



Fakultät für Chemie

Fachgebiet Analytische Chemie

**Entwicklung und Validierung eines Verfahrens zur
Quantifizierung von Edelmetall-Nanopartikeln in
Wasserproben**

Georg Hartmann

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K. Köhler

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schuster
2. Priv.-Doz. Dr. B. Helmreich
3. Univ.-Prof. Dr. A. V. Hirner (em.)

Universität Duisburg-Essen

Die Dissertation wurde am 07.01.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 24.02.2014 angenommen.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 2011 bis Januar 2014 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Michael Schuster in der Fachgruppe Analytische Chemie am Department Chemie der Technischen Universität München.

Mein größter Dank gilt dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Herrn Prof. Dr. M. Schuster. Er hat mir die Möglichkeit gegeben an diesem interessanten Thema zu arbeiten und war mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Danke besonders für das mir entgegengebrachte Vertrauen, welches mir erlaubte, jederzeit größte forschersische Freiheit genießen zu können.

Danksagung

Vielen Dank auch an alle netten Kollegen, allen voran Dr. Anja Zierhut, die mir als „alter Hase“ viele wertvolle Tipps geben konnte und mir auch nach meiner Ernennung zum Praktikumsorganisator immer zur Seite stand, sowie Holger Sievers, der nach fast 3 gemeinsamen Jahren mehr für mich ist als nur Labornachbar.

Vielen Dank liebe AK-Kollegen: Anna Kalinnik, Monika Stoiber, Vera Kregel, Viola Kirchner, Tanja Baumgartner, Lingxiangyu Li, Ben Greisen und Stephan Fromm, ihr habt immer dafür gesorgt, dass ich jeden Tag gerne die Reise nach Garching unternommen habe. Gleiches gilt für alle „Ulmer“ (Prof. Dr. Kerstin Leopold, Nadine Feichtmeier, Jessica Huber und Roland Schindl): leider seid ihr viel zu schnell umgezogen...

Vielen Dank auch an alle Menschen, die mir in irgendeiner Form bei meiner Arbeit geholfen haben: Mein Praktikant Alex, meine Bachelorette Christine; Richard, Annika und Dr. Mei Zhang-Pressé, die während des Praktikums eine riesengroße Hilfe waren, Simon Meyer (AK Köhler), der viele IR-Proben mit mir und für mich gemessen hat und Stefan Baueregger, der mich in die Messung der Oberflächenladung von Partikeln eingewiesen hat. Weiterhin danke ich Frau Dr. Marianne Hanzlik (AK Weinkauff) und Dr. Markus Döblinger (LMU), die mit unendlicher Geduld meine manchmal etwas abenteuerlichen TEM-Proben gemessen haben sowie Dr. Marina Maier (LfU), bei der ich AF⁴ und spICP-MS Versuche durchführen durfte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die mich während meiner langen Ausbildung immer unterstützten und nie an mir gezweifelt haben.

Der wichtigsten Person in meinem Leben, Alexandra Dieter, möchte ich dafür danken, dass sie immer für mich da ist, wenn ich sie brauche. Mit niemandem ist es schöner, sich in guten Zeiten gemeinsam zu freuen und einander in schlechten Zeiten gegenseitig den Rücken zu stärken!

Verzeichnis von Abkürzungen, Akronymen und mathematischen Formelzeichen

0	als Index: zum Zeitpunkt Null
°C	Grad Celsius
A	Extinktion (Einheit)
AA	Atomabsorption
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AES	Atomemissionsspektrometrie
AF ⁴	Feld-Fluss-Fraktionierung mit asymmetrischem Fluss (engl.: <i>asymmetric flow field flow fractionation</i>)
Ag-NPs	Silber-Nanopartikel
ATR	Abgeschwächte Totalreflektion (engl.: <i>attenuated total reflection</i>)
Au-NPs	Gold-Nanopartikel
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
c	Als Formelzeichen: Konzentration
c	als Präfix: centi- (10^{-2})
c(X)	Konzentration der Substanz X
c.m.c.	kritische mizellare Konzentration (engl.: <i>critical micellar concentration</i>)
CE	Kapillarelektrophorese
CPE	Cloud-Point Extraktion
d	Schichtdicke der Messzelle
d _{cut-off}	<i>cut-off</i> Durchmesser
Da	Dalton
ΔS _m	Mizellbildungsentropie
E	Extinktion (Formelzeichen)
EC50	mittlere Effektkonzentration
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl.: <i>energy dispersive x-ray spectroscopy</i>)
EM-NPs	Edelmetall-Nanopartikel
engl.	englisch
ENPs	Künstlich hergestellte Nanopartikel (engl.: <i>engineered nanoparticles</i>)
ET-AAS	Elektrothermale Atomabsorptionsspektrometrie
<i>et al.</i>	und Mitautoren (lat.: <i>et alii</i>)
eV	Elektronenvolt
ε	Extinktionskoeffizient
F-AAS	Atomabsorptionsspektrometrie mit Flammenatomisator
FFF	Feld-Fluss-Fraktionierung
FT	Fourier-Transformation
g	Gramm
GE	Gelelektrophorese
Gew.-%	Gewichtsprozent
h	Stunde(n)

HC5	Konzentration, bei der 5 % aller Test-Organismen Schaden nehmen (engl.: <i>hazard concentration</i>)
HDC	Hydrodynamische Chromatographie
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Airfilter</i>
HKL	Hohlkathodenlampe
I	(Licht)Intensität
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl.: <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
IER	Ionenaustauscher (engl.: <i>ion exchange resin</i>)
IR	infrarot
ISO	Internationale Organisation für Normung (engl.: <i>International Organisation for Standardisation</i>)
k	als Formelzeichen: Konstante
k	als Präfix: kilo- (10^3)
L	Liter
LC50	mittlere lethale Konzentration
LLE	flüssig-flüssig Extraktion (engl.: <i>liquid-liquid extraction</i>)
LMU	Ludwig Maximilian Universität München
λ	Wellenlänge
m	als Einheit: Meter
m	als Präfix: milli- (10^{-3})
M	als Einheit: molar
M	als Formelzeichen: Molare Masse
m/v	Masse bezogen auf das Volumen
min	Minute(n)
MUA	11-Mercaptoundecansäure (eng.: <i>11-mercaptoundecanoic acid</i>)
μ	als Präfix: micro- (10^{-6})
n	als Präfix: nano- (10^{-9})
n	als Formelzeichen: Wiederholmessungen für eine Probe
N	Anzahl unabhängiger Proben
NOM	Natürliches organisches Material
NPs	Nanopartikel
NR	Nordic Reservoir
v	Frequenz
p	als Präfix: pico- (10^{-12})
PC	Arbeitsplatzrechner (engl.: <i>personal computer</i>)
Pd-NPs	Palladium-Nanopartikel
PEC	prognostizierte Umweltkonzentration (engl.: <i>predicted environmental concentration</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration (lat.: <i>pondus hydrogenii</i>)
pHPZC	Isoelektrischer Punkt (engl.: <i>point of zero charge pH</i>)
PNEC	prognostizierte Konzentration, bei der kein Effekt zu erwarten ist (engl.: <i>predicted no effect concentration</i>)
PSSD	probabilistische Spezies Sensitivitäts Verteilung (engl.: <i>probabilistic species sensitivity distribution</i>)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
π	linear polarisierte Komponente des Lichts

RQ	Risikoquotient
s	als Formelzeichen: Standardabweichung
s	als Einheit: Sekunde(n)
s.	siehe
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl.: <i>size exclusion chromatography</i>)
SPE	Festphasenextraktion (engl.: <i>solid phase extraction</i>)
spICP-MS	Einzelpartikel Massenspektrometrie (engl.: <i>single particle inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
SR	Suwannee River
$\sigma^{+/-}$	zirkular polarisierte Komponenten des Lichts
t	Zeitpunkt
T_c	Trübungspunkt (engl.: <i>cloud-point temperature</i>)
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
THGA	querbeheizter Graphitrohr-Atomisator (engl.: <i>transversally heated graphite atomizer</i>)
TOC	gesamter organisch gebundener Kohlenstoff (engl.: <i>total organic carbon</i>)
TRFA	Totalreflektions Röntgenfluoreszenzanalyse
TU	Technische Universität
TX-114	Triton X-114
U	Umdrehungen
UPW	Ultrareines Wasser (engl.: <i>ultra pure water</i>)
UV/Vis	sichtbarer und ultra-violetter Bereich
V_{x0}	Relative Verfahrensstandardabweichung
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: <i>World Health Organisation</i>)
WWTP	Klärwerk (engl.: <i>wastewater treatment plant</i>)
z.B.	zum Beispiel

Nomenklatur von Silber-Nanopartikeln:

Ag-only-NPs	Silbernanopartikel ohne zusätzliche Oberflächenfunktionalisierung
CA@Ag-NPs	citratstabilisierte Silber-Nanopartikel
PVP ₁₀ @Ag-NPs	PVP-funktionalisierte Silber-Nanopartikel (selbst hergestellt)
PVP _{SA} @Ag-NPs	PVP-funktionalisierte Silber-Nanopartikel (Sigma-Aldrich)
MUA@Ag-NPs	MUA-funktionalisierte Silber-Nanopartikel
MSA@Ag-NPs	Mercaptobernsteinsäure-funktionalisierte Silber-Nanopartikel
BSA@Ag-NPs	Rinderserumalbumin-funktionalisierte Silber-Nanopartikel
Lys@Ag-NPs	Lysin-funktionalisierte Silber-Nanopartikel
Cys@Ag-NPs	Cystein-funktionalisierte Silber-Nanopartikel
Starch@Ag-NPs	stärkebeschichtete Silber-Nanopartikel
AgCl@Ag-NPs	silberchloridbeschichtete Silber-Nanopartikel
Ag ₂ S@Ag-NPs	silbersulfidbeschichtete Silber-Nanopartikel
Ag ₃ PO ₄ -NPs	Silberphosphat-Nanopartikel

Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden die folgenden Publikationen, Vorträge und Poster:

Publikationen:

- (1) Georg Hartmann, Michael Schuster:
“Species Selective Preconcentration and Quantification of Gold Nanoparticles Using Cloud Point Extraction and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry”
Analytica Chimica Acta (2013) Volume 761, 27 – 33.

- (2) Georg Hartmann, Christine Hutterer, Michael Schuster:
“Ultra-trace Determination of Silver Nanoparticles in Water Samples Using Cloud Point Extraction and ETAAS”
Journal of Analytical Atomic Spectrometry (2013) Volume 28, 567 – 572.

- (3) Georg Hartmann, Tanja Baumgartner, Michael Schuster
„Influence of Particle Coating and Matrix Constituents on the Cloud Point Extraction Efficiency of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) and Application for Monitoring the Formation of Ag-NPs from Ag+“
Von der Zeitschrift Analytical Chemistry am 26. November 2013 zur Publikation angenommen. Doi: 10.1021/ac403289d

- (4) Lingxiangyu Li, Georg Hartmann, Markus Döblinger, Michael Schuster
„Quantification of Nanoscale Silver Particles Removal and Release from Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany”
Environmental Science & Technology (2013), Volume 47, 7317 – 7323.

Vorträge:

- (1) Georg Hartmann, Michael Schuster:
“Species Selective pre-Concentration and Quantification of Ag, Au and Pd Nanoparticles Using Cloud Point Extraction (CPE) and Graphite Furnace AAS”
Nanosafe 2012, Grenoble (Frankreich)
- (2) Georg Hartmann, Tanja Baumgartner, Michael Schuster:
„Cloud-Point Extraction as a Versatile Tool for Nanoparticle Separation, Pre-concentration, and Quantification: Application for Environmental Samples”
Nano-Environment 2013, Aix-en-Provence (Frankreich)

Poster:

- (1) Georg Hartmann, Michael Schuster:
„Entwicklung und Validierung eines Verfahrens zur Spuren-Bestimmung von Silber-Nanopartikeln in wässrigen Umweltproben“
ANAKON 2013, Essen

Kurzfassung

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren für die Anreicherung und Quantifizierung von Metall-Nanopartikeln, konkret für Gold (Au-NPs) und Silber (Ag-NPs), entwickelt. Momentan werden die Toxikologie und das Umweltverhalten von Nanopartikeln intensiv erforscht, doch ohne verlässliche Daten zur Exposition sind keine vernünftigen Aussagen über das Gefährdungspotential der Nanotechnologie für Mensch und Umwelt möglich. Für die Gewinnung dieser Daten jedoch existiert momentan noch keine vollständig validierte und routinetaugliche analytische Methode. Besondere Herausforderungen an die Analytik stellen die momentan sehr geringe Konzentration der Analyten in Realproben, die Unterscheidung zwischen Nanopartikeln und gelösten Ionen des gleichen Elements und die bei Realproben teils sehr komplexe Matrix dar.

Zur Anreicherung der Analyten wurde die Cloud-Point Extraktion (CPE) eingesetzt, die auf der temperaturinduzierten Phasentrennung in Tensid-in-Wasser-Gemischen beruht. Nach Optimierung der Extraktionsbedingungen und unter Verwendung geeigneter Komplexliganden war eine selektive Anreicherung von Au-NPs und Ag-NPs mit Anreicherungsfaktoren von etwa 80 möglich. Durch die Verwendung der Elektrothermalen Atomabsorptionsspektrometrie (ET-AAS) wurden Nachweisgrenzen von wenigen Nanogramm pro Liter erreicht. Gleichzeitig zeichnet sich die Methode durch eine hohe Matrixtoleranz aus, sowohl gegenüber organischen Störstoffen als auch gegenüber anorganischen Salzen und Kolloiden. Die Extraktionseffizienz wird von der Oberflächenchemie der Partikel nur in Ausnahmefällen beeinflusst. Dies ist besonders wichtig, da es in der Natur zu zahlreichen Umwandlungsprozessen der Analyten kommt, welche eine quantitative Erfassung zusätzlich erschweren können. Mittels Elektronenmikroskopie wurde außerdem gezeigt, dass es im Zuge der Extraktion zu keiner Änderung der Partikelgröße kommt. Damit steht einer Verwendung von CPE-Extrakten für andere Analysetechniken, welche von einer Anreicherung des Analyten zur Verbesserung des Nachweisvermögens profitieren könnten, nichts im Wege.

Ein wichtiger Beitrag zur Erforschung der Umweltexposition durch Nanopartikel wurde durch die Untersuchung der Stoffströme von Ag-NPs in neun süddeutschen Klärwerken geleistet. Dabei wurde mittels CPE und ET-AAS die Konzentration von Ag-NPs in unbehandeltem kommunalem Abwasser, sowie in komplett geklärtem Abwasser, welches vom Klärwerk in die aquatische Umwelt eingeleitet wird, bestimmt. Dabei zeigte sich, dass in allen Klärwerken X

über 95 % des im Zulauf enthaltenen nanopartikulären Silbers aus dem Wasser entfernt wird. Im Ablauf finden sich nur mehr Konzentrationen im unteren Nanogramm-pro-Liter Bereich, was um mehrere Größenordnungen unter den Konzentrationen liegt, bei denen negative Auswirkungen auf die Umwelt zu erwarten sind. Dies ist die erste bekannte Studie, welche die Eliminierung und Freisetzung realen Nano-Silbers in realen Klärwerken untersucht. Damit wurden Ergebnisse und Vorhersagen von Studien an Modell-Klärwerken im Labormaßstab bestätigt. Hier zeigt sich das große Potential der CPE als einfache, schnelle und robuste Methode zur Ermittlung eines Summenparameters.

Abstract

In the present work a method for the enrichment and quantification of metal nanoparticles (gold (Au-NPs) and silver (Ag-NPs)) has been developed.

At the moment the toxicology and environmental fate of nanoparticles are being investigated intensively. But without reliable exposure data no predictions for the potential negative effects of nanotechnology on humans and the environment are possible. To gain those data, no analytical technique is currently available that has been fully validated. Special challenges for such a technique are the concentrations of the analyte which are still very low in the environment, the separation of nanoparticles from ions of the same element, and the matrix which can be very complex.

For the enrichment of the analyte, cloud-point extraction (CPE) is used. This technique uses the temperature induced phase separation of mixtures of surfactants in water. After optimizing the conditions for extraction, the selective extraction of Au-NPs and Ag-NPs was possible using suitable ligands and enrichment factors up to 80 were achieved. By using electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS) detection limits in the lower nanogram per liter range were achieved. At the same time the method exhibited exceptional matrix tolerance not only with respect to organic matrix components but also against inorganic salts and colloids. With only minor exceptions the surface coating of the particles does not influence the extraction. This is especially important since nanoparticles are known to undergo numerous transformation processes in the environment which may eventually obstruct their quantitative assessment. Additionally it was shown by electron microscopy that the particle size is not influenced by the extraction process. Hence the CPE can also be used as an enrichment method for other techniques that may benefit from pre-concentration of the analyte to improve their limit of detection.

By investigating the Ag-NP concentration in nine wastewater treatment plants (WWTP) in southern Germany a major contribution was made to the assessment of environmental nanoparticle exposure. CPE and ET-AAS were used to determine the concentration of Ag-NPs in untreated municipal wastewater and in WWTP effluent that is discharged into the aquatic environment. This study shows that 95 % or more of all nano-sized silver is removed in the WWTP. In the effluent only concentrations in the lower nanogram per liter range were

found which is several orders of magnitude lower than concentrations which may be associated with negative effects on the environment. To the best of my knowledge this is the first study to investigate elimination and release of nano-silver in WWTPs under real conditions. The results support predictions made by other groups on the basis of lab-scale experiments and model WWTPs, showing the potential of CPE as a fast, easy and robust method for the determination of a sum parameter.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Ziel der Arbeit	2
1.2. Gliederung	2
2. Nanopartikel	3
2.1. Definition und Vorkommen	3
2.2. Edelmetall-Nanopartikel – eine moderne Erfindung?	3
2.3. Synthese von Nanopartikeln.....	4
2.4. Risiken der Nanotechnologie	6
2.4.1. Toxikologie	7
2.4.2. Exposition.....	10
2.4.3. Transformation von Nanopartikeln	11
3. Analytische Methoden zur Bestimmung von Nanopartikeln in der Umwelt	14
3.1. Mechanische Verfahren.....	14
3.2. Mikroskopische Verfahren	15
3.3. Optische und Spektrophotometrische Verfahren.....	16
3.4. Einzelpartikel Massenspektrometrie	16
3.5. Größenfraktionierung	17
3.5.1. Elektrophorese.....	18
3.5.2. Feld-Fluss-Fraktionierung	18
3.5.3. Feldfreie Methoden	20
3.6. Extraktionstechniken	21
3.6.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion	21
3.6.2. Festphasen-Extraktion	22
3.6.3. Ionenaustauscher	22
3.7. Fazit.....	23
4. Verwendete Methoden	24

4.1.	Cloud-Point Extraktion.....	24
4.2.	Elektrothermale Atomabsorptionsspektrometrie.....	29
4.2.1.	Vergleich mit anderen Quantifizierungsmethoden.....	29
4.2.2.	Theoretische Grundlagen der AAS	30
4.2.3.	Untergrundkorrektur.....	31
4.2.4.	Aufbau.....	33
4.2.5.	Strahlungsquelle	34
4.2.6.	Atomisator	35
4.2.7.	ET-AAS und CPE	36
4.3.	UV/Vis-Photometrie.....	37
4.4.	Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie	38
4.5.	Dialyse.....	38
4.6.	Transmissionselektronenmikroskopie	39
5.	Experimenteller Teil.....	41
5.1.	Allgemeines.....	41
5.2.	Synthese von Gold-Nanopartikeln	41
5.3.	Synthese von Silber-Nanopartikeln.....	41
5.3.1.	Citratfunktionalisierte Silber-Nanopartikel	41
5.3.2.	Polyvinylpyrrolidonfunktionalisierte Silber-Nanopartikel.....	42
5.3.3.	11-Mercaptoundecansäurefunktionalisierte Silber-Nanopartikel.....	42
5.3.4.	Mercaptobernsteinsäurefunktionalisierte Silber-Nanopartikel.....	42
5.3.5.	Rinderserumalbuminfunktionalisierte Silber-Nanopartikel	42
5.3.6.	Lysin-funktionalisierte Silbernanopartikel	42
5.3.7.	Cystein-funktionalisierte Silbernanopartikel	43
5.3.8.	Stärkefunktionalisierte Silbernanopartikel	43
5.3.9.	Silberchloridbeschichtete Silbernanopartikel.....	43
5.3.10.	Silbersulfidbeschichtete Silbernanopartikel	44
5.3.11.	Silberphosphat-Nanopartikel.....	44

5.4.	Reinigung von Nanopartikeln mittels Dialyse	44
5.5.	Durchführung der Cloud-Point Extraktion.....	44
5.6.	ET-AAS-Messung der Tensid-Phasen	45
5.6.1.	Auswertung der Messdaten	46
5.6.2.	Kalibrierung zur Bestimmung der Analyt-Konzentration in Realproben.....	47
5.7.	Charakterisierung der Oberflächenfunktionalisierung mittels FT-IR	47
5.8.	Elektronenmikroskopie	48
6.	Ergebnisse	49
6.1.	Entwicklung eines Verfahrens zur speziesselktiven Anreicherung und Quantifizierung von Gold-Nanopartikeln mittels Cloud-Point Extraktion und Elektrothermaler Atomabsorptionsspektrometrie	50
6.2.	Entwicklung eines Verfahrens zur speziesselktiven Anreicherung und Quantifizierung von Silber-Nanopartikeln mittels Cloud-Point Extraktion und Elektrothermaler Atomabsorptionsspektrometrie	52
6.3.	Einfluss von Partikeloberfläche und von Matrixbestandteilen auf die Cloud-Point Extraktions-Effizienz für Silber-Nanopartikel und Anwendung der Methode zur Quantifizierung der Bildung von Silber-Nanopartikeln aus Silber-Ionen	54
6.4.	Quantifizierung der Eliminierung und Freisetzung nanoskaliger Silberpartikel durch kommunale Klärwerke in Deutschland	57
7.	Zusammenfassung und Ausblick	59
8.	Anhang	61
8.1.	Publikationen.....	61
	Publikation 1:.....	61
	Publikation 2:.....	69
	Publikation 3:.....	79
	Publikation 4:.....	96
8.2.	Materialien	114
8.2.1.	Verwendete Geräte	114
8.2.2.	Verwendete Chemikalien	115
8.2.3.	Verwendete Verbrauchsmittel	117
8.2.4.	Verwendete Software	117

8.3.	Statistische Grundlagen.....	118
8.3.1.	Mittelwert und Standardabweichung.....	118
8.3.2.	Kenndaten einer Kalibrierfunktion.....	118
8.3.3.	Nachweisgrenze.....	120
8.3.4.	Standardadditionsverfahren.....	120
8.3.5.	Fehlerfortpflanzung.....	121
8.4.	Literaturverzeichnis.....	122

1. Einleitung

Nanopartikel (NPs), insbesondere Edelmetall-Nanopartikel (EM-NPs), werden bereits seit längerem in steigendem Maße in verschiedenen Bereichen eingesetzt. Damit einhergehend wird auch von einer zunehmenden Freisetzung von EM-NPs in die Umwelt ausgegangen. Dies kann aufgrund der möglichen schädlichen Wirkung von EM-NPs zu negativen Effekten auf vorhandene Ökosysteme führen. Allen voran für Silber-NPs (Ag-NPs) wurden bereits zahlreiche Studien über deren toxikologisches Verhalten, unter anderem gegenüber Wasserorganismen, veröffentlicht. Für Gold- (Au-NPs) und Palladium-Nanopartikel (Pd-NPs) gilt dies in eingeschränktem Maße ebenso. Zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch noch nicht einmal klar, ob die Nanopartikel überhaupt schädlicher sind als die entsprechenden Metallionen. Daneben treten Effekte durch (Bio-)Transformation, die Oberflächenbeschichtung und Größenunterschiede der Partikel auf, welche einen – teilweise bis heute nicht bekannten – Einfluss auf deren Wirkung haben. Es handelt sich also um ein hochkomplexes Thema, bei dem bis jetzt, trotz – oder vielleicht gerade wegen – der großen Aufmerksamkeit, welche diesem widerfährt, auf einige Fragen noch keine endgültige Antwort gefunden wurde.

Bei allem für und wider scheint es dennoch angebracht, sich bereits jetzt mit der Analytik von EM-NPs in Realproben zu beschäftigen. Bislang ist weder der Verbleib der Nanopartikel geklärt, noch sind die Konzentrationen von EM-NPs in relevanten Umweltproben bekannt bzw. zuverlässig messbar. Sollte sich letzten Endes herausstellen, dass bei einer gewissen Konzentration von EM-NPs, etwa in Wasserproben, von einer Gefährdung der aquatischen Umwelt auszugehen ist, wäre es, sowohl aus Sicht der Legislative, als auch aus Sicht der mit der Umweltüberwachung betrauten Stellen, äußerst wichtig, bereits über ein Instrumentarium zu verfügen, mit welchem man in der Lage ist, die Konzentration von EM-NPs in Realproben routinemäßig zu bestimmen.

Momentan jedoch gibt es noch kein etabliertes Verfahren, welches dazu in der Lage ist. Zwar wurde schon eine Vielzahl möglicher Methoden vorgeschlagen, doch jede einzelne bringt auch gravierende Nachteile wie etwa geringe Matrixtoleranz, aufwändige Instrumentierung oder Durchführung, schlechte Reproduzierbarkeit oder eine zu hohe Nachweisgrenze mit sich. Eine geeignete Methode zu entwickeln und zu validieren ist darum vordringliche Aufgabe der Analytischen Chemie.

1.1. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, mit der Cloud-Point Extraktion (CPE) ein einfaches Verfahren zu entwickeln, welches in der Lage ist, EM-NPs aus wässrigen Proben zu extrahieren und anzureichern. Voraussetzung dabei ist eine hohe Selektivität der Nanopartikel gegenüber Metallionen desselben Elements, eine hohe Matrixtoleranz und eine niedrige Nachweisgrenze bei der Quantifizierung. Dazu wird mit der Elektrothermalen Atomabsorptionsspektrometrie (ET-AAS) eine Methode verwendet, mit der die verbleibende Matrix effektiv zu eliminieren ist und Edelmetalle selektiv und nachweisstark bestimmt werden können

Nach der Entwicklung einer brauchbaren Methode soll diese umfassend validiert werden. Wichtige Kriterien sind dabei Matrixtoleranz, der Einfluss der Partikeloberfläche, Selektivität und die Erhaltung der ursprünglichen Partikelgrößenverteilung. Da Silber-Nanopartikel laut gegenwärtigem Forschungsstand [1] möglicherweise das größte Umweltrisiko darstellen, wird diesen hier auch die größte Aufmerksamkeit unter den EM-NPs zuteil und die Methode für diese auch am umfassendsten validiert.

Anhand der Messung von Realproben, etwa aus natürlichen Gewässern oder Klärwerken, wird abschließend untersucht, inwiefern sich die Methode zur Messung von Umweltproben eignet. Daneben sollen, wenn möglich, Daten über das Verhalten und den Verbleib von Ag-NPs in Klärwerken erhoben werden.

1.2. Gliederung

Nach dieser Einleitung wird in Kapitel 2 ein Überblick über den aktuellen Wissensstand zu Nanopartikeln, deren schädliche Effekte und den daraus resultierenden Risiken gegeben. Kapitel 3 zeigt allgemein die momentan gebräuchlichen Methoden zur Analyse von Nanopartikeln, während in Kapitel 4 in vertiefter Form die in dieser Arbeit verwendeten analytischen Techniken erklärt werden. Nach dem experimentellen Teil, der eine genaue Beschreibung der durchgeführten Experimente gibt (Kapitel 5) wird eine Zusammenfassung der Forschungsergebnisse präsentiert (Kapitel 6), welche in den im Anhang dieser Arbeit befindlichen Publikationen (Kapitel 8.1) enthalten sind. Kapitel 7 schließt die Arbeit mit einer Zusammenfassung und einem Ausblick ab.

2. Nanopartikel

2.1. Definition und Vorkommen

Der Begriff Nanopartikel stellt zunächst eine sehr willkürliche [2] Bezeichnung für Objekte verschiedenster Art dar, welche nur ihre räumliche Ausdehnung gemeinsam haben. Laut Definition der Internationalen Organisation für Normung (ISO) ist ein Nanopartikel ein Objekt, dessen Abmaße in allen drei Raumrichtungen im Bereich zwischen 1 – 100 nm liegt [3]. Damit sind diese auch klar gegenüber Nanofasern und Nanoplättchen abgegrenzt, bei denen nur zwei bzw. eine Dimension innerhalb dieses Größenbereichs liegen [3]. Daneben existiert auch die Bezeichnung Nanomaterial, welche zusätzlich auch solche Objekte einschließt, die zwar in ihrer räumlichen Ausdehnung deutlich größer sind, jedoch in ihrem Inneren oder ihrer Oberfläche Strukturen aufweisen, die den zuvor genannten Definitionen genügen, sowie Aggregate und Agglomerate von Nanopartikeln [4]. Der Präfix *nano* leitet sich dabei jeweils vom griechischen Wort *νανος* (nanos, zu Deutsch: *der Zwerg*) her [2].

Viren, Proteine, DNA-Stränge und natürliche Ton- oder Staubpartikel, wie sie etwa bei Vulkanausbrüchen oder Waldbränden entstehen, fallen damit prinzipiell genauso unter den Begriff Nanomaterial wie vom Menschen unbeabsichtigt freigesetzte Nanopartikel, z.B. Ruß, Aerosole, Abriebprodukte, etc... [5]. Zur Abgrenzung wurde darum der Begriff *engineered nanoparticles (ENPs)*, d.h. technisch hergestellte Nanopartikel, eingeführt. Dabei handelt es sich *per definitionem* um Nanoobjekte welche gezielt hergestellt und in den Verkehr gebracht werden [6, 7]. Diese ENPs umfassen beispielsweise Metall(oxid)-Nanopartikel, Kohlenstoff-Nanoröhren, Graphen, Dendrimere, Latex-Sphären oder Quantenpunkte. In dieser Arbeit werden lediglich Edelmetall-Nanopartikel behandelt.

2.2. Edelmetall-Nanopartikel – eine moderne Erfindung?

Die Verwendung von Gold-Nanopartikeln ist bereits aus der Antike bekannt, wo Au-NPs zum Färben von Gläsern verwendet wurden [8]. Wenngleich der Begriff Nanopartikel damals freilich noch nicht existierte, zeigt sich hierin schon klar, wie sehr sich Nanomaterialien vom entsprechenden Festkörper unterscheiden können: Während Gold in seiner makroskopischen Form den ihm typischen, goldenen Glanz zeigt, erscheinen Au-NPs aufgrund ihrer elektronischen Struktur rötlich bis violett [9]. Mit der Entwicklung der chemischen Industrie und Tech-

nik Ende des 19. bzw. Anfang des 20. Jahrhunderts erlebten die Synthese und Untersuchung von Metall-Nanopartikeln einen ersten Boom. Zeitgleich haben sich EM-NPs aufgrund ihrer intrinsisch hohen Oberfläche vor allem im Bereich der heterogenen Katalyse etabliert – nur wurden sie auch hier zunächst nicht als solche bezeichnet, da die Struktur der Katalysatoren auf atomarer Ebene nicht oder nicht ausreichend bekannt war. Auch die antibakterielle Wirkung feinstverteilten, kolloidalen Silbers wird nachweislich schon seit über 100 Jahren genutzt [10], lange bevor der Begriff der Nanowissenschaften geprägt wurde. Weitere Beispiele für frühe Nanomaterialien sind Farbpigmente sowie organische und anorganische Polymere (z.B. poly-Kieselsäuren).

Erst mit der Kommerzialisierung der Elektronenmikroskopie Mitte des 20. Jahrhunderts [11] stand ein bildgebendes Verfahren für Nanoobjekte zu Verfügung, welches zu deren rasanter Erforschung führte. Der Begriff der Nanotechnologie wurde zuerst 1974 von Taniguchi benutzt [12], seither liefern Materialwissenschaften, Chemie und Physik in atemberaubendem Tempo neue Entwicklungen und Anwendungen, die auf dem gezielten Einsatz von Nanopartikeln beruhen. Diese reichen von optischen Anwendungen, wie etwa Quantenpunkten [13], über chemische Anwendungen in Synthese und (Photo)Katalyse [14-16], Sensortechnik [17, 18] und verbesserte Oberflächeneigenschaften von Materialien, allen voran der so genannte Lotus-Effekt [19], bis hin zu medizinischen Anwendungen [20] im Bereich Diagnose, Wirkstofftransport und neue Medikamente, oder der Behandlung von Krebs [21]. Auch im Bereich Umweltschutz und Umwelttechnik werden Nanopartikel verwendet: So kann beispielsweise nanoskaliges Fe(0) zur Reinigung von mit chlorierten Lösungsmitteln kontaminierten Böden und Grundwasser verwendet werden [22, 23]. Die Analytische Chemie kann in besonderem Maße von der Nanotechnologie profitieren: Magnetische Nanopartikel dienen zum Aufkonzentrieren und Reinigen von Analyten [24, 25] oder Ag-NPs zur markierungsfreien Detektion von Mikroorganismen [26]. Aufgrund der breiten Einsatzmöglichkeiten wird die Nanotechnologie von Wissenschaft und Politik oft als Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts tituiert.

2.3. Synthese von Nanopartikeln

Wegen der wachsenden Bedeutung von Nanopartikeln ist auch deren Synthese zu einem bedeutenden Forschungsgebiet geworden. Grundsätzlich zu unterscheiden sind zwei ver-

schiedene Ansätze zur Herstellung von Nanopartikeln. Diese werden als *bottom-up* bzw. *top-down*-Ansatz bezeichnet [27].

Bei der Synthese nach dem *bottom-up*-Prinzip geht man zunächst von einer Lösung von Salzen des entsprechenden Metalls aus. Durch ein geeignetes Reduktionsmittel werden die Metall-Kationen dann zum Metall-Nanopartikel reduziert. Als Reduktionsmittel kommen hierbei – neben vielen anderen – Natriumborhydrid (NaBH_4), Hydrazin, verschiedene Zucker, Citronensäure oder Ascorbinsäure zum Einsatz [28]. Pionierarbeit auf dem Gebiet der Synthese von Nanopartikeln leistete vor allem *Turkevich*, dessen 1951 publizierte Studie zur Herstellung von Gold-Nanopartikeln auch heute noch in weiten Teilen den Stand der Technik darstellt [29]. Da die Entstehung und das Wachstum der Nanopartikel in diesem Fall hauptsächlich von der Zahl der Nukleationskeime abhängt und damit kinetisch gesteuert ist [27], kann es bei den Produkten, insbesondere bei der Morphologie und der Größenverteilung der Partikel, zu deutlichen Variationen zwischen einzelnen Chargen kommen. Dies ist weder bei der Anwendung in der Forschung, noch bei kommerziellen Herstellern erwünscht ist. Verbesserte Reproduzierbarkeit kann durch exakte Kontrolle aller Reaktionsparameter erreicht werden. Alternativ kann auch ein diffusionsgesteuertes Wachstum bei Verwendung entsprechender Template oder die Synthese in Mikroemulsionen ein besseres Ergebnis liefern [27].

Sehr wichtig ist auch die Stabilisierung der hergestellten Nanopartikel. Da die Aggregation von Nanopartikeln thermodynamisch bevorzugt ist, mussten Methoden entwickelt werden, die Zusammenballung der Nanopartikel zu verhindern [27]. Zwei Konzepte wurden dabei etabliert: Stabilisation durch Abstoßung gleichnamiger Ladungen und sterische Hinderung der Aggregation [27]. In beiden Fällen wird die Oberfläche der Partikel mit entsprechenden Liganden funktionalisiert. Typische Liganden, die eine elektrostatische Abstoßung bewirken, sind organische Säuren, wie etwa Zitronensäure oder Ascorbin. Liganden, welche eine sterische Hinderung der Aggregation hervorrufen, sind entsprechend meist (Bio-)Polymere mit einer ausreichend hohen Molmasse, z.B. Stärke oder Polyvinylpyrrolidon (PVP).

Neben den bisher beschriebenen Methoden für Synthesen werden, vor allem in der chemischen Industrie, oft auch *top-down*-Methoden angewendet. Dabei werden ausgehend von makroskopischen Festkörpern nanoskalige Teilchen erzeugt. Beispiele sind das ultrafeine Zermahlen von Partikeln oder die Laserablation von Metallen. Bei dem letztgenannten Verfahren werden durch Bestrahlung mit hochenergetischer Laserstrahlung einer bestimmten

Frequenz Nanopartikel aus dem Bulk-Material erzeugt und in das umgebende flüssige Medium abgegeben [30]. Der besondere Vorteil dieser Methode ist, dass damit sehr reine Nanopartikel-Suspensionen ohne Additive in vielen verschiedenen Lösungsmitteln erzeugt werden können.

2.4. Risiken der Nanotechnologie

Die mit der Nanotechnologie verbundenen Hoffnungen und bisweilen auch Utopien wecken in manchen Teilen der Bevölkerung aber auch Misstrauen und Furcht. Dies findet seinen Ausdruck nicht nur in kritischen Fachartikeln, sondern auch in Horror-Romanen wie *Michael Crichtons* Roman *Prey* (dt. Beute) [31], bei dem Nano-Roboter über die Menschheit herfallen, oder dem Ruf nach einem Moratorium zur sofortigen Einstellung der Produktion von Nanomaterialien [32, 33]. Im Jahr 2011 kam es in Mexiko gar zu einer Serie von Bombenanschlägen auf Wissenschaftler, welche auf dem Gebiet der Nanotechnologie forschen [34].

Davon abgesehen gibt es auf Seiten der Wissenschaft einen lebhaften Diskurs, welcher sich mit der Abschätzung des Risikos von ENPs für Mensch und Umwelt beschäftigt. Dabei sind zwei Faktoren maßgeblich: Exposition und Toxizität. In der Chemikalienbewertung gibt es dafür das bewährte Konzept des Risikoquotienten (RQ), wie es etwa in der REACH-Verordnung (Anhang I) [35] vorgeschrieben ist. Dieser kann aus der prognostizierten Umweltkonzentration (PEC, engl.: *predicted environmental concentration*) und der prognostizierten Konzentration, bei der kein Effekt auf die Umwelt zu erwarten ist (PNEC, engl.: *predicted no effect concentration*) berechnet werden (Gleichung 1).

$$RQ = \frac{PEC}{PNEC} \quad (1)$$

Ein RQ in der Größenordnung von 1 oder größer signalisiert eine mögliche Gefährdung, während bei Werten $\ll 1$ von einer vernachlässigbaren Gefahr auszugehen ist. Sehr toxische Partikel, welche aber kaum freigesetzt werden, stellen demnach ebenso wenig eine Gefährdung dar wie vergleichsweise harmlose Partikel, die in großen Mengen in die Umwelt gelangen. Um eine vernünftige Risikoabschätzung durchführen zu können, müssen beide Faktoren hinreichend genau erfasst werden.

2.4.1. Toxikologie

Toxikologen verfügen schon seit langem über ein ausgereiftes Instrumentarium, um die schädliche Wirkung von einzelnen Stoffen zu bewerten. Jedoch greifen viele dieser Methoden bei Nanopartikeln nicht oder nur beschränkt:

Das liegt zum einen daran, dass die stoffliche Vielfalt von Nanopartikeln sehr groß ist: Bei „klassischen“ Analyten der Elementanalytik, wie etwa Quecksilber, behandeln alle toxikologischen Studien stets ein und dieselbe Substanz, welche allenfalls minimal chemisch modifiziert ist, wie etwa das Methyl- und Dimethyl-Quecksilber [36, 37]. Dagegen kann man nicht davon ausgehen, dass mehrere Studien, die sich alle mit der Toxizität von Ag-NPs beschäftigen, auch jeweils die gleichen Partikel verwenden. Unterschiede in Größe, Morphologie oder Oberflächenfunktionalisierung beeinflussen die Toxizität der Partikel mitunter stark [38-41].

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf Edelmetall-Nanopartikeln in der aquatischen Umwelt. Darum soll auch bei der Behandlung der Toxikologie von Nanopartikeln dieser Aspekt im Vordergrund stehen. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass auch für andere ENPs (TiO₂-NPs, ZnO-NPs, Kohlenstoff-Nanoröhren,...) entsprechende Studien erschienen sind. Neben der Aufnahme von Nanopartikeln aus der wässrigen Phase stellen diese auch im Boden oder – in besonderem Maße – als Aerosol eine potentielle Gefährdung für die Gesundheit von Pflanzen, Tieren und letztlich natürlich auch die des Menschen dar.

Der genaue Mechanismus der toxischen Wirkung von Ag-NPs ist noch nicht bekannt. Einerseits ist es mittlerweile anerkannter Stand der Forschung, dass ein großer Teil der Toxizität von Ag-NPs auf der Freisetzung von Ag⁺ beruht. Andererseits wurden jedoch in manchen Studien unterschiedliche Effekte von Silber-Salzen bzw. Nanopartikeln beobachtet.

Eine Forschergruppe beobachtete bei Zuckmücken, welche mit Silber in Form von Ag-NPs bzw. Ag⁺ behandelt wurden, Unterschiede in der Genexpression, je nachdem ob die Individuen mit Ag-NPs bzw. Ag⁺ behandelt wurden. Bei den mit Nanopartikeln behandelten Insekten wurde dabei eine auffällig hohe Expression von Genen beobachtet, welche für die Herstellung von Antioxidantien verantwortlich sind [42].

Bei der Exposition der Acker-Schmalwand (*ARABIDOPSIS THALIANA*) mit Ag-NPs konnten Forscher unter anderem einen Anstieg der Expression von Genen beobachten, welche üblicherweise im Zusammenhang mit Abwehrreaktionen bei Verwundungen oder Insektenbefall stehen [43]. Diese Reaktion des Organismus wurde nur für Silber als Nanopartikel, nicht aber in dessen ionischer Form, beobachtet.

Andere Studien kommen zu gegenteiligen Ergebnissen: Zebrafisch-Embryonen, welche Silber in Form von Ag-NPs, Ag⁺ bzw. Ag⁰ als Festkörper exponiert waren, zeigten jeweils ein sehr ähnliches Genexpressionsmuster, unterscheiden sich jedoch signifikant von der Kontrollgruppe [44]. Daraus schließen die Forscher, dass der Wirkmechanismus in allen drei Fällen derselbe ist.

Die Tatsache, dass jeweils verschiedene Spezies untersucht wurden, macht es schwer, die Studien direkt zu vergleichen. Als Konsequenz muss man feststellen, dass noch keine letztgültige Aussage über den genauen Wirkmechanismus von Ag-NPs getroffen werden kann: Es ist noch nicht bekannt, ob die Wirkung nur auf der Freisetzung toxischer Ionen beruht, oder ob auch ein „Nano-Effekt“ eine Rolle spielt.

