova, Landsberg am Lech
Borsäure	Merk, Darmstadt

Calciumsulfat	Merk, Darmstadt
Chloroform	Merk, Darmstadt
Coomassie Brillant Blau R250, G250	AppliChem, Darmstadt
Cyclopentanon	Merk, Darmstadt
Deuteriochloroform	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Dichlormethan	Merk, Darmstadt
Diisopropylamin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Dimethyl sulfoxide-d6	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Dimethylformamid	Merk, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merk, Darmstadt
Di-tetrabutylammonium cis-bis(isothio- cyanato)bis(2,2'-bipyridyl-4,4'-dicar- boxylato)ruthenium(II) N-719	Solaronix, Aubonne, Schweiz
Essigsäure	Merk, Darmstadt
Ethanol	Merk, Darmstadt
Ethylacetat	Merk, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Merk, Darmstadt
Fluoresceinisothiocyanat, FITC	Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Gold-Standardlösung	Merk, Darmstadt
Hexan	Merk, Darmstadt
Imidazol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Isopropanol	Merk, Darmstadt
Kalilauge, Plätzchen	Merk, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merk, Darmstadt
Mercaptobernsteinsäure	Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merk, Darmstadt
Natriumacetat	Merk, Darmstadt
Natriumborhydrid	Merk, Darmstadt
Natriumchlorid	Merk, Darmstadt
Natriumcitrat	Merk, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merk, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merk, Darmstadt
Natriumhydroxid, Plätzchen	AppliChem GmbH, Darmstadt

Natrium-Naphthionat	Merk, Darmstadt
Natriumsulfat	Merk, Darmstadt
Natriumsulfid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Natronlauge	Merk, Darmstadt
NOM Referenzmaterial, 1R101 N	International Humic Substance Society, St. Paul, USA
NOM Referenzmaterial, 1R108 N	International Humic Substance Society, St. Paul, USA
NOM Referenzmaterial, 2R101 N	International Humic Substance Society, St. Paul, USA
Oxalylchlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Palladium-Standardlösung	Merk, Darmstadt
Perylen-3,4,9,10-tetracarbonsäuredianhydrid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
pH-Meter Kalibrierlösungen pH=4, pH=7	Merk, Darmstadt
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Rinderalbumin, BSA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salpetersäure	Merk, Darmstadt
Salzsäure	Merk, Darmstadt
Silber-Standardlösung	Merk, Darmstadt
tert-Butanol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Tetrachloridogoldsäure	Merk, Darmstadt
Toluol	Merk, Darmstadt
Triethylamin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Triethylsilan	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Trifluoressigsäure	Merk, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-amminomethan	VWR, Darmstadt
Triethylchlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Triton X-114	AppliChem, Darmstadt
Zitronensäure	Merk, Darmstadt



#### **9.2.4 Verwendete Software**

AA WinLab 32 für Windows, Version 6.5 (PerkinElmer, Waltham, USA)

ChemDraw für Windows (PerkinElmer, Waltham, USA)

FLDM für Windows (PerkinElmer, Waltham, USA)

MS Office 2003 Paket für Windows (Microsoft Corp., Redmond, USA)

UV WinLab für Windows, Version 5.1.4 (PerkinElmer, Waltham, USA)