Neben dem qualitativen ist auch der quantitative Vergleich der schädlichen Wirkung von gelösten Ionen und Nanopartikeln untersucht worden. Eine Gruppe von schweizerischen und spanischen Wissenschaftlern hat dazu beispielsweise die Photosyntheseaktivität von Algen verglichen. Bezogen auf die Gesamtmenge an Silber liegt die schädigende Wirkung von Ag⁺ deutlich über der einer entsprechenden Menge Ag-NPs. Bezogen auf die ermittelte Menge an freiem Ag⁺ (d.h. jener Ag⁺-Ionen, die aus den Ag-NPs laufend frei werden) sind jedoch Ag-NPs deutlich toxischer, was nicht mit der Freisetzung von Ag⁺ alleine erklärt werden kann [45]. Eine stetig zunehmende Anzahl von Publikationen ist zum Thema Nanotoxikologie erschienen, seit diese Disziplin von *Oberdörster, Oberdörster* und *Oberdörster* in ihrem Aufsatz von 2005 in das Bewusstsein der Forschungsgemeinschaft gerufen wurde [46]. Eine aktuelle Recherche mit der Literatur-Datenbank *SciFinder*[®] liefert für die Suchanfrage „nano* AND toxicol*“ über 18.000 Treffer, darunter fast 1000 für die Begriffe „nano* AND silver AND toxicol*“. Wegen dieser Fülle an Studien erscheint es günstig, sich bei diesem Thema hauptsächlich auf Übersichtsartikel und Meta-Studien zu beziehen, welche die Daten bereits in aufbereiteter Form präsentieren und teilweise auch eine Vorselektion bezüglich Qualität der zugrunde liegenden Methoden und Relevanz des Expositions-Szenarios vornehmen.

In einem Aufsatz aus dem Jahr 2013 haben *Chernousova* und *Epple* [40] die Ergebnisse aus über 40 Studien zusammengefasst, die sich mit der Toxikologie von Ag-NPs beschäftigen. Dabei kommen sie zu dem Ergebnis, dass die kritische Konzentration von Ag^+ und Ag-NPs aus *in-vivo*-Studien mit Einzellern und mehrzelligen Organismen deutlich niedriger liegt als für Experimente mit Zellkulturen. Die *kritische Konzentration* meint in diesem Zusammenhang die niedrigste Konzentration, bei der ein negativer Effekt festgestellt wurde. Insbesondere für mehrzellige Organismen wurden Effekte teilweise bereits bei Konzentrationen berichtet, welche im Bereich des Grenzwerts für Silber in Trinkwasser liegen ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ laut WHO [47] bzw. $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ laut Deutscher Trinkwasserverordnung [48]). Im Mittel ist die auf die Massenkonzentration bezogene Toxizität von Ag-NPs jedoch nicht höher, eher sogar etwas niedriger, als die Toxizität des Ag^+ -Ions.

Gottschalk, Kost & Nowack unternehmen in einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2013 [1] den Versuch, eine PNEC für Ag-NPs empirisch zu ermitteln. Dafür wurden 25 experimentell ermittelte *no-effect*-Konzentrationen für verschiedene Wasserorganismen aus 13 unterschiedlichen Studien herangezogen und in Form einer Verteilungsfunktion miteinander in Bezug gesetzt (PSSD, engl.: *probabilistic species sensitivity distribution*). Der Median des anhand einer Verteilungsfunktion berechneten HC5-Werts, (von engl.: *hazard concentration*, d.h. der Wert, bei dem 5 % aller Organismen bei einem Konfidenzniveau von 50 % Schaden nehmen [49]), beträgt demnach für Ag-NPs $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Bereits im Jahr 2010 stellten *Kahru* und *Dubourguier* [50] LC50- bzw. EC50-Werte für Ag-NPs zusammen. Dabei handelt es sich um die Konzentrationen, bei denen 50 % der Individuen durch die Zugabe der Testsubstanz sterben (LC50) bzw. einen (negativen) Effekt zeigen (EC50). Der niedrigste LC50-Wert von $40 \mu\text{g Ag-NPs} \cdot \text{L}^{-1}$ wurde dabei für eine Wasserfloh-Spezies (*DAPHNIA PULEX*) festgestellt. Die Autoren stufen Silber-NPs darum als sehr toxisch („*extremely toxic*“) für Wasserorganismen ein.

Vergleichsweise wenige Studien sind dagegen für andere EM-NPs wie Au-NPs oder Pd-NPs erschienen. Im Falle der Gold-Nanopartikel herrscht in der Literatur noch keine Einigkeit darüber, ob überhaupt von toxischen Effekten auszugehen ist. Zwar zeigen *Alkilany & Murphy* in einem Übersichtsartikel [51] Beispiele für die Bioakkumulation von Au-NPs. In keiner der genannten Studien wurden jedoch akut toxische Wirkungen festgestellt. Auch eine sehr aktuelle Studie von *García-Cambero et al.* [52] vergleicht die Toxizität von Au-NPs auf drei ver-

schiedene Spezies (Algen, Daphnien, Zebrafisch) von Wasserorganismen mit der von gelösten Gold-Ionen (AuCl_4^-). Bei den gewählten Konzentrationen, welche mit $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ extrem hoch waren, konnte kein negativer Effekt der Nanopartikel festgestellt werden¹. Gold-Ionen waren dagegen bereits bei Konzentrationen von $1 - 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ für Algen und Daphnien toxisch. Durch die bekanntermaßen große chemische Inertheit stellt Gold in Form von Nanopartikeln nach aktuellem Forschungsstand kein größeres Risiko für die Umwelt dar.

Noch dürftiger ist die Datenlage bei Palladium-Nanopartikeln. Die wenigen Studien zu Toxikologie von Pd-NPs berichten von negativen Effekten auf Lungenzellen [53] und Pollen [54]. Es wurde auch gezeigt, dass die toxische Wirkung von Pd-NPs höher ist als die von gelöstem Palladium [54]. Da eine mögliche Umweltbelastung als Aerosol für Pd-NPs aufgrund ihrer Verwendung in Abgaskatalysatoren und der daraus resultierenden Freisetzung im Abgas ein realistisches Szenario ist [55], sind die untersuchten Proben durchaus relevant. Daneben wurden Pd-NPs als potentiell Allergen identifiziert [56].

Bei kritischer Betrachtung wird klar, dass für manche EM-NPs negative Effekte auf die aquatische Umwelt tatsächlich nicht ausgeschlossen werden können. Einzelne Wasserorganismen werden bereits bei Ag^+ - und Ag-NP-Konzentrationen geschädigt, die unter dem Grenzwert für Silber in Trinkwasser liegen. Sollte es zu einem entsprechenden Expositionsszenario kommen, können Beeinträchtigungen nicht ausgeschlossen werden. Hier jedoch stößt man auf die zweite große Unbekannte bei der Risikoabschätzung: die Exposition.

2.4.2. Exposition

Mit dem zunehmenden Einsatz von Nanomaterialien, vor allem in Verbrauchsgütern, ist davon auszugehen, dass auch deren Emission in verschiedene Umweltkompartimente ansteigt. Mehrere Studien haben bereits experimentell bewiesen, dass die Freisetzung von Silber aus mit Ag-NPs beschichteten Textilien in Form von intakten bis leicht chemisch modifizierten Nanopartikeln erfolgt [57, 58]. Darum ist durchaus anzunehmen, dass auch eine reale Ag-NP-Exposition in der Umwelt existiert.

¹ Lediglich das Algenwachstum wurde durch die Trübung bei einer derartig hohen Kolloid-Konzentration gestört. Dies jedoch ist, nach Aussage der Autoren, nicht als toxischer Effekt der Au-NPs einzuordnen, sondern als Wachstumsinhibierung durch Lichtentzug.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind jedoch praktisch keine, auf realen Konzentrationsmessungen beruhenden Daten, zur Exposition durch EM-NPs vorhanden. Dies liegt schlicht und ergreifend daran, dass momentan noch keine vollständig validierte Methode existiert, welche in der Lage ist, diese Daten zu liefern. Lediglich einige probabilistische Modellierungen, die auf dem berechneten und abgeschätzten Materialfluss von Nanopartikeln beruhen, konnten bislang für die Expositionsabschätzung herangezogen werden. Dabei sind diese auch noch mit enormen Unsicherheiten behaftet. So ist für die meisten der modellierten ENPs die weltweite Produktionsmenge überhaupt nicht bekannt und kann nur abgeschätzt werden. Je nach verwendetem Modell und gewählten Verteilungsfaktoren schwanken die errechneten Stoffkonzentrationen teilweise um mehrere Größenordnungen [59]. Aus modellierten Konzentrationen und der PSSD haben *Gottschalk et al.* Risikofaktoren für ENPs in verschiedenen Umweltkompartimenten berechnet. Dabei wurden für Ag-NPs, welche als einzige der EM-NPs behandelt wurden, Risikofaktoren von 0,7 % und 39,7 % in Oberflächenwasser und Klärwasser erhalten [1]. Besonderer Fokus bei der Messung von Umweltproben sollte also auch auf diese Kompartimente gelegt werden. Für unbehandelten und mit Klärschlamm gedüngten Boden betragen die Risikofaktoren dagegen jeweils 0 [1]. Bezüglich des tatsächlichen Risikos sollte jedoch stets im Auge behalten werden, dass sowohl die modellierten Konzentrationen als auch die PSSD mit einer hohen Unsicherheit behaftet sind. Außerdem liegt dem Wert ein Sicherheitsfaktor von 1000 zugrunde [60].

Die wenigen verfügbaren, analytisch ermittelten Daten zur Konzentration von ENPs in Realproben wurden mit sehr speziellen Methoden gewonnen, welche für ein großes Probenaufkommen, wie es bei der Umweltüberwachung anfällt, längst noch nicht geeignet sind [59].

Abhilfe kann hier nur ein Verfahren schaffen, das in der Lage ist, die Konzentration von Nanopartikeln in wässrigen Proben effektiv zu bestimmen. Es muss dabei möglich sein, mit relativ einfachen Mitteln belastbare Daten zu erhalten. Auf Basis realer Umweltkonzentrationen können anschließend detaillierte Expositionsdaten gewonnen werden, anhand derer auch eine vernünftige Abschätzung des Umweltrisikos möglich ist.

2.4.3. Transformation von Nanopartikeln

Dabei ist jedoch zu beachten, dass EM-NPs in der Form, in der sie für Konsumgüter eingesetzt werden, in Realproben höchst unwahrscheinlich anzutreffen sind [58, 61]. Viel zu hoch

ist dafür in relevanten Medien die Konzentration von Substanzen, welche mit den Partikeln interagieren, sowie die exponierte Partikeloberfläche. Deswegen müssen auch Umwandlungsprozesse betrachtet werden. Man kann dabei unterscheiden zwischen einer Umwandlung, welche die chemische Zusammensetzung von Teilen des Partikels verändert und einem Ligandenaustausch [61]. Im letztgenannten Fall ändert sich lediglich die Funktionalisierung der Partikeloberfläche während die chemische Zusammensetzung des Partikels selbst unverändert bleibt. Da die meisten Edelmetalle relativ beständig gegenüber Oxidation sind, gleichzeitig aber eine hohe Thiophilie aufweisen, ist die Interaktion mit Sulfid und schwefelhaltigen Liganden, welche gerade im Abwasser in hoher Konzentration vorkommen, äußerst wichtig [62, 63].

Weil die Partikel-Umwandlung ein zumeist irreversibler chemischer Prozess ist, hat diese für das Umweltverhalten der untersuchten ENPs große Relevanz. Es wurde gezeigt, dass EM-NPs – allen voran Silber-Nanopartikel als meiststudiertes System – mit Sulfid bereitwillig eine Reaktion eingehen, bei der die Partikeloberfläche fortschreitend oxidiert wird, bis schließlich eine Ag_2S -Phase entsteht [63, 64]. Diese Reaktion ist bereits bei umweltrelevanten Konzentrationen rein kinetisch und nicht durch die freie S^{2-} -Konzentration limitiert [65]. Dieser Transformationsprozess hat auch einen Einfluss auf die Toxizität des Systems, da der schädliche Effekt von Ag_2S -passivierten Partikeln viel geringer ist als der von reinen Ag-NPs [66]. Allerdings kann auch nicht pauschal davon ausgegangen werden, dass es zu einer vollständigen Umsetzung kommt. Im Inneren von sulfidierten Ag-NPs stets Reste einer reinen Ag^0 -Phase erhalten [65]. Ähnliches gilt – speziell im Falle des Silbers – auch für die Wechselwirkung mit Halogeniden. Da diese, vor allem das Chlor, in Umweltproben in vergleichsweise hoher Konzentration vorliegen und die Verbindungen AgX ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) sehr schwerlöslich sind, kann es auch sehr leicht zur Bildung von Nanopartikeln kommen welche eine AgX -Phase an ihrer Oberfläche aufweisen.

Der Ligandenaustausch an EM-NP-Oberflächen ist ein weitaus weniger gut verstandener Prozess. Zwar gibt es Synthesevorschriften zur Herstellung von EM-NPs mit bestimmten Oberflächenfunktionalisierungen, welche sich den Ligandenaustausch gezielt zu nutzen machen [67-69]. Jedoch stellt die Komplexität und Vielzahl möglicher Liganden in Realproben die Umweltwissenschaft vor ernsthafte Probleme [61]. Es ist mittlerweile anerkannter Stand der Forschung, dass Partikel mit schwach bindenden bzw. sterisch wenig abschirmenden Ligan-

den, wie z.B. dem oft verwendeten Citrat, eine rasche Transformation durchlaufen. Bevorzugte Liganden dürften hierbei schwefelhaltige (Makro-)Moleküle und – aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in der Umwelt – Proteine sein [61, 70]. Man spricht daher von der Ausbildung einer *Protein-Korona*. Bei Experimenten unter Laborbedingungen stellten sich außerdem Humin- und Tanninsäuren als potente Liganden heraus [71]. Da die Ermittlung der schädlichen Wirkung von EM-NPs an sich schon sehr komplex ist, stellt die Vielzahl der Oberflächenmodifikationen eine weitere Herausforderung dar. Obwohl einige Studien bereits einen Einfluss der Partikeloberfläche auf die Schädlichkeit der Partikel feststellen konnten [72, 73], herrscht zum jetzigen Zeitpunkt keine Klarheit, welche Liganden einen besonders positiven oder negativen Einfluss auf die Umweltverträglichkeit der Partikel haben.

Aufgrund dessen ist es für jede analytische Methode zur Quantifizierung von ENPs entscheidend, den jeweiligen Analyt, trotz der resultierenden Komplexität der Oberflächeneigenschaften, in Realproben als Gesamtheit zu erfassen [74].

3. Analytische Methoden zur Bestimmung von Nanopartikeln in der Umwelt

Innerhalb der oben beschriebenen Rahmenbedingungen ist es nun Sache der Analytischen Chemie, durch die Entwicklung eines geeigneten Verfahrens eine Lösung für diese Fragestellung zu finden [75]. Der kritischste Faktor möglicherweise ist dabei eine an den Analyten angepasste Probenvorbereitung [76]. Die Anforderungen an ein analytisches Verfahren sind im Wesentlichen die folgenden:

- Hohe Matrixtoleranz, um auch in komplexen Proben richtige Werte zu liefern [76]
- Niedrige Nachweisgrenze, optimalerweise im $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ Bereich, um auch geringe Mengen von Nanopartikeln quantifizieren zu können. Dies kann auch durch eine Anreicherung der ursprünglichen Probe erreicht werden [75, 76]
- Selektiver Nachweis des jeweiligen Analyts, insbesondere auch in Gegenwart von anderen Nanopartikeln [74] und Ionen desselben Elements [76]
- Kein Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung, da es sonst zu einem Minderbefund kommen kann [74]
- Billige, schnelle und einfache Durchführung, um eine mögliche Anwendung im Routine- und Überwachungsbetrieb, auch durch gering qualifiziertes Personal, zu ermöglichen

Die folgende Aufstellung soll einen Überblick über die wichtigsten, momentan verfügbaren Techniken geben, welche dafür prinzipiell in Betracht kommen. Insbesondere sollen dabei auch Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden abgewogen werden.

3.1. Mechanische Verfahren

Hier sind in erster Linie Filtration, Dialyse und Zentrifugation zu nennen. Bei der Filtration kommen Ultra- und Nanofiltration in Frage, welche Partikel im Größenbereich von $0,1 - 0,01$ bzw. $0,01 - 0,001 \mu\text{m}$ ($10 - 1 \text{ nm}$) im Filtrat zurückhalten. Bei der Dialyse sind *cut-off* Durchmesser ($d_{\text{cut-off}}$) bis hinab zu 3 kDa Stand der Technik, was in etwa einem Cluster von 30 Sil-

ber-Atomen entspricht – wenngleich diese Kennzahl eher für Biomoleküle ausgelegt ist, welche eine geringere Dichte besitzen.

Vorteile der Dialyse sind deren gute Verfügbarkeit und einfache Anwendung. Allerdings steht der Probe ein großer Überschuss an entionisiertem Wasser gegenüber, was zu einer Änderung der Ionenstärke und des Redoxpotentials der Lösung führt. Es ist davon auszugehen, dass es infolgedessen zu einer Auflösung von Partikeln kommt, zumal die Trennung sich über einen längeren Zeitraum hinzieht [38, 76]. Bei den meisten Filtrationstechniken stellen hohe Verluste an der Membran insbesondere für die quantitative Analytik einen gravierenden Nachteil dar. Außerdem sind die Methoden oftmals sehr arbeits- und energieintensiv [38]. So sind diese hauptsächlich zur Aufreinigung von Nanopartikeln in der Synthese geeignet.

3.2. Mikroskopische Verfahren

Wie bereits oben erwähnt stellt die Elektronenmikroskopie eine Schlüsseltechnologie bei der Entwicklung und Charakterisierung von Nanomaterialien dar [27]. Für eine Beschreibung der zugrundeliegenden physikalischen Prozesse sei auf Kapitel 4.6 verwiesen.

Insbesondere die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht mit einer Auflösung im sub-nm Bereich beeindruckende Einblicke in die Morphologie nanostrukturierter Objekte [27]. In Verbindung mit EDX (Energiedispersive Röntgenspektroskopie, engl.: *energy dispersive X-ray spectroscopy*) kann nicht nur die elementare Zusammensetzung einzelner Partikel gemessen, sondern sogar die die Verteilung einzelner Elemente innerhalb des Partikels bestimmt werden. Allerdings sind sowohl die Anschaffung als auch der Betrieb dieser Geräte sehr teuer. Insbesondere jedoch ist das Erzielen statistisch signifikanter Resultate außerordentlich aufwändig, da stets nur eine sehr geringe Zahl von Partikeln innerhalb der Probe analysiert werden kann und Probenvorbereitung, Messung und Auswertung arbeitsintensiv und schlecht automatisierbar sind.

So stellt die Elektronenmikroskopie gewissermaßen einen Gold-Standard bei der Referenzierung von Partikelgröße und –zusammensetzung dar, ist jedoch für die quantitative Routineanalytik ungeeignet.

3.3. Optische und Spektrophotometrische Verfahren

Absolute Standardtechniken zur Charakterisierung von Nanopartikeln sind Lichtstreuung sowie UV/Vis-Spektrometrie. Ein besonderer Vorteil der Lichtstreuung ist, dass hier mit relativ einfachen Mitteln die Partikelgrößenverteilung direkt zugänglich ist. Die Photometrie erlaubt anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes unkompliziert die Konzentrationsbestimmung von Partikeln, welche in diesem Bereich photoaktiv sind. Mit Einschränkungen ist auch die Bestimmung der Größenverteilung anhand der Lage des Absorptionsmaximums möglich [9]. Beide Methoden jedoch besitzen keine hohe Nachweisempfindlichkeit und eine geringe Selektivität [77, 78]. Sie sind darum sehr anfällig für Störungen durch andere photoaktive bzw. streuende Teilchen in der Probe und somit für Umweltproben nicht geeignet [7]. Außerdem ist die Lichtstreuung gerade für sehr kleine Partikel wenig effektiv [78, 79] was die gemessene Größenverteilung stark verfälschen kann [80]. Routinemäßig zum Einsatz kommen beide Methoden zur Produktkontrolle in Forschung und Entwicklung.

3.4. Einzelpartikel Massenspektrometrie

Das Prinzip der Einzelpartikel-Massenspektrometrie (*single particle ICP-MS*, spICP-MS) wurde im Jahr 2003 von *Degueldre* und *Favarger* beschrieben [81]: Die Signalintensität eines bestimmten Isotops in der Probe (z.B. ^{107}Ag für die Bestimmung von Silber-NPs) wird zeitaufgelöst betrachtet. Während gelöste Metallsalze ein – von statistischen Schwankungen abgesehen – kontinuierliches Signal liefern, werden durch Partikel diskontinuierliche, gepulste Signale erzeugt (Abbildung 1). Diese entstehen, weil aus einem Partikel in der Plasmafackel eine große Zahl von Ionen gleichzeitig entsteht. Diese Ionen-Wolke erzeugt beim Auftreffen auf den Detektor ein Signal von hoher Intensität, welches sich vom Untergrundsignal deutlich abhebt.

Dies gilt jedoch nur, wenn die Partikel groß genug sind, ein Signal zu erzeugen, welches sich statistisch einwandfrei belegbar von dem, durch gelöste Ag^+ -Ionen herrührenden, Hintergrund abhebt. Aktuell sind Partikel kleiner als 20 nm mit der spICP-MS nicht messbar [82, 83]. Ein weiterer Nachteil ist, dass es sehr leicht zu Mess-Artefakten kommen kann, wenn innerhalb eines Datenerfassungs-Intervalls die Ionen-Wolken von zwei oder mehr Partikeln auf dem Detektor auftreffen oder umgekehrt eine Ionen-Wolke nur teilweise erfasst wird [82, 84]. Es handelt sich dennoch um ein sehr interessantes Verfahren, welches die direkte,

schnelle und gröÙenselektive Messung von Nanopartikeln in Suspensionen zulässt [82]. Aufgrund einer niedrigen Nachweisgrenze ist es auch für die Direktmessung von Umweltproben geeignet [83], wenngleich die Matrixtoleranz, gerade bei komplexen Proben, wie bei allen ICP-Methoden ein limitierender Faktor ist.

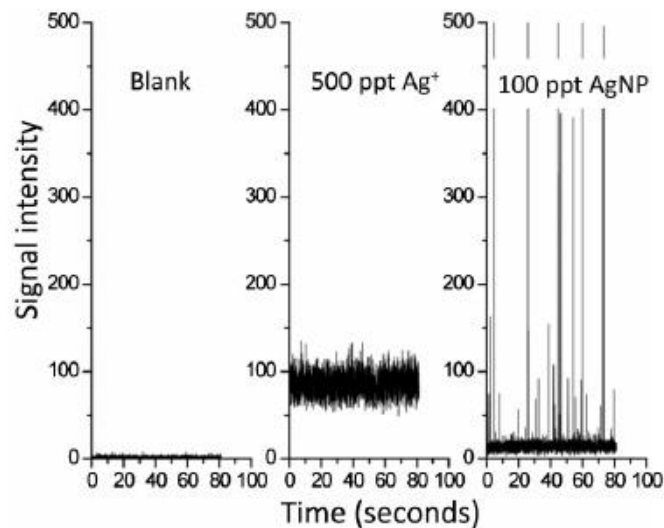


Abbildung 1: Praktische Anwendung der spICP-MS (aus [85]) zur Messung von Silber. Aufgetragen ist das zeitaufgelöste Detektorsignal (*signal intensity*) bei Messung einer Blindprobe (Blank, links), einer Ag⁺ Lösung (500 ng·L⁻¹, Mitte) oder einer Ag-NP-Suspension (100 ng·L⁻¹, rechts).

3.5. Größenfraktionierung

Techniken, welche durch Größenfraktionierung die Messung einer Partikelgrößenverteilung in der Probe zulassen, sind insbesondere für die Analytik von Nanopartikeln sehr attraktiv, da einige Eigenschaften von Partikeln, wie z.B. Toxizität, spezifische Oberfläche oder katalytische Aktivität, explizit von deren Größe abhängen können [86]. Wie bei vielen anderen Analytischen Trennmethode ist auch hier für die Quantifizierung eine zusätzliche Detektionstechnik notwendig. Dafür werden z.B. optische (s. Kapitel 3.3) [80] oder elementspezifische Methoden [87, 88] verwendet. Da viele Größenfraktionierungstechniken Durchflussmethoden im weitesten Sinne sind, bietet sich die Möglichkeit der *on-line*-Kopplung mit einem Detektor an, welcher eine kontinuierliche Probenzufuhr erlaubt [75, 89]. Hervorgehoben sei an dieser Stelle die Kopplung mit ICP-MS, welche für viele (Schwer-)Metalle eine außerordentlich niedrige Nachweisgrenze erreicht [90]. Da viele Nanopartikel auch eine sehr spezif-

ische Fluoreszenz zeigen, kann auch ein Fluoreszenzdetektor zur Messung der Partikelkonzentration herangezogen werden.

3.5.1. Elektrophorese

Bei der Elektrophorese wird die Wanderung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld beobachtet. Je nach Größe und Ladung der Partikel ergibt sich eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität, was in der Trennung verschiedenartiger Teilchen resultiert [91]. Die Elektrophorese kann auch für die Größenfraktionierung von EM-NPs verwendet werden, was sowohl für die Gelelektrophorese (GE) [92, 93], als auch für die Kapillarelektrophorese (CE) [94-96] bereits prinzipiell gezeigt wurde. Der Vorteil der CE gegenüber der GE liegt in der besseren Automatisierbarkeit [97] und der Möglichkeit zur Verknüpfung mit Durchflussdetektoren [98]. Dies ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch keine kommerziell erhältliche Standard-Instrumentierung [98] und darum mit hohem Aufwand und Kosten verbunden. Ein genereller Nachteil elektrophoretischer Verfahren ist, dass dabei nur Partikel getrennt werden können, die eine Ladung tragen [97]. Streng genommen muss sogar sichergestellt werden, dass alle gleichartigen Partikel auch ein identisches Ladung-zu-Oberfläche bzw. Ladung-zu-Volumen-Verhältnis aufweisen, da sonst keine Proportionalität zwischen elektrophoretischer Mobilität und Partikelgröße gegeben ist [91]. Dies ist insbesondere bei realen Partikeln mit unbekannter Oberflächenchemie eine Herausforderung. Darüber hinaus ist momentan noch keine Studie bekannt, welche die Trennung von EM-NPs in einer komplexen Matrix und bei einer umweltrelevanten Konzentrationen demonstriert. Die Elektrophorese könnte also auch durchaus von einer Voranreicherung oder Matrixabtrennung profitieren.

3.5.2. Feld-Fluss-Fraktionierung

Die Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF) ist eine Trenntechnik, bei der Partikel in einer Flusszelle durch das Anlegen eines äußeren Feldes aufgetrennt werden (vgl. auch Abbildung 2). Der theoretische Hintergrund der Technik ist von *Giddings*, der gleichzeitig Erfinder der FFF ist [99], zusammengefasst worden [100]: Voraussetzung ist, dass zwischen den beiden Wänden der Flusszelle ein laminares Flussregime in der mobilen Phase vorherrscht. Dies bedingt ein parabolisches Profil der Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase, welche alle darin enthaltenen Partikel transportiert. Die horizontale Wanderungsgeschwindigkeit jedes Partikels

in der Flusszelle ist also bestimmt durch dessen vertikale Position und die dort auftretende Fließgeschwindigkeit. Diese vertikale Position wiederum ergibt sich aus dem Kräftegleichgewicht zwischen Diffusion und einer entgegengerichteten Kraft, die durch ein äußeres Feld auf den Partikel wirkt. Partikel, für die der Beitrag der Diffusionsrate höher oder der aus dem Feld resultierende Beitrag geringer ist, sind im Mittel also häufiger in Regionen größerer Fließgeschwindigkeit zu finden und eluieren schneller.

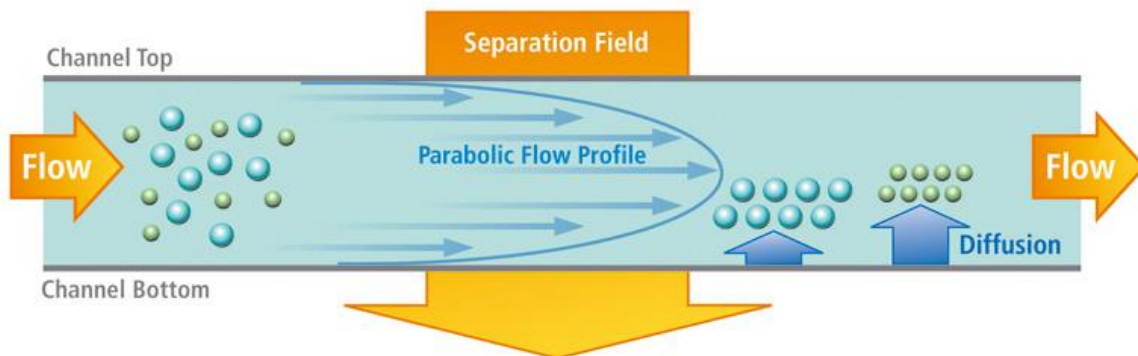


Abbildung 2: Trennprinzip der FFF [101]: Die mobile Phase fließt von links nach rechts und bildet dabei ein parabolisches Flussprofil zwischen oberer (*channel top*) und unterer (*channel bottom*) Begrenzung der Flusszelle aus. Senkrecht zur Fließrichtung wirkt ein – nicht weiter benanntes – Kraftfeld (*separation field*). Die blauen bzw. grünen Sphären stellen Analyt-Partikel unterschiedlicher Größe dar, die anhand des Kraftfeldes und der Diffusion getrennt werden.

Eine Reihe möglicher externer Felder wurde für die FFF vorgeschlagen und verwendet [86, 102]: die Schwer- bzw. Zentrifugalkraft, ein Temperaturgradient zwischen den Flusszellenwänden, ein elektrisches bzw. magnetisches Feld oder ein *cross-flow*, ein zweiter, zur Elutionsrichtung senkrecht stehender Fluss.

Besonders gut für die Analyse von Nanopartikeln geeignet ist die Asymmetrische Fluss FFF (AF⁴). Bei dieser besteht eine der Flusszellenwände aus einer Membran, durch welche stetig ein Teil des Elutionsmittels hindurchfließt. Der Vorteil bei dieser Art der FFF ist, dass dabei auch eine Fokussierung, also eine Anreicherung der Probe in der Flusszelle, möglich ist [88]. Eine Reihe von Publikationen hat bereits gezeigt, dass verschiedene EM-NPs mit der AF⁴-Methode größenselektiv aufgetrennt werden können [80, 102, 103]. Als Detektor kamen dabei meist ICP-MS, UV/Vis oder Lichtstreuung zum Einsatz. Es wurde jedoch bereits von mehreren Autoren darauf hingewiesen, dass die Kalibrierung der Elutionszeit mit NP-

Größenstandards keine exakte Größenbestimmung der eluierten Partikel zulässt [80, 82, 104, 105]. Grund hierfür sind Einflüsse des Lösungsmittels und Wechselwirkungen zwischen Partikeln und Membran [80, 104]. Es müssen also für richtige Messungen größenselektive Detektoren wie spICP-MS oder Lichtstreuung verwendet werden, wobei ersterer sehr teuer und letzterer keine ausreichende Sensitivität für die Messung von EM-NPs in Realproben besitzt [80, 82]. Ein großer Nachteil der AF⁴ ist, neben den sehr hohen Anschaffungskosten, eine oftmals geringe Analyt-Wiederfindung von teilweise < 50 % [106], bedingt durch hohe Verluste durch Adsorption an der Membran [82]. Zudem müssen die teuren Membranen auch sehr oft ausgetauscht werden [107].

3.5.3. Feldfreie Methoden

Feldfreie Methoden trennen Partikel aufgrund ihrer diffusionsbedingt unterschiedlichen Verteilung in Fluidkompartimenten unterschiedlicher Fließgeschwindigkeit, ohne dabei auf ein äußeres Feld zurückzugreifen.

Dies erfolgt bei der Größenausschlusschromatographie (SEC) anhand einer stationären Phase aus porösem Gel, in welche kleinere Partikel besser eindringen können, woraufhin diese im Mittel weniger Zeit in der mobilen Phase verbringen als größere Partikel. Darum eluieren große Partikel schneller als kleine [108, 109]. Die Trennung erfolgt hier idealerweise einzig nach der Partikelgröße (genauer gesagt dem Hydrodynamischen Durchmesser), was die Probenvorbereitung vereinfacht. Allerdings kommt es wegen der sehr hohen inneren Oberfläche leicht zu unerwünschten Wechselwirkungen der stationären Phase mit dem Analyten. Auch die Matrixtoleranz ist als nicht sehr hoch einzuschätzen. In der Praxis ist die Anwendung der SEC für Nanopartikel noch nicht über das Stadium der Erprobung an idealen Systemen von reinen Partikeln in Wasser oder Pufferlösung hinausgekommen [110-113].

Desweiteren kommt auch noch die Hydrodynamische Chromatographie (HDC) für die Größenfraktionierung in Frage. Diese nutzt – ähnlich wie die FFF – den Fließgeschwindigkeitsgradienten innerhalb einer laminar fließenden Flüssigkeit für die Trennung. Jedoch wird bei der HDC kein externes Feld angelegt sondern nur der Effekt des parabolischen Flussprofils ausgenutzt. Kleinere Partikel, welche aufgrund rein geometrischer Faktoren (Durchmesser) näher an die Randbereiche der Flusszelle und damit in Zonen geringerer Strömungsgeschwindigkeit gelangen können, werden somit langsamer eluiert als große Partikel, die stetig

mit schneller strömenden Bereichen in Kontakt sind. Die Trennung erfolgt somit auch nur nach der Größe, während Dichte, Partikelzusammensetzung oder –oberfläche keine Rolle spielen. Als Trennstrecke dient entweder eine dünne Kapillare oder eine mit inerten, nichtporösen Partikeln gefüllte Säule [114, 115].

Im Vergleich zur AF⁴ bietet die HDC eine bessere Wiederfindung von Nanopartikeln (77 – 96 %), während die Größenauflösung deutlich schlechter ist [106]. Vor allem in Kombination mit (sp)ICP-MS bietet die HDC eine vielversprechende, relativ robuste Methode für die Größenfraktionierung von EM-NPs [116-118]. Da die Kommerzialisierung der Geräte jedoch noch nicht weit fortgeschritten ist und sich erst wenige Arbeitsgruppen mit der HDC auseinandergesetzt haben, wird diese eher mittelfristig eine Option darstellen.

3.6. Extraktionstechniken

Neben der Cloud-Point Extraktion, welche im Rahmen dieser Arbeit intensiv untersucht wurde und der darum ein eigener Abschnitt (s. Kapitel 4.1) gewidmet ist, sind auch andere Methoden zur Anreicherung von Metall-Nanopartikeln denkbar. In Verbindung mit einer elementspezifischen Quantifizierung, z.B. ET-AAS oder ICP-MS erlaubt die selektive Extraktion von Metall-Nanopartikeln die schnelle Bestimmung eines Summenparameters, z.B. die Gesamtkonzentration von Ag-NPs in der Probe, ohne dabei auf die Größenverteilung einzugehen.

Der große Vorteil sämtlicher Extraktionsmethoden ist, dass diese prinzipiell mit allen hier vorgestellten Quantifizierungsmethoden kombiniert werden können. Durch die mit der Extraktion meist einhergehende Anreicherung kann daher das Nachweisvermögen einer Analysemethode deutlich verbessert werden.

3.6.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion

Eine der bekanntesten und am weitesten verbreiteten Extraktionstechniken ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE, engl.: *liquid-liquid-extraction*). Diese beruht auf der unterschiedlichen Verteilung eines Analyten zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten unterschiedlicher Polarität. In einigen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die LLE zur Anreicherung von Metall-Nanopartikeln prinzipiell geeignet ist [119, 120]. Allerdings bringt diese Technik auch große Nachteile mit sich: Da die meisten künstlichen EM-NPs an ihrer Oberfläche eine Funk-

tionalisierung tragen, welche ihnen gute Dispersionseigenschaften in wässrigen Medien verleiht, ist es nicht trivial, diese in eine organische Phase zu extrahieren. Außerdem werden viele EM-NPs erfahrungsgemäß an einer Phasengrenze destabilisiert und neigen dazu, sich abzuscheiden oder zu aggregieren. In den oben zitierten Studien werden darum organische Liganden verwendet, um die die Polarität der Analyt-Nanopartikel zu verändern. Dies führt jedoch zu zusätzlichen Arbeitsschritten und damit zu einer Verkomplizierung der Analyse. Da das Phasenverhältnis zwischen polarer und apolarer Phase nicht beliebig einstellbar ist, sind mit der LLE keine allzu hohen Anreicherungsfaktoren möglich. Außerdem bedeutet die Verwendung der LLE grundsätzlich, potentiell toxische und leicht entflammbare, organische Lösungsmittel zu handhaben, weshalb unter ökologischen und sicherheitstechnischen Aspekten andere Methoden möglicherweise vorzuziehen sind.

3.6.2. Festphasen-Extraktion

Eine weitere Untergruppe von Extraktionstechniken ist die Festphasenextraktion (SPE, von engl.: *solid phase extraction*). Hier erfolgt die Extraktion des Analyten auf einer Säule, welche üblicherweise mit alkylfunktionalisiertem Kieselgel beladen ist. Die zu extrahierende Probe wird über die Säule geleitet, wobei der Analyt zurückgehalten wird. Dieser kann anschließend unter geeigneten Bedingungen wieder freigesetzt werden. Dazu ist meist nur eine geringe Menge organischen Lösungsmittels notwendig. Da es möglich ist, große Probenvolumina über eine relativ kleinen Säule zu leiten, sind sehr hohe Anreicherungsfaktoren möglich. In einer der wenigen zu diesem Thema erschienenen Arbeiten wird ein Anreicherungsfaktor von bis zu 250 erreicht [121]. Die zitierte Arbeit zeigt jedoch auch klar die Nachteile der Methode auf: Die Analysezeit für eine Probe beträgt mehrere Stunden und selbst geringe Konzentration von natürlichem organischem Material (NOM), hier $3,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, können nur durch Behandlung mit H_2O_2 für 24 h toleriert werden; bei höheren NOM-Konzentrationen versagt die Methode komplett.

3.6.3. Ionenaustauscher

Die Anreicherung mittels Ionenaustauscher findet ebenso wie die SPE auf einer Säule statt. In diesem Fall jedoch wird mit einem speziellen Ionenaustauscherharz gearbeitet. Je nachdem, ob Anionen oder Kationen zurückgehalten werden sollen, werden Anionen- bzw. Kationenaustauscher verwendet. Da in Realproben davon auszugehen ist, dass EM-NPs – je

nach Oberflächenfunktionalisierung – unterschiedliche Ladungen tragen, muss auch hier wieder mit Reagenzien zur Oberflächenmodifizierung gearbeitet werden. Ähnlich wie bei der SPE sind mit einem Ionenaustauscher sehr hohe Anreicherungsfaktoren möglich. Es sind jedoch Analysenzeiten von mehr als einem Tag pro Probe notwendig [122, 123], daneben ist auch die Matrixtoleranz des Verfahrens ein limitierender Faktor.

3.7. Fazit

In diesem Kapitel wurden zahlreiche Analysemethoden vorgestellt, jedoch sind die meisten davon trotz unbestreitbarer Vorteile auch mit teils gravierenden Nachteilen behaftet. Dies macht deutlich, dass bei der Quantifizierung von EM-NPs in Umweltproben nach wie vor Handlungsbedarf besteht und alternative Methoden durchaus das Potential besitzen, diese verhältnismäßig junge Disziplin voranzubringen.

4. Verwendete Methoden

Der physikalisch / chemische Hintergrund aller maßgeblichen, in dieser Arbeit verwendeten Techniken und Methoden wird in diesem Abschnitt erklärt. Da es sich in den meisten Fällen um klassische Arbeitsweisen der (analytischen) Chemie handelt, soll jeweils der besondere Bezug zur Analyse von Nanopartikeln hergestellt werden.

4.1. Cloud-Point Extraktion

Wesentliche Teile dieser Arbeit beruhen auf der Anwendung der Cloud-Point Extraktion. Diese Technik, ursprünglich für die Aufreinigung von Proteinen entwickelt [124, 125], macht sich einige spezielle Eigenschaften von nicht-ionischen Tensiden zunutze. Diese bestehen grundsätzlich aus einer hydrophoben Kopfgruppe und einer hydrophilen Endgruppe. Sehr häufig werden bei der CPE Tenside der Triton-X Familie (Octylphenoethoxylate) verwendet (Abbildung 3).

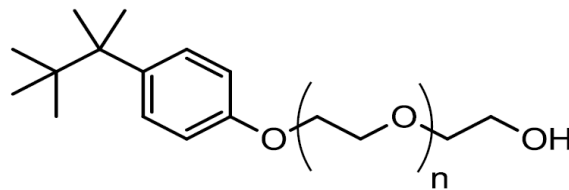


Abbildung 3: Allgemeine Struktur nicht-ionischer Tenside der Triton-X Familie. Für das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Tensid Triton X-114 ist $n = 7 - 8$.

Bei Temperaturen oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts – des sogenannten Trübungspunkts (engl.: *cloud-point temperature*, T_c) – bilden wässrige Lösungen dieser Tenside Mizellen. Voraussetzung dafür ist, dass die Konzentration oberhalb der tensidspezifischen kritischen mizellaren Konzentration (*c.m.c.*, von engl.: *critical micellar concentration*) liegt. Das in dieser Arbeit verwendete Tensid Triton-X 114 (TX-114) bildet Mizellen, welche aus etwa 80 einzelnen Tensidmolekülen bestehen [126, 127]. Bei Temperaturen kleiner als T_c sind die Tenside dagegen in Wasser löslich, die Lösung ist klar (Abbildung 4a).

Der Prozess der Mizellbildung ist entropiegetrieben und komplett reversibel [128]. Die frei werdende Mizellbildungsentropie ΔS_m beruht hauptsächlich auf der Entsolvatisierung der Tensidmoleküle: Die Mizellbildung führt – in vereinfachter Darstellung – dazu, dass Wasser-

moleküle, welche zuvor um die hydrophoben Bereiche des Tensids koordiniert sind, frei werden und sich somit der Entropiegrad des Systems erhöht [128].

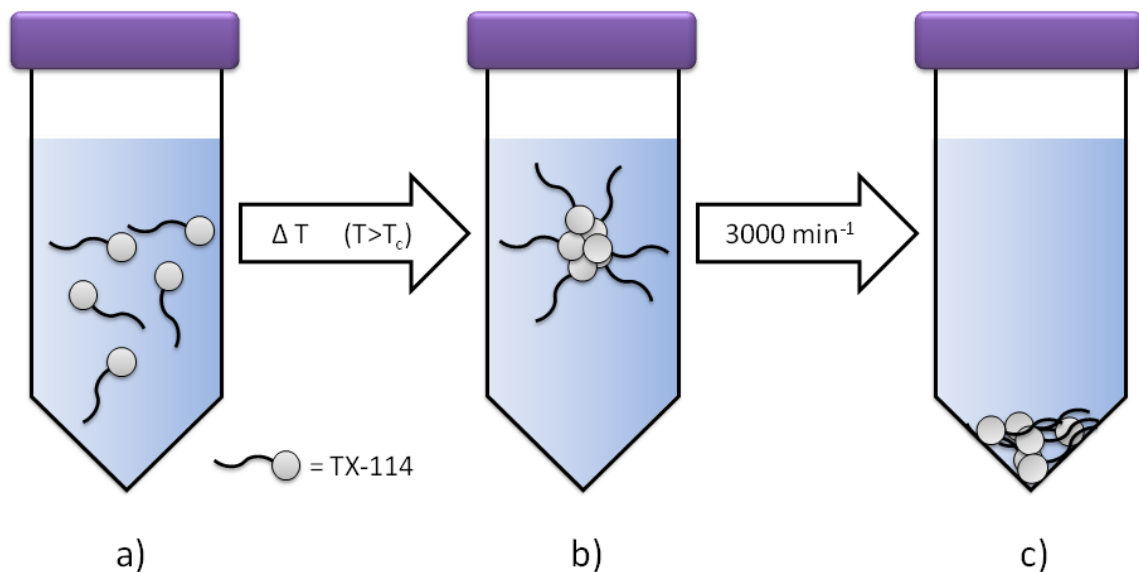


Abbildung 4: Schematischer Ablauf einer Cloud-Point Extraktion (nicht maßstabsgetreu); das Tensid TX-114 ist dargestellt als Kombination aus hydrophober Kopfgruppe (•) und hydrophilem Polyglycolschwanz (~). (a) die (wässrige) Probe mit dem Tensid vor der Extraktion bei $T < T_c$; (b) Bildung von Mizellen nach Erhöhen der Temperatur ($T > T_c$); (c) Abscheidung der Tensid-Phase am Boden des Probengefäßes nach Zentrifugation (in diesem Fall bei 3000 Umdrehungen pro Minute).

Makroskopisch zeigt sich die Mizellbildung in Form einer Trübung der anfangs klaren Lösung. Faktoren, welche die Mizellbildung beeinflussen sind, neben der Wahl des Tensids, unter anderem Temperatur, Tensidkonzentration, Salzgehalt der Lösung, Additive und der pH-Wert [129]. Mikroskopisch erhält man somit ein Zwei-Phasen-System (vgl. Abbildung 4b), bestehend aus feinverteilten hydrophoben Kompartimenten, welche durch die Kopfgruppen des Tensids im Inneren der Mizellen gebildet werden, und der umliegenden wässrigen Phase, in welche die hydrophilen Endgruppen ragen und wo das Tensid nur mehr in stark abgereicherter Konzentration vorliegt. Dieses System ist dynamisch, ständig brechen bestehende Mizellen auf, während sich andere neu bilden. Lipophile Substanzen können darum effektiv in die Mizellen aufgenommen werden, selbst wenn sie zunächst noch in der wässrigen Phase vorliegen.

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Mizellen und der umgebenden Flüssigkeit kommt es zur Phasentrennung in eine wässrige und eine tensidreiche Phase. Die Phasentrennung

kann durch Zentrifugieren beschleunigt werden (vgl. Abbildung 4c). Da das Volumen der Tensidphase im Vergleich zum Volumen der wässrigen Phase klein gewählt werden kann, ist eine Anreicherung des Analyten möglich.

Der Analytiker kann sich nun diesen Effekt zunutze machen, um hydrophobe Substanzen im Inneren der Mizellen zu extrahieren. Die erste praktische Anwendung dieses Verfahrens war, wie oben erwähnt, die Aufreinigung von Proteinen. Schnell fanden sich aber auch in der Umweltanalytik zahlreiche Anwendungen: Neben genuin hydrophoben Substanzen, wie Pestiziden [130, 131], Membranproteinen [125] und polyzyklisch-aromatischen Kohlenwasserstoffen [130, 132] können auch Metallionen extrahiert werden [133]. Dafür muss jedoch ein passender (Chelat-) Ligand zugegeben werden, welcher mit dem Metall einen hydrophoben Komplex bildet. Entsprechende Methoden sind für beinahe alle Metalle des Periodensystems bekannt [134].

Für TX-114, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, liegt der *c.m.c.*-Wert bei 0,23 mM, T_c beträgt in reinem Wasser 23 – 25 °C [127]. Dies hat den Vorteil, dass bei geringer Tensidkonzentration und niedrigen Temperaturen gearbeitet werden kann, wodurch eine hohe Anreicherung möglich ist. Gleichzeitig kann die thermische Beanspruchung des Analyten niedrig gehalten werden.

Zur anschließenden Quantifizierung des Analyten kommen grundsätzlich verschiedene Methoden in Frage. Zu beachten ist allerdings, dass der hohe Tensidgehalt nicht mit allen instrumentell-analytischen Techniken kompatibel ist. Für die Elementanalytik kommen dabei hauptsächlich Atomabsorptions- (ET-AAS, F-AAS) und Massenspektrometrie (ICP-MS) zum Einsatz. Da bei der ICP-MS die Viskosität der Proben die Zerstäubung – und damit die Quantifizierung beeinflusst – ist hier vor der Messung meist ein nasschemischer Aufschluss der Tensid-Phase notwendig.

Der größte Vorteil der CPE – verglichen mit flüssig-flüssig Extraktionstechniken – ist, dass in diesem Fall die Extraktion aus einer zunächst homogenen Lösung erfolgen kann. Erst bei Temperaturen oberhalb von T_c findet die Phasentrennung – und damit die Extraktion – statt. Da sich das Extraktionsmittel bei Temperaturen unterhalb von T_c in Wasser gleichmäßig verteilen kann, sind Durchmischungseffekte, wie sie in der klassischen LLE vorkommen, von

vornherein ausgeschlossen. Darum kann bei der CPE auch mit wesentlich geringeren Konzentrationen des Extraktionsmittels gearbeitet werden, was eine höhere Anreicherung zulässt.

Für die CPE verwendete Tenside sind zum größten Teil nicht toxisch und nur in geringem Maße umweltschädlich. Damit bietet die CPE gegenüber der LLE auch unter den Gesichtspunkten Arbeits- und Umweltschutz Vorteile. Außerdem denaturieren die meisten Tenside, im Gegensatz zu organischen Lösungsmitteln, empfindliche Analyten wie Proteine oder Nanopartikel nicht. Dadurch wird verhindert, dass Extrakte unbrauchbar oder nachfolgende Messungen verfälscht werden. Ein weiterer Vorteil der CPE ist die schnelle Equilibrierung des Systems, was, in Verbindung mit einer durch Zentrifugation beschleunigten Phasentrennung, Analysezeiten von unter einer Stunde erlaubt.

Der größte Nachteil der CPE ist sicherlich, dass die Tensidphase auch nach der Extraktion eine sehr anspruchsvolle Matrix darstellt. Während die bei der LLE üblicherweise eingesetzten, organischen Lösungsmittel sehr leicht durch Evaporation entfernt werden können, ist dies mit den gängigen Tensiden nicht möglich. Deren Siedepunkt liegt bei über 200 °C und geht einher mit der thermischen Zersetzung bzw. Pyrolyse des Tensids. Es muss also bei allen nachgeschalteten Analysetechniken sichergestellt werden, dass diese mit der resultierenden Matrix kompatibel sind. Ein weiterer Nachteil, welcher nicht nur für die CPE, sondern auch für viele weitere Extraktionstechniken gilt, ist die bisweilen sehr geringe Selektivität. Die Trennung erfolgt lediglich nach dem Verteilungskoeffizienten zwischen organischer und wässriger Phase. So kann zwar ein Analyt, wie etwa bestimmte Nanopartikel, extrahiert werden. Gleichzeitig werden aber noch zahlreiche andere Stoffe, zum Beispiel Huminsäuren [135], welche bei den gewählten Bedingungen bevorzugt in die lipophilen Kompartimente wandern, mitextrahiert. Es ist also wichtig, für eine selektive Bestimmung eines Analyten eine entsprechend selektive Analysetechnik nachzuschalten.

Wie bereits erwähnt, können auch (Metall-)Nanopartikel mittels CPE extrahiert und angereichert werden. Darüber hinaus können diese, bei geeigneten Bedingungen, von Metallionen desselben Elements abgetrennt werden. Kriterium ist auch hier die Ladung der Analyten. Da die Ladung von Nanopartikeln stark vom pH-Wert abhängt [136], ist es wichtig, diesen für die Extraktion mit einem Puffer entsprechend einzustellen. Um zu verhindern, dass auch Metall-Ionen mitextrahiert werden, welche die Messung der Nanopartikel verfälschen,

können diese mit passend gewählten Liganden in anionische Komplexe überführt werden. Diese bleiben bevorzugt in der wässrigen Phase.

Tabelle 1: Übersicht über den momentanen Stand der Technik bei der Anwendung der CPE für die Extraktion von Nanopartikeln. Neben dem Analyten und dem für die CPE verwendeten Tensid ist, falls zutreffend, auch der verwendete Ligand für die Speziestrennung angegeben. Es wird unterschieden zwischen analytischen und sonstigen Anwendungen. Letztere umfassen, nach Angaben der Autoren, u.a. die Aufreinigung von NPs, Reinigung von kontaminierten Gewässern und Recycling von NPs. Bei den analytischen Anwendungen werden dabei auch die Detektionstechnik und die erreichte Nachweisgrenze (NWG) angegeben.

Analyt	Verwendetes Tensid	Verwendeter Ligand	Anwendung	Detektion (NWG)	Quelle
Ag-NPs	TX-114	Na ₂ S ₂ O ₃	Analytisch	ICP-MS 6 ng·L ⁻¹	[136]
Ag-NPs	TX-114	EDTA	Analytisch	ET-AAS 0,7 ng·L ⁻¹	Diese Arbeit, [137]
Au-NPs, Pd-NPs	TX-114 / TX-100 Mischungen	-	Sonstige	-	[138]
Au-NPs	TX-114	Na ₂ S ₂ O ₃	Analytisch	ET-AAS 6 ng·L ⁻¹	Diese Arbeit, [139]
CuO-NPs	TX-114	-	Sonstige	-	[140]
ZnO-NPs	TX-114	EDTA	Analytisch	ICP-MS 50 ng·L ⁻¹	[141]

4.2. Elektrothermale Atomabsorptionsspektrometrie

4.2.1. Vergleich mit anderen Quantifizierungsmethoden

Für die Quantifizierung von Edelmetall-Nanopartikeln im Anschluss an die CPE bieten sich mehrere instrumentell-analytische Verfahren an, nämlich Totalreflektions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TRFA), Massenspektrometrie (MS), Atomemissions- (AES) und Atomabsorptionsspektrometrie (AAS). Röntgenfluoreszenz, insbesondere die TRFA, bietet eine gute Möglichkeit, Metalle zerstörungsfrei nachzuweisen, allerdings sind die in diesem Fall erreichten Nachweisgrenzen für Edelmetalle schlechter als für andere Methoden [142]. Auch ist eine störungsfreie Messung für verschiedene Edelmetalle im Spurenbereich nur mit Geräten möglich, welche eine sehr hochenergetische Röntgenstrahlung erzeugen. Aufgrund der im Vergleich zu AAS und ICP-MS mäßigen Nachweisgrenze scheidet auch die AES für die meisten Edelmetalle aus [142].

Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer Methode entwickelt, die aus der Elementanalytik nicht mehr wegzudenken ist. Konsequenterweise nutzen auch die ersten Studien, die zur CPE von Metall-NPs durchgeführt wurden, ICP-MS zur Quantifizierung. Dabei wurden in Wasser Nachweisgrenzen von $6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ für Ag-NPs erreicht [136]. Bei der ICP-MS wird die Probe durch einen Zerstäuber in das Plasma eingebracht, weswegen die Viskosität der Probe einen großen Einfluss auf die Quantifizierung hat. Darum müssen hier die Tensid-Proben, wie bereits erwähnt, zunächst aufgeschlossen werden. Neben dem damit verbundenen Arbeitsaufwand kommt es hier auch zu einer starken Verdünnung der Probe, teilweise um den Faktor 100 oder mehr. So wird einer der großen Vorteile der CPE, nämlich die Anreicherung des Analyten, im nächsten Schritt wieder zunichte gemacht.

Mit der elektrothermalen Atomabsorptionsspektrometrie steht jedoch eine Methode zur Verfügung, welche sowohl eine hohe Matrixtoleranz in Bezug etwa auf Tenside, als auch eine hohe Nachweisstärke und Selektivität bei der Messung von Edelmetallen aufweist. Mittels eines geeigneten Temperaturprogramms kann die organische Matrix sehr einfach eliminiert und der Analyt störungsfrei gemessen werden.

4.2.2. Theoretische Grundlagen der AAS [108, 143]

Die AAS beruht auf der Anregung von Valenzelektronen durch elektromagnetische Strahlung. Dabei kommt es zur resonanten Absorption von Photonen durch die in der Probe enthaltenen Atome. Die Energie der absorbierten Photonen entspricht dabei der Energiedifferenz zwischen Grundzustand und elektronisch angeregtem Zustand des Elektrons. Die genaue Lage dieser Absorptionswellenlängen – oftmals auch als Spektral- oder Absorptionslinien bezeichnet – ist also durch die elektronische Struktur des Atoms determiniert. Zur Veranschaulichung dieses Zusammenhangs wird oft das Termschema eines Elements herangezogen (vgl. Abbildung 5).

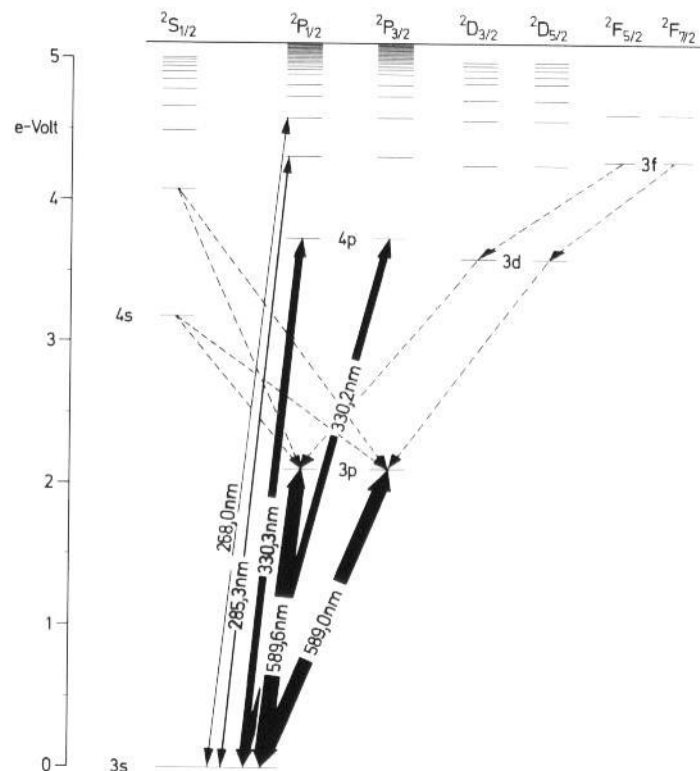


Abbildung 5: Termschema des Natrium-Atoms. Die Pfeile symbolisieren elektronische Übergänge, die durch die Absorption von Photonen angeregt werden können. Die Breite der Pfeile symbolisiert dabei die Wahrscheinlichkeit des Übergangs und damit die Intensität der entsprechenden Spektrallinie. Entnommen aus [143].

Da sich die elektronische Struktur – insbesondere die der Valenzelektronen – mit dem Redox-Zustand des Atoms dramatisch ändert, muss die Probe vor der Messung atomisiert werden. Bei der ET-AAS wird dazu ein, durch elektrischen Widerstand beheiztes, Graphitrohr verwendet (vgl. Kapitel 4.2.6).

Wenn nun die Atomwolke, die durch die Atomisierung der Probe erzeugt wurde, mit Licht auf der Absorptionswellenlänge eines in der Probe vorhandenen Elements durchstrahlt wird, wird ein Teil des Lichts absorbiert. Diese Abschwächung kann gemessen und zur Quantifizierung dieses Elements in der Probe herangezogen werden. Zur Beschreibung dieses Zusammenhangs wird das *Lambert-Beer'sche* Gesetz (Gleichung 2) herangezogen.

$$E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (2)$$

Dabei ist E_{λ} die Extinktion bei der Wellenlänge λ , I_0 die Intensität des eingestrahlt Lichts und I die Intensität des Lichts nach Passieren der Probe; ε_{λ} ist der Extinktionskoeffizient des Analyten bei der Wellenlänge λ , c die Analytkonzentration und d die Schichtdicke der Probenkammer. Reale Systeme bei der ET-AAS werden von dieser Gleichung jedoch nur schlecht beschrieben: Erstens ist d nicht genau bekannt bzw. zu definieren, zweitens beschreibt c in Gleichung 2 genau genommen die Konzentration des Analyten in der Atomwolke, jedoch nicht in der Probe selbst, und drittens treten neben der hier beschriebenen resonanten Absorption noch weitere Prozesse auf, welche zu einer Abschwächung des Lichts führen, nämlich Reflexion sowie unspezifische Streuung und Absorption, etwa durch Moleküle oder Rußteilchen. Darum wird für die ET-AAS eine allgemeiner gefasste Version des Lambert-Beer'schen Gesetz (Gleichung 3) verwendet.

$$E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = k \cdot c' \quad (3)$$

Hier ist c' die Konzentration des Analyten in der Probe und k eine Konstante, welche neben ε_{λ} viele weitere Faktoren, einschließlich der Geometrie des Stahlgangs (entspricht d aus Gleichung 2), die Atomisierungsrate des zu bestimmenden Elements bei den gegebenen Messbedingungen und das aufgegebenes Probenvolumen beinhaltet. Ist k nach Durchführung einer Kalibrierung bekannt, kann die Konzentration des Analyten auch in unbekanntes Proben bestimmt werden.

4.2.3. Untergrundkorrektur [143, 144]

Keine Abhilfe schafft diese Herangehensweise jedoch für die oben angesprochenen Prozesse der unspezifischen Streuung und Absorption, welche einen Untergrund bei der Messung der resonanten Atomabsorption bilden. Es muss daher eine Untergrundkorrektur erfolgen,

mittels derer der Anteil der Atomabsorption des Analyten an der gesamten Extinktion ermittelt wird. Moderne ET-AA-Spektrometer nutzen dabei meistens den nach seinem Entdecker benannten *Zeeman*-Effekt. Dieser zeigte 1897, dass sich Absorptionslinien von Elementen beim Anlegen eines magnetischen Feldes aufspalten [145]. Aus einer Resonanzlinie bei der Wellenlänge λ_0 werden dabei drei Linien: Eine Linie (π), welche parallel zum Magnetfeld linear polarisiert ist und zwei weitere Linien σ^+ / σ^- welche zirkular polarisiert sind. Bezogen auf λ_0 sind σ^+ und σ^- spektral verschoben (vgl. Abbildung 6).

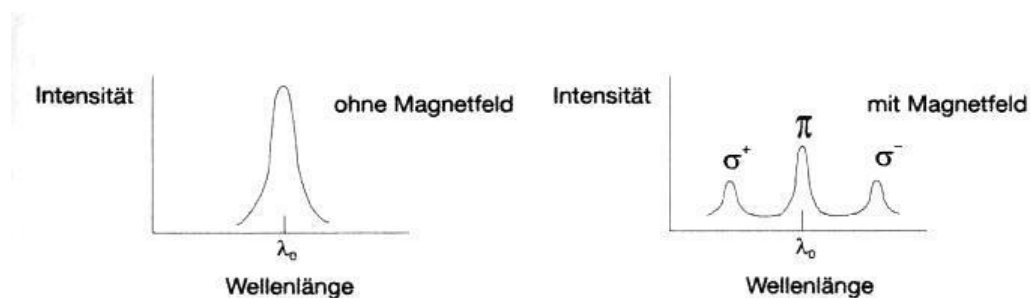


Abbildung 6: Symbolische Darstellung einer Absorptionslinie ohne (links) und mit (rechts) angelegtem Magnetfeld. Bei Anlegen eines Magnetfelds kommt es zur Aufspaltung der ursprünglichen Linie in drei Komponenten (π / σ^+ / σ^-). Entnommen aus [146].

Wird dabei das Magnetfeld parallel zum Strahlengang angelegt (longitudinaler *Zeeman*-Effekt), so erscheint die π -Komponente nicht im Spektrum, da sich in diesem Fall das Licht parallel zur Richtung des elektrischen Vektors der π -Komponente ausbreitet. Bei der Wellenlänge λ_0 kann nun also nicht-resonante Absorption, d.h. der Untergrund, gemessen werden. Im feldfreien Fall dagegen wird sowohl die elementspezifische, als auch die unspezifische Absorption erfasst (vgl. Abbildung 7). Durch Subtraktion des Absorptionswerts bei angelegtem Magnetfeld vom Wert ohne Magnetfeld kann man also eine effektive Untergrundkorrektur durchführen.

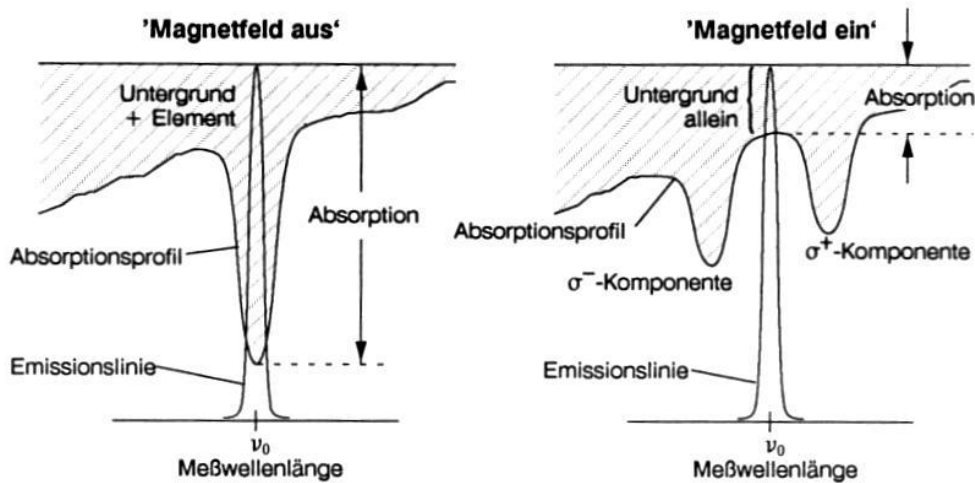


Abbildung 7: Veränderung des Absorptionsprofils einer hypothetischen Probe ohne (links) und mit (rechts) parallel zur Beobachtungsrichtung angelegtem Magnetfeld. Zu beachten ist hierbei besonders die tatsächlich gemessene Absorption (jeweils rechts im Bild). Entnommen aus [144].

4.2.4. Aufbau

Generell besteht ein ET-AAS-Spektrometer, wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt, aus folgenden Komponenten: Strahlungsquelle (vgl. Kapitel 4.2.5), Graphitrohrfen (vgl. Kapitel 4.2.6), einem optischen System, bestehend aus verschiedenen Spiegeln und einem Monochromator, sowie einem Detektor. Letzterer ist, vor allem bei älteren Geräten, oft ein Photomultiplier, während bei modernen Geräten – wie dem für diese Arbeit verwendeten – Halbleiterdetektoren verbaut werden. Diese zeichnen sich vor allem durch ein besseres Signal-zu-Rauschen-Verhältnis aus.

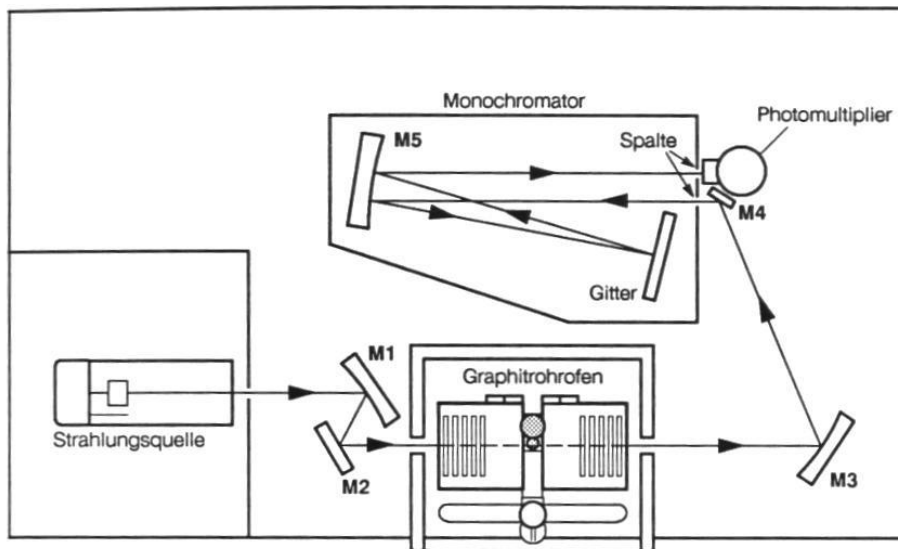


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines ET-AAS-Spektrometers, bestehend aus Strahlungsquelle, Graphitrohrföfen, Monochromator und Detektor (aus [144]). M1 – M5: Spiegel.

Nicht in Abbildung 8 enthalten, aber dennoch zum Aufbau gehörend, sind der *Zeeman*-Magnet für die Untergrundkorrektur, ein automatischer Probengeber („Autosampler“) und die Steuer- und Auswerte-Elektronik, die über einen PC bedient wird.

4.2.5. Strahlungsquelle [142, 143]

In der AAS werden als Strahlungsquelle bevorzugt Linienstrahler eingesetzt, welche genau auf der Absorptions-Wellenlänge des zu messenden Elements emittieren. Die Selektivität der Messung und die Leistungsfähigkeit der Untergrundkorrektur nämlich hängen maßgeblich von der spektralen Bandbreite des eingestrahltten Lichts ab. Für die meisten Metalle wird dazu eine Hohlkathodenlampe (HKL) eingesetzt, deren Aufbau in Abbildung 9 dargestellt ist.

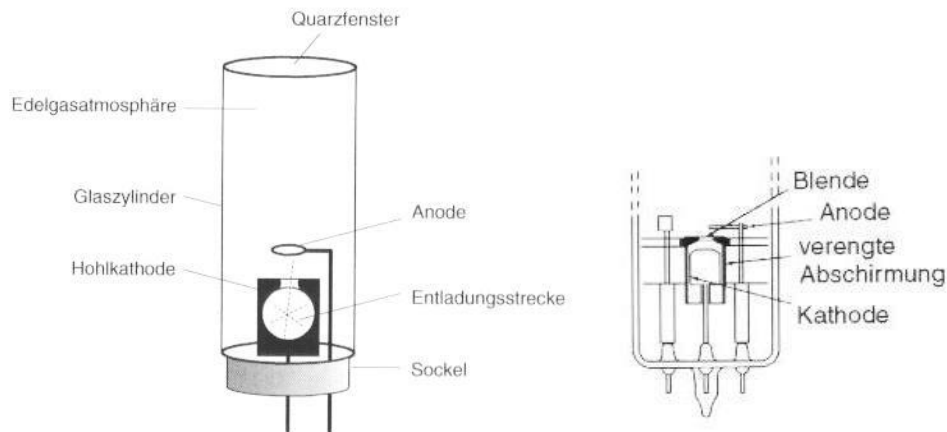


Abbildung 9: Aufbau einer HKL: links der Lampenkörper, welcher im unteren Teil aus Glas und im oberen Teil aus Quarzglas besteht und mit einem Edelgas gefüllt ist (aus [142]). Rechts eine detaillierte Skizze des Anoden- bzw. Kathoden-Teils der HKL (aus [143]).

Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen Anode und Kathode wird das Füllgas (meist Argon) angeregt und teilweise ionisiert. Die Edelgas-Ionen treffen auf die Kathode, welche aus dem zu analysierenden Element besteht, und schlagen beim Aufprall Kathodenmaterial heraus. Die freigesetzten Metall-Atome prallen nun auf angeregte Edelgasatome oder Elektronen und werden dadurch ihrerseits elektronisch angeregt. Die Relaxation erfolgt durch Emission elementspezifischer elektromagnetischer Strahlung, deren Halbwertbreite (ca. 1 – 10 pm) im Vergleich zur Wellenlänge (ca. 200 – 800 nm) außerordentlich schmal ist und so zur Messung bei der AAS sehr gut verwendet werden kann.

4.2.6. Atomisator [143]

Bei der ET-AAS-Messung einer flüssigen Probe sind einige Prozessschritte notwendig: zunächst müssen das Lösungsmittel und organische Matrixkomponenten entfernt werden (Trocknung und Pyrolyse). Erst dann soll der Analyt, welcher als Ion oder als Bestandteil einer chemischen Verbindung vorliegen kann, atomisiert werden. Die ersten AAS-Geräte, die nach der Entwicklung der Methode durch *Sir Alan Walsh* 1955 [147] hergestellt wurden, benutzten dafür ausnahmslos einen Gasbrenner („Flamme“). Die Flammen-AAS (F-AAS) ist auch heute noch eine der am weitesten verbreiteten Analysenmethoden.

Durch die Verwendung eines Graphitrohrs als Atomisator, was von *L'vov* Mitte der 1950er Jahre entwickelt wurde, und dem 1970 von der Firma *PerkinElmer* erstmals kommerziell

hergestellten querbeheizten Graphitrohr-Atomisators (THGA, engl.: *transversally heated graphite atomizer*), lässt sich das Nachweisvermögen der AAS für viele Elemente nochmals deutlich verbessern. Ein solche Graphitrohr-Atomisator (Abbildung 10) kann, aufgrund seines hohen *Ohm'schen* Widerstands, durch Anlegen von elektrischem Strom sehr schnell und definiert erhitzt werden.

Die zuvor erwähnten Schritte (Trocknung, Pyrolyse, Atomisierung) können somit innerhalb eines genau definierten Temperaturprogramms erfolgen, welches durch Variation der Stärke des am Graphitofen anliegenden Stromes erreicht wird. Die Technik wird daher als elektrophotermale AAS bezeichnet. Durch den Aufbau des Graphitrohrs mit einer speziellen Plattform für die Probenaufgabe (*L'vov*-Plattform) und die transversale Beheizung wird eine gleichmäßige Temperatur innerhalb der Messzelle und eine effektive Atomisierung erreicht.

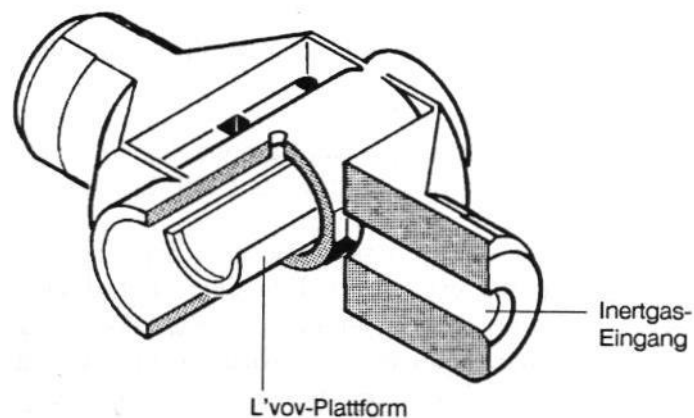


Abbildung 10: Skizze eines in der ET-AAS verwendeten Graphitrohrs mit *L'vov*-Plattform (aus [144]). Die Probe wird durch das oberhalb der Plattform angedeutete Loch zupipettiert.

4.2.7. ET-AAS und CPE

Es wurde bereits angedeutet, dass sich die ET-AAS sehr gut dafür eignet, Proben mit hohem Tensid-Gehalt, wie sie bei der CPE anfallen, zu analysieren. Darum ist es nicht verwunderlich, dass ein erheblicher Anteil aller Arbeiten zur Bestimmung von Metallen mit CPE die ET-AAS zur Quantifizierung nutzt [134, 148, 149]. Während andere Techniken, wie etwa ICP-MS, unter einer hohen Tensidkonzentration in der Probe leiden, kann die Nachweisgrenze der

ET-AAS durch die Zugabe von Tensid oder organischen Lösungsmitteln sogar verbessert werden [150]. Grund hierfür ist, dass tensidhaltige Lösungen bessere Benetzungseigenschaften für Graphit aufweisen und sich solche Proben schon vor der Atomisierung besser im Graphitrohr verteilen [150]. Es wurden mit der ET-AAS nach Anreicherung mit CPE Nachweisgrenzen von $2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ für Gold [151], $14 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ für Palladium [152] und $1,2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ für Silber [153] erreicht, ohne jedoch dabei auf verschiedene Spezies einzugehen. Auch die F-AAS eignet sich zur direkten Messung von CPE-Extrakten, jedoch liegen die Nachweisgrenzen hier teils deutlich höher [142]. Für Gold wurde, durch Messung mit der ET-AAS, bei ansonsten annähernd identischen Extraktionsbedingungen, die Nachweisgrenze um den Faktor 260 gegenüber der F-AAS verbessert [154]. Bei diesen Beispielen wurde aber jeweils nur der Gesamtgehalt des jeweiligen Elements bestimmt, teilweise erst nach Säureaufschluss. Zu Beginn dieser Arbeit, im März 2011, gab es noch keine Veröffentlichung², welche die attraktive Kombination von CPE und ET-AAS für die Quantifizierung von EM-NPs aufzeigt.

4.3. UV/Vis-Photometrie [108, 142]

Die Photometrie im Spektralbereich von ultraviolettem und sichtbarem Licht (UV/Vis-Photometrie) ist eine sehr weit verbreitete Methode zur Charakterisierung und Quantifizierung von verschiedenen organischen und anorganischen Analyten. Die Methode beruht auf der resonanten Absorption von Licht bei der elektronischen Anregung von Valenzelektronen. Die Lage des Absorptionsmaximums lässt dabei Rückschlüsse auf die Struktur des Analyts zu, während über die Messung der Extinktion dessen Konzentration bestimmt werden kann (Lambert-Beer'sches Gesetz).

Viele Metall-Nanopartikel, allen voran Silber und Gold, zeigen im sichtbaren Bereich eine starke Lichtabsorption [155, 156]. Dies ist zurückzuführen auf die Anregung von Oberflächenplasmonen, also die kollektive Anregung von freien Elektronen. Da die Resonanzfrequenz maßgeblich von Form, Größe und chemischer Zusammensetzung der Partikel abhängt [155, 157], ist die UV/Vis-Spektrometrie eine geeignete Charakterisierungsmethode für viele EM-NPs [158, 159]. Jedoch ist diese auf vergleichsweise einfache Systeme und hohe NP-Konzentrationen limitiert.

² lt. Datenbankrecherche mit *SciFinder*[®] sowie im *Web of Science*[™]

4.4. Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie [108, 142]

Im Spektralbereich des infraroten Lichts (IR, Wellenzahl $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$; entsprechend einer Wellenlänge von $2,5 - 25 \text{ }\mu\text{m}$) erfolgt die Anregung von Molekülschwingungen. Da sich viele charakteristische IR-Absorptionsbanden einzelnen funktionellen Gruppen zuordnen lassen, ist die IR-Spektroskopie für die Strukturaufklärung organischer Moleküle gut geeignet. Das für diese Arbeit verwendete IR-Spektrometer funktioniert nach dem Prinzip der abgeschwächten Totalreflektion (ATR, von engl.: *attenuated total reflection*). Dabei wird IR-Strahlung durch einen entsprechenden Lichtleiter an eine Oberfläche geleitet, an welcher es zu einer Totalreflektion der Strahlung kommt. Es wurde jedoch beobachtet, dass sich das Feld der Strahlung auch jenseits der Oberfläche, an der es reflektiert wird, ausbreitet. Die Dicke dieses *evaneszenten Feldes* entspricht grob der einfachen Wellenlänge der reflektierten Strahlung, also einigen μm . IR-aktive Substanzen, welche sich innerhalb des evaneszenten Feldes befinden, absorbieren einen Teil der Strahlung. Durch Messung der Abschwächung der Strahlung kann ein IR-Spektrum gemessen und anhand dessen Information über die Struktur des Analyten erhalten werden. Die besonderen Vorteile dieser Methode sind, dass nur sehr kleine Probemengen benötigt werden (1 mg oder weniger) und auch Feststoffe direkt analysiert werden können. Aufgrund dieser Eigenschaften ist die Methode für die Charakterisierung der Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln ideal, wenn diese zuvor als Feststoff isoliert werden.

Durch die Verwendung der Fourier-Transformations-Analyse (FT), bei der durch mathematische Umformung aus einem Interferogramm das IR-Spektrum errechnet wird, können innerhalb kurzer Zeit viele Spektren der Probe gemessen werden, was unter anderem zu einem verbesserten Signal-zu-Rauschen-Verhältnis und kürzeren Analysenzeiten führt.

4.5. Dialyse [160, 161]

Die Dialyse ist eine Technik zur Abtrennung kleiner Moleküle und Ionen (z.B. Salze, Zucker,...) aus Lösungen. Die Trennung erfolgt an einer Membran, welche Poren eines gewissen Durchmessers besitzt (*cut-off*-Durchmesser) und von größeren Molekülen oder Partikeln nicht durchquert werden kann. Man kann die Dialyse daher für die Aufreinigung von Makromolekülen oder Nanopartikeln verwenden. Die treibende Kraft dabei ist die Diffusion der zu entfernenden Teilchen. Es muss zu einer effizienten Aufreinigung einer Substanz also ein Kon-

zentrationsgradient zwischen beiden Seiten der Membran errichtet werden. Daraufhin ist das System bestrebt, den unterschiedlichen osmotischen Druck auf beiden Seiten der Membran auszugleichen. Dies geschieht, indem Ionen oder Moleküle von der einen Seite der Membran auf die andere wandern. Eine einfache Möglichkeit, dies in der Praxis zu realisieren, ist, die mit der zu reinigenden Substanz gefüllte, schlauchförmige Membran in ein Bad zu geben, welches mit einem Überschuss an Reinstwasser gefüllt ist.

Eine klassische Anwendung der Dialyse ist die Aufreinigung von biologischen Makromolekülen (DNA, Proteine) in der Biochemie. Allerdings kann die Dialyse auch zur Reinigung von Kolloiden bzw. Nanopartikeln verwendet werden [162]. In einer typischen Nanopartikel-Synthese enthält das Produkt, neben den erwünschten Nanopartikeln, weitere Bestandteile, wie etwa unverbrauchtes Reduktionsmittel, nicht reduzierte Metall-Kationen, sowie die jeweiligen Gegenionen der eingesetzten Salze. Um eine möglichst reine, definierte Nanopartikel-Suspension zu erhalten, sollte das Produkt darum nach der Synthese mittels Dialyse gereinigt werden.

4.6. Transmissionselektronenmikroskopie [163, 164]

Wie bereits erwähnt, stellt die TEM (vgl. Abbildung 11), besonders in Kombination mit EDX, eine hervorragende Methode zur Charakterisierung einzelner Nanopartikel dar. Zur Abbildung von Objekten im nm-Größenbereich werden diese mit hochenergetischen Elektronen durchstrahlt. Anhand der nichtgestreuten Elektronen kann man ein Bild der Probe erhalten, dessen Auflösung von der *de-Broglie*-Wellenlänge der eingestrahlten Elektronen abhängt. In diesem Bild erscheinen Bereiche, in denen die Elektronen von der Probe stark gestreut oder reflektiert werden dunkel, und Bereiche, die den Elektronenstrahl fast nicht abschwächen, hell. Der Kontrast für Atome höherer Ordnungszahl ist daher höher, da diese Elektronen stärker streuen und somit weniger Elektronen den Detektor erreichen. Schwere Elemente, wie z.B. Gold, lassen sich darum besonders gut messen. Momentan liegt das technisch machbare Limit der Auflösung für die TEM im Bereich von 0,05 nm [165].

Zur Messung von Nanopartikel-Suspensionen wird die Probe auf einem Probenträger fixiert, der die Messung möglichst wenig beeinflussen sollte. Ein idealer Probenträger ist darum sehr dünn und besteht aus einem Material mit niedriger Ordnungszahl, in der Praxis hauptsächlich aus Kohlenstoff.

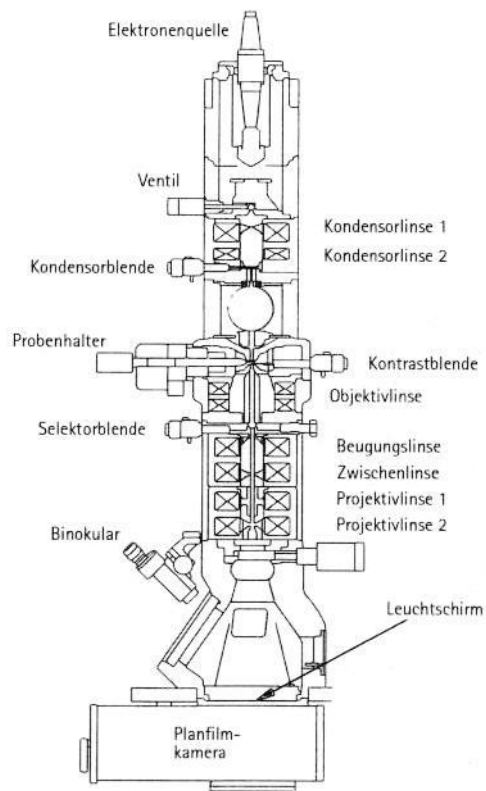


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Transmissions-Elektronenmikroskops (aus [164]).

Zusätzliche Information über den Aufbau der Probe können durch die Kombination der Elektronenmikroskopie mit EDX erhalten werden. Dabei wird die Röntgenfluoreszenz gemessen, die von der Probe bei Anregung durch den für die TEM verwendeten, fokussierten Elektronenstrahl emittiert wird. Das Spektrum der freigesetzten Strahlung ist elementspezifisch. Da die Auflösung im Wesentlichen nur von der Breite des Röntgenstrahls limitiert ist [163], kann die elementare Zusammensetzung der Probe mit einer Auflösung < 1 nm bestimmt werden.

5. Experimenteller Teil

5.1. Allgemeines

Sämtliche Experimente wurden entsprechend den Arbeitsmethoden der Spurenanalytik durchgeführt. Alle Glasgefäße wurden vor der Benutzung dreifach mit verdünnter HNO_3 (1:10) gespült, anschließend 4 h mit Salpetersäure ausgedämpft, dreifach mit Reinstwasser (UPW) gespült und verschlossen in einer partikelfreien Umgebung gelagert. Nach Kontakt mit Goldlösungen wurden die Gefäße zusätzlich für 24 h mit Königswasser behandelt. Sämtliche verwendeten Chemikalien und Gebrauchsgegenstände, welche mit der Probe in Kontakt kommen, wurden zuvor auf Kontamination durch das jeweilige Metall getestet.

5.2. Synthese von Gold-Nanopartikeln

Citratstabilisierte Au-NPs wurden nach einer am Lehrstuhl entwickelten Vorschrift hergestellt, welche im Wesentlichen auf der Methode von *Haiss et al.* beruht [159]. Dafür werden 96 mL UPW mit 2 mL 1 % Citronensäure (m/v in UPW) versetzt und 10 min gerührt. Zu dieser Lösung wird 1 mL Gold-Standardlösung (HAuCl_4 in 2 M HCl, $c(\text{Au}) = 1.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) zugegeben und erneut für 10 min gerührt. Zuletzt wird 1 mL einer eisgekühlten NaBH_4 Lösung ($75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 1 % Citronensäure) rasch zugegeben. Unter Gasentwicklung kommt es zur Reduktion des Golds, die Farbe der Reaktionsmischung ändert sich von leicht gelblich hin zu einem intensiven Violett. Nach weiterem Rühren für 10 min ist die Reaktion abgeschlossen. Die hergestellte Suspension enthält Au-NPs einer mittleren Größe von 10 – 20 nm und ist bei Lagerung unter Lichtausschluss für mehrere Wochen stabil.