## Literaturverzeichnis

- (1) Yin, Y.; Yu, S.; Liu, J.; Jiang, G. *Environmental science & technology* **2014** (5), 2671–2679.
- (2) Yu, S.-j.; Yin, Y.-g.; Liu, J.-f. *Environ. Sci.: Processes Impacts* **2012** (1), 78.
- (3) Kim, K.-J.; Sung, W. S.; Suh, B. K.; Moon, S.-K.; Choi, J.-S.; Kim, J. G.; Lee, D. G. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **2009** (2), 235–242.
- (4) Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. *Journal of colloid and interface science* **2004** (1), 177–182.
- (5) Liu, J.; Sonshine, D. A.; Shervani, S.; Hurt, R. H. *ACS nano* **2010** (11), 6903–6913.
- (6) Khan, A. K.; Rashid, R.; Murtaza, G.; Zahra, A. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **2014** (7), 1169–1177.
- (7) Online Browsing Platform (OBP). *ISO/TS 27687:2008 "Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate"*, <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:44278:en>.
- (8) Gaffet, E. *Comptes Rendus Physique* **2011**.
- (9) BSI Standards. *BSI Standards Publication PAS 71:2011* **31 August 2011**.
- (10) Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chemical reviews* **2004** (1), 293–346.
- (11) Horikoshi, S.; Serpone, N., Introduction to Nanoparticles. In *Microwaves in Nanoparticle Synthesis*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.
- (12) Reidy, B.; Haase, A.; Luch, A.; Dawson, K.; Lynch, I. *Materials* **2013** (6), 2295–2350.
- (13) Conde, J.; Dias, J. T.; Grazú, V.; Moros, M.; Baptista, P. V.; de la Fuente, Jesus M. *Frontiers in chemistry* **2014**, 48.
- (14) Akhtar, M. S.; Panwar, J.; Yun, Y.-S. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2013** (6), 591–602.

- (15) Umweltbundesamt. *Liste der Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren gemäß § 11 Trinkwasserverordnung 2001*.
- (16) Zhang, T.; Wang, L.; Chen, Q.; Chen, C. *Yonsei medical journal* **2014** (2), 283–291.
- (17) Lankveld, D P K; Oomen, A. G.; Krystek, P.; Neigh, A.; Troost-de Jong, A.; Noorlander, C. W.; Van Eijkeren, J C H; Geertsma, R. E.; De Jong, W H. *Biomaterials* **2010** (32), 8350–8361.
- (18) Levard, C.; Hotze, E. M.; Lowry, G. V.; Brown, G. E. *Environmental science & technology* **2012** (13), 6900–6914.
- (19) Lee, K. J.; Browning, L. M.; Nallathamby, P. D.; Desai, T.; Cherukuri, P. K.; Xu, X.-H. N. *Chemical research in toxicology* **2012** (5), 1029–1046.
- (20) Römer, I.; White, T. A.; Baalousha, M.; Chipman, K.; Viant, M. R.; Lead, J. R. *Journal of chromatography. A* **2011** (27), 4226–4233.
- (21) Suresh, A. K.; Pelletier, D. A.; Wang, W.; Morrell-Falvey, J. L.; Gu, B.; Doktycz, M. J. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **2012** (5), 2727–2735.
- (22) Kawata, K.; Osawa, M.; Okabe, S. *Environmental science & technology* **2009** (15), 6046–6051.
- (23) Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.; Odzak, N.; Sigg, L.; Behra, R. *Environmental science & technology* **2008** (23), 8959–8964.
- (24) Foldbjerg, R.; Dang, D. A.; Autrup, H. *Archives of toxicology* **2011** (7), 743–750.
- (25) Yin, L.; Cheng, Y.; Espinasse, B.; Colman, B. P.; Auffan, M.; Wiesner, M.; Rose, J.; Liu, J.; Bernhardt, E. S. *Environmental science & technology* **2011** (6), 2360–2367.
- (26) Yang, X.; Gondikas, A. P.; Marinakos, S. M.; Auffan, M.; Liu, J.; Hsu-Kim, H.; Meyer, J. N. *Environmental science & technology* **2012** (2), 1119–1127.
- (27) Bouwmeester, H.; Poortman, J.; Peters, R. J.; Wijma, E.; Kramer, E.; Makama, S.; Puspitaningandita, K.; Marvin, Hans J P; Peijnenburg, Ad A C M; Hendriksen, Peter J M. *ACS nano* **2011** (5), 4091–4103.