5.3. Synthese von Silber-Nanopartikeln

5.3.1. Citratfunktionalisierte Silber-Nanopartikel

In Analogie zur Herstellung citratstabilisierter Au-NPs werden citratstabilisierte Silber-Nanopartikel (CA@Ag-NPs) durch Zugabe von 1 mL einer eisgekühlten NaBH_4 Lösung ($75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 1 % Citronensäure) zu einer Mischung aus 92 mL UPW, 6 mL 1 % Citronensäure und 1 mL Silber-Standardlösung (AgNO_3 in 0,5 M HNO_3 , $c(\text{Ag}) = 1.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) unter konstantem Rühren hergestellt. Die Reaktion verläuft sehr rasch. Unter Gasentwicklung färbt sich die zunächst farblose Reaktionsmischung durch Bildung der Ag-NPs gelb.

5.3.2. Polyvinylpyrrolidonfunktionalisierte Silber-Nanopartikel

Analog zu der von *Mahl et al.* beschriebenen Methode [166] werden 10 mL einer Ag-NP-Suspension (CA@Ag-NPs, $c(\text{Ag}) = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mit 500 μL einer PVP-Lösung ($M = 10 \text{ kDa}$, 0,02 mM bezogen auf das Monomer in UPW) versetzt. Die Mischung wird für 19 h bei Raumtemperatur gerührt um PVP-funktionalisierte Silber-Nanopartikel zu erhalten (PVP₁₀@AgNPs).

5.3.3. 11-Mercaptoundecansäurefunktionalisierte Silber-Nanopartikel

10 mL einer Ag-NP-Suspension (CA@Ag-NPs, $c(\text{Ag}) = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) werden mit 100 μL einer Lösung von 11-Mercaptoundecansäure (MUA; 0,01 M in UPW) versetzt, bei Raumtemperatur für 3 h gerührt und weitere 15 h unter Lichtausschluss inkubiert, um mit MUA funktionalisierte Silber-Nanopartikel (MUA@Ag-NPs) zu erhalten [123].

5.3.4. Mercaptobernsteinsäurefunktionalisierte Silber-Nanopartikel

Mit Mercaptobernsteinsäure (MSA) funktionalisierte Silber-Nanopartikel (MSA@AgNPs) werden analog zur in Kapitel 5.3.3 beschriebenen Methode hergestellt, indem MSA statt MUA zur Synthese eingesetzt wird.

5.3.5. Rinderserumalbuminfunktionalisierte Silber-Nanopartikel

Mit Rinderserumalbumin (BSA) funktionalisierte Silber-Nanopartikel (BSA@Ag-NPs) werden nach einer Methode von *Garza-Ocañas et al.* [167] hergestellt: 153 mg AgNO₃ und 943 mg BSA werden in UPW gelöst und auf ein Volumen von 38 mL aufgefüllt. Bei der Zugabe von 2 mL einer 0,6 M NaBH₄-Lösung bei Raumtemperatur bilden sich in einer sehr raschen Reaktion, unter starker Schaumentwicklung, mit BSA funktionalisierte Silber-Nanopartikel (BSA@Ag-NPs). Nach einer Alterungsphase durch 30 min Rühren und 5 h Lagerung bei Raumtemperatur können die Partikel mittels Dialyse aufgereinigt werden.

5.3.6. Lysin-funktionalisierte Silbernanopartikel

In Anlehnung an eine von *Bae et al.* beschriebene Methode [68] werden mit Lysin funktionalisierte Silber-Nanopartikel (Lys@Ag-NPs) durch die Reaktion von 10 mL einer Ag-NP-Suspension (CA@Ag-NPs, $c(\text{Ag}) = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mit 1 mL Lysin-Lösung (4 mM in UPW) hergestellt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur ist die Reaktion abgeschlossen.

5.3.7. Cysteinifunktionalisierte Silbernanopartikel

Nach der Methode von *Mandal et al.* [69] werden 10 mL einer Ag-NP-Suspension (CA@Ag-NPs, $c(\text{Ag}) = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mit 200 μL Cystein-Lösung (1 mM in UPW) zur Reaktion gebracht, um mit Cystein funktionalisierte Silber-Nanopartikel (Cys@Ag-NPs) zu erhalten. Die Mischung wird 10 min bei Raumtemperatur gerührt und weitere 24 h im Dunkeln stehen gelassen, bis die Reaktion abgeschlossen ist.

5.3.8. Stärkefunktionalisierte Silbernanopartikel

Für die Synthese stärkebeschichteter Silber-Nanopartikeln (Starch@Ag-NPs) wird die sonochemische Methode von *Vasileva et al.* [168] verwendet. Hierfür werden 32 mL einer 2 Gew.-% Stärke-Lösung in UPW mit 16 mL einer wässrigen 1 mM AgNO_3 -Lösung vermischt und bei einer Temperatur von 30 °C im Ultraschallbad behandelt. Nach 10 min. werden gleichzeitig 480 μL 0,1 M D-(+)-Glucose-Lösung und 2,4 mL 0,1 M Natronlauge zugegeben. Innerhalb weniger Sekunden bilden sich Starch@Ag-NPs, was eine intensive Gelbfärbung des Reaktionsmediums zur Folge hat. Die Mischung wird für weitere 60 min. im Ultraschallbad behandelt, um die Reaktion abzuschließen.

5.3.9. Silberchloridbeschichtete Silbernanopartikel

Sun berichtet von einer Methode zur Herstellung silberchloridbeschichteter Silber-Nanofäden [169] ausgehend von Nanofäden aus reinem Silber. Eisen(III)chlorid fungiert hierbei gleichzeitig als Oxidationsmittel und Chlorid-Quelle, zusätzlich wird auch PVP als Stabilisator eingeführt. In analoger Weise werden silberchloridbeschichtete Silber-Nanopartikel (AgCl@Ag-NPs) hergestellt: 6,7 mL einer Ag-NP-Suspension (CA@Ag-NPs, $c(\text{Ag}) = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) werden mit 100 μL einer PVP-Lösung (62 mM bezogen auf das Monomer, in UPW) vermischt. Anschließend werden unter ständigem Rühren tropfenweise 100 μL einer frisch hergestellten FeCl_3 -Lösung (5 mM in UPW) zugegeben. Dabei ändert sich die Farbe der ursprünglich gelben Suspension hin zu einem bräunlicheren Ton. Zum Abschluss der Reaktion wird die Reaktionsmischung für 1 h bei Raumtemperatur gerührt.

5.3.10. Silbersulfidbeschichtete Silbernanopartikel

Zur Herstellung von silbersulfidbeschichteten Silber-Nanopartikeln ($\text{Ag}_2\text{S}@\text{Ag-NPs}$) werden 10 mL einer Ag-NP-Suspension ($\text{CA}@\text{Ag-NPs}$, $c(\text{Ag}) = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mit 200 μL einer 0,01 M Natriumsulfid-Lösung versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt [123].

5.3.11. Silberphosphat-Nanopartikel

Nach der Methode von *Khan et al.* [16] werden identische Volumina (15 mL) einer AgNO_3 und Na_2HPO_4 Lösung (jeweils 0,02 M in UPW) vermischt, woraufhin sich sofort eine intensiv gelblich bis orange gefärbte Suspension von Silberphosphat-Nanopartikeln ($\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{-NPs}$) bildet.

5.4. Reinigung von Nanopartikeln mittels Dialyse

Zur Abtrennung von verbliebenem Reduktionsmittel, freien Metallionen und anderen niedermolekularen Störstoffen, werden alle hergestellten Nanopartikel der Dialyse unterzogen. Dafür wird zunächst ein etwa 10 – 15 cm langes Stück des zu verwendenden Dialyseschlau-ches für mindestens 5 min. in UPW konditioniert und anschließend dreifach mit UPW ge-spült. Danach wird ein Ende des Dialyseschlau-ches durch eine dafür vorgesehenen Klemme verschlossen und mit etwa 10 mL der zu reinigenden NP-Suspension befüllt. Nachdem auch das zweite Ende verschlossen wird, kann die eigentliche Dialyse beginnen. Dazu wird der Schlauch in einem mit UPW gefüllten Becherglas mit einem Volumen von 1 L positioniert. Die Reinigung erfolgt unter leichtem Rühren und Lichtausschluss über einen Zeitraum von 24 h, wobei nach 1 und 19 h das UPW erneuert wird.

5.5. Durchführung der Cloud-Point Extraktion

Für die CPE werden konifizierte 50 mL Polypropylen-Zentrifugenröhrchen verwendet. Vor der CPE werden 40 mL Probe mit den notwendigen Reagenzien versetzt. Für Gold-Nanoparti- kel werden je 400 μL 1 M HCl, 1 % (m/v) Citronensäure und 1 M Natrium-Thiosulfat-Lösung sowie 800 μL einer 10 Gew.-% TX-114 Lösung (alle in UPW) auf 40 mL Probe verwendet. Für Ag-NP-Proben werden analog 1,0 mL kaltgesättigte EDTA-Lösung, 400 μL 1 M Natrium-Ace- tat-Lösung, 100 μL 1,25 M Essigsäure sowie 1,0 mL 10 Gew.-% TX-114 verwendet. Die Addi- tive werden gut mit der Probe durchmischt und für 30 min bei 40 °C im Wasserbad erwärmt, wobei rasch eine Trübung durch die Bildung von Mizellen auftritt. Anschließend wird durch

Zentrifugieren bei $5.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ für 12 min eine schnelle und effektive Phasenseparation erreicht. Nach dem Zentrifugieren ist die Tensid-Phase als dünner Film am Boden des Gefäßes erkennbar. Bei einigen Versuchsreihen der Methodenoptimierung für Au-NPs wurden die Proben bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ über mehrere Stunden in einem Trockenschrank inkubiert, bis sich die Tensid-Phase von selbst am Gefäßboden absetzt.

Die Probe wird nach der Extraktion für wenige Minuten in einem Eisbad abgekühlt. Dadurch wird die Viskosität des Tensids erhöht und die wässrige Phase kann leicht, durch einfaches Dekantieren, entfernt werden. Die Tensid-Phase, welche den Analyt enthält, steht nun für Messungen zur Verfügung.

5.6. ET-AAS-Messung der Tensid-Phasen

Für die Konzentrationsbestimmung von EM-NPs in den nach Kapitel 5.5 gewonnenen Extrakten wird die Tensid-Phase zunächst in $100 \mu\text{L}$ Ethanol aufgenommen. Dies dient einerseits dem Herabsetzen der Viskosität der Probe, wodurch diese besser gehandhabt werden kann. Andererseits kann nur so eine homogene Probe erhalten werden, da sich neben dem Tensid immer auch noch Reste von Wasser im Gefäß befinden, welche durch Dekantieren nicht komplett entfernt werden können. Die in Ethanol gelöste Probe wird nun für die ET-AAS-Messung in ein Autosampler-Probengefäß überführt. Die Messung am Atomabsorptionsspektrometer erfolgt vollautomatisch, wobei jedoch einige Parameter an die Probe angepasst werden müssen. Insbesondere muss die Pipettiergeschwindigkeit der Probenzuführungseinheit auf 50 % des Maximalwerts reduziert werden. So werden Schwankungen des in das Graphitrohr injizierten Probenvolumens reduziert und damit die Präzision der Methode erhöht. Auch das Ofen-Temperaturprogramm wurde speziell an die Proben angepasst (Tabelle 2). Durch den hohen Gehalt an organischen Verbindungen kommt es bei der Pyrolyse zu starker Rauchentwicklung, weshalb auf eine ausreichende Belüftung geachtet werden muss. Die Messbedingungen für die elementspezifische Detektion am AASpektrometer sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 2: Graphitofen-Temperaturprogramme für die Messung der Tensid-Phase nach der CPE von Gold- und Silber-Nanopartikeln. Die Messung erfolgte jeweils während des Atomisierungs-Schritts.

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Aufheizzeit [s]	Haltezeit [s]	Argon-Fluss [mL·min ⁻¹]
Temperaturprogramm für die Messung von Gold				
Trocknen I	80	5	20	250
Trocknen II	130	10	20	250
Pyrolyse	1000	20	20	250
Atomisierung	1800	0	5	0
Reinigung	2450	1	3	250
Temperaturprogramm für die Messung von Silber				
Trocknen I	80	5	20	250
Trocknen II	130	10	20	250
Pyrolyse	600	20	20	250
Kühl-Schritt	300	1	5	250
Atomisierung	1800	0	5	0
Reinigung	2450	1	3	250

Tabelle 3: Mess- und Betriebsbedingungen des AA-Spektrometers bei der Messung von Gold und Silber mittels ET-AAS.

Element	Mess-Wellenlänge [nm]	Mess-Dauer [s]	HKL-Betriebsstrom [mA]
Gold	242,8	5	10
Silber	328,1	5	10

5.6.1. Auswertung der Messdaten

Durch die Spektrometer-Software wird unspezifische Absorption und Streuung mittels einer Zeeman-Untergrundkorrektur eliminiert und die korrigierte Extinktion (Einheit: [A]) in zeit-aufgelöster Form gemessen. Durch numerische Integration über die Zeitachse wird ein Wert erhalten, welcher der Summe aller zum Zeitpunkt t_i gemessenen Extinktionen E_i entspricht. Dieser Wert hat die Einheit [A·s] und wird im Folgenden als Extinktions-Wert, Signalintensität oder Messwert bezeichnet. Für einen (idealen) Blindwert, bei dem der Detektor lediglich ein

zufällig verteiltes Untergrundrauschen aufzeichnet, ist der effektive Messwert gleich Null, da alle Werte für E_i statistisch um den Wert 0 verteilt sind und das Integral somit ebenfalls 0 ergibt.

5.6.2. Kalibrierung zur Bestimmung der Analyt-Konzentration in Realproben

Ausgehend von einer gereinigten Nanopartikel-Stammsuspension bekannter Konzentration, werden, durch Verdünnung mit UPW, Nanopartikel-Suspensionen zur Kalibrierung hergestellt. Deren Konzentration sollte der erwarteten Analytkonzentration in der Probe angepasst werden. Die letzte Verdünnung erfolgt auf ein Volumen von 40 mL direkt in einem Zentrifugengefäß, in welchem die CPE durchgeführt wird. Zu diesen Suspensionen werden die für die CPE notwendigen Additive entsprechend Kapitel 5.5 gegeben. Die CPE und AAS-Messung folgt der Vorgehensweise bei der Analyse von Realproben. Zur Auswertung wird die Signalintensität der Kalibrierlösung gegen den Analytgehalt aufgetragen. Nach Aufstellen einer Regressionsgerade (s. Anhang) kann die Analyt-Konzentration der Realprobe bestimmt werden.

5.7. Charakterisierung der Oberflächenfunktionalisierung mittels FT-IR

Vor der Messung müssen die zu untersuchenden Nanopartikel zunächst aus der Synthesemischung abgetrennt werden, damit sichergestellt werden kann, dass IR-Signale ausschließlich von an NPs gebundenen funktionellen Gruppen herrühren, nicht aber von überschüssigem Funktionalisierungsreagens. Dazu wird die zu untersuchende Nanopartikel-Suspension in 2 mL Mikroreaktionsgefäßen für 1 h bei $14.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das am Gefäßboden befindliche NP-Pellet in UPW resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dem erneuten Entfernen des Überstands werden mehrere Proben vereinigt, um eine ausreichende Probenmenge für die Charakterisierung zu erhalten, und über Nacht unter HEPA-gefilterter Luft getrocknet.

Zur Messung wurde ein BioRad FTS 570 C FT-IR Spektrometer (BioRad, Hercules, USA), ausgerüstet mit einer MIRacle ATR-Einheit (PIKE Technologies, Madison, USA), verwendet. Das Nanopartikel-Pulver wird auf den ATR-Kristall des Spektrometers aufgebracht und gemessen. Der Messbereich lag zwischen $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$; es werden jeweils 32 Einzelspektren aufgenommen und der Mittelwert berechnet, um das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu verbes-

sern. Die Identifizierung und Signalzuordnung erfolgt anhand von Referenzsubstanzen oder Literaturspektren.

5.8. Elektronenmikroskopie

Zur Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie werden zunächst die TEM-Proben-träger durch Plasmabehandlung hydrophobisiert. Anschließend werden einige μL der Probe aufgetragen und für wenige Minuten auf dem Probenträger belassen. Dabei scheidet sich eine für die Messung ausreichende Menge an Nanopartikeln auf der Oberfläche des Proben-trägers ab. Danach wird die überstehende Flüssigkeit entfernt und der Probenträger in einer partikelfreien Umgebung komplett getrocknet. Die Konzentration der Probe muss zuvor so eingestellt werden, dass die Menge der sich abscheidenden Partikel weder zu groß noch zu klein ist. Nur so kann ein Bild aufgenommen werden, das weder durch Überlappung einzelner Nanopartikel gestört ist, noch eine für die statistische Auswertung zu geringe Zahl an Nanopartikel abbildet. Tensidhaltige Proben werden dazu mit Ethanol, alle anderen mit UPW verdünnt.

Die Messungen selbst wurden von Frau Dr. Marianne Hanzlik (TU München, Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie) bzw. Herrn Dr. Markus Döblinger (LMU) durchgeführt. Dafür standen ein JEM 100CX (JEOL, Akishima, Japan) mit einer Beschleunigungsspannung von 100 keV und ein FEI Titan 80 – 300 (FEI Company, Hillsboro, USA) mit einer Beschleunigungsspannung von 300 keV zur Verfügung. Die Auswertung von EDX-Spektren erfolgt automatisch durch die Gerätesoftware. Die entstandenen Aufnahmen wurden in digitaler Form zur Verfügung gestellt.

Zur Auswertung einer Größenverteilung wurde, für eine statistisch signifikante Anzahl Partikel ($N > 100$), anhand des bekannten Vergrößerungsfaktors der Durchmesser bestimmt. Daraus lässt sich mit Hilfe von Statistik-Software die mittlere Größe der Partikel berechnen sowie eine Größenverteilung erstellen.

6. Ergebnisse

Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse der angefügten Publikationen zusammengefasst. Zunächst wurde ein CPE Verfahren für die Extraktion von Au-NPs (Publikation 1) und Ag-NPs (Publikation 2) entwickelt. In Publikation 3 wurde das in Publikation 2 präsentierte Verfahren intensiv getestet und validiert. In Publikation 4 wurde die Methode angewendet, um die Konzentration und Eliminierung von Ag-NPs in Kläranlagen (WWTPs) zu untersuchen.

6.1. Entwicklung eines Verfahrens zur speziesselktiven Anreicherung und Quantifizierung von Gold-Nanopartikeln mittels Cloud-Point Extraktion und Elektrothermaler Atomabsorptionsspektrometrie (Publikation 1)

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Kombination von CPE und ET-AAS für die Quantifizierung von EM-NPs vorgestellt. Dazu wurden zunächst die Extraktionsbedingungen hinsichtlich pH-Wert, Tensidkonzentration, Speziesselktivität, Anreicherungsfaktor und Extraktionseffizienz untersucht. Für ein Probevolumen von 40 mL stellten sich folgende Additive als optimal heraus (Tabelle 4):

Tabelle 4: Verwendete Additive für die CPE von Au-NPs in einer wässrigen Probe. Das zugegebene Volumen ist dabei jeweils auf ein Probevolumen von 40 mL bezogen, alle Lösungen in UPW.

Komponente	Konzentration	Zugegebenes Volumen [μL]
TX-114	10 Gew.-%	800
HCl	0,1 M	400
Citronensäure	1 Gew.-%	400
Natrium-Thiosulfat	1 M	400

Bei einer Inkubationszeit von 30 min bei 40 °C wurde unter diesen Bedingungen eine Extraktionseffizienz von $95,2 \pm 2,5$ % für citratstabilisierte Au-NPs und ein Anreicherungsfaktor von 80 erreicht. Degegen betrug die Extraktionseffizienz für Au(III) nur etwa 2 %. Ebenfalls optimiert wurde das Ofentemperaturprogramm für die ET-AAS-Messung der Tensidphase. Bei einer Pyrolysetemperatur von 1000 °C und einer Atomisierungstemperatur von 1800 °C wurde eine Nachweisgrenze von $5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ für Au-NPs ermittelt. Mittels TEM-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Extraktion keinen Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung hat. Umgekehrt jedoch zeigte sich eine Abhängigkeit der Extraktionseffizienz von der Größe der verwendeten Partikel: so liegt diese für Au-NPs mit einer mittleren Größe von 2 nm bei $101 \pm 5,5$ %, während Partikel mit einem Durchmesser von 150 nm nur zu $51,5 \pm 15,5$ % extrahiert werden (vgl. Abbildung 12).

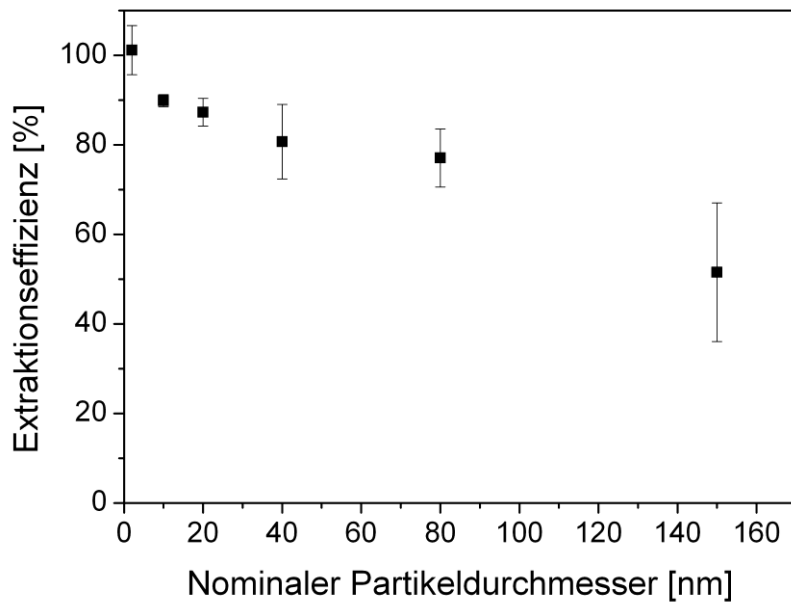


Abbildung 12: Einfluss der Partikelgröße auf die Extraktionseffizienz bei der CPE von Au-NPs.

Zur weiteren Validierung der Methode wurde der Einfluss von anorganischen Kolloiden (TiO_2 -Partikel) sowie von Huminsäuren auf die Extraktion untersucht. Während bei TiO_2 -Partikel-Konzentrationen bis zu $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in der Probe kein Einfluss auf die CPE von Au-NPs festgestellt wurde, kommt es bei Huminsäure-Konzentrationen $> 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ zu Störungen.

Aufstockungs-Experimente in Realproben (Flusswasser und Klärwerks-Ablauf) erbrachten eine Wiederfindung zwischen 91,1 und 103,2 % für Au-NP-Konzentrationen im Bereich von $30 - 220 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. In den ursprünglichen Proben konnten jedoch keine Au-NPs nachgewiesen werden. Lediglich in ungeklärtem Abwasser konnte mittels eines Standardadditionsverfahrens eine reale Konzentration von Gold-Partikeln bestimmt werden ($17,6 \pm 6,8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$). Es ist jedoch weder die Herkunft dieser Gold-Partikel bekannt, noch, ob es sich dabei tatsächlich um ENPs handelt.

6.2. Entwicklung eines Verfahrens zur speziesselktiven Anreicherung und Quantifizierung von Silber-Nanopartikeln mittels Cloud-Point Extraktion und Elektrothermaler Atomabsorptionsspektrometrie (Publikation 2)

In Analogie zu Publikation 1 wurde in dieser Studie ein Verfahren für die Extraktion von Ag-NPs entwickelt. Während das Grundprinzip dasselbe bleibt, zeigten sich deutliche Unterschiede bei den optimalen Extraktionsbedingungen für das jeweilige Element (Tabelle 5).

Tabelle 5: Additive für die CPE von Au-NPs in einer wässrigen Probe. Das zugegebene Volumen ist dabei jeweils auf ein Probenvolumen von 40 mL bezogen, alle Lösungen in UPW.

Komponente	Konzentration	Zugegebenes Volumen [μL]
TX-114	10 Gew.-%	1000
EDTA	Kaltgesättigt	1000
Natrium-Acetat	1 M	400
Essigsäure	1,25 M	100

Durch die Zugabe von EDTA wurde die Extraktionseffizienz für Ag(I) auf 4 % gesenkt, während sie für citratstabilisierte Ag-NPs 93 ± 2 % beträgt. Bei der ET-AAS-Messung wurde auch nach Optimierung von Pyrolyse- und Atomisierungstemperatur (600 bzw. 1800 °C) kein zufriedenstellendes Messsignal erzielt. Durch die zu schnelle Atomisierung des Analyten fällt das Messsignal nicht auf die Basislinie, sondern auf negative Werte ab. Durch Hinzufügen eines Abkühlschritts (300 °C) vor der Atomisierung konnte dies entscheidend verbessert werden (vgl. Abbildung 13). Die damit erreichte Nachweisgrenze für Ag-NPs betrug $0,7 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

Auch für diese Methode wurden Aufstockungsexperimente in Flusswasser und Klärwerks-Ablauf durchgeführt. Die Wiederfindung lag bei 88,4 – 116,5 % für Ag-NP-Konzentrationen zwischen 15 und $300 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Während in den Flusswasserproben die Ag-NP-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnten in Klärwerksablauf $7,0 - 11,8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ partikuläres Silber gemessen werden. Zusätzlich wurde auch ungeklärtes Abwasser analysiert. Da es sich hier um eine sehr komplexe Matrix handelt wurde, neben der Konzentrationsbestimmung anhand einer Kalibrierfunktion, auch eine Konzentrationsbestimmung mittels Standardadditionsverfahren durchgeführt. Dass die bestimmten Ag-NP-Konzentrationen im Rahmen der Messungengenauigkeit mit $371 \pm 11 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Kalibrierung) gegenüber $342 \pm 81 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Standard-

addition) sehr gut übereinstimmten, kann als ein Hinweis auf Abwesenheit von systematischen Fehlern und damit auf die Richtigkeit des Verfahrens gewertet werden.

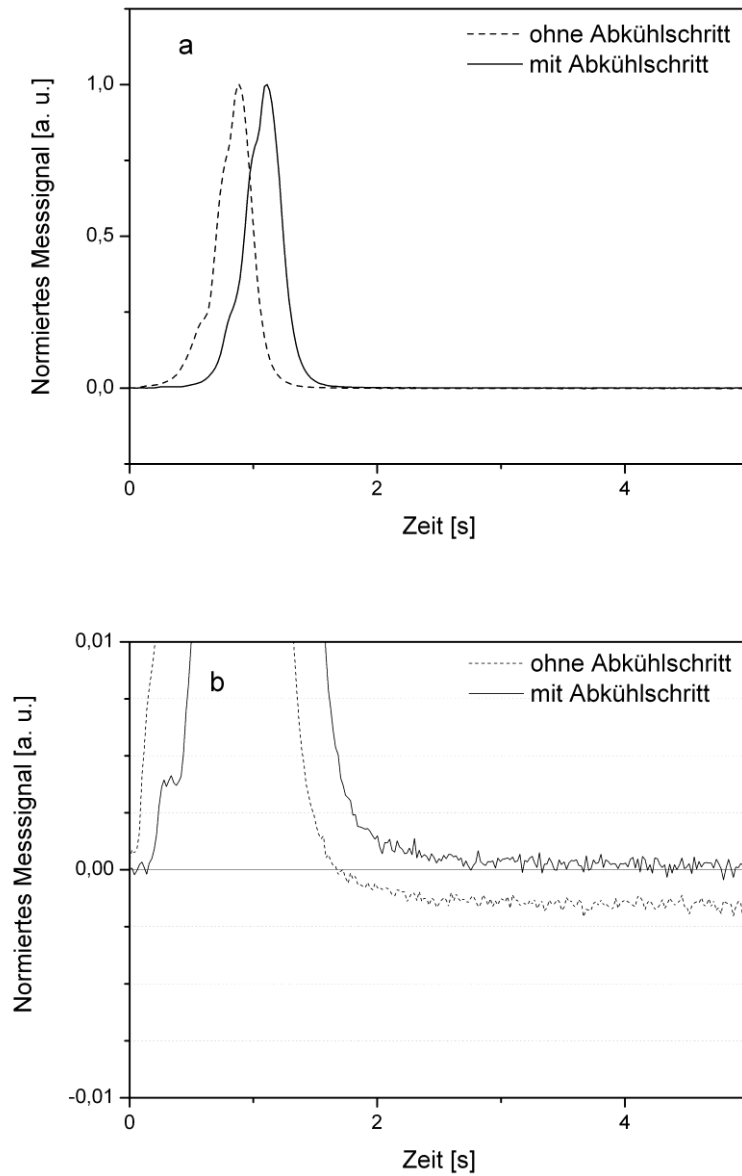


Abbildung 13: Einfluss des Abkühlschritts nach der Pyrolyse auf Lage und Form des transienten Signals bei der Bestimmung von Ag-NPs in CPE-Extrakten mittels ET-AAS. (a) Einfluss auf die Lage des Signalmaximums; (b) Einfluss auf die Basislinientreue des Signals (vergrößerter Ausschnitt aus (a))

6.3. Einfluss von Partikeloberfläche und von Matrixbestandteilen auf die Cloud-Point Extraktions-Effizienz für Silber-Nanopartikel und Anwendung der Methode zur Quantifizierung der Bildung von Silber-Nanopartikeln aus Silber-Ionen (Publikation 3)

Nachdem in Publikation 2 ein Verfahren zur CPE von Ag-NPs entwickelt wurde, sollte in dieser Arbeit eine umfassende Validierung der Methode durchgeführt werden. Dabei wurden schwerpunktmäßig zwei Faktoren betrachtet: Der Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung der Partikel, sowie die Zusammensetzung der Probenmatrix auf die Extraktion.

Zur Untersuchung des ersten Gesichtspunkts wurden zwölf verschiedenartige Ag-NP-Typen untersucht. Diese wurden teilweise selbst hergestellt, teilweise handelte es sich um kommerziell erhältliche Partikel. Die Oberflächenfunktionalisierung umfasst organische Moleküle (Citrat, PVP, Mercapto-Bernsteinsäure (MSA), Mercaptoundecansäure (MUA)), Biomoleküle (Rinderserumalbumin (BSA), Stärke, Aminosäuren (Lysin, Cystein)) und anorganische Ionen (Chlorid, Sulfid). Alle Partikel konnten erfolgreich synthetisiert werden; die Oberflächenfunktionalisierung wurde mittels ATR-FT-IR und TEM-EDX charakterisiert. Daneben wurden auch durch Laserablation in Reinstwasser hergestellte Ag-NPs untersucht, welche keine Oberflächenfunktionalisierung, außer durch Wassermoleküle, aufweisen. Es zeigte sich, dass für 11 der 12 untersuchten Ag-NPs eine sehr gute Extraktionseffizienz von 82 % oder höher erreicht wird (siehe Tabelle 6), der Mittelwert beträgt 94 ± 6 %. Lediglich die mit BSA funktionalisierten Ag-NPs wiesen eine signifikant geringere Extraktionseffizienz von etwa 2 % auf. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die biologische Funktion von BSA sein: Dieses Protein fungiert im Organismus als Lösungsvermittler für Fettsäuren und andere hydrophobe Substanzen in Blut. Darum ist es nicht verwunderlich, dass dieses Protein auch entsprechend funktionalisierte Kolloide sehr gut in Lösung halten kann und diese sich somit der CPE entziehen. Da der Anteil BSA funktionalisierter Nanopartikel an der Gesamtmenge der in die Natur freigesetzten Ag-NPs vernachlässigbar sein dürfte, ist davon auszugehen, dass dadurch die Bestimmung des Gehalts an Ag-NPs in Realproben kaum gestört wird.

Tabelle 6: Extraktionseffizienz für die in dieser Arbeit untersuchten Ag-NP-Typen. Zur Bedeutung der Kürzel siehe Publikation 3, Tabelle 1 oder das Abkürzungsverzeichnis dieser Arbeit.

Bezeichnung	Extraktions- effizienz [%]
Ag-only-NP	98 ± 13
CA@Ag-NP	90 ± 3
PVP ₁₀ @Ag-NP	105 ± 13
PVP _{SA} @Ag-NP	95 ± 2
MUA@Ag-NP	102 ± 6
MSA@Ag-NP	87 ± 6
BSA@Ag-NP	2 ± 2
Lys@Ag-NP	89 ± 1
Cys@Ag-NP	98 ± 4
starch@Ag-NP	82 ± 5
AgCl@Ag-NP	96 ± 7
Ag ₂ S@Ag-NP	94 ± 6

Die Untersuchung der Einflüsse möglicher Matrixbestandteile erstreckte sich über umweltrelevante Ionen (NH_4^+ , Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-}), NOM-Isolate als Repräsentanten für organische Abbauprodukte (Referenzmaterialien SR-NOM und NR-NOM) sowie TiO_2 -Partikel als Repräsentant für anorganische Kolloide. Die verwendeten Konzentrationen wurden so gewählt, dass diese die in komplexen Realproben, wie ungeklärtem Abwasser, vorherrschenden Konzentrationen übersteigen oder diesen zumindest entsprechen. In keinem Fall wurde ein Einfluss der simulierten Matrix auf die CPE von Ag-NPs festgestellt (Abbildung 14).

Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass die entwickelte Methode zur Analyse des Ag-NP-Gehalts von realen Wasserproben grundsätzlich geeignet ist, selbst wenn es sich dabei um eine sehr komplexe Matrix mit hohem Gehalt an Salzen, organischen Abbauprodukten oder ungelösten anorganischen Stoffen handelt.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit aufgezeigt, wie mittels der CPE auf elegante Art und Weise die Bildung von Nanopartikeln aus Metall-Ionen quantifiziert werden kann. Als Beispiel wurde die Reduktion von Ag^+ mit NOM untersucht. Dabei zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen Endkonzentration an Silber in der Tensidphase und der Konzentration an NOM in der Probe.

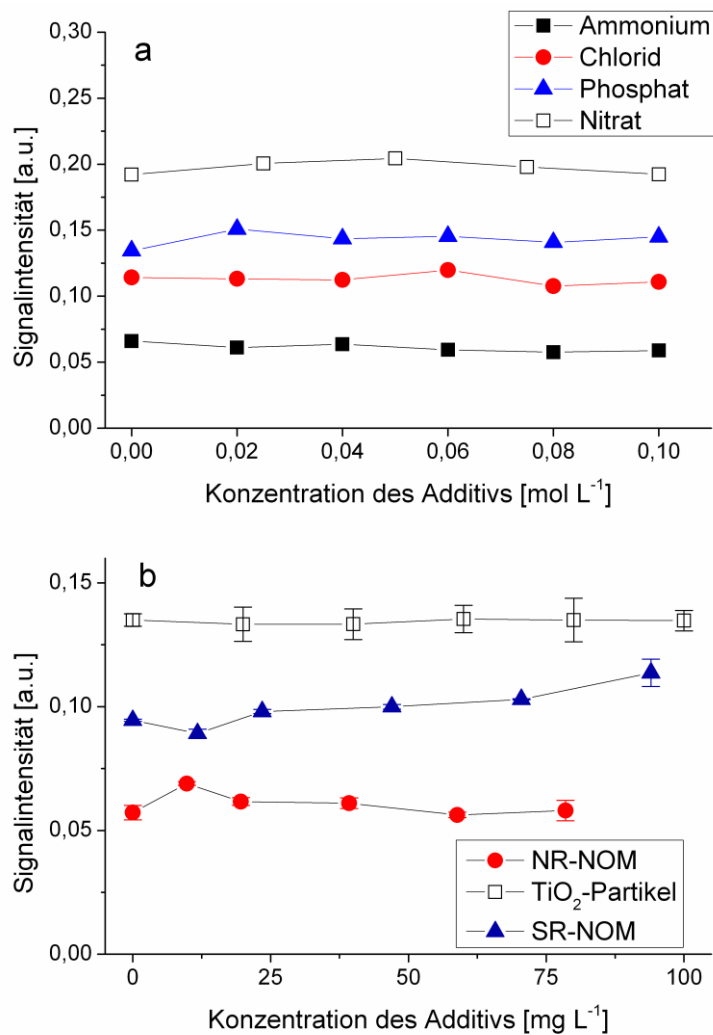


Abbildung 14: Einfluss verschiedener, simulierter Matrix-Komponenten auf die CPE-Extraktionseffizienz von Ag-NPs. (a) anorganische Ionen; (b) anorganische Kolloide und NOM.

Da die CPE selektiv Ag-NPs extrahiert, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei dem in der Tensidphase enthaltenen Silber um Ag-NPs handelt, was mittels UV/Vis-Spektrometrie und TEM-Aufnahmen bestätigt werden konnte. Die CPE bietet sich somit auch als Methode an, zur Untersuchung der Bildung von NPs an und ist dabei deutlich weniger aufwändig als andere dafür geeignete Methoden.

6.4. Quantifizierung der Eliminierung und Freisetzung nanoskaliger Silberpartikel durch kommunale Klärwerke in Deutschland (Publikation 4)³

Ziel dieser Arbeit war es, den Eintrag und den Verbleib von nanoskaligem Silber in Kläranlagen zu untersuchen. Dafür wurden in 9 verschiedenen Klärwerken in Süddeutschland Proben von Zulauf, vorbehandeltem Abwasser und Ablauf analysiert. Dies erfolgte mittels der zuvor beschriebenen CPE-Methode (Publikationen 2 & 3). Zusätzlich wurde der Ablauf auch mit einer weiteren Methode zur Quantifizierung von Ag-NPs analysiert. Diese greift für die Anreicherung von Ag-NPs und die Abtrennung von Ag(I) auf einen Ionenaustauscher zurück (IER-Methode). Die Analyse von Klärwerkszulauf mit der IER-Methode war leider nicht möglich, da dieses Verfahren mit der komplexen Matrix überfordert ist.

Die mit der CPE-Methode gemessenen Ag-NP-Konzentrationen im Zulauf lagen zwischen $1,5 - 0,06 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, im Ablauf dagegen nur bei $1 - 12 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Daraus lässt sich ableiten, dass in allen untersuchten Klärwerken zwischen 94,9 und 99,8 % aller Ag-NPs während des Reinigungsprozesses eliminiert wurden (Abbildung 15). Dies ist das erste Mal, dass die Effizienz der Eliminierung von Ag-NPs unter Realbedingungen gemessen wurde. Die Ergebnisse stimmen sehr gut mit den Vorhersagen aus Studien überein, die das Verhalten von zudosierten Ag-NPs in Versuchsklärwerken im Labor- oder Pilotmaßstab untersucht haben [170, 171].

³ Diese Publikation wurde von mir als Zweitautor in Zusammenarbeit Herrn Dr. Lingxiangyu Li (L.L.) unter der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Michael Schuster (M.S.) aus der Arbeitsgruppe für Analytische Chemie (TU München), sowie Herrn Dr. Markus Döblinger (M.D.) von der LMU München angefertigt. Mein Teil der Arbeit bestand in der Quantifizierung von Ag-NPs mittels der zuvor entwickelten CPE-Methode in Klärwerkszu- und -ablauf. L.L. analysierte mittels einer von ihm entwickelten IER-Methode ebenfalls den Ag-NP-Gehalt, jedoch nur in den Ablaufproben. Daneben führte er einige Berechnungen durch und war für die Anfertigung des größten Teils des Manuskripts verantwortlich. M.D. führte TEM und TEM-EDX Analysen durch.

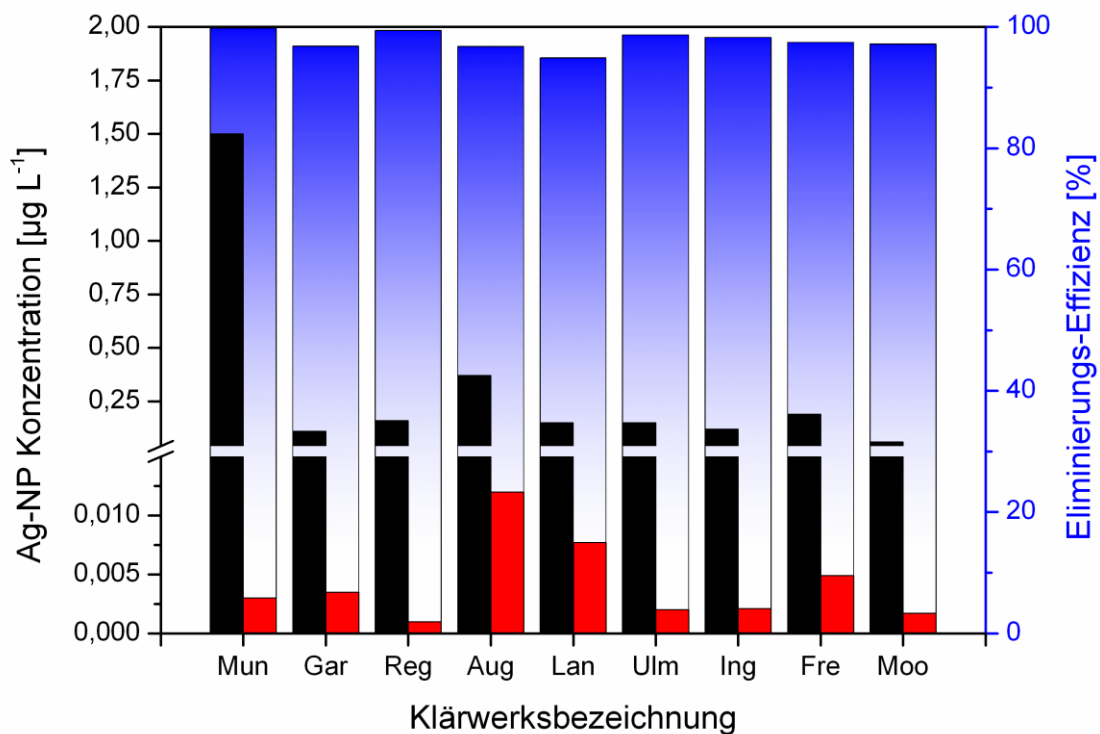


Abbildung 15: Gemessene Ag-NP-Konzentration im Zulauf (schwarz) und Ablauf (rot) der neun untersuchten WWTPs. Daraus wurde jeweils die Eliminierungseffizienz (blau, rechte y-Achse) berechnet.

Daneben wurden die Messungen der Ag-NP-Konzentration im Ablauf herangezogen, um die beiden verwendeten Quantifizierungsmethoden (IER und CPE) zu vergleichen. Im Allgemeinen wurde eine gute Übereinstimmung der mit der jeweiligen Methode bestimmten Ag-NP-Konzentration festgestellt: In 4 von 9 Fällen kommen beide Methoden im Rahmen der einfachen Standardabweichung zum selben Ergebnis. Betrachtet man die zweifache Standardabweichung, stimmen gar 8 von 9 Werten (89 %) überein. Für eine Messung im $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ Bereich und nahe an der Nachweisgrenze der jeweiligen Methode ist das ein bemerkenswertes Ergebnis. Dies kann als weiteres Indiz für die Richtigkeit der Methode betrachtet werden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Cloud-Point Extraktions-Verfahren für die Anreicherung und Abtrennung von Au- und Ag-NPs aus Realproben entwickelt und validiert. Es sind dabei für beide Elemente unterschiedliche Extraktionsbedingungen notwendig, welche jeweils optimiert wurden. Die CPE zeichnet sich durch hohe Matrixtoleranz, Selektivität für NPs gegenüber dem jeweiligen Metall in ionischer Form, geringem Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung der NPs sowie einfache und kostengünstige Durchführung aus. Durch die Verwendung der ET-AAS als Quantifizierungsmethode wurde eine sehr niedrige Nachweisgrenze von $6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ für Au-NPs und $0,7 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ für Ag-NPs erreicht. Für Ag-NPs bedeutet dies, dass die bisher aus der Literatur bekannte Nachweisgrenze etwa um den Faktor 10 verbessert wurde [136].