- (28) Xiu, Z.-M.; Ma, J.; Alvarez, Pedro J J. *Environmental science & technology* **2011** (20), 9003–9008.
- (29) Levard, C.; Reinsch, B. C.; Michel, F. M.; Oumahi, C.; Lowry, G. V.; Brown, G. E. *Environmental science & technology* **2011** (12), 5260–5266.
- (30) Jing-Fu Liu **2015**.
- (31) Adegboyega, N. F.; Sharma, V. K.; Siskova, K.; Zbořil, R.; Sohn, M.; Schultz, B. J.; Banerjee, S. *Environmental science & technology* **2013** (2), 757–764.
- (32) Mitrano, D. M.; Rimmelé, E.; Wichser, A.; Erni, R.; Height, M.; Nowack, B. *ACS nano* **2014** (7), 7208–7219.
- (33) Cleveland, D.; Long, S. E.; Pennington, P. L.; Cooper, E.; Fulton, M. H.; Scott, G. I.; Brewer, T.; Davis, J.; Petersen, E. J.; Wood, L. *The Science of the total environment* **2012**, 267–272.
- (34) Sillanpää, M. *Natural Organic Matter in Water*; Elsevier Science: Burlington, 2014.
- (35) Leenheer, J. A.; Croué, J.-P. *Environ. Sci. Technol.* **2003** (1), 18A.
- (36) Aiken, G. R.; Hsu-Kim, H.; Ryan, J. N. *Environmental science & technology* **2011** (8), 3196–3201.
- (37) Akaighe, N.; Maccuspie, R. I.; Navarro, D. A.; Aga, D. S.; Banerjee, S.; Sohn, M.; Sharma, V. K. *Environmental science & technology* **2011** (9), 3895–3901.
- (38) Akaighe, N.; Depner, S. W.; Banerjee, S.; Sharma, V. K.; Sohn, M. *Science of The Total Environment* **2012** (0), 277–289.
- (39) Akaighe, N.; Depner, S. W.; Banerjee, S.; Sohn, M. *Chemosphere* **2013** (4), 406–412.
- (40) Yin, Y.; Liu, J.; Jiang, G. *ACS nano* **2012** (9), 7910–7919.
- (41) Hou, W.-C.; Stuart, B.; Howes, R.; Zepp, R. G. *Environmental science & technology* **2013** (14), 7713–7721.
- (42) Glover, R. D.; Miller, J. M.; Hutchison, J. E. *ACS nano* **2011** (11), 8950–8957.
- (43) Cai, W.; Zhong, H.; Zhang, L. *J. Appl. Phys.* **1998** (3), 1705.
- (44) Liu, J.; Hurt, R. H. *Environmental science & technology* **2010** (6), 2169–2175.

- (45) Elechiguerra, J. L.; Larios-Lopez, L.; Liu, C.; Garcia-Gutierrez, D.; Camacho-Bragado, A.; Yacaman, M. J. *Chem. Mater.* **2005** (24), 6042–6052.
- (46) McMahon, M. D.; Lopez, R.; Meyer, H. M.; Feldman, L. C.; Haglund, R. F. *Appl. Phys. B* **2005** (7), 915–921.
- (47) Kim, B.; Park, C.-S.; Murayama, M.; Hochella, M. F. *Environmental science & technology* **2010** (19), 7509–7514.
- (48) Kaegi, R.; Voegelin, A.; Sinnet, B.; Zuleeg, S.; Hagendorfer, H.; Burkhardt, M.; Siegrist, H. *Environmental science & technology* **2011** (9), 3902–3908.
- (49) Liu, J.; Pennell, K. G.; Hurt, R. H. *Environmental science & technology* **2011** (17), 7345–7353.
- (50) Reinsch, B. C.; Levard, C.; Li, Z.; Ma, R.; Wise, A.; Gregory, K. B.; Brown, G. E.; Lowry, G. V. *Environmental science & technology* **2012** (13), 6992–7000.
- (51) Tiede, K.; Boxall, Alistair B A; Tear, S. P.; Lewis, J.; David, H.; Hasselov, M. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* **2008** (7), 795–821.
- (52) López-Serrano, A.; Olivas, R. M.; Landaluze, J. S.; Cámara, C. *Anal. Methods* **2014** (1), 38–56.
- (53) Dr. Thorsten Klein, Evelin Moldenhauer, Postnova Analytics GmbH.
- (54) Podzimek, S. *Light scattering, size exclusion chromatography, and asymmetric flow field flow fractionation*; Wiley: Hoboken, N.J., 2011.
- (55) Liu, F.-K.; Ko, F.-H.; Huang, P.-W.; Wu, C.-H.; Chu, T.-C. *Journal of Chromatography A* **2005** (1), 139–145.
- (56) Proulx, K.; Wilkinson, K. J. *Environ. Chem.* **2014** (4), 392.
- (57) Lewis, D. J. *The Analyst* **2015** (5), 1624–1628.
- (58) Hanauer, M.; Pierrat, S.; Zins, I.; Lotz, A.; Sönnichsen, C. *Nano letters* **2007** (9), 2881–2885.
- (59) Xu, X.; Caswell, K. K.; Tucker, E.; Kabisatpathy, S.; Brodhacker, K. L.; Scrivens, W. A. *Journal of chromatography. A* **2007** (1), 35–41.
- (60) Helfrich, A.; Brüchert, W.; Bettmer, J. *J. Anal. At. Spectrom.* **2006** (4), 431.