Durch die Quantifizierung von Ag-NPs in unbehandeltem und geklärtem kommunalen Abwasser konnte erstmals die Eliminierung von Ag-NPs in Klärwerken unter Realbedingungen bestimmt werden. Es zeigte sich, dass hier mehr als 95 % aller Ag-NPs aus dem Abwasser entfernt werden. Damit konnte die These, dass Klärwerke eine Punktquelle für die Emission von Ag-NPs in die Umwelt darstellen, falsifiziert werden.

Mit der hier vorgestellten Methode wird ein wichtiger Beitrag zur Ermittlung der Umweltexposition mit Ag-NPs und damit zur Risikoabschätzung der Nanotechnologie geleistet. Neben der Umweltanalytik wurden auch weitere Anwendungsgebiete, wie etwa die Quantifizierung der Bildung von Ag-NPs aus Ag(I) durch Reduktion mittels NOM, angeschnitten, was die breite Anwendbarkeit der CPE verdeutlicht.

In Zukunft kann auch die Etablierung der CPE als Anreicherungstechnik für andere Quantifizierungs- und Trenntechniken zu Fortschritten bei der Analytik von Nanopartikeln in Realproben führen. So könnte durch die Kombination von CPE und Größenfraktionierung mittels AF⁴ oder spICP-MS die Nachweisgrenze der jeweiligen Methode dramatisch verbessert werden. Erste Vorversuche in Kooperation mit dem Bayerischen Landesamt für Umweltschutz haben gezeigt, dass dies grundsätzlich möglich ist.

Auf Basis der Studie zur Eliminierung von Ag-NPs in Klärwerken wurde zwar gezeigt, dass es zu einer effektiven Eliminierung kommt; jedoch ist dadurch das Problem nicht aus der Welt. Da die Partikel mit großer Wahrscheinlichkeit in den Klärschlamm eingebunden werden,

kommt es lediglich zu einer Verlagerung des Problems. In logischer Konsequenz muss die Fragestellung lauten: Wie verhalten sich die Nanopartikel im Klärschlamm und kann eine Remobilisierung der Partikel erfolgen, wenn zum Beispiel Klärschlamm als Dünger für die Lebensmittelproduktion eingesetzt wird?

Darüber hinaus ist auch die Ausweitung der Methode auf andere Arten von NPs angedacht. Mögliche Kandidaten sind hier NPs von Metallen wie Pt, Pd oder Rh, die in z.B. Autoabgaskatalysatoren verwendet werden. Die Metalle werden in partikulärer Form mit dem Autoabgas ausgetragen und reichern sich in Umweltkompartimenten an. Zur Extraktion von Pd-NPs wurden bereits vielversprechende Experimente durchgeführt [172]. Pd-NPs wurden mit TX-114 angereichert und durch Zugabe von EDTA von Pd(II)-Ionen getrennt. Die Nachweisgrenzen lagen dabei im Bereich von $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

Auch Metalloxid-NPs können mittels CPE angereichert werden, wie zahlreiche Publikationen zeigen [140, 141, 173]. Von ökologischer Relevanz sind hier z.B. SiO_2 , TiO_2 , ZnO , oder CuO -NPs. In Kombination mit einer multielementfähigen Quantifizierungstechnik wäre mit der CPE dann eine einfache Methode zur Messung der Umweltkonzentration verschiedener Metall(oxid)nanopartikel verfügbar. Sollten, durch Änderungen der Gesetzeslage, Grenzwerte für einige NPs aufgestellt werden, könnte deren Einhaltung auf diese Weise sehr effizient überwacht werden.

Wenn die Nanotechnologie eine Schlüsseltechnologie für die Gesellschaft des 21. Jahrhunderts ist, dann ist die Risikoabschätzung von Nanomaterialien eine Schlüsselaufgabe für diese Gesellschaft, die von Toxikologen und Umweltwissenschaftlern in Zusammenarbeit mit Analytischen Chemikern zu lösen ist. Die hier vorgestellte Methode könnte in Zukunft einen wichtigen Beitrag leisten, auf Seiten der Exposition das Risiko von Nanopartikeln vernünftig und zuverlässig abzuschätzen.

8. Anhang

8.1. Publikationen

Publikation 1:

“Species selective preconcentration and quantification of gold nanoparticles using cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry”

Veröffentlicht 2013 in der Fachzeitschrift *Analytica Chimica Acta*, Band 761, Seiten 27 – 33.

Autoren: Georg Hartmann und Michael Schuster



Species selective preconcentration and quantification of gold nanoparticles using cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry



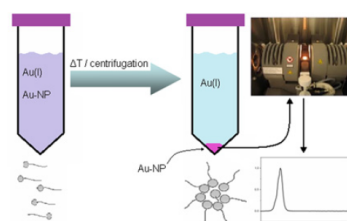
Georg Hartmann*, Michael Schuster

Department of Chemistry, Technische Universität München, 85748 Garching, Germany

HIGHLIGHTS

- ▶ We optimized cloud point extraction and ET-AAS parameters for Au-NPs measurement.
- ▶ A selective ligand (sodium thiosulphate) is introduced for species separation.
- ▶ A limit of detection of 5 ng Au-NP per L is achieved for aqueous samples.
- ▶ Measurement of samples with high natural organic matter content is possible.
- ▶ Real water samples including wastewater treatment plant effluent were analyzed.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2012
 Received in revised form
 21 November 2012
 Accepted 27 November 2012
 Available online 5 December 2012

Keywords:

Gold nanoparticles
 Cloud point extraction
 Pre-concentration
 Species analysis
 Waste water
 Natural waters

ABSTRACT

The determination of metallic nanoparticles in environmental samples requires sample pretreatment that ideally combines pre-concentration and species selectivity. With cloud point extraction (CPE) using the surfactant Triton X-114 we present a simple and cost effective separation technique that meets both criteria. Effective separation of ionic gold species and Au nanoparticles (Au-NPs) is achieved by using sodium thiosulphate as a complexing agent. The extraction efficiency for Au-NP ranged from 1.01 ± 0.06 (particle size 2 nm) to 0.52 ± 0.16 (particle size 150 nm). An enrichment factor of 80 and a low limit of detection of 5 ng L^{-1} is achieved using electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS) for quantification. TEM measurements showed that the particle size is not affected by the CPE process. Natural organic matter (NOM) is tolerated up to a concentration of 10 mg L^{-1} . The precision of the method expressed as the standard deviation of 12 replicates at an Au-NP concentration of 100 ng L^{-1} is 9.5%. A relation between particle concentration and the extraction efficiency was not observed. Spiking experiments showed a recovery higher than 91% for environmental water samples.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use and production of nanoparticles has been rapidly growing in the past decades. Especially metal nanoparticles (MNPs) are

widely applied due to their unique properties [1,2]. Also the possible risks of such particles are subject to intensive evaluation. Studies observed adverse effects for several kinds of MNPs. Recently silver nanoparticles were found affect human skin cells [3] and fish [4]. Gold nanoparticles showed cytotoxic effects on model human skin [5], lung [6] and stem [7] cells. Although most of these effects were only observed in vitro and at elevated MNP concentrations, analytical methods should be developed for monitoring of MNPs. Since the environmental MNP concentrations are expected to be very low [8] quantification techniques should ideally involve an

* Corresponding author at: Technische Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching, Germany. Tel.: +49 89 289 13137; fax: +49 89 289 14513.
 E-mail addresses: georg.hartmann@tum.de (G. Hartmann), michael.schuster@tum.de (M. Schuster).

enrichment of the analyte. Due to their high chemical stability and well characterized properties gold nanoparticles (Au-NP) might serve as a model substance for the assessment of nanoparticle occurrence, distribution, behavior and fate in the environment.

Several approaches have been made for MNP pre-concentration from environmental samples: liquid–liquid extraction has successfully been applied on nanoparticles [9] but this technique requires relatively large amounts of (toxic) organic solvent and do not allow for high enrichment factors. Several studies have employed flow techniques for the direct quantification of metallic nanoparticles. One intensively investigated approach is asymmetric flow field flow fractionation (AF⁴) [10–12]. In combination with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) size and elemental composition of NPs can be measured simultaneously [10,11]. However, this method requires complex and costly instrumentation. Also, AF⁴ suffers from incomplete recovery and analyte loss on instrument surfaces [11,13,14]. Recently single particle ICP-MS (spICP-MS) was presented for quantification of metallic NPs. But this technique is still in an early stage of development and does at the moment not allow for the quantification of particles smaller than 20 nm in diameter [15–17]. A ligand-assisted solid phase extraction followed by a ligand-assisted liquid extraction for the separation and pre-concentration of Au-NPs from waters is described by Li et al. [18]. With this labor-intensive and time-consuming procedures species selectivity and pre-concentration factors up to 250 are achieved.

Another very promising approach is cloud-point extraction (CPE) [19]. This separation technique is based on the temperature dependent aggregation behavior of surfactants in aqueous solutions. If a solution with the surfactant concentration above the critical micellar concentration (*c.m.c.*) is heated to a certain temperature – termed *cloud point* – the surfactant molecules form micelles that generate an additional phase. This surfactant-rich phase is – depending on the kind of surfactant employed – lighter or heavier than the aqueous phase and can easily be separated from the latter. Non-polar molecules are able to enter the micelles and are therefore co-extracted while polar substances and ions will remain in the aqueous phase. Since the *c.m.c.* of typical surfactants is usually in the range of some 0.1 wt% an effective pre-concentration is possible. CPE is a well established technique for the analytical pre-concentration of both organic [20] and inorganic [21] analytes. Ions can be extracted using suitable ligands. CPE has already successfully been applied for the quantification of Au(III) in minerals and water samples in combination with ICP-MS [22,23] or AAS [24,25]. However, no species separation was possible in these cases.

Using CPE and ICP-MS silver nanoparticles (Ag-NPs) were measured in different matrices and consumer products by Liu et al. [26,27]. Effective species selection between Ag⁺-ions and Ag-NPs was achieved. However, prior to ICP-MS measurement the surfactant-rich phase had to be digested and diluted from some 100 μ L to 50–100 mL.

To overcome this limitation we used ET-AAS for quantification, a technique that allows direct measurement of small sample volumes with high surfactant concentrations.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and standards

All chemicals used were analytical grade or better. Before usage chemicals were checked for gold contamination using ET-AAS. Hydrochloric acid, nitric acid, ethanol, citric acid, sodium borohydride, and sodium thiosulphate (TS), all purchased from Merck (Darmstadt, Germany), Triton X-114 (TX-114, AppliChem, Darmstadt, Germany), humic acid dry powder (Carl Roth GmbH,

Karlsruhe, Germany; batch number 25462019) and amorphous TiO₂ particles (mean aggregate size 5 μ m, Strem Chemicals Inc., Bischoheim, France) were used without further purification. Ultra pure water (UPW, resistance >18 M Ω cm⁻¹) was obtained from a Direct-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). A humic acid stock solution with a concentration of 1 g L⁻¹ was produced by suspending 0.20 g of humic acid (HA) dry powder (water-soluble fraction approximately 20%) in UPW and subsequently making the suspension up to 200 mL. No filtration was applied in order to preserve particulate or colloid organic matter in the resulting solutions. Before usage the HA stock solution was vigorously stirred to re-suspend non water-soluble microparticles. A TiO₂ stock solution (4 g L⁻¹) was prepared analogously.

Freshly prepared dilutions of gold standard solution (999 \pm 5 mg L⁻¹ in 2 mol L⁻¹ HCl, Merck) were used for calibration of the ET-AAS instrument. All glass vessels were cleaned by overnight treatment with freshly prepared *aqua regia*, subsequent steaming with nitric acid vapor for 4 h and threefold rinsing with UPW. Size selected Au-NPs in water (2, 10, 20, 40, 80 and 150 nm) were purchased from BBI int. (Cardiff, UK). Laser ablated [28] Au-NP in ultra pure water without any additives or stabilizing agents (average diameter 4.9 nm, concentration 35 mg L⁻¹) were obtained from Particular (Hannover, Germany).

Samples of waste water treatment plant (WWTP) influent and effluent were taken from the waste water treatment plant in Grosslappen, Munich, Germany. River water samples were collected from the Isar-River in Garching, Germany. All natural water samples were directly used for extraction and spiking experiments without filtration or chemical treatment.

2.2. Nanoparticle synthesis

Citrate capped Au-NPs were synthesized by reduction of Au(III) to Au(0) by NaBH₄ in the presence of citric acid. For the synthesis of 100 mL Au-NP stock solution with a concentration of approximately 10 mg L⁻¹, 2 mL of 1% citric acid in UPW and 1 mL of gold standard solution (see above) were mixed with 96 mL of UPW. To this mixture 1 mL of a freshly prepared solution of 150 mg NaBH₄ in 2 mL citric acid (1 wt% in water) was added rapidly under constant stirring. The color of the solution changes immediately from slightly yellow to an intense violet. After the reaction the product was stirred for another 10 min and kept in darkness afterwards. The gold concentration of the solution was determined by ET-AAS one day after the synthesis to allow aging of the particles and establishment of a stable solution [29]. The average size of the so-prepared particles ranged from 10 to 25 nm with a nearly Gaussian distribution as determined by transmission electron microscopy.

2.3. CPE parameters

Samples for CPE were prepared in polypropylene centrifuge tubes (50 mL, VWR, Darmstadt, Germany). For a 40 mL-sample 400 μ L of 0.1 M HCl, 400 μ L 1% citric acid and 800 μ L of 10% TX-114 were added. Besides, 400 μ L of 1 M sodium thiosulphate (TS) solution was applied whenever species separation was requested. The samples were mixed vigorously with a vortex mixer (VF2, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen i. Br., Germany) and heated to 40 °C to induce cloud formation. Phase separation was either accomplished by thermal settling when stored overnight in a heated oven or by centrifugation at 3000 rpm for 15 min (Labofuge 200 Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After the extraction being finished the samples were put on ice in order to increase the viscosity of the surfactant-rich phase, which then forms a viscous droplet attached to the bottom of the tube. The supernatant aqueous phase can then easily be removed by

Table 1

ET-AAS temperature program for the determination of Au after cloud point extraction.

Process	Temperature (°C)	Ramp time (s)	Hold time (s)	Argon flow rate (mL min ⁻¹)	Read trigger
Drying 1	80	5	20	250	
Drying 2	130	10	20	250	
Pyrolysis	1000	20	20	250	
Atomization	1800	0	5	0	X
Clean out	2450	1	3	250	

decanting. The droplet was dissolved in 200 μ L of ethanol and transferred to ET-AAS measurement.

2.4. Extraction efficiency measurements

Extraction efficiency (η) is chosen as an index to evaluate the effect of the variation of different CPE parameters, a high extraction efficiency of nearly 1 therefore indicates optimum conditions. For extraction efficiency measurements samples of known Au concentration (either Au-NP or Au(III)) were subjected to the CPE procedure. After extraction the surfactant-rich phase was made up to a defined volume with ethanol. The gold content of each sample is given by the sample volume multiplied by the Au-concentration measured by ET-AAS. Extraction efficiency was calculated from the ratio of the final (m_f) and initial (m_i) gold content. In this case calibration was performed with solutions identically prepared as the samples but spiked with an increasing concentration of gold standard-solution. The uncertainty in extraction efficiency ($\Delta\eta$) for a given sample is mainly determined by the uncertainty of the measurement of the initial (Δm_i) and final concentration (Δm_f), both given as the standard deviation. Therefore $\Delta\eta$ is calculated as the positive square root of the combined variance $\Delta\eta^2$ which can be calculated from the law of propagation of uncertainty [30]:

$$\Delta\eta^2 = \left(\frac{\partial\eta}{\partial m_i} \Delta m_i \right)^2 + \left(\frac{\partial\eta}{\partial m_f} \Delta m_f \right)^2$$

2.5. Instrumentation

Atomic absorption spectrometry measurements were carried out using an AAnalyst 800 Zeeman corrected spectrometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) equipped with a THGA 800 graphite tube atomizer and an AS-72 autosampler. Hollow cathode gold lamps (Maassen GmbH, Reutlingen, Germany) were operated at 10 mA. A sample volume of 20 μ L was introduced into the graphite tube (PerkinElmer) by the autosampler at a pipetting speed of 50%. The optimized graphite furnace temperature program is shown in Table 1. The signal intensity for gold was calculated by integrating the absorbance at $\lambda = 242.8$ nm over a time of 5 s. Calibration for enriched samples was carried out by extraction of NP solutions of known concentration. Thereby the extraction efficiency, phase ratio and enrichment factor is already implied in the calibration function. For concentration determination by standard addition aliquots of Au-NP standard solution with known concentration were added to the sample solution. The absorbance was plotted over the concentration of Au-NP added. The initial sample concentration can be calculated from the x-axis intercept of the calibration curve obtained in a linear least-square fit.

Transmission electron microscopy (TEM) images were taken on a JEM 100 CX (JEOL GmbH, Eching, Germany) operating at 100 kV. Aqueous Au-NP solutions were directly used for measurements. CPE samples were diluted 30-fold in ethanol before TEM measurement to reduce the background in the images caused by the surfactant.

Total organic carbon (TOC) measurements were carried out with a HighTOC II system (Elementar Analysensysteme, Hanau, Germany) according to the recommendations of the manufacturer.

3. Results and discussion

3.1. CPE conditions

To optimize the extraction conditions for the nanoparticles pH was varied between 1 and 7 using hydrochloric acid for pH adjustment. The highest extraction efficiency was achieved at pH 3.1 (Fig. 1a). Hence, for all further experiments the pH was adjusted to this value by adding 0.1 M HCl. The further addition of 100 μ L of 1% (m/v) citric acid (CA) solution per 10 mL of gold nanoparticle solution was found to increase the extraction efficiency significantly. The pH of the solution is not influenced by CA addition.

For the highest possible enrichment the final volume of the nanoparticle rich phase should be as small as possible. On the other hand the extraction efficiency of nanoparticles should not be decreased by the use of an insufficient amount of surfactant. Experiments with different amounts of TX-114 at constant overall volume and nanoparticle concentration (Fig. 1b) showed that for an aqueous sample of 40 mL 800 μ L of a 10% TX-114 solution (m/m in UPW, corresponding to 0.2 wt% in the sample solution) are sufficient to meet the above criteria.

The high viscosity of the so prepared surfactant rich phase made it necessary to dissolve the sample prior to sample introduction to ET-AAS. Ethanol appeared to be a feasible solvent since it readily dissolves the surfactant rich phase and it prevents degradation of the enriched nanoparticles.

The relative signal intensity for samples prepared from solutions containing identical amounts of nanoparticles depends on the volume of solvent used for dilution. To adjust this parameter, different volumes (100–1000 μ L) of ethanol were tested for the dissolution of samples extracted according to the procedure described above. As expected the least diluted sample (100 μ L ethanol) yielded the highest absorbance in ET-AAS measurement but also showed a comparatively high relative standard deviation (RSD > 10%, Fig. 1c). Therefore a volume of 200 μ L of ethanol was used for all measurements. This way an enrichment factor of ~ 80 and a RSD of 2.3% in ET-AAS measurement is achieved.

3.2. Species separation

For the assessment of the species selectivity solutions of dissolved Au(III) were extracted under the conditions described above. A notable co-extraction of Au(III) (up to 14%) was observed. This result indicates that the use of another additive is necessary to accomplish species selectivity. Sodium thiosulphate was found to reduce the extraction efficiency of Au(III) considerably. This additive reduces the Au(III) species to Au(I) which is the most stable oxidation state of gold. Hence all non-(nano)particulate gold will be in the oxidations state +I after the reduction. Also thiosulphate forms a very stable gold complex with the molecular formula $[\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$ [31]. This negatively charged compound is not extracted by the surfactant.

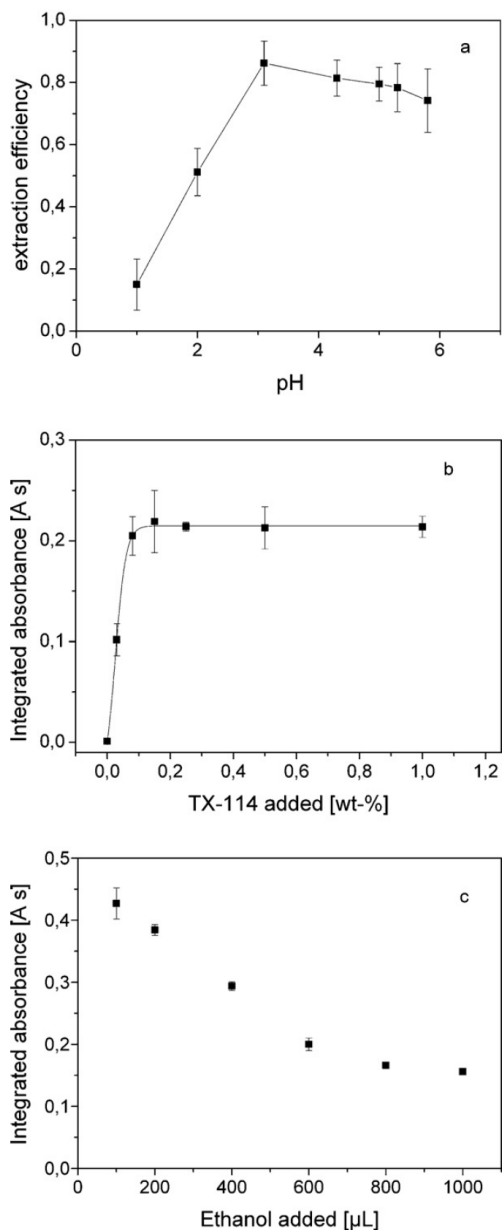


Fig. 1. (a) Influence of the pH on the extraction efficiency of Au-NPs after CPE. Au-NP initial concentration was $100 \mu\text{g L}^{-1}$ at a sample volume of 10 mL. (b) Influence of the surfactant concentration on CPE efficiency. Au-NP initial concentration was 150 ng L^{-1} at a sample volume of 40 mL and (c) Absorbance of an Au-NP/TX-114 sample dissolved in various amounts of ethanol. Volume of surfactant rich phase $\sim 600 \mu\text{L}$, initial gold concentration was 150 ng L^{-1} . Error bars indicate standard deviation of three independent replicates.

With the addition of $100 \mu\text{L}$ of a $1 \text{ M Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution per 10 mL of sample solution the co-extraction of Au(III) is reduced to an extraction efficiency of 0.02 even for initial Au(III) concentrations as high as 1 mg L^{-1} . This suggests that a small fraction of the gold-TS complex is extracted into the surfactant-rich phase by the remaining water that still encloses the hydrophilic moieties of

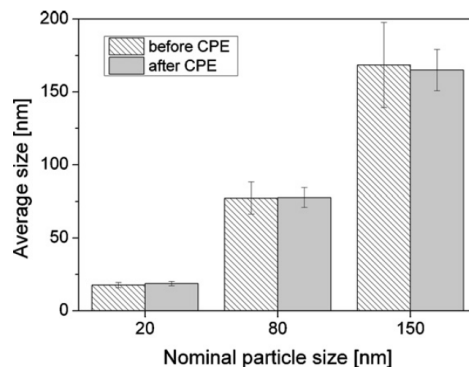


Fig. 2. Size as determined by TEM of size selected Au-NPs before (hatched) and after (grey) CPE. For each value at least 100 particles were evaluated.

the surfactant. Experiments with a higher surfactant concentration in the initial solution and hence higher volume of the surfactant-rich phase after CPE yielded a higher extraction efficiency for Au(III) solutions. This, again, indicates that the employment of low amounts of surfactant is advantageous for the analytical performance of this method.

To overcome interferences caused by thiosulphate in the AAS measurement of gold, calibration solutions must contain $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ in the same concentration as the samples. This way, no decrease of Au-NP extraction efficiency was observed.

3.3. Evaluation of the preservation of the nanoparticle size distribution

To gain an insight in the size distribution of the nanoparticles in real samples it is necessary to know whether the size distribution of Au-NPs is changing during the extraction procedure or not. This was studied using TEM for imaging of the particles before and after CPE. As shown in Fig. 2 the size of particles that underwent the extraction process is more or less identical to the size before CPE treatment. Thereby we conclude that the size distribution is not affected by the presented method. This supports the results of Chao et al. that studied CPE for metal nanoparticles [26]. This finding is especially important because the size determination of nanoparticles is an important issue in current research. CPE samples of Au-NPs can therefore be used for size determination after pre-concentration.

3.4. Optimization of AAS parameters

The temperature program (Table 1) of the THGA oven was adapted to the matrix composition. At lower pyrolysis temperatures ($<600^\circ\text{C}$) the signal intensity for gold is slightly increased compared to higher pyrolysis temperatures. Yet, with increasing pyrolysis-temperatures $>700^\circ\text{C}$ the background signal decreased dramatically by more than one order of magnitude (Fig. 3a). So a pyrolysis-temperature of 1000°C was chosen for all ET-AAS measurements. At this temperature pyrolysis of the matrix is almost complete and the analyte signal is still very high. For the atomization the influence of the temperature was relatively small (Fig. 3b). The highest signal intensity was observed at 1800°C which is a typical value for the ET-AAS determination of gold.

3.5. Method validation

3.5.1. Precision

The precision, expressed as the standard deviation obtained under repeatability conditions [32,33], was tested by repeatedly

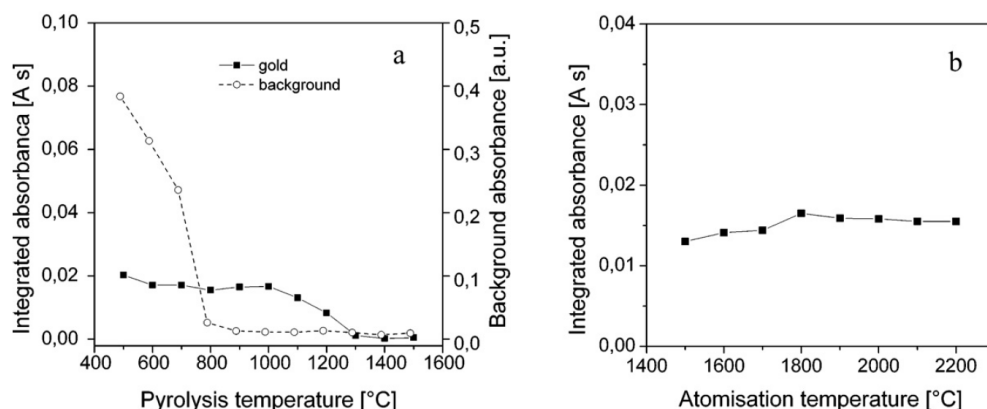


Fig. 3. (a) Signal and background intensity as a function of pyrolysis temperature intensity. Atomization temperature was 1800 °C and (b) Influence of the atomization temperature on the signal intensity for gold. Pyrolysis temperature was 1000 °C. Sample matrix in both experiments was a WWTP effluent sample spiked with Au-NPs at a concentration of 100 ng L⁻¹.

measuring identically prepared NP solutions at a concentration of 100 ng L⁻¹. For experiments at three days, four samples each, we found the precision to be 9.5% ($N = 12$). Hereby the intra-day precision ranged from 2.8 to 6.2% ($N = 4$), the inter-day precision was 8.2% ($N = 3$).

3.5.2. Calibration

For Au-NP with a size of 15 nm, prepared using the method described above, a typical calibration yielded a limit of detection (LoD) of 5 ng L⁻¹. The LoD is the concentration calculated from the maximum height of the prediction interval at zero Au-NP concentration using the calibration function [34,35]. A highly linear correlation ($R^2 > 0.99$) was found for Au-NP concentrations ranging from 12 to 240 ng L⁻¹. The slope and intercept of a typical calibration function are 1.785×10^{-4} and 1.053×10^{-3} , respectively. The coefficient of variation of the method is 5.5% [34,35].

3.5.3. Extraction efficiency for different NPs

To validate the general applicability of the described method the extraction efficiency was determined for nanoparticles of different origin. Self-made citrate capped Au-NPs were compared to commercially available Au-NPs of different size and nanoparticles generated by laser ablation performed in high purity water. The latter can be considered as genuinely free from additives. The extraction efficiency for citrate capped particles (0.952 ± 0.025) differed only slightly from the one of laser ablation generated particles (0.899 ± 0.065). The particle size was comparable for both kinds of Au-NP, the average size was 11.2 and 8.7 nm for citrate capped and laser ablated particles.

Interestingly, we found a relationship between the particle size and the extraction efficiency (Fig. 4). The extraction efficiency decreases from 1.011 ± 0.055 (2 nm) to 0.515 ± 0.155 (150 nm). Nevertheless the method appears very promising since the particles >100 nm are not considered to be nanoparticles in the sense that their properties are different from bulk material of the same composition (see e.g. IUPAC recommendations [36]). Although this definition is not a strict dividing line between nanoparticles and non-nanoparticles, studies have shown that adverse effects of MNPs depend on their size with the smallest particles being more toxic [37]. It is exactly this size range of gold particles which is extracted with a very high efficiency.

3.5.4. Influence of natural organic matter and inorganic colloids on CPE efficiency

The relevance of an analytical method depends mainly on the performance when applied to complex matrices and real environmental samples. Natural aquatic samples are considered to contain a high amount of natural organic matter (NOM). Especially in real samples that are most likely expected to contain gold nanoparticles (e.g. wastewater, industrial effluent, or sewage) a high concentration of NOM is found. To simulate the impact of NOM on the extraction process, commercially available humic acid (HA) was applied [38]. The influence of HA in different concentrations on the extraction behavior and extraction efficiency of both, gold nanoparticles and dissolved Au(III), was investigated. Aliquots of a HA stock suspension (1 g L⁻¹) were used to produce samples with HA concentrations ranging from 0 to 25 mg L⁻¹. The results of the CPE experiments are shown in Fig. 5 (note that the concentration of Au(III) used was 50 times higher than for Au-NPs). For Au-NP samples the absorbance is merely constant for HA concentrations up to 10 mg L⁻¹. Only for HA levels higher than 10 mg L⁻¹ significant changes of the extraction behavior were observed. For Au(III) the extraction is slightly increasing with HA concentration. However, even at a HA concentration as high as 25 mg L⁻¹ the extraction is

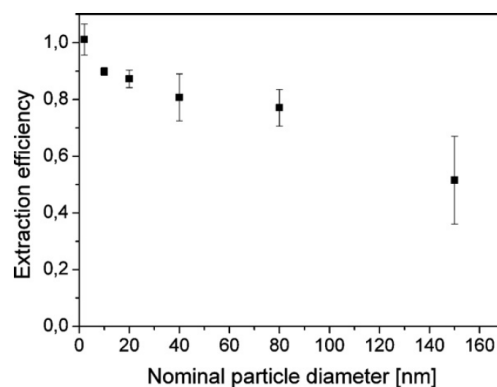


Fig. 4. CPE extraction efficiency for Au-NPs of different size; HCl (0.1 M) was used for pH adjustment, 0.1% TX-114 (w/v), 100 μg L⁻¹ Au-NP. Error bars indicate standard deviation of three independent replicates.

Table 2Recovery rates for Au-NPs spiked to environmental samples at different concentrations ($n = 3$).

Sample name and TOC	Au-NP added (ng L^{-1})	Au-NP found (ng L^{-1})	Recovery (%)
River water (Isar-River); TOC = 1.9 mg L^{-1}	0	<LoD	–
	55	54.3 ± 2.9	98.7 ± 11.0
	110	113.0 ± 1.3	102.7 ± 6.4
	220	227.1 ± 3.8	103.2 ± 6.9
WWTP outlet; TOC = 4.2 mg L^{-1}	0	<LoD	–
	30	28.0 ± 4.7	93.3 ± 15.7
	60	59.2 ± 4.5	98.7 ± 7.5
	180	163.9 ± 4.8	91.1 ± 2.7

lower than 5%. For a HA concentration of 10 mg L^{-1} the extraction efficiency is increased from 0.02 (no HA) to 0.03. We conclude that for HA levels lower than 10 mg L^{-1} the effect on CPE is negligible for both, Au-NP and dissolved gold. Since in most waters, especially fresh waters, the HA concentrations range from 0 to 10 mg L^{-1} [39] the method should be readily applicable. For higher NOM concentrations the method might still be feasible if the standard addition method is used for calibration. Since the water-soluble fraction of the HA used for the experiments is only approximately 20% of the total NOM content, this experiment also indicates that nano- and micro-particles other than Au-NPs do not interfere with the extraction.

For further testing this issue, mixtures of TiO_2 -particles and Au-NP were analyzed. This material was chosen for two reasons: on one hand TiO_2 is often being used as a model substance for minerals and colloids in water [40], on the other hand TiO_2 -NP are predicted to rise in concentration in natural waters in the near future [8], so it is advantageous for the proposed CPE method to tolerate such matter at least in natural occurring concentrations. In our experiments we found no influence of TiO_2 particles on the Au-NP extraction up to a TiO_2 concentration of 50 mg L^{-1} (Fig. 6).

3.5.5. Spiking experiments and analysis of real samples

The applicability of the proposed method was tested with different real water samples. In many of the samples examined, Au-NPs could not be detected at a LoD of 5 ng L^{-1} . Therefore, spiking experiments were conducted to test the potential of the method for measurement of these samples. WWTP effluent and river water was spiked with self made citrate capped Au-NPs. Preliminary experiments at elevated Au-NP concentrations ($\sim 20 \mu\text{g L}^{-1}$) resulted in an average recovery of $93.6 \pm 3.5\%$ ($N = 13$) in WWTP effluent.

For lower concentrations between 30 and 220 ng L^{-1} , the recovery rates in river and WWTP water can be found in Table 2. For the

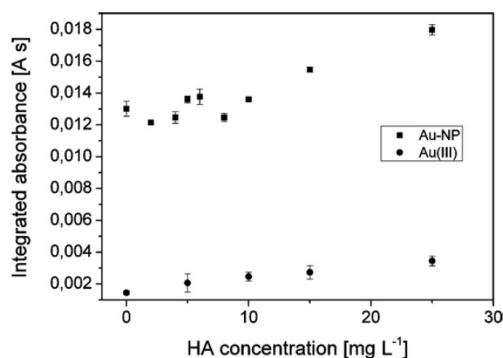


Fig. 5. Signal intensity for Au-NP CPE samples when extracted in presence of humic acid (HA); HA concentrations ranged from 0 to 25 mg L^{-1} ; Au-NP and Au(III) concentration of the initial sample was 50 ng L^{-1} and 2500 ng L^{-1} . Error bars indicate standard deviation of three independent replicates.

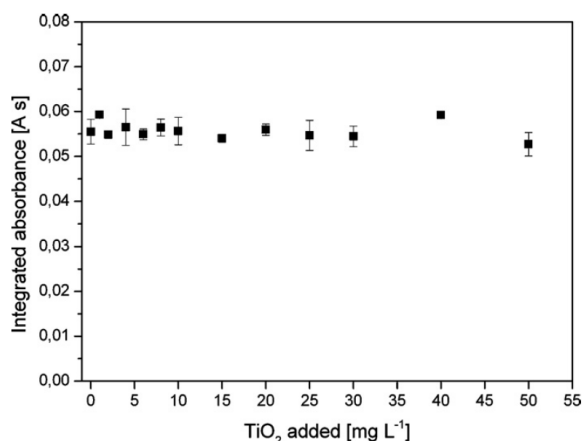


Fig. 6. Absorbance for CPE samples of Au-NP in UPW ($c = 500 \text{ ng L}^{-1}$) spiked with varying amounts of TiO_2 particles. Error bars indicate the standard deviation of the triplicate measurement for each sample.

spiked samples a major fraction (91–103%) of the Au particles could be extracted. The recovery seems not to depend on the particle concentration since the results for samples in the ng L^{-1} range are very similar to those for samples with concentrations of some $\mu\text{g L}^{-1}$ of Au-NPs. It is worth noting that all results presented in this section were produced using a short incubation and subsequent centrifugation. Overnight incubation resulted, especially for WWTP effluent, in a lower recovery of about 70%. We suggest that this apparent decrease of efficiency is caused by NP degradation. It has already been observed that gold nanoparticles can get dissolved in natural waters, especially at high concentrations of natural organic matter [41,42]. Hence Au-NPs might readily decompose in the WWTP effluent, especially at elevated temperatures.

In addition to WWTP effluent, where no Au-NPs could be detected, we also investigated WWTP influent (untreated urban wastewater), where higher concentrations of AuNPs could be expected. Here an Au-NP concentration of $17.3 \pm 6.8 \text{ ng L}^{-1}$ was found. This value was obtained using a standard addition approach. The gold content in the wastewater of German cities has already been investigated by the analysis of sewage sludge. [43] The source – especially for nano-sized particles – is however not yet clear. Major sources might be jewelry, dental industry, and catalysis.

4. Conclusion

We have presented a method for the determination of gold nanoparticles in aquatic systems. The particles are separated and pre-concentrated by cloud point extraction using Triton X-114 as collecting phase. Effective species separation from dissolved gold species and an enrichment factor of 80 for Au-NP is achieved by a simple and easy to perform procedure. For quantification ET-AAS

is employed which allows for direct measurement of the slightly diluted surfactant-rich phase with a limit of detection in the lower ng L^{-1} – range. Robustness regarding NOM and particulate minerals such as TiO_2 implies the suitability of the method for the analysis of real environmental samples. Also, the proposed method does not affect the size of the particles that undergo extraction. Consequently, samples prepared by CPE could be used not only to determine the overall Au-NP concentration but also be further processed for the evaluation of particle size distributions in aqueous samples. Experiments with spiked water samples revealed, that Au-NP can be recovered almost quantitatively even at concentrations as low as 30 ng L^{-1} . In WWTP influent Au-NPs were present at a concentration of $17.6 \pm 6.8 \text{ ng L}^{-1}$ while no gold nanoparticles were found in WWTP effluent and river water at a limit of detection of 5 ng L^{-1} . Therefore we conclude that the environmental concentration of Au-NP is still very low. However, due to enhanced production and application of gold nanoparticles their input into the environment might increase within the next years.

Further experiments will include studies regarding the recovery of Au-NPs from other media and the implementation of other metal nanoparticles (Ag, Pt and Pd).

Acknowledgements

This research project was financed by the Bavarian State Ministry of the Environment and Public Health. G.H. would like to thank Dr. Marianne Hanzlik at the chair for electron microscopy, Technische Universität München (TUM), for conducting the TEM measurements and discussing the results. Also, we thank Prof. Dr. Brigitte Helmreich and Wolfgang Schröder at the Institute for Water Chemistry Control, TUM, for TOC measurements.

References

- [1] M. Youns, J.D. Hoheisel, T. Efferth, *Curr. Drug Targets* 12 (2011) 357–365.
- [2] R. Sardar, A.M. Funston, P. Mulvaney, R.W. Murray, *Langmuir* 25 (2009) 13840–13851.
- [3] V. Rattanaruengsriikul, N. Pimpha, P. Supaphol, *J. Appl. Polym. Sci.* 124 (2012) 1668–1682.
- [4] R.J. Griffitt, N.J. Brown-Peterson, D.A. Savin, C.S. Manning, I. Boube, R.R. Ryan, M. Brouwer, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 160–167.
- [5] N.M. Schaeblin, L.K. Braydich-Stolle, E.I. Maurer, K. Park, R.I. MacCusprie, A.R.M. Nabiul-Afroz, R.A. Vaia, N.B. Saleh, S.M. Hussain, *Langmuir* 28 (2012) 3248–3258.
- [6] S.Y. Choi, S. Jeong, S.H. Jang, J. Park, J.H. Park, K.S. Ock, S.Y. Lee, S.W. Joo, *Toxicol. In Vitro* 26 (2012) 229–237.
- [7] J.H. Fan, W.T. Li, W.I. Hung, C.P. Chen, J.M. Yeh, *Biomed. Eng.: Appl. Basis Commun.* 23 (2011) 141–152.
- [8] F. Gottschalk, T. Sonderer, R.W. Scholz, B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9216–9222.
- [9] O. Myakonkaya, Z. Hu, M.F. Nazar, J. Eastoe, *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 11784–11790.
- [10] H. Hagendorfer, R. Kaegi, J. Traber, S.F.L. Mertens, R. Scherrers, C. Ludwig, A. Ulrich, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 367–378.
- [11] B. Schmidt, K. Loescher, N. Hadrup, A. Mortens, J.J. Sloth, C. Bender Koch, E.H. Larsen, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2461–2468.
- [12] S.K. Ratanathanawongs Williams, J.R. Runyon, A.A. Ashames, *Anal. Chem.* 83 (2011) 634–642.
- [13] H. Hagendorfer, R. Kaegi, M. Parlinska, B. Sinnet, C. Ludwig, A. Ulrich, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2678–2685.
- [14] A. Ulrich, S. Losert, N. Bendixen, A. Al-Kattan, H. Hagendorfer, B. Nowack, C. Adlhart, J. Ebert, M. Lattuada, K. Hungerbühler, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1120–1130.
- [15] R.B. Reed, C.P. Higgins, P. Westerhoff, S. Tadjiki, J.F. Ranville, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1093–1100.
- [16] J. Touriniemi, G. Cornelis, M. Hasselöv, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3965–3972.
- [17] D.M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, C.P. Higgins, J.F. Ranville, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1131–1142.
- [18] L. Li, K. Leopold, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4340–4349.
- [19] U. Pfüller, *Mizellen-Vesikel-Mikroemulsionen*, Springer Verlag, Berlin, 1986.
- [20] S. Xie, M.C. Paau, C.F. Li, D. Xiao, M.M.F. Choi, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2306–2317.
- [21] C.B. Ojeda, F.S. Rojas, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 759–782.
- [22] M.A. Mesquita da Silva, V.L.A. Frescura, A.J. Curtius, *Spectrochim. Acta B* 55 (2000) 803–813.
- [23] L. Tavakolib, Y. Yaminia, H. Ebrahimzadehc, A. Nezhadali, S. Shariatia, F. Nourmohammadiand, *J. Hazard. Mater.* 152 (2008) 737–743.
- [24] M.A. Mesquita da Silva, V.L.A. Frescura, F.J.N. Aguilera, A.J. Curtius, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 1369–1373.
- [25] J.L. Manzoori, H. Abdolmohammad-Zadeh, M. Amjadi, *Microchim. Acta* 159 (2007) 71–78.
- [26] J.B. Chao, J.F. Liu, S.J. Yu, Y.D. Feng, Z.Q. Tan, R. Liu, Y.G. Yin, *Anal. Chem.* 83 (2011) 6875–6882.
- [27] J.F. Liu, J.B. Chao, R. Liu, Z.Q. Tan, Y.G. Yin, Y. Wu, G.B. Jiang, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6496–6502.
- [28] N. Bärtsch, J. Jakobi, S. Weiler, S. Barcikowski, *Nanotechnology* 20 (2009) 445603.
- [29] M. Hillert, *Acta Metall.* 13 (1965) 227–238.
- [30] Joint Committee for Guides in Metrology, JCGM 100:2008: Evaluation of Measurement Data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, 2008.
- [31] J.P. Fackler, W.E. van Zyl, B.A. Prihoda, in: H. Schmidbaur (Ed.), *Gold – Progress in Chemistry, Biochemistry and Technology*, John Wiley & Sons, Chichester, 1999.
- [32] International Organization for Standardisation, ISO 3534-1:1993 Statistics – Vocabulary and Symbols – Part 1 Probability and General Statistical Terms, 1993.
- [33] S.L.R. Ellison, A. Williams (Eds.), *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2012.
- [34] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1992.
- [35] J. Vogelgesang, J. Hädrich, *Accred. Qual. Assur.* 3 (1998) 242–255.
- [36] J.H. Duffus, M. Nordberg, D.M. Templeton, *Pure Appl. Chem.* 79 (2007) 1153–1344.
- [37] T.-H. Kim, M. Kim, H.-S. Park, U.S. Shin, M.-S. Gong, H.-W. Kim, *J. Biomed. Mater. Res. A* 100A (2012) 1033–1043.
- [38] P. MacCarthy, in: E.A. Ghabbour, G. Davies (Eds.), *Humic Substances – Structures, Models and Functions*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001.
- [39] S.J. Klaine, P.J.J. Alvarez, G.E. Batley, T.F. Fernandes, R.D. Handy, D.Y. Lyon, S. Mahendra, M.J. McLaughlin, J.R. Lead, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1825–1851.
- [40] M. Olson, A.-M. Jakobsson, Y. Albinsson, *J. Colloid Interface Sci.* 266 (2003) 269–275.
- [41] G.R. Aiken, H. Hsu-Kim, J.N. Ryan, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 3196–3201.
- [42] F. Reith, M.F. Lengke, D. Falconer, D. Crow, G. Southam, *ISME J.* 1 (2007) 567–584.
- [43] B.G. Lottermoser, *Int. J. Env. Stud.* 46 (1994) 167–171.

Publikation 2:

“Ultra-trace determination of silver nanoparticles in water samples using cloud point extraction and ETAAS”

Veröffentlicht 2013 in der Fachzeitschrift *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*,
Band 28, Seiten 567 – 572.

Autoren: Georg Hartmann, Christine Hutterer und Michael Schuster

Ultra-trace determination of silver nanoparticles in water samples using cloud point extraction and ETAAS†

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 567

Georg Hartmann, Christine Hutterer and Michael Schuster*

The continuing boom of nanotechnology leads to the question of the environmental fate of engineered nanoparticles. In this study an improved method for the quantification of silver nanoparticles (Ag-NPs) in environmental samples in the nanogram per litre range by means of cloud point extraction (CPE) and electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) is presented. Separation of nanoparticles from ionic silver species is achieved by addition of the ligand EDTA. A limit of detection (LoD) as low as 0.7 ng L⁻¹ was obtained by optimizing the extraction conditions, the enrichment factor, and the ETAAS measurement conditions. In comparison to previously published studies the LoD for silver nanoparticles after CPE is improved by a factor of 10 because ETAAS detection requires no additional sample digestion after extraction. Samples of different complexity such as river water, treated and untreated municipal wastewater and synthetic solutions containing dissolved and particulate organic matter with a total organic carbon (TOC) content up to 10 mg L⁻¹ were spiked with different concentrations of Ag-NPs and a high recovery (>80%) was found in all cases. Due to the low LoD and high tolerance levels for other particulate matter, TOC and ionic species, selective determination of Ag-NPs in municipal wastewater and also in the effluent of sewage treatment plants is now possible.

Received 11th December 2012

Accepted 12th February 2013

DOI: 10.1039/c3ja30365a

www.rsc.org/jaas

Introduction

Over the past couple of years the number of consumer products containing engineered nanomaterials (ENMs) has grown rapidly. Besides other ENMs like carbon nanotubes or TiO₂ nanoparticles, nanosized silver particles – or silver nanoparticles (Ag-NPs) – are widely used due to their antimicrobial and antibacterial properties.^{1,2} A report from the European Consumer Organisation³ shows that in 2012 there are more than 116 products on the European market that are claimed to contain “nano-silver”. As a consequence also the quantity of Ag-NPs emitted to the environment is predicted to rise.⁴ At the same time adverse effects of Ag-NPs are in the focus of current research. Several studies show the potential toxicity of engineered Ag-NPs not only for bacteria but also for fish^{5,6} and even human cell lines.^{7,8} Yet the predicted concentrations of Ag-NPs in the aquatic environment are in the range of 0.1 to 100 ng L⁻¹,⁴ which is far below the concentrations used in the toxicity studies cited above. Nevertheless environmental monitoring might be appropriate, since it has been demonstrated that silver may accumulate in the food chain and can harm animals even at sublethal doses.⁹

However, no standard method for the quantification of Ag-NPs in environmental samples has yet been established. Major challenges are the low concentrations expected, the complexity of the matrix in samples like untreated wastewater, and species-selective detection. Some studies have presented the combination of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for elemental analysis with a size-selective approach like field-flow fractionation^{10,11} (FFF) or hydrodynamic chromatography¹² (HDC) for the analysis of silver and gold NPs. One limiting factor of these methods is the high limit of detection (>0.5 µg L⁻¹), which is – among other problems – due to sample dilution during the analytical procedure. This problem could be partly overcome by using enrichment steps.¹³ Another critical aspect is the interaction between ENMs and the membranes used in FFF, which sometimes cause low recoveries and other obstacles.¹⁴ Direct detection of nanoparticulate metals was reported using single particle ICP-MS (spICP-MS). Here the particle size is correlated with the integral signal intensity for a selected *m/z* ratio over a short period of time (usually a few milliseconds). Silver NPs have been quantified using spICP-MS with a limit of detection (LoD) in the lower ng per liter range.^{15,16} In a very promising approach the combination of spICP-MS and HDC has been demonstrated for gold NPs.¹⁷ But due to statistical means and a poor signal-to-noise ratio, detection of particles smaller than 20 nm in diameter is not possible yet using spICP-MS.¹⁵

Another approach for Ag-NP quantification is cloud-point extraction (CPE). This method is well known for the analysis of

Technische Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching, Germany.
E-mail: michael.schuster@tum.de; Fax: +49 89 289-14513; Tel: +49 89 289-13763

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3ja30365a

non-polar organic substances and metal ions after complexation to non-polar compounds in water.^{18,19} A surfactant – in this case Triton X-114 (TX-114) – is added to the sample at a concentration that exceeds the critical micellar concentration (cmc). For a temperature higher than the specific cloud point temperature (23 °C for TX-114) the surfactant forms micelles in which non-polar substances are encapsulated. Since the density of the micelles is higher than that of water, they settle after some time – this process is usually accelerated by centrifugation. As the volume of surfactant is very small in comparison to the overall sample volume, not only separation of different chemical species of one element, but also high enrichment is possible. Liu *et al.* used CPE for the first time to determine Ag-NPs in aqueous samples.^{20,21} Using ICP-MS for quantification, separation of silver nanoparticles from Ag⁺ ions, determination of Ag-NP release from consumer products, and measurement of spiked environmental samples with a recovery ranging from 57–116% and a LoD of 6 ng L⁻¹ could be achieved. Also, electron microscopy showed that the size and shape of nanoparticles are not affected by the extraction procedure. For the measurement, the surfactant-rich phase (volume ~ 100 µL) has, however, to undergo microwave assisted acid digestion and further dilution to 50–100 mL prior to ICP-MS measurement. This makes the analytical method laborious and leads to a distinct decrease of the limit of detection.

In this study we report a CPE method for the extraction of silver nanoparticles with electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) for quantification. Our aim was to develop a faster and more simple method where the surfactant rich phase can directly be used for ultra-trace determination of Ag-NPs in environmental samples.

Experimental

Chemicals and materials

All chemicals were of analytical grade or better unless stated otherwise. Before being used they were checked for silver contamination by ETAAS. Ethanol, ethylenediaminetetraacetate disodium salt (EDTA), acetic acid, citric acid, sodium borohydride, sodium acetate, sodium thiosulphate, sulfuric and nitric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). TX-114 was purchased from AppliChem (Darmstadt, Germany). For synthesis of Ag-NPs and ETAAS-calibration, silver stock solution (AgNO₃ in 0.5 M HNO₃, 1000 mg L⁻¹, Merck) was used. Ultrapure water (UPW) was prepared using a DirectQ 3 Ultrapure Water System (Millipore, Billerica, MA, USA). All glass vessels were rinsed with diluted nitric acid 6.5% (v/v) three times, steamed with nitric acid vapor for four hours, rinsed threefold with UPW and then stored in a particle free environment until usage. Humic acid (HA) dry powder (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) was used to simulate natural organic matter (NOM). The soluble fraction of this material is approx. 20% so not only dissolved organic matter (DOM) but also particulate organic matter can be simulated. The total organic carbon (TOC) content was adjusted to 10 mg L⁻¹ for HA containing samples. Silver nanoparticles were synthesized by reduction of Ag(I) with

sodium borohydride in the presence of citrate and purified by dialysis afterwards. Details can be found in the ESI.†

Sewage treatment plant (STP) influent and effluent were obtained from the public STP of the cities of Munich and Augsburg, Germany. River water was taken from the river Isar near Munich, Germany.

Instrumentation

A Zeeman-corrected atomic absorption spectrometer AAnalyst 800 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) equipped with a transversally heated THGA 800 graphite tube atomizer was used for ETAAS measurement. High purity argon (99.996%) was used as inert gas for AAS measurement. Silver hollow cathode lamps (Photron, Victoria, Australia) were operated at 10 mA. The absorption line at $\lambda = 328.1$ nm was selected for the quantification of silver. The signal intensity was calculated by integrating the background corrected absorbance over an interval of 5 s. The optimized temperature program for the graphite furnace can be found in Table 1. All samples were measured at least in triplicate.

UV-vis spectra were recorded with a Lambda 35 UV-vis spectrometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) using PMMA sample cuvettes (VWR, Darmstadt, Germany). TOC measurements were carried out with a HighTOC II system (Elementar Analysensysteme, Hanau, Germany) according to the recommendations of the manufacturer.

CPE sample preparation and calibration procedure

Tapered 50 mL polypropylene screw cap vials (VWR, Darmstadt, Germany) were used for CPE sample preparation. 40 mL of aqueous sample solution were mixed with 1.0 mL of saturated EDTA solution, 400 µL of 1 M sodium acetate, 100 µL 1.25 M acetic acid, and 1 mL of 10% TX-114 (w/w in UPW). Samples prepared this way were stirred intensively and then kept at a temperature of 40 °C for 2 hours. Afterwards the tubes were centrifuged at 5000 rpm to accelerate phase separation and then placed on ice to increase the viscosity of the surfactant rich phase. The aqueous supernatant was removed by decanting. 100 µL of ethanol were added to dissolve the remaining surfactant droplet and this solution was then forwarded to ETAAS measurement.

Table 1 Graphite furnace temperature program for the determination of silver after CPE (surfactant rich phase in 100 µL of ethanol)

Process	Temperature [°C]	Ramp time [s]	Hold time [s]	Argon flow rate [mL min ⁻¹]
Drying I	80	5	20	250
Drying II	130	10	20	250
Pyrolysis	600	20	20	250
Cooling	300	1	5	250
Atomization ^a	1800	0	5	0
Clean-out	2450	1	3	250

^a Read step.

For ETAAS calibration, standard solutions of a defined Ag-NP concentration in water were used. These solutions were pre-treated, extracted, and measured the same way as described above. The calibration functions, the associated confidence intervals and the limit of detection were calculated as described in the literature.^{22,23}

For standard addition experiments aliquots of Ag-NP stock solution were spiked to the sample matrix immediately before the extraction. The extraction and measurement procedure was the same as described above. After measurement the ETAAS signal intensity was plotted *versus* the spiked Ag-NP concentration. From the linear plot of the signal intensity over the concentration of Ag-NPs spiked, the *x*-axis intercept x_0 was calculated, which represents the initial Ag-NP concentration.

To optimize the CPE method, extraction efficiency was determined for aqueous Ag-NP solutions under different conditions (pH value, surfactant volume, HA concentration) and with different additives (thiosulphate, thiocyanate, nitrate, 11-mercapto-*n*-undecanoic acid and EDTA) at an initial volume of 40 mL and with Ag-NP concentrations in the μg or ng L^{-1} range. The extraction efficiency (η) is the main parameter that describes the performance of the extraction procedure. Basically, η is the fraction of the analyte in the initial sample that is transferred to the surfactant phase during the extraction process. In practice η was calculated from the ratio of the final silver content (c_{final}) in the surfactant-rich phase and the initial silver content (c_{init}) in the sample. While c_{init} was calculated from the concentration of the Ag-NP stock solution used, for the calculation of c_{final} the surfactant-rich phase had to be measured by ETAAS. Before measurement, the surfactant-rich phase was made up to a fixed volume of 10 mL in a volumetric flask using ethanol. The values obtained for c_{final} were divided by four because of the different volumes of the initial sample and the solutions finally used for quantification.

Results and discussion

CPE parameter optimization

pH-value. The pH value is one of the most relevant parameters for CPE efficiency. In a previous study²⁰ a pH of ~ 3 using HNO_3 yielded the best CPE extraction efficiency for Ag-NPs. We did not find a η higher than 0.6 at pH-levels ranging from 1 to 7 using HNO_3 and H_2SO_4 buffer solutions. Instead, a $\text{pH} \geq 5$ using an acetic acid–sodium acetate buffer solution resulted in the highest extraction efficiency ($\eta > 0.9$). This might be caused by different surface modifications of the particles that were used in both studies which in turn leads to different zeta potentials and zero point charge pHs of the NPs. The influence of these parameters on the CPE is already known and described in the literature.²⁰

Species selectivity. The separation of nanoparticles and ionic species of the same metal is a key challenge for each analytical method developed to quantify metal nanoparticles. In CPE species separation is usually achieved by complexation of the ionic species with an appropriate ligand, which binds the metal ions and forms non-extractable (usually negatively) charged metal–ligand complexes. In the literature thiosulphate (TS) was

identified as a suitable ligand for the separation of Ag(I) from Ag-NPs.²⁰ In our experiments we did, however, find a very low apparent extraction efficiency for Ag-NPs using TS as an additive. This might most likely be attributed to the use of ETAAS for quantification. Pyrolysis products of TS – such as SO_2 or S_8 (ref. 24) – may cause spectral interference in the AAS determination of silver.

Several other complexing agents like thiocyanate, nitrate, 11-mercapto-*n*-undecanoic acid and EDTA were tested. Based on these experiments the widely used ligand EDTA turned out to be suitable for $\text{Ag}^+/\text{Ag-NP}$ species separation. For an Ag^+ solution with a matrix that only contained UPW the extraction efficiency for Ag^+ did not differ between EDTA and non-EDTA samples. More complex samples, that contained a high amount of natural organic matter, were simulated by adding aliquots of humic acid to Ag-NP solutions. Here, a significant co-extraction of Ag^+ was observed that was linearly correlated with the HA concentration ($R^2 = 0.97$, see ESI Fig. S-1†). To show the influence of EDTA on Ag^+ extraction, samples containing 10 mg L^{-1} HA and different amounts of EDTA were extracted. We found that EDTA reduces the Ag^+ co-extraction for these samples to the value typical for samples without HA. (see ESI Fig. S-2†). Hence the usage of EDTA can compensate the effect of Ag^+ co-extraction that is caused by humic acids and other NOM. Under the conditions described in the Experimental section the average extraction efficiency for Ag^+ was as low as 0.042 ± 0.002 ($n = 3$).

Even if the concentration of dissolved silver is in the same range as that of Ag-NPs, the contribution of ionic silver to the quantification of Ag-NPs using the proposed method can be neglected. This is the case for most of the environmental samples, where concentrations of dissolved silver from 0.23 to 0.42 nmol L^{-1} ($24\text{--}45 \text{ ng L}^{-1}$) are reported in the literature for the STP influent.²⁵

Enrichment factor. To achieve a low limit of detection the optimization of the enrichment factor is crucial. For practical reasons (sample handling, centrifugation, *etc.*) it is not suitable to use a very high initial sample volume. Instead, it is much more advantageous to reduce the final volume of the analytical sample after extraction for a given initial sample volume. This especially applies if only a very small amount of analytical sample is required for detection, which is the case for ETAAS where a small volume of $100 \mu\text{L}$ is sufficient for a 5-fold determination.

One way to attain a small final volume is to reduce the amount of surfactant added. On the other hand the recovery and precision should not suffer from the reduction of the surfactant concentration. For the experiments discussed in this paragraph samples were prepared from Ag-NP suspensions in UPW containing always the same Ag-NP concentration. After extraction the surfactant-rich phase was made up to 10 mL with ethanol to avoid a bias in the signal intensity caused by a different final volume for different surfactant concentrations. Hence, only the relative extraction efficiency is observed as a function of the volume of TX-114 added. We found an increase of the relative ETAAS signal intensity for a fixed particle concentration with increasing amount of TX-114 (see ESI, Fig. S-3†). Additionally the relative standard deviation (RSD) of a

threefold measurement is notably high for surfactant concentrations $<100 \mu\text{L}$ TX-114 and an initial sample volume of 40 mL. Too small quantities of surfactant therefore deteriorate the precision of the method. The addition of higher quantities of surfactant $>100 \mu\text{L}$ TX-114 leads to a slightly higher Ag-NP recovery, but the resulting increase of the final sample volume also causes an over-all reduction of the enrichment factor. We therefore decided to use an amount of $100 \mu\text{L}$ TX-114 for Ag-NP enrichment from a sample volume of 40 mL for all further experiments, yielding an enrichment factor of about 80. Because of the high viscosity of the surfactant, TX-114 was added as 10 wt% aqueous solution. Under the given conditions the average extraction efficiency for silver nanoparticles was 0.93 ± 0.02 ($n = 9$).

The second parameter that influences the enrichment factor is the type and amount of organic solvent used to dissolve the surfactant-rich phase before ETAAS measurement. This step is necessary because of the high viscosity of the enriched surfactant phase, which impairs homogenization and proper pipetting of the sample into the graphite tube. Ethanol was found to be well suited for this purpose. It readily dissolves the surfactant phase, agglomeration and precipitation of enriched particles do not occur, it is fully compatible with ETAAS requirements and as a welcome side-effect it is non-toxic. An inverse correlation between the signal intensity and the ethanol volume was found (see ESI, Fig. S-4†). Dissolution of the surfactant phase in less than $100 \mu\text{L}$ of ethanol results in a too high viscosity of the solution and as a consequence a loss of reproducibility in ETAAS measurement. Hence, a volume of $100 \mu\text{L}$ of ethanol was used for all further experiments.

ETAAS procedure

Furnace program optimization. In the first step the pyrolysis temperature (T_p) was varied in a temperature range from 400–900 °C (Fig. 1a). The ramp and hold times were kept constant at 20 s. Adjusting T_p accurately is particularly important because the analytical sample contains a very high amount of organic material, mainly the surfactant but also co-extracted NOM. For low T_p (<500 °C) the background signal is very high. Incomplete pyrolysis of organic material leads to soot generation and unspecific absorbance during the atomization step. The silver signal intensity shows a maximum at $T_p = 600$ °C and decreases for higher pyrolysis temperatures. The atomization temperature (T_a) has a much lower effect on the signal intensity (Fig. 1b); the difference between the maximum and minimum intensity is only 10% in the temperature range between 1500 and 2000 °C. The highest absorbance was achieved at $T_a = 1800$ °C. Also the background signal was almost constant. For all further experiments T_p and T_a were set to 600 and 1800 °C, respectively.

Applying the optimum conditions derived from the results presented above, the analyte in the sample tends to atomize very fast, the highest absorbance is reached after ~ 0.85 s (Fig. 2a, dotted line). Furthermore the shape of the transient peak, *i.e.* the time resolved absorbance signal, is not satisfactory in terms of baseline stability (Fig. 2b, dotted line). After about 1.7 s the absorbance falls below the base line. Obviously, the built-in

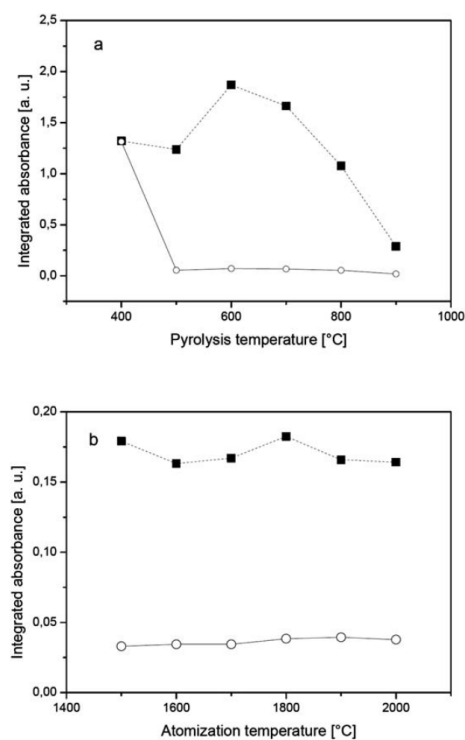


Fig. 1 Silver signal intensity (■) and background intensity (○) as a function of (a) pyrolysis temperature and (b) atomization temperature.

measurement and evaluation algorithms of the AAS spectrometer are not able to handle this correctly. As a consequence the integrated absorbance calculated by the instrument is too low, especially in the case of low analyte concentrations. To solve this problem an additional temperature step was implemented between the pyrolysis and atomization procedure. The furnace was allowed to cool down for 5 s, which results in a slightly delayed atomization and a base-line stable atomization signal. Temperatures between 200 and 400 °C were tested for this intermediate cooling step. The highest absorbance for a constant analyte concentration is achieved at a cooling step temperature (T_c) of 300 °C (Fig. 2c, squares), although the difference in signal intensity is merely small for different T_c . The background signal intensity is only slightly affected by T_c . Using the cooling step at $T_c = 300$ °C the base-line stability is improved as to be seen in Fig. 2b (solid line). This is especially important for the measurement of low concentrations of Ag-NPs, where the integrated absorbance is very low. The relative effect of negative bias on the integrated absorbance is significant: the signal intensity for the determination of silver in an environmental sample after CPE (*e.g.* STP effluent) with an Ag-NP concentration of approximately 12 ng L^{-1} is improved by more than 30% and as a consequence a better signal to noise ratio and a better limit of detection are achieved.

Calibration. Because of the simplicity of the CPE procedure it is useful to perform the calibration in the same way the

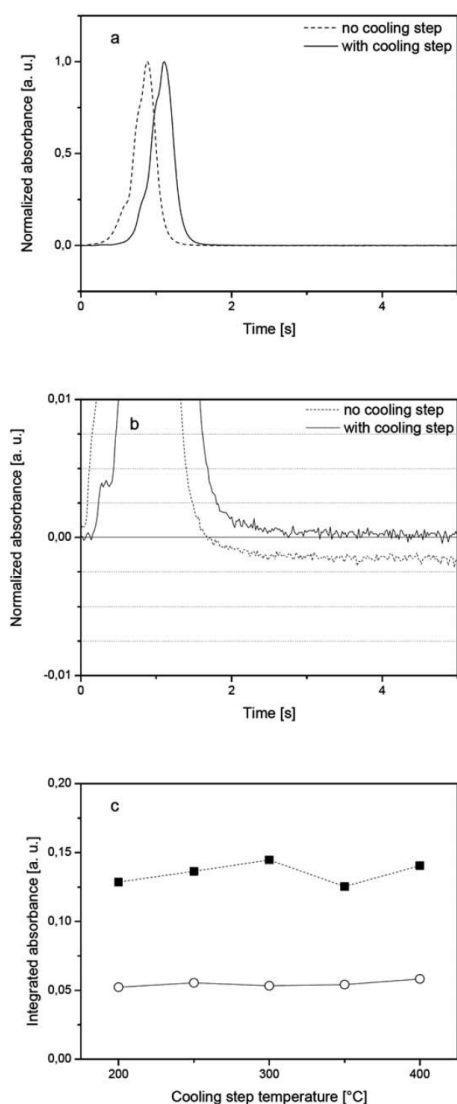


Fig. 2 (a) Time resolved transient peak display of the silver signal intensity with (solid line) and without (dotted line) cooling step; (b) 100 \times magnification of (a); (c) silver signal intensity (■) and background intensity (○) for different cooling step temperatures.

analytical samples are prepared. This allows for a better compensation of unrecognized variations in the enrichment procedure, final sample volume, *etc.* Moreover, the basic physical and chemical properties of the analytical samples and the calibration standards are the same. For this purpose, aqueous Ag-NP suspensions of known concentrations were subjected to the CPE procedure and used for calibration of ETAAS measurement.

The detection limit of the method, calculated from the confidence interval of the linear regression function,²³ is 0.7 ng Ag-NP per liter. Four calibration standards with different Ag-NP concentrations were applied for ETAAS calibration. The RSD of the signal intensity for the five-fold determination of each calibration point was between 1.8 and 12.8%. Linearity of the resulting calibration function was good ($R^2 > 0.99$) for Ag-NP concentrations ranging from 1.25 to 50 ng L⁻¹. This includes the concentration range that is predicted for silver nanoparticles in environmental samples based on probabilistic material flow analysis.⁴ With this method using ETAAS for quantification, the limit of detection is one order of magnitude lower than with ICP-MS (6 ng L⁻¹).²⁰ For higher Ag-NP concentrations, like some 100 ng L⁻¹ or even $\mu\text{g L}^{-1}$, the volume of ethanol used for dissolution of the surfactant rich phase can be increased to maintain the linearity of the calibration function.

Method validation. Recovery experiments with environmental samples spiked with different Ag-NP concentrations were conducted to study the influence of real matrices on the proposed CPE method. The results for STP effluent and river water samples revealed a recovery rate >88% for spiked Ag-NPs (Table 2). Furthermore, untreated urban wastewater (STP influent, TOC = 14.2 mg L⁻¹) was analysed. An Ag-NP concentration of $371 \pm 11 \text{ ng L}^{-1}$ ($n = 3$) was found in the non-spiked sample. For this sample, providing a complex matrix, it was investigated whether the measured Ag-NP concentration is affected by chemical and/or physical properties of the sample matrix. Therefore, for the validation of the measurement described above, the standard addition method was applied, yielding a concentration of $342 \pm 81 \text{ ng L}^{-1}$ ($n = 3$). The deviation between the two mean values is about 10%, what is acceptable for a quantification in the ng L⁻¹ range.²⁶ It also proves that the developed analytical procedure is free of proportional and constant systematic errors.

Due to the lack of certified reference materials the described CPE procedure was compared with another technique for Ag-NP

Table 2 Ag-NP concentration in environmental water samples (0 ng Ag-NP added) and recovery rates for Ag-NPs spiked to river water and STP effluent samples. Values represent the mean of three independent experiments ± 1 SD

Matrix		Concentration of Ag-NPs added [ng L ⁻¹]				
		0	15	30	150	300
River water [TOC < 1 mg L ⁻¹]	Concentration of Ag-NPs found [ng L ⁻¹]	<LoD	14.3 \pm 1.0	26.5 \pm 0.6	153.9 \pm 16.2	283.5 \pm 29.6
	Recovery rate [%]	—	95.3 \pm 6.9	88.4 \pm 2.3	102.6 \pm 10.8	94.5 \pm 9.9
STP effluent ^a [TOC 4.6 mg L ⁻¹]	Concentration of Ag-NPs found [ng L ⁻¹]	7.0–11.8 ^b	17.5 \pm 0.9	31.8 \pm 3.5	151.8 \pm 9.5	298.8 \pm 19.7
	Recovery rate [%]	—	116.5 \pm 6.0	105.9 \pm 11.6	101.2 \pm 6.3	99.6 \pm 6.6

^a Concentration of Ag-NPs found and recovery rate were both corrected for the initial sample concentration of the corresponding sample. ^b Here the range of Ag-NP concentrations found is given rather than the mean and SD.

enrichment and quantification that was developed in our group.²⁷ For nine STP effluent samples from different sources that were analysed with both methods the average absolute deviation of the mean values was below 3 ng L⁻¹. Since both methods are based on different principles (ligand assisted solid phase extraction vs. CPE) the matching of the results suggests that the described method delivers reliable results for ultra-trace analysis of AgNPs in complex environmental samples.

Conclusions

We have presented a method that uses CPE and ETAAS for the quantification of nanoparticulate silver in environmental samples. Easy sample preparation and a low limit of detection are the major advantages of the method. Three main parameters were adjusted to obtain optimal analytical results: extraction parameters and additives, enrichment factor, and ETAAS measurement conditions.

The mean recovery for Ag-NPs spiked to environmental samples was higher than 88% in all cases. Moreover the comparison of calibration and standard addition method for untreated wastewater showed that the influence of the matrix on the results is only minor. In sewage treatment plant influent and effluent Ag-NPs were found with a concentration of 371 and 11.8 ng L⁻¹, respectively.

However, all results in this study were obtained by using one kind of lab-made Ag-NP. Future research will be focussed on the discrimination of silver particles of different compositions (e.g. silver sulfide nanoparticles) and coatings, which have an important influence on the ecotoxicological effects of the particles.¹³ Another interesting field of research will be the combination of CPE with size selective techniques to determine the Ag-NP size distribution in the samples.

Acknowledgements

This research project was financed by the Bavarian State Ministry of the Environment and Public Health. G.H. would like to thank Vera Krekel for her help in conducting some of the experiments. Also, we thank Prof. Dr Brigitte Helmreich and Wolfgang Schröder at the Institute for Water Chemistry Control, TUM, for TOC measurements.

Notes and references

- I. Soni and B. Salopek-Bondi, *J. Colloid Interface Sci.*, 2004, **275**, 1770–1782.
- M. K. Rai, S. D. Deshmukh, A. P. Ingle and A. K. Gade, *J. Appl. Microbiol.*, 2012, **112**, 841–852.
- ANEC and BEUC, *ANEC/BEUC inventory of products claiming to contain nano-silver particles available on the EU market*, 2012, <http://www.beuc.org/beucnoframe/Common/GetFile.asp?PortalSource=2530&DocID=24222&mfd=off&pdoc=1>, accessed 18 September 2012.
- F. Gottschalk, T. Sonderer, R. W. Scholz and B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 9216–9222.
- P. V. Asharani, Y. Lianwu, Z. Gong and S. Valiyaveetil, *Nanotoxicology*, 2011, **5**, 43–54.
- R. J. Griffitt, N. J. Brown-Peterson, D. A. Savin, C. S. Manning, I. Boube, R. R. Ryan and M. Brouwer, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2012, **31**, 160–167.
- V. Rattanaruengsriikul, N. Pimpha and P. Supaphol, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2012, **124**, 1668–1682.
- S. G. Mulkherjee, N. O'Clonadh, A. Casey and G. Chambers, *Toxicol. in Vitro*, 2012, **26**, 238–251.
- S. E. Hook and N. S. Fisher, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2001, **20**, 568–574.
- B. Schmidt, K. Loescher, N. Hadrup, A. Mortens, J. J. Sloth, C. Bender Koch and E. H. Larsen, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 2461–2468.
- S. K. Ratanathanawongs Williams, J. R. Runyon and A. A. Ashames, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 634–642.
- K. Tiede, A. B. A. Boxall, X. Wang, D. Gore, D. Tiede, M. Baxter, H. David, S. P. Tear and J. Lewis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, **25**, 1149–1154.
- R. D. Handy, F. van der Kammer, J. R. Lead, M. Hassellöv, R. Owen and M. Crane, *Ecotoxicology*, 2008, **17**, 287–314.
- A. Ulrich, S. Losert, N. Bendixen, A. Al-Kattan, H. Hagedorfer, B. Nowack, C. Adlhart, J. Ebert, M. Lattuada and K. Hungerbühler, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1120–1130.
- J. Touriniemi, G. Cornelis and M. Hassellöv, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 3965–3972.
- R. B. Reed, C. P. Higgins, P. Westerhoff, S. Tadjiki and J. F. Ranville, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1093–1100.
- S. A. Pergantis, T. L. Jones-Lepp and E. M. Heithmar, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 6454–6462.
- C. D. Stalikas, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2002, **21**, 343–355.
- F. H. Quina and W. L. Hinze, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1999, **38**, 4150–4168.
- J. F. Liu, J. B. Chao, R. Liu, Z. Q. Tan, Y. G. Yin, Y. Wu and G. B. Jiang, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 6496–6502.
- J. B. Chao, J. F. Liu, S. J. Yu, Y. D. Feng, Z. Q. Tan, R. Liu and Y. G. Yin, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 6875–6882.
- M. Kolb, A. Bahr, S. Hippich and W. Schulz, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 1993, **21**, 308–311.
- J. Vogelgesang and J. Hädrich, *Accredit. Qual. Assur.*, 1998, **3**, 242–255.
- S. G. Mamylov, O. I. Lomowski and W. W. Boldyrew, *Thermochim. Acta*, 1984, **73**, 41–46.
- N. W. H. Adams and J. R. Kramer, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, **18**, 2667–2673.
- W. Horwitz, *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 67A–76A.
- L. Li, G. Hartmann, M. Döblinger and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, submitted.

Ag-NP synthesis

To produce an aqueous suspension of Ag-NPs, Ag(I) was reduced by sodium borohydride in the presence of citrate. For the synthesis of 100 mL Ag-NP solution 92.0 mL UPW, 1.0 mL Ag(I) stock solution, and 6.0 mL 1 % (w/v in UPW) citric acid are mixed in an Erlenmeyer flask at room temperature. Under constant stirring 1.0 mL of a freshly prepared, ice-cold 1 % citric acid solution containing 75 mg of NaBH₄ is added. The colorless mixture immediately turns brown in color and after approximately 10 minutes becomes yellow by formation of silver nanoparticles. When stored at room temperature in the dark the suspension is stable for several weeks or months.

To separate nanoparticulate silver from residual Ag⁺ ions, AgNPs were purified by dialysis before being used for CPE experiments. For this purpose a piece (~15 cm) of tubular cellulose dialysis membrane (ZelluTrans 3.5, nominal MWCO 3,500 Da supplied by Carl Roth, Karlsruhe, Germany) was soaked with UPW for 24 hours and afterwards filled with 10 mL of crude Ag-NP solution, sealed at both ends with clamps and placed in a glass beaker containing 1 litre of UPW. The UPW was replaced after 4 and 20 hours. After 24 hours the dialysate was transferred in a glass vial and sonicated for 10 minutes using a Branson B-1200 ultrasonic bath (Branson Corp., Danbury, CT, USA) to redisperse aggregates. The final concentration of the purified nanoparticles was determined using ETAAS. No changes in the UV-vis absorption spectrum were observed indicating that the particle size distribution is not affected by dialysis.

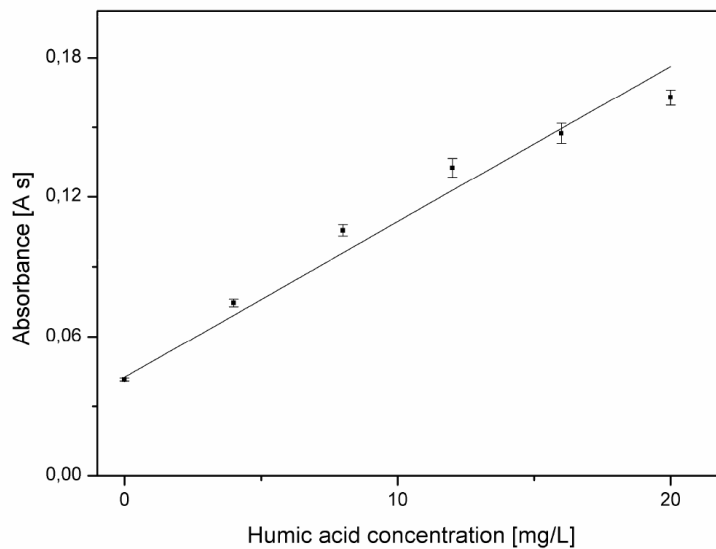


Figure S-1 ETAAS absorbance for samples containing a constant Ag^+ concentration ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) after CPE without EDTA. Different amounts of humic acid were added to each sample. $n = 3$

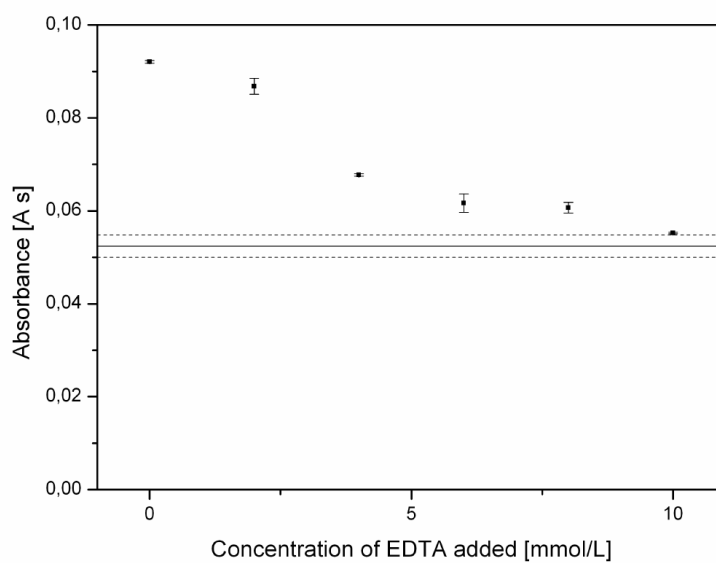


Figure S-2 ETAAS absorbance for samples containing a constant Ag^+ ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and HA ($10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) concentration after CPE with different amounts of EDTA in the sample solution. The average absorbance for a control sample containing no HA is indicated by a solid line (\pm SD (dashed line), $n = 3$).

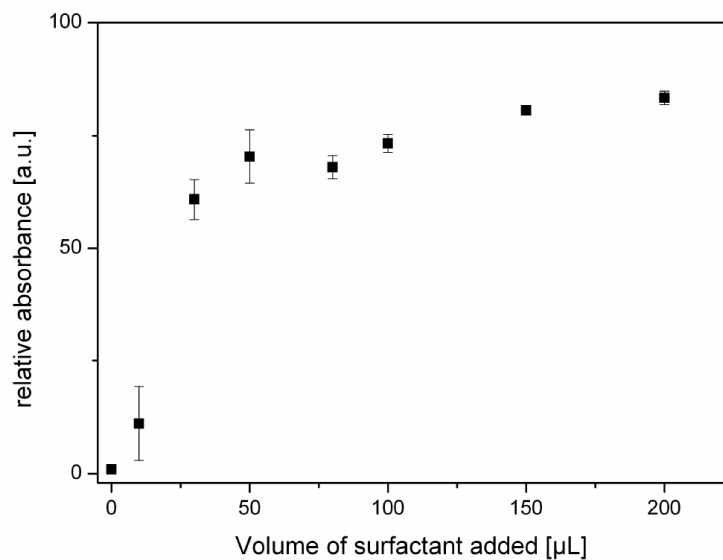


Figure S-3 ETAAS absorbance for the measurement Ag-NP after CPE with different amounts of the surfactant TX-114. $n = 3$

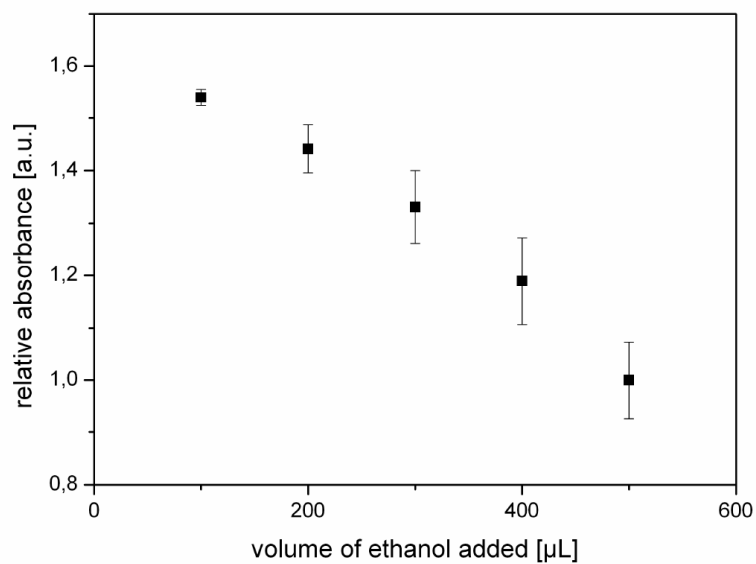


Figure S-4 Normalized ETAAS signal intensity for different volumes of ethanol used to dissolve the surfactant rich phase after CPE. Initial Ag-NP concentration was identical in all cases. $n = 3$

Publikation 3:

“Influence of Particle Coating and Matrix Constituents on the Cloud Point Extraction Efficiency of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) and Application for Monitoring the Formation of Ag-NPs from Ag⁺.”

Am 26.11.2013 zur Publikation in der Fachzeitschrift *Analytical Chemistry* angenommen.

Autoren: Georg Hartmann, Tanja Baumgartner und Michael Schuster

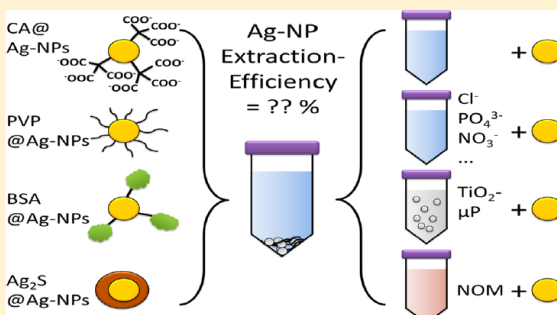
Influence of Particle Coating and Matrix Constituents on the Cloud Point Extraction Efficiency of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) and Application for Monitoring the Formation of Ag-NPs from Ag⁺

Georg Hartmann, Tanja Baumgartner, and Michael Schuster*

Department of Chemistry, Technische Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: For the quantification of silver nanoparticles (Ag-NPs) in environmental samples using cloud point extraction (CPE) for selective enrichment, surface modification of the Ag-NPs and matrix effects can play a key role. In this work we validate CPE with respect to the influence of different coatings and naturally occurring matrix components. The Ag-NPs tested were functionalized with inorganic and organic compounds as well as with biomolecules. Commercially available NPs and NPs synthesized according to methods published in the literature were used. We found that CPE can extract almost all Ag-NPs tested with very good efficiencies (82–105%). Only Ag-NPs functionalized with BSA (bovine serum albumin), which is a protein with the function to keep colloids in solution, cannot be extracted. No or little effect of environmentally relevant salts, organic matter, and inorganic colloids on the CPE of AgNPs was found. Additionally we used CPE to observe the *in situ* formation of Ag-NPs produced by the reduction of Ag⁺ with natural organic matter (NOM).