- (61) Surugau, N.; Urban, P. L. *Journal of separation science* **2009** (11), 1889–1906.
- (62) Lin, K.-H.; Chu, T.-C.; Liu, F.-K. *Journal of chromatography. A* **2007** (1-2), 314–321.
- (63) Degueldre, C.; Favarger, P.-Y. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003** (1-3), 137–142.
- (64) Mitrano, D. M.; Leshner, E. K.; Bednar, A.; Monserud, J.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* **2012** (1), 115–121.
- (65) Laborda, F.; Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J. *Analytical chemistry* **2014** (5), 2270–2278.
- (66) Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; Holler, F. J. *Instrumentelle Analytik*, 6th edition; Springer: Berlin [u.a.], 2013.
- (67) Cammann, K., Ed. *Instrumentelle Analytische Chemie*, 1st edition; Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg, 2010.
- (68) *Instrumentelle Analytik*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1996.
- (69) Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2003** (7), 470–485.
- (70) Liu, J.-f.; Liu, R.; Yin, Y.-g.; Jiang, G.-b. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2009** (12), 1514–1516.
- (71) Hartmann, G.; Schuster, M. *Analytica chimica acta* **2013**, 27–33.
- (72) Hartmann, G.; Hutterer, C.; Schuster, M. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013** (4), 567.
- (73) Hartmann, G.; Baumgartner, T.; Schuster, M. *Analytical chemistry* **2014** (1), 790–796.
- (74) Dörfler, H.-D. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*; Springer: Berlin [u.a.], 2002.
- (75) Wagner, G. *Waschmittel - Chemie, Umwelt, Nachhaltigkeit*; Wiley, 2011.
- (76) Liu, J.-f.; Chao, J.-b.; Liu, R.; Tan, Z.-q.; Yin, Y.-g.; Wu, Y.; Jiang, G.-b. *Analytical chemistry* **2009** (15), 6496–6502.
- (77) Welz, B.; Sperling, M. *Atomabsorptionsspektrometrie*, 4th edn.; Wiley-VCH: Weinheim, 1997.

- (78) Renz, H. *Praktische Labordiagnostik*; De Gruyter: Berlin, New York, 2009.
- (79) Dean, J. R.; Ando, D. J.; Metcalfe, E. *Atomic absorption and plasma spectroscopy*, 2nd edn.; Published on behalf of ACOL (University of Greenwich) by J. Wiley: Chichester, New York, 1997.
- (80) Harris, D. C.; Werner, G.; Werner, T. *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*, 8th edn.; Imprint: Springer Spektrum: Berlin, Heidelberg, 2014.
- (81) Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH. *4100 ZL Atomabsorptions-Spektrometer*, 1992.
- (82) Falbe, J.; Regitz, M. *Römpf Lexikon Chemie*, 10th edn.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1996-1999.
- (83) Shimadzu. *Total Organic Carbon Analyzer TOC-L*, 2012.
- (84) A., H.; Santos, J. A.; Z., R.; Matencio, T., Ceramic Materials for Solid Oxide Fuel Cells. In *Advances in Ceramics - Synthesis and Characterization, Processing and Specific Applications*; Sikalidis, Costas, Ed.; InTech, 2011.
- (85) Malvern Instruments Ltd. *Zetasizer Nano series*, 2013.
- (86) Marcos M. Alvarez. *J. Phys. Chem. B* **1997** (101), 3706–3712.
- (87) D. B. Pedersen. *Defence Research and Development Canada* **2005**.
- (88) Amendola, V.; Meneghetti, M. *J. Phys. Chem. C* **2009** (11), 4277–4285.
- (89) Ghosh, S. K.; Pal, T. *Physical chemistry chemical physics: PCCP* **2009** (20), 3831–3844.
- (90) Kyung A Kang. *Journal of Nanobiotechnology* **2011** (9), Artikel Nr. 16.
- (91) Dulkeith, E.; Ringler, M.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Muñoz Javier, A.; Parak, W. *J. Nano letters* **2005** (4), 585–589.
- (92) Dulkeith, E. *Dissertation: Optische Charakterisierung von Hybridsystemen aus Gold Nanopartikeln und Farbstoffmolekülen* **2004**.
- (93) Haiss, W.; Thanh, Nguyen T K; Aveyard, J.; Fernig, D. G. *Analytical chemistry* **2007** (11), 4215–4221.
- (94) G. Frens. *Nature-Phys Sci* **1973** (241), 20–22.