Within the past few years, the emission, environmental effects, and fate of manufactured nanoparticles (MNPs) have gained much interest due to their increasing production and application. Among these, nanosized silver particles (Ag-NPs) represent one of the most important groups of MNPs due to their broad application and numerous reports of adverse effects.^{1,2} This originated the need to develop an inventory of tools to identify and determine the concentration of Ag-NPs in environmental samples.^{3–5} Several techniques that employ different physical principles, such as field flow fractionation (FFF),^{6,7} hydrodynamic chromatography (HDC),^{8,9} size exclusion chromatography (SEC),¹⁰ single particle ICP-MS (spICP-MS),^{11,12} or capillary electrophoresis (CE),¹³ have been presented to face this issue. Most of these do, however, suffer from insufficient detection limits and other restrictions which do not allow for the determination of Ag-NPs in real environmental samples. Additionally, in most cases methods are laborious, and sophisticated equipment is required which makes routine analysis time-consuming and/or expensive. As a consequence, several studies have focused on the development of simple and selective enrichment methods for nanoparticles. Besides mechanical concepts, such as filtration or centrifugation, physicochemical approaches, such as liquid–liquid extraction (LLE)¹⁴ solid-phase-extraction (SPE),^{15,16} and cloud-point extraction (CPE),^{17–19} have been presented. Thereof, LLE often involves handling of potentially toxic organic solvents, while most studies published on SPE require very harsh conditions to elute the analyte from the stationary

phase. CPE, in contrast, is a very simple technique that enables high enrichment-factors of up to 100. Limits of detection in the lower nanogram per liter range for Ag-NPs are possible using ICP-MS^{17,18} or electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS)¹⁹ for quantification. It preserves the size and morphology of the particles in the sample and provides high species selectivity in separating NPs from dissolved ions of the same and other elements. With ET-AAS, matrix components can be eliminated very effectively using an adequate furnace temperature program.¹⁹ The limit of detection of this method is as low as 0.7 ng L⁻¹ (ref 19) and allows for species selective quantification of Ag-NPs even in complex samples such as wastewater treatment plant (WWTP) influent and effluent.²⁰

Unlike other analytes, Ag-NPs are not one compound of known chemistry and constitution but usually involve a confusing diversity of particles with different sizes, morphologies, and surface coatings.^{4,21} For any method that is developed for the quantification of Ag-NPs, it is therefore crucial to be selective not toward one special kind of lab-made NPs with a specified surface coating but to every kind of Ag-NPs that might be present in environmental samples.²² This involves, on the one hand, Ag-NPs with coatings commonly used in NP fabrication to enhance dispersibility and reduce aggregation.²³ On the other hand, possible transformation products of Ag-NPs

Received: October 11, 2013

Accepted: November 26, 2013

Table 1. Overview over All Nanoparticles Used in This Work Including the Abbreviations Used through the Manuscript^a

abbreviation	coating	reducing agent	source/preparation method
Ag-only-NP			Particular GmbH, Hannover, Germany
CA@Ag-NP	citrate	NaBH ₄	<i>in-situ</i> reduction/functionalization ¹⁹
PVP ₁₀ @Ag-NP	polyvinylpyrrolidone (PVP, 10 kDa)	NaBH ₄	ligand exchange ⁴⁰
PVP _{SA} @Ag-NP	PVP		Sigma Aldrich
MUA@Ag-NP	12-mercaptopundecanoic acid (MUA)	NaBH ₄	ligand exchange ²⁰
MSA@Ag-NP	mercaptosuccinic acid (MSA)	NaBH ₄	ligand exchange ²⁰
BSA@Ag-NP	boval serum albumine (BSA)	NaBH ₄	<i>in-situ</i> reduction/functionalization ⁴¹
Lys@Ag-NP	lysine	NaBH ₄	ligand exchange ⁴²
Cys@Ag-NP	cysteine	NaBH ₄	ligand exchange ⁴³
starch@Ag-NP	starch	glucose	<i>in-situ</i> reduction/functionalization ⁴⁴
AgCl@Ag-NP	chloride, PVP (10 kDa)	NaBH ₄	ligand exchange ⁴⁵
Ag ₂ S@Ag-NP	sulfide	NaBH ₄	ligand exchange ²⁰
Ag ₃ PO ₄ -NP	phosphate	NaBH ₄	coprecipitation ⁴⁶

^aWhere no reducing agent is given, it is either unknown or the NPs were prepared from bulk metal; i.e., no reduction was necessary. For commercially available Ag-NPs, the names of the manufacturer are given; for all others, the method of preparation along with the relevant literature reference are given.

that bound sulfides,²⁴ chloride,²² or biogenic materials such as sugars or proteins²⁵ have to be considered to realize a sound determination. In one of the first studies addressing the CPE of nanoparticles, Liu and co-workers have already shown the broad applicability of the method for different NPs and coatings.²⁶ Besides the complexity of the analyte, the complexity of the matrix has to be considered. High concentrations of Ag-NPs are expected to be found in wastewater streams²⁷ where the influence of dissolved or colloidal organic and inorganic compounds may impair the performance of CPE.

Little is known about the background level of nanosized silver in natural waters. Nonmanufactured Ag⁰-particles were considered to arise mainly from bulk-abrasion of ores carrying native silver. Only recently several studies^{28–31} have given evidence for the redox-induced formation of Ag-NPs from dissolved silver-ions with natural organic matter (NOM) as reducing agent. These nonmanufactured, yet chemically formed Ag-NPs may represent a major fraction of Ag-NPs measured in environmental water samples and lead to a ubiquitous background level of Ag-NPs in natural and man-made aqueous media. A better understanding of this process is needed to evaluate how nonmanufactured Ag-NPs are formed and to which extent they may bias the quantification of manufactured Ag-NPs. Experimental approaches for quantifying and monitoring NOM-induced Ag-NP-formation in previous studies have been laborious by using ultracentrifugation followed by acid digestion of the sample²⁹ or required synchrotron radiation for XANES experiments.²⁸ In contrast, CPE has the potential to be used as a straightforward, smart, and simple tool to quickly and quantitatively measure Ag-NP-formation even in complex media.

In this study we evaluate the CPE method previously communicated¹⁹ by surveying 13 types of Ag-NPs functionalized with environmentally relevant coatings. Also, the effect of frequently occurring matrix constituents on the CPE is investigated. As an example of the capability of the CPE method to quickly and simply yield results for Ag-NP-concentrations in complex samples, the NOM mediated formation of Ag-NPs from Ag⁺ is investigated.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Methods. All chemicals used were supplied from Merck (Darmstadt, Germany) if not stated otherwise. If available, analytical grade reagents were used. Additionally, all chemicals were tested for silver contaminations by ET-AAS. For all experiments, ultrapure water (UPW), produced with a DirectQ 3 ultrapure water system (Millipore, Billerica, MA, USA), was used. Glassware was cleaned by rinsing with 6.5% HNO₃, subsequent steaming with nitric acid vapor for four hours, and triplicate washing with UPW.

Ethylenediaminetetraacetic acid sodium salt (EDTA) and Triton X 114 (TX-114) were from AppliChem (Darmstadt, Germany). Lysine, 1-mercaptopundecanoic acid (MUA), polyvinylpyrrolidone (PVP) with a molecular weight of 10 kDa (PVP₁₀), and commercially available PVP functionalized Ag-NPs (PVP_{SA}@Ag-NP, *d* < 100 nm) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MI, USA). Uncoated Ag-NPs without any additives (Ag-only-NPs), generated by laser ablation in UPW, were a custom-made product from Particular (Hannover, Germany). Titanium(IV) oxide nanopowder was purchased from Strem (Newburyport, MA, USA). Natural organic matter (NOM) reference materials from the Suwannee River (SR-NOM) and the Nordic Reservoir (NR-NOM) were obtained from the International Humic Substance Society.

Instrumentation. ET-AAS measurements were conducted using an AAnalyst 800 atomic absorption spectrometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) equipped with a graphite tube atomizer (THGA 800) and an autosampler (AS-72). Silver hollow cathode lamps (Maasen GmbH, Reutlingen, Germany) were operated at the recommended current of 10 mA. For the determination of silver, the absorption at $\lambda = 328.1$ nm was integrated for a period of 5 s. An unspecific absorption signal was eliminated by background subtraction using the built-in Zeeman-correction of the spectrometer.

UV/vis spectra were measured with a Lambda 35 photometer (Perkin-Elmer) using disposable PMMA cuvettes obtained from VWR (Darmstadt, Germany). Fourier-transform infrared (FT-IR)-spectra were recorded using a FTS 570 C FT-IR-spectrometer (BioRad, Hercules, CA, USA) equipped with a MIRacle ATR sampling accessory (PIKE Technologies, Madison, WI, USA) in a spectral range from 500 to 4000 cm⁻¹. Before measurement, particles were centrifuged at 14,000 rpm for 1 h in 2 mL centrifuge vials (VWR). After removing the

supernatant, the Ag-NP pellet at the bottom of the vial was dried overnight in an atmosphere of HEPA filtered air. The resulting dry powder was placed on the diamond crystal plate of the sample holder unit for measurement. Total organic carbon content was analyzed using a TOC-L CSH/CSN (Shimadzu, Kyoto, Japan), and TEM images were recorded on a JEM 100 CX (JEOL, Akishima, Japan) operating at 100 kV. For TEM-EDX a FEI Titan 80-300 with a field emitter at 300 kV was used. Samples were prepared on TEM grids hydrophilized with a plasma source.

Particle surface charge was measured with a Müttek PCD 03 pH device (BTG Industries, Herrsching, Germany) after adjusting the pH of the Ag-NP-suspension using either acetic acid or sodium hydroxide solution. Data points were plotted and interpolated by a logistic fit to obtain the zero point charge pH (pHPZC).

Nanoparticles. A wide variety of Ag-NPs was used for CPE experiments—some of them commercially available, some of them lab-made according to methods described in the literature. An overview over all Ag-NPs used in this study and the respective nomenclature is given in Table 1, and detailed information on synthesis and characterization can be found in the Supporting Information. All synthesized NPs were obtained in sizes lying between 2 and 80 nm. Based on results obtained previously with gold NPs, the influence of particle size on extraction efficiency can be neglected in this size range.³² Before being used for CPE, all nanoparticles were dialyzed using a 3 kDa MWCO cellulose membrane (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) to remove any residual silver ions, reducing agents, or other small molecules. PVP_{SA}@Ag-NP, which are delivered as dry powder, were dispersed in UPW in an ultrasonic bath and afterward dialyzed as well.

Cloud Point Extraction. All CPE samples were prepared according to a method published previously.¹⁹ In brief, 40 mL of sample, 400 μ L of 1.25 M sodium acetate solution, 100 μ L of 1 M acetic acid, 1.0 mL of saturated EDTA solution, and 1.0 mL of a 10% TX-114 solution (w/w in water) are mixed in a tapered sample vial (polypropylene, VWR) and shaken intensively. This mixture is incubated at 40 °C for 30 min, centrifuged at 5000 rpm (rcf = 2650) for 12 min, and subsequently cooled down to 0 °C in an ice-bath to increase the viscosity of the surfactant-rich phase at the bottom of the vial. The supernatant aqueous phase can easily be removed by decanting. The remaining surfactant droplet contains the analyte and is dissolved in ethanol for further handling. For this study samples were made up to a distinct volume (10 mL) after extraction. Thus, the signal intensity correlates directly to the extraction efficiency, since other effects, such as the slightly varying volume of the surfactant-rich phase after CPE, can be ruled out. From the ethanol solution, a volume of 20 μ L is introduced into the graphite furnace for ET-AAS measurement. An optimized graphite furnace temperature program¹⁹ was used for solvent removal, pyrolysis, and atomization (see Table 2). For calibration, aliquots of diluted silver stock solution that adequately matched the matrix were applied; for example, if the analyte was quantified in the surfactant-rich phase after dilution with ethanol, calibration standards were made from ethanol containing the surfactant.

To study the influence of particle surface coatings on the extraction efficiency, aqueous suspensions containing a known concentration of coated Ag-NPs (see Table 1) were subjected to the CPE procedure. The extraction efficiency can be

Table 2. Graphite Furnace Temperature Program for the Determination of Silver after CPE (Surfactant-Rich Phase in Ethanol)

process	temp (°C)	ramp time (s)	hold time (s)	argon flow rate (mL·min ⁻¹)
drying I	80	5	20	250
drying II	130	10	20	250
pyrolysis	600	20	20	250
cooling	300	1	5	250
atomization/read step	1800	0	5	0
clean out	2450	1	3	250

calculated from the initial and final silver content measured by ET-AAS.

Study of Matrix Effects. Although the method has successfully been applied for real samples,²⁰ a thorough examination of the influence of potential matrix constituents on CPE is necessary. The major objective was to find tolerance limits for any single compound assessed. Those include inorganic ions (ammonium, chloride, phosphate, nitrate) and solids (TiO₂-particles) as well as different kinds of natural organic matter (NOM). The concentration was chosen in a way to exceed the maximum concentration expected in real samples. Solutions containing different amounts of the tested substances were extracted by CPE. The ET-AAS silver signal intensity obtained from matrix-containing suspensions was correlated with the signal intensity of a matrix-free reference to give a measure of the influence of the compound added on CPE efficiency. For all samples of a test series, the Ag-NP concentration and overall volume were identical to allow the direct comparison of the results. For the experiments, CA@Ag-NPs were chosen due to their widespread application in model studies, although other particles might be environmentally more relevant. As shown later in the Results and Discussion section of this study, no major differences between most Ag-NPs used were found. Therefore, the use of only one species may not be considered an undue simplification.

NOM-Induced Formation of Ag-NPs. To simulate the reduction of silver ions in real samples, NOM reference material was used. For the CPE of Ag⁺ ions in the presence of NOM, a respective NOM stock suspension was diluted and mixed with diluted AgNO₃ stock solution to obtain the desired concentrations of 0–40 mg·L⁻¹ for NOM and 150 ng·L⁻¹ for Ag. The mixtures were incubated at a temperature of 40 °C for 30 min in PP-vials. Afterward, CPE was conducted as described above and the surfactant-rich phase was analyzed using ET-AAS, UV/vis, and TEM. All experiments were conducted in a dark environment away from sunlight. For the samples that were analyzed by UV/vis and TEM, a higher concentration of NOM (200 mg·L⁻¹) and Ag⁺ (15 mg·L⁻¹) was used for a better visualization of the Ag-NPs generated.

RESULTS AND DISCUSSION

Nanoparticle Synthesis. ATR-FT-IR turned out to be a facile tool for the validation of surface functionalization for particles capped with organic molecules. Spectra of the synthesized particles (see Supporting Information) matched spectra found in the literature and/or the spectrum of the pure capping agent. Residual unbound capping agent can be ruled out as the origin of the signals in the spectra, since all nanoparticles were thoroughly cleaned by dialysis and

centrifugation before measurement. Besides organic capping agents, also the presence of phosphate in the Ag_3PO_4 -NP could be confirmed by the specific absorption line at $\sim 950\text{ cm}^{-1}$ (P–O stretch).³³ One major obstacle was the low concentration at which most of the Ag-NPs were obtained after synthesis. Samples had to be centrifuged several times to obtain a sufficient amount of NP powder for IR-measurement. For non-IR-active NP coatings, i.e. AgCl@Ag-NPs and $\text{Ag}_2\text{S@Ag-NPs}$, TEM-EDX was used as an element-specific analytical technique with an excellent lateral resolution. The images and EDX spectra (see Supporting Information) give clear evidence that both Ag-NP-types could be synthesized in the desired composition and morphology. After verification of successful synthesis and surface functionalization, all particles were used for further experiments.

Extraction Efficiency. Since the CPE method appears particularly well-suited to gain a sum parameter, i.e. to determine the total amount of nanosized silver in a water sample, it is of utmost importance that really all Ag-NPs can be extracted at the same—preferably high—rate. Therefore, a large variety of differently coated Ag-NPs was extracted and the individual extraction efficiencies were determined. An overview of the results of these experiments is given in Figure 1. The

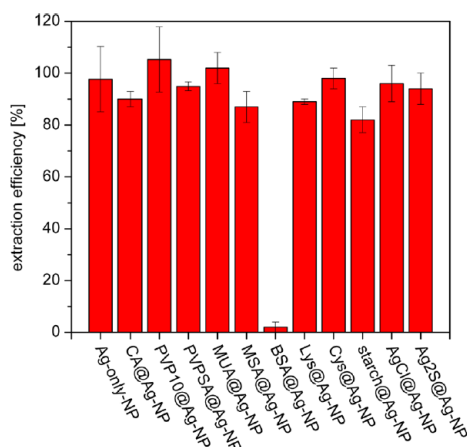


Figure 1. CPE extraction efficiency for 12 differently coated Ag-NPs. The initial Ag-NP concentration was $1\text{--}3\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for all samples. For the nomenclature of the different Ag-NPs, see Table 1.

extraction efficiency lies in the range from 82–105% for 11 out of the 12 nanoparticles synthesized and analyzed. Even Ag-NPs with no coating at all, that were generated by laser ablation of bulk Ag in ultrapure water, can be extracted with an efficiency of 97%. It is worth noting that a very low Ag-NP concentration ($1\text{--}3\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was chosen for all experiments. So, possible sources of error that might occur in the analysis of Ag-NPs as a trace contaminant in real samples—such as analyte loss due to adsorption to the vessel walls or during pipetting—are already implied in our results. The very low concentration used is also the reason why, for the Ag_3PO_4 -NPs, no extraction efficiency could be determined: although Ag_3PO_4 is normally considered to be insoluble in water, at the trace level and in the nanosized form, it dissolves readily. Calculations using the solubility product of Ag_3PO_4 in water show that the silver concentration (given as Ag^+) that is required to form Ag_3PO_4 -NPs is $2\text{--}3\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, assuming a phosphate concentration of $5\text{--}10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and a

solubility constant K_{sp} of 1.6×10^{-18} for Ag_3PO_4 , as found in the literature.³⁴ This is close to the value of $6.4\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ reported for the solubility of Ag_3PO_4 in pure water.³⁵ Size effects that come alongside the enormous molar surface of nanoparticles³⁶ are not considered, as well as the fact that not all phosphate will be present as completely deprotonated PO_4^{3-} at environmental pH-levels. This leads to the assumption that under normal conditions no Ag_3PO_4 -NPs or Ag-NPs with a noticeable phosphate coating are expected to be found, not even in WWTP samples where the phosphate concentration is exceptionally high compared to phosphate concentrations in the (noncontaminated) aquatic environment.

Commercially available PVP-coated Ag-NPs ($\text{PVP}_{\text{SA}}@Ag\text{-NP}$) were, in the first CPE experiments, used directly after dispersion in water. The extraction efficiency found was lower than expected when compared to lab-made $\text{PVP}_{10}@Ag\text{-NP}$ (75% vs >99%). After dialysis of the particles, the extraction efficiency was significantly improved to $95 \pm 2\%$. This might be an indication that some of the total silver contained in the initial dispersion might in fact be ions, generated by oxidation of the particles during storage or the dispersion process.

A notable exception among all investigated nanoparticles were the BSA@Ag-NPs , which exhibited an unexpectedly low extraction efficiency of less than 4%. This was observed despite the fact that Ag-NPs could actually be found at high concentrations in the sample solutions, as proven by TEM investigations. We must therefore conclude that the CPE cannot be applied to BSA-containing solutions or rather to BSA-coated nanoparticles. Although free BSA ($M \approx 66\ \text{kDa}$) will not be removed from the BSA@Ag-NP -suspension during dialysis ($d_{\text{cutoff}} = 3\ \text{kDa}$), the remaining BSA is not considered to impair the extraction. Since samples are diluted 10^5 -fold or more before CPE, the residual BSA concentration is in the level of some milligrams per liter. Previous studies have shown a major influence of the particle surface charge on CPE extraction efficiency.^{17,18} Since the pHPZC of BSA@Ag-NPs (5.0 ± 0.2) is very similar to that of other Ag-NPs which are extracted very efficiently, such as CA@Ag-NPs (pHPZC = 4.7) or $\text{Ag}_2\text{S@Ag-NPs}$ (pHPZC = 4.6), the charge state of BSA@Ag-NPs does not explain the low extraction efficiency of these particles in CPE. Additionally, we conducted CPE with BSA@Ag-NPs at a pH ranging from 3 to 9. Under none of these conditions was a notable amount of BSA@Ag-NPs extracted.

A more likely explanation for the bad CPE efficiency for BSA@Ag-NPs is that serum albumins maintain and regulate the oncotic pressure in the cardiovascular system of mammals and therefore must be highly water-soluble. Additionally, albumins also function as the principal carrier of fatty acids and as solubilizer for other hydrophobic substances in the blood that are otherwise insoluble.³⁷ Obviously, they also keep Ag-NPs in solution and prevent their CPE extraction. The fact that other nanoparticles bearing amino acids on their surface, namely Lys@Ag-NPs and Cys@Ag-NPs , are extracted with a very good efficiency (>89%) leads to the assumption that the difficulties in the extraction of BSA@Ag-NPs represent a special case which cannot be generalized. In environmental samples, containing a vast mixture of all types of engineered or naturally produced Ag-NPs and the transformation products thereof, BSA-coated particles most likely represent a negligible fraction.²³

Ag-NPs coated with inorganic salts were extracted very efficiently. Extraction efficiency was $94 \pm 6\%$ for sulfide-coated and $96 \pm 7\%$ for chloride-coated Ag-NPs. This is particularly important because studies have shown that a major fraction of

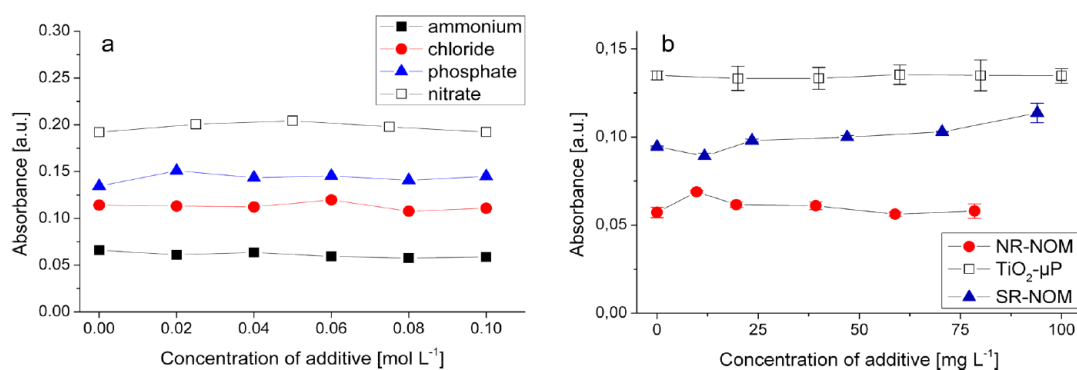


Figure 2. Influence of several possible matrix components on CPE extraction efficiency: (a) ammonium (as NH_4Cl), chloride (as NaCl), phosphate (as NaH_2PO_4), nitrate (as NaNO_3). No error bars are shown for better clarity; RSD was $<3\%$ for all data points; (b) TiO_2 - μP s and NOM. CA@Ag-NP were used for all experiments at concentrations of 100–400 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Data points have been shifted to allow better graphical representation of several data sets per graph.

Ag-NPs in environmental samples will either be chlorinated (e.g., during washing of Ag-NP-containing textiles³⁸) or sulfidized.³⁹

Examination of Matrix Effects. In a previous study we have—for the first time—systematically applied CPE for the determination of Ag-NPs in samples with a very complex matrix (untreated wastewater).²⁰ In the present study a more detailed examination of matrix-influences on CPE was performed. Environmentally relevant ions such as NH_4^+ , Cl^- , NO_3^- , and PO_4^{3-} , high concentrations of organic degradation products, as well as organic and inorganic colloids were tested as potentially interfering matrix constituents. NOM isolates, SR-NOM and NR-NOM, were used to simulate an organic matrix, in both dissolved and particulate form, while Ti(IV) oxide particles (TiO_2 - μP s) with a broad size distribution from several nanometers up to 5 μm were used as representative for inorganic colloids. For all experiments in this section we used citrate-coated Ag-NPs because they are easily accessible and very likely the most frequently used form of Ag-NPs.²³ The concentration of all matrix test materials was chosen in a way that was equal (NOM) or at least 10-fold (ions) the maximum expected concentration in WWTP influent samples. For TiO_2 - μP s, where the environmental concentration can only be estimated, we used a maximum concentration that was $\sim 10^5$ times the concentration of Ag-NPs in the samples.

From Figure 2 it can be seen that the silver signal intensity of the surfactant-rich phase is not affected by the species added for matrix simulation. This confirms the results obtained with real matrix (WWTP influent and effluent) in previous investigations.²⁰ For NR-NOM the results had to be blank corrected due to the silver content of the purchased NR-NOM sample, which showed a significant silver signal in blank extracts without Ag-NP addition. Details can be found in the Supporting Information. We therefore conclude that none of the matrix constituents tested has a significant effect on the CPE extraction efficiency of Ag-NPs.

Compared to other methods for NP extraction that severely suffer, especially from TOC contents higher than a few milligrams per liter,^{15,16} the matrix tolerance of the CPE method is exceptional.

NOM-Induced Formation of AG-NPs. In addition to testing the influence of NOM on the CPE of Ag-NPs, it was also tested if organic matter influences the species selectivity of the method. Therefore, Ag⁺ samples containing various

amounts of SR-NOM were extracted. We found an increasing silver content of the surfactant-rich phase with increasing TOC content of the sample (Figure 3). One explanation could be an

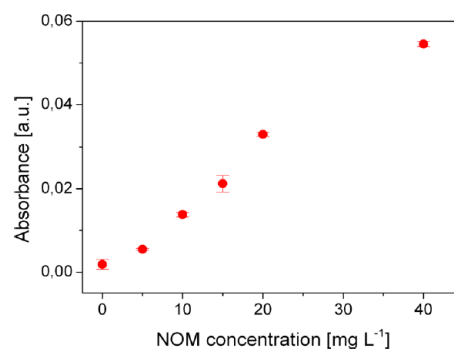


Figure 3. Influence of NOM concentration on the reduction of Ag⁺ ($c_{\text{Ag}} = 150 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) to Ag-NPs. After CPE the surfactant-rich phase was analyzed by ET-AAS ($n = 3$).

increased coextraction of Ag⁺ ions that form complexes with functional groups of the NOM. Since the latter are partially extracted as well, a “Trojan-horse”-like coextraction effect was considered. But studies have shown that the activity of free Ag⁺ in solutions is not influenced by the NOM content.²⁸ This implies that almost no NOM-Ag⁺ complexes are formed in the samples and rules out the assumption of the Ag⁺ coextraction mechanism. The same study²⁸ does, however, report the formation of Ag-NPs from Ag⁺, with NOM as reducing agent under environmentally relevant conditions. Also, other studies have recently reported the same effect with²⁹ or without³⁰ irradiation with (simulated) sunlight. Hence, the formation of Ag-NPs from Ag⁺ in the sample solution needs to be considered as a process very likely to happen. To investigate this, UV/vis-spectra and TEM images were recorded from the CPE extracts of solutions containing a high amount of NOM and Ag⁺ ions. As a reference, solutions without Ag⁺ addition were used. From Figure 4 it can clearly be seen that the sample initially containing Ag⁺ (red line) shows an increased light absorption in the range from 350–500 nm. The difference between sample and reference (Figure 4, blue line) shows a broad peak with a maximum around 400 nm, which is exactly

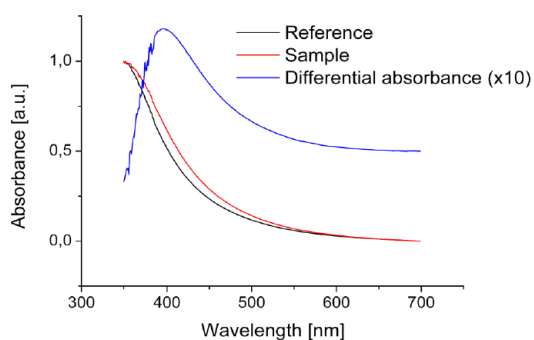


Figure 4. Normalized UV/vis spectra of the surfactant-rich phase after CPE of solutions initially containing $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SR-NOM (TOC $\approx 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (sample, red line) or $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ag^+ (reference, black line). The differential absorbance (sample minus reference) is plotted as well (10-fold magnification, blue line).

the range for the surface plasmon resonance (SPR) of silver nanoparticles. This is an indication for the formation of Ag-NPs in the sample. To visualize the Ag-NPs, TEM images of the Ag-containing sample and the reference (Figure 5) were recorded.

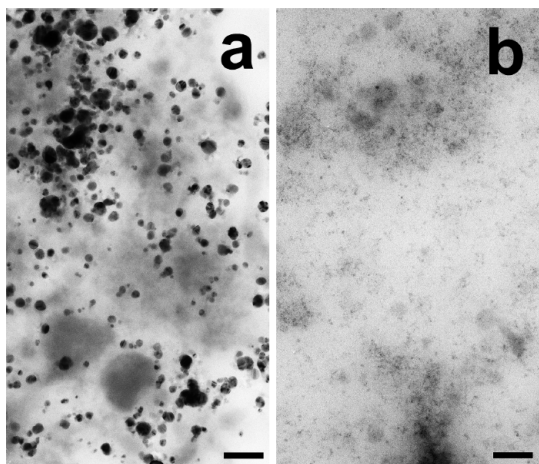


Figure 5. TEM image of the surfactant-rich phase after CPE of a solution initially containing $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SR-NOM (TOC $\approx 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and (a) $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ or (b) $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ag^+ . Images depict an area of the TEM grid representative for the respective sample. Magnification was 66k in both cases; the scale bar in the lower right represents 100 nm in both images. Dark debris is due to residual NOM and TX-114.

The presence of nanosized particles in the sample can clearly be confirmed (Figure 5a) while in the reference no such objects were found (Figure 5b). These two findings are an evidence for the formation of Ag-NPs from Ag^+ in the presence of NOM. Obviously, the newly generated Ag-NPs are extracted by the CPE method as any other type of Ag-NPs is.

The linear relation between NOM content and silver in the surfactant-rich phase in Figure 3 may be an indication for a reaction of pseudo-first-order with Ag^+ added in excess. Since the scope of this experiment only was to investigate the influence of NOM on CPE, for this issue no rate constants or other reaction parameters were determined.

Given our results, we suggest that CPE is a very promising approach to straightforwardly monitor the formation of Ag-NPs even in complex samples with high NOM content.

CONCLUSION

The environmental analysis of metallic nanoparticles requires techniques that can detect those regardless of their surface properties and other influencing factors such as matrix effects. It was demonstrated that CPE is a promising tool that can be used to enrich a variety of differently coated Ag-NPs with an extraction efficiency of 82–105%. Even high contents of common inorganic salts, colloids, or organic matter had little or no influence on the extraction. We recommend this technique as an attractive and facile method for the species-selective enrichment of Ag-NPs from aqueous samples. The reduction of Ag^+ by NOM was observed, and nanosized silver was identified using TEM and the SPR peak of Ag-NPs in the UV/vis spectral range. Using CPE, it is now possible to observe the formation of Ag-NPs in NOM-suspensions very easily. Further studies should address the kinetics and thermodynamics of this pathway of Ag-NP-formation to get a better understanding of this process and the impact of such particles on the environment.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: Michael.Schuster@tum.de. Tel: +49 89 289-13763. Fax: +49 89 289-14513.

Notes

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This research project was financed by the Bavarian State Ministry of the Environment and Consumer Protection (StMUV). We would like to thank Simon Meyer (TUM) for FT-IR, Marianne Hanzlik (TUM) for TEM, and Markus Döblinger (Department of Chemistry and Center for Nano-Science (CeNS), University of Munich) for TEM and TEM-EDX measurements. G.H. would like to thank Prof. Brigitte Helmreich (TUM) for fruitful advice on WWTP matrix conditions.

REFERENCES

- (1) Chernousova, S.; Epele, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 1636–1653.
- (2) Maurer-Jones, M. A.; Gunsolus, I. L.; Murphy, C. J.; Haynes, C. L. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3036–3049.
- (3) von der Kammer, F.; Ferguson, P. L.; Holden, P. A.; Maison, A.; Rogers, K. R.; Klaine, S. J.; Koelmans, A. A.; Horne, N.; Unrine, J. M. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 32–49.
- (4) Hassellöv, M.; Readman, J. W.; Ranville, J. F.; Tiede, K. *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 344–361.
- (5) Weinberg, H.; Galyean, A.; Leopold, M. *Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 72–83.
- (6) Hagedorfer, H.; Kaegi, R.; Parlinska, M.; Sinnet, B.; Ludwig, C.; Ulrich, A. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2678–2685.
- (7) Mitrano, D. M.; Barber, A.; Bednar, A.; Westerhoff, P.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1131–1142.

- (8) Tiede, K.; Boxall, A. B. A.; Wang, X.; Gore, D.; Tiede, D.; Baxter, M.; David, H.; Tear, S. P.; Lewis, J. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 1149–1154.
- (9) Pergantis, S. A.; Jones-Lepp, T. L.; Heithmar, E. M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6454–6462.
- (10) Liu, F.-K. *Chromatographia* **2007**, *66*, 791–796.
- (11) Touriniemi, J.; Cornelis, G.; Hassellöv, M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3965–3972.
- (12) Reed, R. B.; Higgins, C. P.; Westerhoff, P.; Tadjiki, S.; Ranville, J. F. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1093–1100.
- (13) Liu, F.-K.; Ko, F.-H.; Huang, P.-W.; Wu, C.-H.; Chu, T.-C. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1062*, 139–145.
- (14) Myakonkaya, O.; Hu, Z.; Nazar, M. F.; Eastoe, J. *Chem.—Eur. J.* **2010**, *16*, 11784–11790.
- (15) Li, L.; Leopold, K. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4340–4349.
- (16) Li, L.; Leopold, K.; Schuster, M. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9165–9167.
- (17) Liu, J. F.; Chao, J. B.; Liu, R.; Tan, Z. Q.; Yin, Y. G.; Wu, Y.; Jiang, G. B. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6496–6502.
- (18) Chao, J. B.; Liu, J. F.; Yu, S. J.; Feng, Y. D.; Tan, Z. Q.; Liu, R.; Yin, Y. G. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6875–6882.
- (19) Hartmann, G.; Hutterer, C.; Schuster, M. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *28*, 567–572.
- (20) Li, L.; Hartmann, G.; Döblinger, M.; Schuster, M. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 7317–7323.
- (21) Pettibone, J. M.; Gigault, J.; Hackley, V. A. *ACS Nano* **2013**, *7*, 2491–2499.
- (22) Nowack, B.; Ranville, J. F.; Diamond, S.; Gallego-Urrea, J. A.; Metcalfe, C.; Rose, J.; Horne, N.; Koelmans, A. A.; Klaine, S. J. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 50–59.
- (23) Tolaymat, T. M.; El Badawy, A. M.; Genaidy, A.; Scheckel, K. G.; Luxton, T. P.; Suidan, M. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, 999–1006.
- (24) Kim, B.; Park, C.-S.; Murayama, M.; Hochella, M. F. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 7509–7514.
- (25) Monopoli, M. P.; Walczyk, D.; Campbell, A.; Elia, G.; Lynch, I.; Baldelli Bombelli, F.; Dawson, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2525–2534.
- (26) Liu, J.-f.; Liu, R.; Yin, Y.-g.; Jiang, G.-b. *Chem. Commun.* **2009**, 1514–1516.
- (27) Gottschalk, F.; Sonderer, T.; Scholz, R. W.; Nowack, B. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 9216–9222.
- (28) Maurer, F.; Christl, I.; Hoffmann, M.; Kretzschmar, R. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 8808–8816.
- (29) Hou, W.-C.; Stuart, B.; Howes, R.; Zepp, R. G. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 7713–7721.
- (30) Akaighe, N.; MacCuspie, R. I.; Navarro, D. A.; Aga, D. S.; Banerjee, S.; Sohn, M.; Sharma, V. K. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 3895–3901.
- (31) Yin, Y.; Liu, J.; Jiang, G. *ACS Nano* **2012**, *6*, 7910–7919.
- (32) Hartmann, G.; Schuster, M. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *761*, 27–33.
- (33) Rameshbabu, N.; Sampath Kumar, T. G.; Sastry, V. S.; Murty, K. V. G. K.; Prasad Rao, K. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, *80*, S81–S91.
- (34) Küster, F. W.; Thiel, A.; Ruland, A. *Rechentafeln für die Chemische Analytik*; de Gruyter: Berlin, 2002.
- (35) Bottger, W. Z. *Phys. Chem.* **1903**, *46*, 521–619.
- (36) Hefter, G. T.; Tomkins, R. P. T. *The Experimental Determination of Solubilities*; J. Wiley & Sons: Chichester, 2003.
- (37) He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209–215.
- (38) Lorenz, C.; Windler, L.; von Goetz, N.; Lehmann, R. P.; Schuppler, M.; Hungerbühler, K.; Heuberger, M.; Nowack, B. *Chemosphere* **2012**, *89*, 817–824.
- (39) Kaegi, R.; Voegelin, A.; Ort, C.; Sinnet, B.; Thalmann, B.; Krüger, J.; Hagendorfer, H.; Elumelu, M.; Müller, E. *Water Res.* **2013**, *47*, 3866–3877.
- (40) Mahl, D.; Greulich, C.; Meyer-Zaika, W.; Köller, M.; Epele, M. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6176–6181.
- (41) Garza-Ocañas, L.; Ferrer, D. A.; Burt, J.; Diaz-Torres, I. A.; Ramírez Cabrera, M.; Tamez Rodríguez, V.; Luján Rangel, R.; Romanovicz, D.; Jose-Yacamán, M. *Metallomics* **2010**, *2*, 204–210.
- (42) Bae, D. R.; Han, W. S.; Lim, J. M.; Kang, S.; Lee, J. Y.; Kang, D.; Jung, J. H. *Langmuir* **2009**, *26*, 2181–2185.
- (43) Mandal, S.; Gole, A.; Lala, N.; Gonnade, R.; Ganvir, V.; Sastry, M. *Langmuir* **2001**, *17*, 6262–6268.
- (44) Vasilieva, P.; Donkova, B.; Karadjova, I.; Dushkin, C. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects* **2011**, *382*, 203–210.
- (45) Sun, Y. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 2127–2133.
- (46) Khan, A.; Qamar, M.; Muneer, M. *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *519*–520, 54–58.

Supporting information (SI)

Influence of Particle Coating and Matrix Constituents on the Cloud Point Extraction Efficiency of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) and Application for Monitoring the Formation of Ag-NPs from Ag⁺.

Georg Hartmann, Tanja Baumgartner, and Michael Schuster

Department of Chemistry, Technische Universität München, 85747 Garching, Germany

NANOPARTICLE SYNTHESIS

In the following the synthesis of all sorts of Ag-NP used in this study is described. In general, all NP suspensions were purified by dialysis to remove residual Ag^+ ions which might have an adverse effect on the CPE extraction efficiency as well as residual capping agent which might result in false conclusion derived from ATR-FT-IR-spectra of the particles. Therefore, 10 mL NP suspension were dialyzed against UPW for 20 h. Water was changed after 3 and 19 h. The Ag concentration of the resulting, purified nanoparticles was determined by ET-AAS and the suspension was used for CPE immediately.

CA@Ag-NPs

According to a procedure developed in our lab [1] for the synthesis of 100 mL citrate coated silver nanoparticles (CA@Ag-NPs) suspension, 92.0 mL UPW, 1.0 mL Ag(I) stock solution ($1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and 6.0 mL 1 % (w/v in UPW) citric acid are mixed in an Erlenmeyer flask at room temperature. Under constant stirring 1.0 mL of a freshly prepared, ice-cold 1 % citric acid solution containing 75 mg of NaBH_4 is added. This solution is stirred for 10 minutes to obtain the final product.

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 1772 (\text{C}=\text{O}), 2851 (\text{C}-\text{H}), 2923 (\text{C}-\text{H}), 3351 (\text{O}-\text{H}).$

PVP₁₀@Ag-NPs

Similarly to the procedure reported by Mahl *et al.* [2], 10 mL of an Ag-NP suspension (CA@Ag-NPs, $c = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) are mixed with 500 μL of a PVP solution (PVP₁₀: $M = 10 \text{ kDa}$, 0.02 mM in UPW) and stirred for 19 h to obtain PVP-coated silver nanoparticles

(PVP₁₀@Ag-NPs)

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 1084 (\text{C}-\text{N}), 1375 (\text{C}-\text{H}, \text{O}-\text{H}), 1660 (\text{C}=\text{O}), 2851 (\text{C}-\text{H}), 2918 (\text{C}-\text{H}), 3374 (\text{O}-\text{H}).$

MUA@Ag-NPs / MSA@Ag-NPs

Mercaptoundecanoic acid (MUA) and mercaptosuccinic acid (MSA) functionalized Ag-NP (MUA@Ag-NPs / MSA@Ag-NPs) were prepared as described before [3]: 10 mL of an Ag-NP suspension (CA@Ag-NPs, $c = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) are mixed with 100 μL of MUA or MSA solution (0.01 M in UPW), respectively, stirred for 3 h and aged for 15 h.

$\tilde{\nu}$ (MUA@Ag-NP) [cm^{-1}] = 1084 (C-N), 1375 (C-H, O-H), 1660 (C=O), 2851 (C-H), 2918 (C-H), 3374 (O-H).

BSA@Ag-NPs

Bovine serum albumin (BSA) coated Ag-NPs (BSA@Ag-NPs) with a size of 2 – 3 nm were synthesized according to the method presented by Garza-Ocañas *et al.* [4] 38 mL of a solution containing 153 mg AgNO_3 and 943 mg BSA were mixed with 2 mL of a 0.6 M NaBH_4 . In a very quick reaction BSA@Ag-NPs are formed under intensive foam generation. After 30 min of stirring the suspension is left in the dark for 5 h to allow ageing. Due to the high resulting concentration BSA@Ag-NPs were diluted 10-fold before dialysis. The protein-coating of the Ag-NPs was verified by positive biuret and xanthoproteic test of BSA@Ag-NPs purified by centrifugation as described above.

Lys@Ag-NP

Similar to the procedure reported by Bae *et al.* [5], lysine coated Ag-NPs (Lys@Ag-NPs) were produced by mixing 10 mL of an Ag-NP suspension (CA@Ag-NPs, $c = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) with 1 mL of a lysine solution (4 mM in UPW). The mixture is stirred for 24 h to complete the reaction.

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 1064 (C-N), 1393 (O-H, C-H), 1576 (N-H, C=O), 3384 (O-H, N-H).

Cys@Ag-NPs

According to the procedure reported by Mandal *et al.* [6] 10 mL of an Ag-NP suspension (CA@Ag-NPs, $c = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) are mixed with 200 μL of a cysteine solution (1 mM in UPW), stirred for 10 min and left in the dark for ageing for 24 h to obtain cystein coated Ag-NPs (Cys@Ag-NPs).

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 1396 \text{ (O-H)}, 1581 \text{ (N-H)}, 1714 \text{ (C=O)}, 2853 \text{ (C-H)}, 2923 \text{ (C-H)}, 3356 \text{ (O-H, N-H)}$.

Starch@Ag-NPs

For the synthesis of starch coated Ag-NP (Starch@Ag-NPs) the sonochemical method described by Vasileva *et al.* [7] was applied. 32 mL of a 2 % (w/v) starch solution are mixed with 16 mL of a 0.001 M AgNO_3 solution mixed intensively and sonicated at a temperature of 30 °C. After 10 min 480 μL 0.1 M D-(+)-glucose solution and 2.4 mL 0.1 M NaOH solution are added simultaneously. Yellow silver nanoparticles are formed immediately. Under steady sonication the reaction is continued for 60 min.