- (95) Dose, C.; Seitz, O. *Organic & biomolecular chemistry* **2004** (1), 59–65.
- (96) Cheng, Y.-H.; Chen, W.-P.; Zheng, C.; Qu, W.; Wu, H.; Shen, Z.; Liang, D.; Fan, X.-H.; Zhu, M.-F.; Zhou, Q.-F. *Macromolecules* **2011** (10), 3973–3980.
- (97) Gustavson, L. M.; Jones, D. S.; Nelson, J. S.; Srinivasan, A. *Synthetic Communications* **1991** (2), 249–263.
- (98) Kupihár, Z.; Schmél, Z.; Kovács, L. *Molecules* **2000** (12), M144.
- (99) Kozikowski, A. P.; Chen, Y.; Gaysin, A.; Chen, B.; D'Annibale, M. A.; Suto, C. M.; Langley, B. C. *Journal of medicinal chemistry* **2007** (13), 3054–3061.
- (100) Sharrett, Z.; Gamsey, S.; Hirayama, L.; Vilozny, B.; Suri, J. T.; Wessling, R. A.; Singaram, B. *Organic & biomolecular chemistry* **2009** (7), 1461–1470.
- (101) Hormozi-Nezhad, M. R.; Bagheri, H.; Bohloul, A.; Taheri, N.; Robotjazi, H. *Journal of Luminescence* **2013**, 874–879.
- (102) Zedler, L.; Theil, F.; Csáki, A.; Fritzsche, W.; Rau, S.; Schmitt, M.; Popp, J.; Dietzek, B. *RSC Adv.* **2012** (10), 4463.
- (103) El Badawy, Amro M; Luxton, T. P.; Silva, R. G.; Scheckel, K. G.; Suidan, M. T.; Tolaymat, T. M. *Environmental science & technology* **2010** (4), 1260–1266.
- (104) Zhang, W. *Advances in experimental medicine and biology* **2014**, 19–43.
- (105) Struempfer, A. W. *Analytical chemistry* **1973** (13), 2251–2254.
- (106) Yin, Y.; Shen, M.; Zhou, X.; Yu, S.; Chao, J.; Liu, J.; Jiang, G. *Environmental science & technology* **2014** (16), 9366–9373.
- (107) Kohl, C.; Weil, T.; Qu, J.; Müllen, K. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2004** (21), 5297–5310.
- (108) Huang, C.-C.; Chang, H.-T. *Analytical chemistry* **2006** (24), 8332–8338.
- (109) Chen, Y.-M.; Cheng, T.-L.; Tseng, W.-L. *The Analyst* **2009** (10), 2106–2112.
- (110) Doerffel, K. *Statistik in der analytischen Chemie*, 5th edn.; Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie: Leipzig, 1990.
- (111) Miller, J. C.; Miller, J. N. *Statistics for analytical chemistry*, 3rd edition; Ellis Horwood PTR Prentice Hall: New York, 1993.



- (112) Günzler, H. *Statistische Methoden*; Springer: Berlin [u.a.], 1996.
- (113) Günzler, H. *Akkreditierung und Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*; Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 1994.
- (114) Bayerisches Landesamt für Umwelt, M.Maier. *Umweltrelevante Eigenschaften synthetischer Nanopartikel Abschlussbericht, Januar 2013*.