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 1355 \text{ (C-O)}, 1588 \text{ (O-H)}, 2917, 2850 \text{ (C-H)}, 3338 \text{ (O-H)}$.

AgCl@Ag-NPs

As reported by Sun [8] AgCl-coated Ag-NPs (AgCl@Ag-NPs) were produced by a combined oxidation / precipitation process using FeCl_3 . However, nanoparticles (CA@Ag-NPs) were used as precursor instead of nanowires. In brief, 100 μL of a 62 mM PVP-solution and 6.7 mL of a CA@Ag-NP suspension ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) are mixed and 100 μL of a freshly prepared FeCl_3 solution (5 mM) is added drop wise. The colour of the dispersion turns from bright yellow to a more brownish color and is stirred for 1 h afterwards. The EDX-spectrum of a randomly picked particle can be found in fig S-1 (a). The chlorine content, determined from the EDX-spectrum is ~ 1 % that of silver. This indicates a very thin surface coating of chloride.

Ag₂S@Ag-NPs

As reported previously [3], for the synthesis of sulfide coated Ag-NPs (Ag₂S@Ag-NPs), 10 mL of an Ag-NP suspension (CA@Ag-NPs, $c = 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) are mixed with 200 μL of a sodium sulfide solution (0.01 M in UPW) and stirred for 3 h. Details and characterisation of the particles can be found in lit [3].

Ag₃PO₄-NPs

As described by Khan *et al.* [9] 15 mL of an AgNO₃ solution and 15 mL of a Na₂HPO₄ solution, both 0.02 M, are mixed which leads to the immediate formation of a yellow dispersion of nano-sized silver phosphate particles (Ag₃PO₄@Ag-NPs). The EDX-spectrum of a randomly picked particle can be found in fig S-1 (b). The Ag:P atomic ratio, determined from the EDX-spectrum is 2.66:1 which is close to the expected 3:1 stoichiometry for Ag₃PO₄.

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 936 \text{ (P-O)}$.

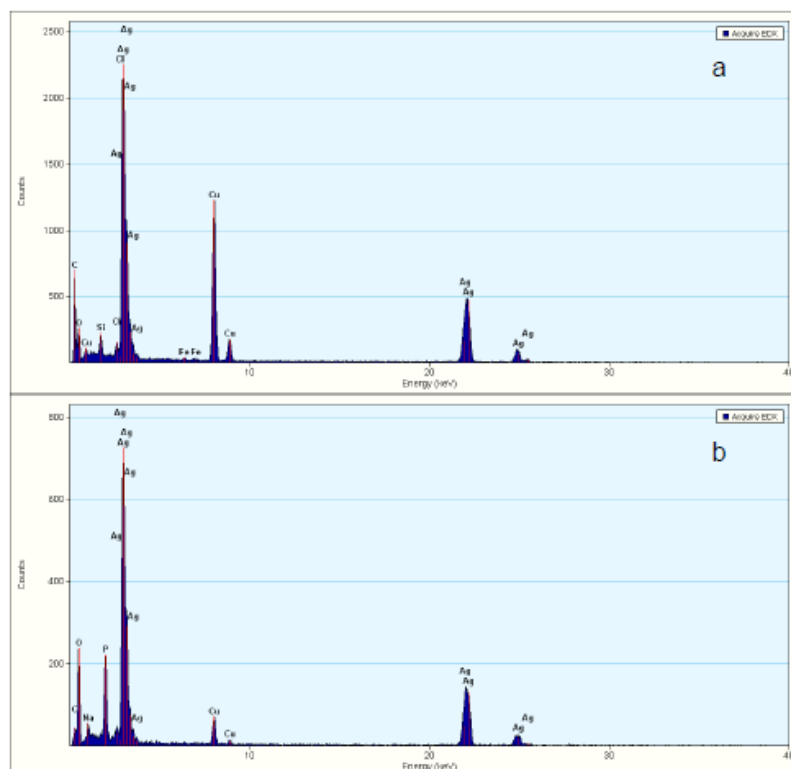


Figure S-1. EDX-spectra of AgCl@Ag-NPs (a) and Ag₃PO₄-NPs (b).

Correction of silver signal intensity for NR-NOM

NR-NOM stock solution was produced by dissolving 60 mg of NR-NOM reference material in 100 mL of UPW. The TOC of the stock solution was determined to be $157 \pm 8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. An amount of 0 / 2.5 / 5 / 10 mL NR-NOM stock solution was made up with water to 40 mL and extracted using the CPE-procedure. ET-AAS measurement of the surfactant rich phase resulted in significant signal intensity (see table S-1). From these data a correction-factor for the signal-intensity of silver-spiked samples can be calculated ($0.0041 \pm 0.0001 \text{ A s mL}^{-1}$). Using this correction the silver signal for NR-NOM samples spiked with Ag-NPs was

constant. We conclude that the increase in silver signal intensity with increasing NOM-concentration found in the first place is an artefact caused by silver-contamination of the NOM material (see fig. S-2).

Table S-1. Silver signal intensity of the ET-AAS measurement of the surfactant rich phase after CPE of diluted NR-NOM stock solution.

Amount of NR-NOM stock solution in a 40 mL sample [mL]	Silver signal intensity [A s]	Silver signal intensity per mL NR-NOM stock solution added [A s]
0	~ 0.0000	-
2.5	0.0099	0.0041
5	0.0226	0.0042
10	0.0342	0.0039

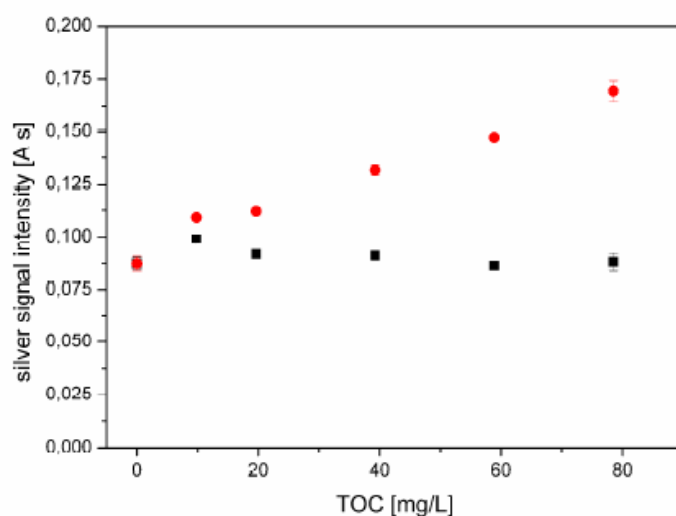


Figure S-2. Silver signal intensity for Ag-NP suspensions ($0.1 \mu\text{g Ag} \cdot \text{L}^{-1}$) extracted with CPE after spiking with different amounts of NR-NOM; un-corrected (●) and corrected (■) for Ag-contamination of the NR-NOM used.

References

1. G. Hartmann, C. Hutterer and M. Schuster, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 567 - 572.
2. D. Mahl, C. Greulich, W. Meyer-Zaika, M. Köller and M. Epele, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 6176 - 6181.
3. L. Li, G. Hartmann, M. Döblinger and M. Schuster, *Env. Sci. Techn.*, 2013, **47**, 7317 - 7323.
4. L. Garza-Ocañas, D. A. Ferrer, J. Burt, I. A. Diaz-Torres, M. Ramirez Cabrera, V. Tamez Rodríguez, R. Luján Rangel, D. Romanovicz and M. Jose-Yacaman, *Metallomics*, 2010, **2**, 204 - 210.
5. D. R. Bae, W. S. Han, J. M. Lim, S. Kang, J. Y. Lee, D. Kang and J. H. Jung, *Langmuir*, 2009, **26**, 2181 - 2185.
6. S. Mandal, A. Gole, N. Lala, R. Gonnade, V. Ganvir and M. Sastry, *Langmuir*, 2001, **17**, 6262 - 6268.

7. P. Vasilieva, B. Donkova, I. Karadjova and C. Dushkin, *Coll. Surf. A.: Physicochem. Eng. Aspects*, 2011, **382**, 203 - 210.
8. Y. Sun, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 2127 - 2133.
9. A. Khan, M. Qamar and M. Muneer, *Chem. Phys. Let.*, 2012, **519 - 520**, 54 - 58.

Publikation 4:

„Quantification of Nanoscale Silver Particles Removal and Release from Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany“

Veröffentlicht 2013 in der Fachzeitschrift *Environmental Science & Technology*, Band 47, Seiten 7317 – 7323.

Autoren: Lingxiangyu Li, Georg Hartmann, Markus Döblinger und Michael Schuster

Quantification of Nanoscale Silver Particles Removal and Release from Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany

Lingxiangyu Li,[†] Georg Hartmann,[†] Markus Döblinger,[‡] and Michael Schuster^{†,*}

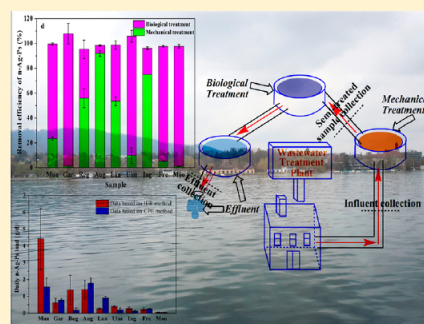
[†]Department of Chemistry, Technische Universität München, Garching 85747, Germany

[‡]Department of Chemistry and Center for NanoScience (CeNS), University of Munich, Munich 81377, Germany

S Supporting Information

ABSTRACT: The majority of pure silver nanoparticles in consumer products are likely released into sewer systems and usually end up in wastewater treatment plants (WWTPs). Research investigating the reduction in nanoscale silver particles (n-Ag-Ps) has focused on the biological treatment process, generally in controlled laboratory experiments. This study, analyzing the field-collected samples from nine municipal WWTPs in Germany, is the first to evaluate the reduction in n-Ag-Ps by mechanical and biological treatments in sequence in WWTPs. Additionally, the concentration of n-Ag-Ps in effluent was determined through two different methods that are presented here: novel ionic exchange resin (IER) and cloud point extraction (CPE) methods. The n-Ag-Ps concentrations in influent were all low (<1.5 μg/L) and decreased (average removal efficiency of ~35%) significantly after mechanical treatment, indicating that the mechanical treatment contributes to the n-Ag-Ps removal.

Afterward, more than 72% of the remaining n-Ag-Ps in the semi-treated wastewater (i.e., wastewater after mechanical treatment) were reduced by biological treatment. Together, these processes reduced 95% of the n-Ag-Ps that entered WWTPs, which resulted in low concentration of n-Ag-Ps in the effluents (<12 ng/L). For a WWTP with 520000 t/d treatment capacity, we estimated that the daily n-Ag-Ps load in effluent discharge equated to about 4.4 g/d. Obviously, WWTPs are not potential point sources for n-Ag-Ps in the aquatic environment.



■ INTRODUCTION

Over the past decade, an increasing number of manufactured nanoparticles (i.e., generally defined as engineered particles with at least one dimension <100 nm) have been incorporated into products and manufacturing processes due to the rapid innovation and commercialization in the field of nanotechnology. Because of their unique antibacterial, antifungal, and partially antiviral properties, silver nanoparticles (Ag-NPs) have been one of the most promising engineered nanoparticles (ENPs) for applications such as medicines, clothing, and cosmetics.^{1–3} According to the nanotechnology consumer products inventory by the Project on Emerging Nanotechnologies, of the 1317 nanotechnology-based consumer products or product lines available on the market in March 2011, products containing Ag-NPs accounted for the largest (24%) and fastest growing category.⁴ The intentional or accidental release of nanoscale silver particles (n-Ag-Ps, the nanometer-sized silver particles such as uncoated Ag-NPs, ligand-coated Ag-NPs, and Ag₂S-NPs) to the environment is hence largely unavoidable. The potential toxicity and bioaccumulation of n-Ag-Ps make it necessary to probe their fates and transport in the environment.^{5–10}

As is the case for most other ENPs like TiO₂-NPs,^{11,12} the majority of n-Ag-Ps in consumer products will be likely released into sewer systems.^{3,13,14} Municipal wastewater treatment plants (WWTPs) therefore act as the “gateways” controlling

release of ENPs from domestic and/or industrial sources to the aquatic environment via treated effluent that is discharged into surface waters. Kim et al.¹⁵ found that Ag-NPs entering the wastewater treatment process could be mostly sulfidized. In addition, based on batch bioreactors in a laboratory, a general conclusion from previous investigations on Ag-NPs removal is that about 90% spiked Ag-NPs are efficiently reduced by biological treatment and accumulated in activated sludge or biosolids as a form of Ag₂S.^{5,13,15–18} Nonetheless, these studies ignored two key points. First, a high dose (mg/L or g/L) of Ag-NPs used in batch bioreactors in a laboratory has a toxic impact on bacteria in wastewater treatment,^{19,20} and second, does mechanical treatment (e.g., screen and grit chambers before biological treatment in real WWTPs) play a role in the reduction of n-Ag-Ps? Therefore, further investigation of n-Ag-Ps removal using field-collected wastewater influent, semi-treated wastewater (i.e., wastewater treated by mechanical devices like screen and grit chambers before biological treatment), and effluent is necessary.

Although evidence from laboratory studies suggest that treatments in WWTPs can greatly reduce the concentration of

Received: October 19, 2012

Revised: May 26, 2013

Accepted: June 10, 2013

Published: June 10, 2013

Table 1. Basic Information and Characteristics of Wastewater Samples from Nine Municipal WWTPs in Germany (Mean \pm s, $n = 3$)

sample	capacity (kt/d)	inhabitant ^a (k)	time of sample collection ^b	influent		semi-treated		effluent	
				pH	TOC (mg/L)	pH	TOC (mg/L)	pH	TOC (mg/L)
Mun	520	1500 ^c	March 28	7.17	36.8 \pm 3.7	7.27	25.9 \pm 5.1	7.58	<1
Gar	220		April 22	7.27	17.2 \pm 2.9	7.19	15.7 \pm 2.1	6.70	<1
Reg	180	400	August 17	7.57	23.4 \pm 3.6	7.67	13.0 \pm 6.2	7.35	<1
Aug	149.5	375	June 13	7.78	14.2 \pm 3.6	7.15	11.7 \pm 1.7	7.03	<1
Lan	120	260	August 17	8.06	31.2 \pm 5.6	7.55	19.0 \pm 2.9	7.48	<1
Ulm	100	200	June 28	7.20	36.5 \pm 2.6	7.11	27.8 \pm 3.6	6.97	5.2 \pm 0.3
Ing	60	275	September 5	7.51	53.0 \pm 1.8	7.42	61.4 \pm 7.2	7.81	<1
Fre	51.8	110	August 28	6.95	223.1 \pm 19.1	7.11	125.7 \pm 6.8	6.98	<1
Moo	18.9	40	August 28	7.39	15.6 \pm 2.9	7.52	12.2 \pm 1.9	7.25	<1

^aInhabitant means the number of inhabitants who discharge wastewater into the WWTP. ^bSamples were collected at noon (11:00–13:00). ^cWWTPs named Mun and Gar serve one city whose population is 1.5 million.

n-Ag-Ps in the treated effluent, this does not mean that we can ignore n-Ag-Ps discharged, especially when several studies showed Ag-NPs even after partial sulfidation could readily be biomagnified within terrestrial and aquatic food webs.^{21,22} As reported by Lowry et al.,²³ Ag from the NPs remained bioavailable even after partial sulfidation and when water column total Ag concentrations were low (<2 $\mu\text{g/L}$). However, there is little information in the literature about quantifying n-Ag-Ps in field-collected wastewater effluent due to the low concentration of n-Ag-Ps in the wastewater matrix. At present, established analytical techniques for NPs quantification have focused so far on synthetic products and are in most cases not suitable for complex mixtures, like environmental or biological samples, nor are they able to detect low concentrations (e.g., ng/L). Hence, as a first step, sample preparation, i.e., extraction and preconcentration of NPs, from complex matrices is required. In our previous study,²⁴ we designed and validated a novel sample preparation technique using IER to extract and concentrate noble metal nanoparticles (Au-, Ag-, and Pd-NPs) in aqueous samples. Meanwhile, Liu et al.^{25,26} and Chao et al.²⁷ also reported an elegant method for selective separation and concentration of n-Ag-Ps by cloud point extraction (CPE) with Triton X-114. Consequently, both of the methods show potential for quantification of n-Ag-Ps in environmental samples.

In the present study, we aim to investigate the n-Ag-Ps removal and release from municipal wastewater treatment plants. For this purpose, nine municipal WWTPs from eight cities in Germany were chosen. Special emphasis was placed on (1) investigating whether and to what extent mechanical treatment plays a role in the n-Ag-Ps removal, (2) quantifying the n-Ag-Ps in field-collected wastewater effluent through IER and CPE methods, respectively, and further determining the relative contribution of biological treatment to reduction in n-Ag-Ps compared to mechanical treatment, and (3) finally, estimating the daily n-Ag-Ps load entering the water environment through effluent discharge.

EXPERIMENTAL SECTION

Field-Collected Samples from Nine Municipal WWTPs.

The field-collected wastewater influent, semi-treated, and effluent samples were from nine municipal WWTPs located in eight German cities between the end of March (28–30) and the beginning of September (5–9) 2012. All samples were collected at noon (about 11:00–13:00) in polyethylene terephthalate (PET) containers (5 L), which were rinsed 3-

fold with the sample before they were filled up to volume and stored at 4 °C until use. According to the treatment capacity, the nine WWTPs were classified into three groups: large (>200 kt/d), medium (100–200 kt/d), and small (<100 kt/d). All WWTPs except one named Moo employ the same treatment processes: first, mechanical treatment; second, biological treatment, including nitrification, denitrification, and phosphorus removal, because major WWTPs in Germany have been operated this way since 1989.²⁸ For the WWTP named Moo, the mechanical treatment is replaced by mixing the influent with one branch of runoff (i.e., a certain amount of semi-treated wastewater is recirculated in the treatment system and mixed with the influent) without precipitation from biological treatment pools. Detailed information on the WWTP samples is shown in Table 1 and Table S1 of the Supporting Information.

Analysis of Silver in Wastewater. In order to analyze silver in wastewater, each of the field-collected influent and semi-treated samples was divided into three subsamples. The first group of subsamples was analyzed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) to quantify total silver concentration. The second group of subsamples was filtered through a 0.45 μm membrane syringe filter, and silver concentration was determined by GFAAS, giving the concentration of silver in ionic forms and particles smaller than 0.45 μm . The third group of subsamples was pretreated by the CPE method and analyzed by GFAAS to determine the concentration of n-Ag-Ps in the wastewater influent.

Extraction of n-Ag-Ps through IER Method. The extraction was performed according to our previous study with minor modifications.²⁴ First, the n-Ag-Ps in the samples were surface modified by mercaptosuccinic acid (MSA); a mixture of 10 mL of 0.01 M MSA and 990 mL of sample was mechanically shaken (200 rpm) for 3 h at room temperature. Then, the pH of the solution was adjusted to 8.0 \pm 0.5 using 0.5 M NaOH. Afterward, the solution, by means of a peristaltic pump, passed through a glass tube with an internal diameter of 20 mm and a length of 9 cm tightly packed (packing length, 2 cm) with 4.5 g of Amberlite IRN-78 nuclear grade ion-exchange resin. The influent rate was adjusted to 1.5 mL/min. Afterwards, the n-Ag-Ps-loaded resin was rinsed with 250 mL of methanol and then transferred to 25 mL of 8% (v/v) formic acid in methanol. The cleavage reaction was conducted using gentle shaking (250 rpm) for different times (4–45 h) at room temperature. The time point for extraction of n-Ag-Ps in WWTP effluents was 4 h on the basis of our previous study.²⁴

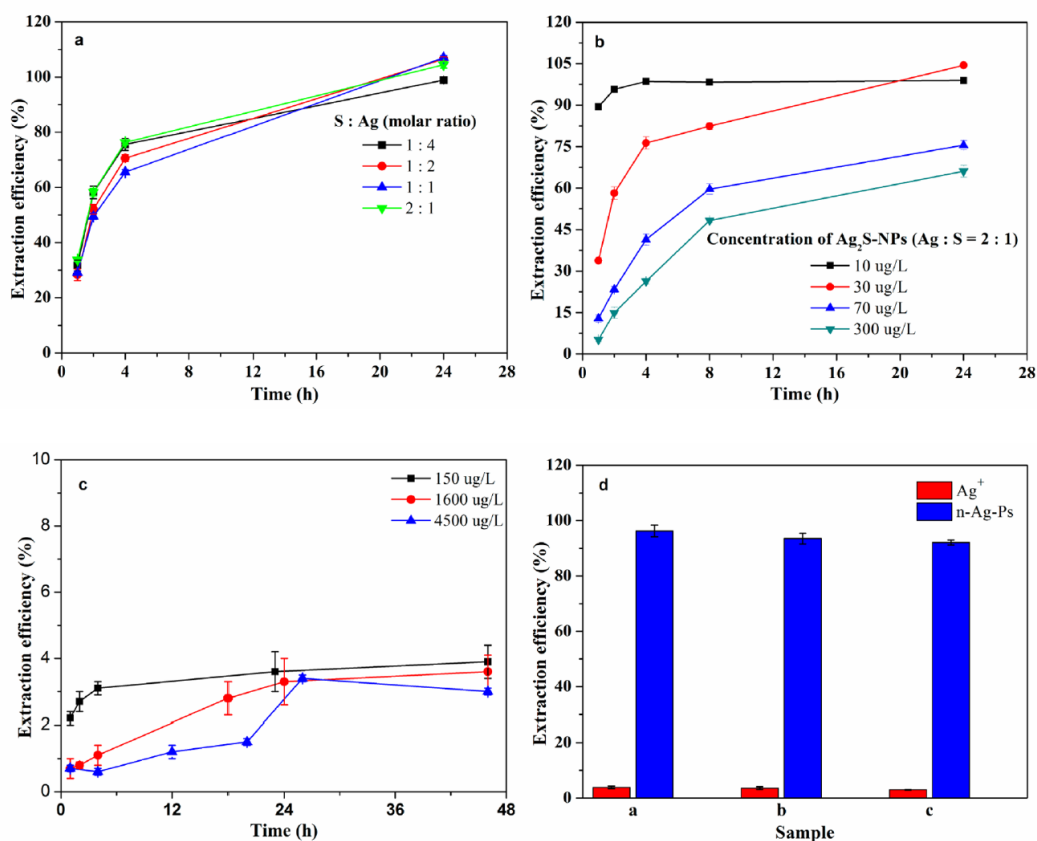


Figure 1. Optimization of the IER method for n-Ag-Ps extraction. (a) Effect of the S to Ag ratio on the extraction of Ag₂S-NPs (concentration: 30 µg/L). (b) Effect of Ag₂S-NPs concentration on the extraction efficiency. (c) Extraction of Ag ions as a function of time by the IER method. (d) Selective extraction of n-Ag-Ps versus Ag⁺ using IER method.

After settling for 15 min, the supernatant containing the n-Ag-Ps was collected and concentrated to 2 mL by evaporation with nitrogen. Details of GFAAS measurement can be found in Table S2 of the Supporting Information.

Extraction of n-Ag-Ps through CPE Method. The extraction was based on the method of Liu et al.^{25,26} and Chao et al.²⁷ and was modified to improve the limit of detection (LOD).²⁹ In the present study, the LOD of modified CPE was as low as 0.7 ng/L,²⁹ which is nearly 10-fold lower than that of the LOD (6 ng/L) reported by Liu et al.^{25,26} and Chao et al.²⁷ In brief, 40 mL of aqueous sample was mixed with 1.0 mL of saturated ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution, 400 µL of 1 M sodium acetate, 100 µL of 1.25 M acetic acid, and 1 mL of 10% (w/w) TX-114 in a 50 mL tapered polypropylene sample tube. The mixture was incubated at 40 °C for at least 60 min and then centrifuged for 5 min at 3000 rpm to enhance phase separation. Afterward, the sample was cooled in an ice bath for 5 min. The aqueous supernatant was removed by decanting. The remaining surfactant-rich phase containing the n-Ag-Ps was dissolved in either 100 µL (for effluent samples) or 1.0 mL (for influent samples) of ethanol and forwarded to GFAAS measurement. Details of GFAAS measurement can be found in Table S3 of the Supporting Information. Calibration was performed using n-Ag-P solutions of known concentration that were subjected to the complete extraction procedure and measured the same way as the

environmental samples. Using this method, LOD for n-Ag-Ps of 0.7 (for effluent samples) and 12.9 ng/L (for influent samples) were achieved for WWTP samples.

Quality Assurance and Quality Control (QA/QC).

Considering the extremely low concentration of n-Ag-Ps in the complex wastewater effluent matrix, strict quality assurance and control measures were implemented to ensure accurate quantification. All glass columns were thoroughly cleaned with 10% nitric acid and aqua regia solution, rinsed 6-fold with ultra pure water (UPW), and oven-dried overnight before use. UPW from a Direct-Q-system (Millipore, Billerica, U.S.A.) with a resistivity of 18.2 MΩ/cm was used in the present study. All the samples were collected in PET containers that were cleaned thoroughly with 5% nitric acid solution and rinsed 3-fold with UPW. Samples were immediately transported to a refrigerator for storage at a temperature of 4 °C. Each batch of nine samples included one procedural blank to check for possible contamination. No n-Ag-Ps were detected in the procedural blanks, and therefore, the quantitative results were not blank corrected in this study. Robustness of analysis was assessed by analyzing three duplicated samples, with a relative standard deviation less than 10%.

Statistical Analysis. Statistical analysis and correlations were performed using SPSS for Windows version 16.0 (Chicago, IL, U.S.A.). In the present study, Spearman rank correlation was applied to investigate the correlations between

Table 2. Determined Concentrations of n-Ag-Ps and Total Silver with and without Filtration, and Calculated Concentration of Free Ag⁺, as well as Ratio of Free Ag⁺ to n-Ag-Ps in Nine Field-Collected Wastewater Influent Samples (Mean ± s, n = 3)

sample	silver concentration (μg/L)		n-Ag-Ps concentration (μg/L)	calculated free Ag ⁺ (μg/L) ^a	percent of free Ag ⁺ in the total silver (%)	ratio of Ag ⁺ to n-Ag-Ps
	unfiltered	filtrated (0.45 μm)				
Mun	3.05 ± 0.13	1.30 ± 0.10	1.50 ± 0.05	– ^b	–	–
Gar	0.35 ± 0.04	0.31 ± 0.02	0.11 ± 0.00	0.20 ± 0.02	58.25 ± 9.03	1.82 ± 0.16
Reg	0.45 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.06 ± 0.03	12.89 ± 7.41	0.35 ± 0.16
Aug	0.76 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.37 ± 0.03	–	–	–
Lan	0.41 ± 0.04	0.23 ± 0.05	0.15 ± 0.01	0.08 ± 0.04	18.24 ± 9.59	0.51 ± 0.27
Ulm	0.37 ± 0.07	0.18 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.06 ± 0.05	8.75 ± 10.23	0.28 ± 0.37
Ing	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.06	0.12 ± 0.00	0.18 ± 0.06	55.60 ± 22.63	1.47 ± 0.50
Fre	0.52 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.03 ± 0.03	6.04 ± 6.00	0.16 ± 0.15
Moo	0.45 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.21 ± 0.03	47.14 ± 12.35	3.51 ± 0.32

^aCalculated by equation: total silver concentration (filtrated) – n-Ag-Ps concentration. ^bValue is negative.

the n-Ag-Ps concentration and TOC concentration after mechanical separation because data sets were not normally distributed (Shapiro–Wilk test). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction of Ag₂S-NPs by IER Method. The extraction procedure was optimized in our previous study.²⁴ It was found that the IER method could effectively and selectively extract spiked uncoated and/or ligand-coated Ag-NPs at a 80 ng/L level from the real environmental water (river/lake/brook). In this present study, given the various extents of Ag-NPs sulfidation in environment,^{15,30} we prepared Ag₂S-NPs with four different ratios of Ag to S. As shown in Figure 1a, the extent of sulfidation had no impact on the extraction efficiencies, indicating that the IER method can be applied to extract Ag₂S-NPs with varied ratios of Ag to S. In addition, the extraction time clearly increased with higher initial concentration of Ag₂S-NPs (Figure 1b). For Ag₂S-NPs concentration below 10 μg/L, the extraction efficiency reached the maximum (~100%) within 4 h and then leveled off, which is in good agreement with recovery of Ag-NPs in our previous study.²⁴ Hence, the extraction time of 4 h was selected in the present study.

Effect of Coexisting Ag⁺ on the Analysis of n-Ag-Ps in Water Samples by IER Method. Because of the release of Ag⁺ from Ag-NPs,^{31,32} environmental samples with Ag-NPs always contain Ag⁺. Furthermore, given that the matrix-associated Ag⁺ in environmental samples might be extracted and falsely counted as n-Ag-Ps, the effect of coexisting Ag⁺ on the determination of n-Ag-Ps in water samples is especially worth mentioning. In our previous study,²⁴ we showed that the coexisting Ag⁺ has negligible effects on the determination of Ag-NPs.

In the present study, we mixed different concentrations of Ag⁺ with Ag-NPs and Ag₂S-NPs to test the effects of coexisting Ag⁺ on the analysis of n-Ag-Ps by the IER method. The resin showed good adsorption behavior (>99%) toward the MSA-modified silver including ions and NPs because the runoff of the column with resin was measured by GFAAS, where typically no silver was found (detection limit 0.20 μg/L). However, as shown in Figure 1c, only less than 4% of the adsorbed Ag⁺ is extracted by an 8:92 formic acid/methanol solution even after 46 h of gentle shaking. On the contrary, the extraction efficiencies of the n-Ag-Ps can reach 92.1–96.2% (Figure 1d). The results imply that this method has the

potential for selective extraction of n-Ag-NPs versus silver ions in water samples.

However, it should be noted that a high content of Ag⁺ in samples still can interfere with the analysis of n-Ag-Ps. This is because when the Ag⁺ concentration is much higher than that of the n-Ag-Ps in samples, the absolute Ag⁺ amount extracted is much higher than that of n-Ag-Ps even though the extraction efficiency of Ag⁺ (<4%) was much lower than that of n-Ag-Ps (>92.1%). For example, for sample c (Table S4, Supporting Information) containing 150 μg/L Ag-NPs, 150 μg/L Ag₂S-NPs, and 4500 μg/L of Ag⁺, the extraction efficiency of 92.1% n-Ag-Ps corresponds to an extracted amount of 276.3 μg/L, and meanwhile, the extraction efficiency of 4% Ag⁺ corresponds to an extracted amount of 180 μg/L of Ag⁺ that would be falsely counted as n-Ag-Ps in the following GFAAS analysis, so it would give rise to an enormously increased n-Ag-Ps in the sample.

Although the high content of Ag⁺ significantly interferes with the analysis of n-Ag-Ps, for most environmental samples, the coexisting Ag⁺ concentration is low and has negligible effects on the quantification of n-Ag-Ps. To the best of our knowledge, the fraction of Ag⁺ is less than 0.1% of the total mass of silver in all environmental water matrices.³³ Furthermore, two recent studies operated by Liu et al.³⁴ and Kittler et al.³⁵ found that the release of Ag⁺ from Ag-NPs in water was dependent on the sample pH, temperature, and NPs surface coating, and the final degree of dissolution in most cases did not exceed 70% of the weight of particles. Therefore, for most real samples, it is expected that the ratio of total Ag⁺ to total n-Ag-Ps should be below 2, and the coexisting Ag⁺ has negligible effects on the analysis of n-Ag-Ps in real samples.

Analysis of Silver in Wastewater Influent. Normally, Ag⁺ and Ag-NPs coexist, given the release of Ag⁺ from Ag-NPs and the transformation of Ag⁺ into Ag-NPs in the environment.^{31,32,36} As shown in Table 2, the concentrations of n-Ag-Ps range from 0.06 to 1.50 μg/L, which represented 13.3–49.2% of the total silver concentration. Most influent samples contained Ag⁺; the concentration of Ag⁺ ranged from 0.03 to 0.21 μg/L, which accounted for between 6.0 and 58.3% of the total silver. Additionally, we also found that the ratio of total Ag⁺ to total n-Ag-Ps were below 2, which was in good agreement with the previous studies.^{27,35} Therefore, coexisting Ag⁺ had a negligible effect on the analysis of n-Ag-Ps in the wastewater influent from WWTP in this study.

In the present study, the concentrations of total silver in the unfiltered influent were in a range from 0.32 to 3.05 μg/L

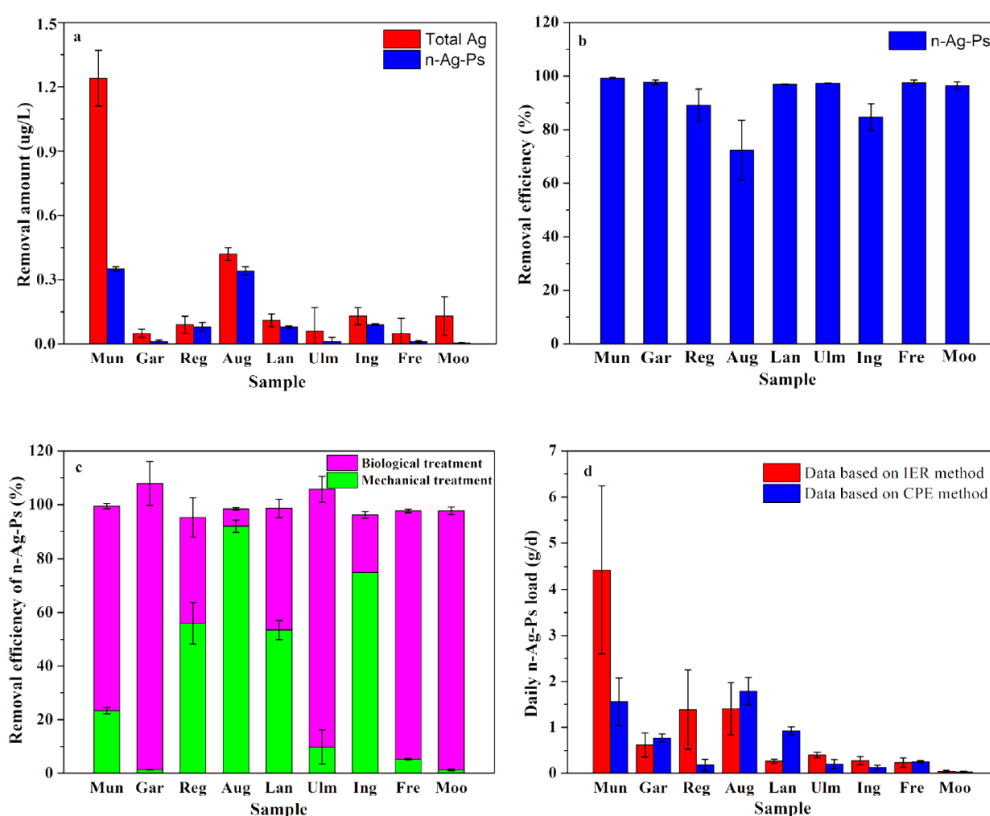


Figure 2. (a) Removal of total Ag and n-Ag-Ps, respectively, by the mechanical treatment. (b) Removal efficiency of n-Ag-Ps by biological treatment. (c) Relative contribution of mechanical treatment to the n-Ag-Ps removal compared to biological treatment. (d) Daily n-Ag-Ps load entering the water environment by effluent discharge.

Table 3. Quantification of n-Ag-Ps in Effluent of Municipal WWTPs (Mean \pm s, $n = 3$)

method	concentration of n-Ag-Ps (ng/L)									
	Mun	Gar	Reg	Aug	Lan	Ulm	Ing	Fre	Moo	
IER	8.5 \pm 3.5	2.8 \pm 1.2	7.7 \pm 4.8	9.4 \pm 3.8	2.2 \pm 0.4	4.0 \pm 0.6	4.6 \pm 1.5	4.5 \pm 2.0	2.2 \pm 1.2	
CPE	3.0 \pm 1.0	3.5 \pm 0.4	1.0 \pm 0.7	12.0 \pm 2.0	7.7 \pm 0.7	2.0 \pm 1.0	2.1 \pm 0.8	4.9 \pm 0.5	1.7 \pm 0.5	

(Table 2), which is much lower than the influent samples in the United States.³⁷ Additionally, the concentrations of total silver in the filtered influent ranged from 0.18 to 1.30 $\mu\text{g/L}$, which represented a range from 43 to 93% of the total silver concentration in unfiltered influents. This may be attributed to the relatively high levels of suspended organic matter in the influent;^{38,39} the portion of silver associated with suspended organic matter is of a size larger than the pore size (0.45 μm) or silver formed aggregates greater than 0.45 μm in size under organic matter abundant condition. The same phenomenon was observed when the semi-treated samples were analyzed (Table S5, Supporting Information).

Role of Mechanical Treatment in n-Ag-Ps Removal. As shown in Figure 2a, mechanical treatment plays an important role in removal of silver in general and n-Ag-Ps from several WWTPs in Germany. We found that the concentration of total silver decreased by 0.05–1.24 $\mu\text{g/L}$, corresponding to a decrease in n-Ag-Ps between 0.01 and 0.35 $\mu\text{g/L}$. This could be attributed to the occurrence of silver (ions and NPs) partly attached to larger particles like suspended organic matter. This is supported by the significant correlation between TOC and n-

Ag-Ps ($r = 0.690$, $p = 0.048$) after the mechanical treatment. Obviously, large-sized silver (e.g., μm level) and/or ions as well as small-sized silver adsorbed/coated by suspended organic matter are removed efficiently by the mechanical treatment. Among the nine WWTPs, Aug and Ing were the best-performing WWTPs in terms of n-Ag-Ps removal by mechanical treatment, and Gar, Ulm, Fre, and Moo were the worst performing, indicating that different WWTPs can have different n-Ag-Ps removal efficiencies by mechanical treatment due to the nature of the mechanical devices used.

Quantification of n-Ag-Ps in Municipal WWTPs Effluent. In general, after the mechanical treatment, the wastewater is subjected to the biological treatment, where microbes remove N and P in sequence. Previous research indicated that about 90% of spiked Ag-NPs were efficiently reduced by biological treatment under controlled laboratory conditions.^{13,37} Our field sampling demonstrates that biological treatment in WWTPs reduced the remaining n-Ag-Ps in the semi-treated wastewater by 72.3–99.3% (Figure 2b). While 8 of the 9 WWTPs had biological treatment systems that functioned

as efficiently as those in laboratory studies, the Aug WWTP was less efficient.

Totally, the effluent samples collected from different cities exhibited similar n-Ag-Ps reduction trends through the wastewater treatment processes including the mechanical and biological treatments; at least approximately 95% of the n-Ag-Ps that entered municipal WWTPs were reduced from wastewater (Figure 2c).

Given the low concentration of n-Ag-Ps in environmental samples, systematic error risks would be high. Hence, two independent measurement methods, namely, IER and CPE, were applied in the present study to confirm the real concentration of n-Ag-Ps in effluent samples. As shown in Table 3, the concentrations of n-Ag-Ps in the field-collected effluents range from 2.2 to 9.4 ng/L using the IER method, which is in good agreement (t test, $t = 0.593$, $p = 0.562$) with the results obtained by using the CPE method. Obviously, the concentrations of n-Ag-Ps in effluent are far lower than the values required by the Germany Federal Environment Agency (GFEA) (1990), whose maximum contaminant level is 0.08 mg/L for silver in drinking water.⁴⁰ Additionally, these effluent concentrations were at the much lower end of normal detection capabilities. It is even below the LOD (6 ng/L) of the method reported by Liu et al.^{25,26} and Chao et al.,²⁷ so it is essential to extract and preconcentrate the n-Ag-Ps before measurement.

In general, wastewater effluent is discharged primarily into surface waters (rivers, lakes, oceans) and represents a significant potential point source for pollutants into the environment. In the present study, the daily n-Ag-Ps load entering the water environment through effluent discharge as estimated for each of the nine municipal WWTPs is summarized in Figure 2d. Among the nine WWTPs, we found that even the highest daily n-Ag-Ps load was 4.4 g/d, indicating WWTPs are not a potential point source. To the best of our knowledge, this study is the first to investigate whether and to what extent mechanical treatment plays a role in the n-Ag-Ps removal in real municipal WWTPs and to further quantify n-Ag-Ps in the effluents. Both the mechanical and biological treatments can reduce the n-Ag-Ps from wastewater. Totally, more than 95% of the n-Ag-Ps that entered municipal WWTPs are reduced through the wastewater treatment processes, which gives rise to extremely low concentrations of n-Ag-Ps in the effluents (e.g., some ng/L).

On the other hand, the removed n-Ag-Ps are likely to be accumulated in the wastewater biosolids that are usually used as agricultural land amendments, placed in landfills, or incinerated. The biosolids may represent a potential source for n-Ag-Ps release into the environment that is very different from WWTP liquid discharge. Hence, future investigation will have to further enlighten the biosolids releases and resulting ecosystem exposures.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

Additional information on chemicals and materials, Ag-NPs synthesis, temperature procedure of GFAAS, and some results such as UV-vis spectra and TEM-EDX of Ag₂S-NPs as well as analysis of wastewater after mechanical treatment. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: michael.schuster@ch.tum.de. Fax: (+49) 89 28913186.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research project was financed by the Bavarian State Ministry for the Environment and Public Health. The authors acknowledge Monika Stoiber (Technische Universität München), Kerstin Leopold, and Jessica Huber (University of Ulm) for assistance with wastewater samples collection. L. Li thanks the China Scholarship Council for a scholarship.

■ REFERENCES

- (1) Quadros, M. E.; Marr, L. C. Silver nanoparticles and total aerosols emitted by nanotechnology-related consumer spray products. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (24), 10713–10719.
- (2) von der Kammer, F.; Legros, S.; Larsen, E. H.; Loeschner, K.; Hofmann, T. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *TrAC* **2011**, *30* (3), 425–436.
- (3) Benn, T. M.; Westerhoff, P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (11), 4133–4139.
- (4) Nanotechnology Consumer Product Inventory. http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/ accessed June 18, 2013).
- (5) Fabrega, J.; Fawcett, S. R.; Renshaw, J. C.; Lead, J. R. Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (19), 7285–7290.
- (6) Handy, R. D.; von der Kammer, F.; Lead, J. R.; Hassellöv, M.; Owen, R.; Crane, M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology* **2008**, *17* (4), 287–314.
- (7) Bar-Ilan, O.; Albrecht, R. M.; Fako, V. E.; Furgeson, D. Y. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small* **2009**, *5* (16), 1897–1910.
- (8) Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.; Odzak, N.; Sigg, L.; Behra, R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (23), 8959–8964.
- (9) Yang, X. Y.; Gondikas, A. P.; Marinakos, S. M.; Auffan, M.; Liu, J.; Hsu-Kim, H.; Meyer, J. N. Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (2), 1119–1127.
- (10) Bradford, A.; Handy, R. D.; Readman, J. W.; Atfield, A.; Muhling, M. Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (12), 4530–4536.
- (11) Kiser, M. A.; Westerhoff, P.; Benn, T.; Wang, Y.; Pérez-Rivera, J.; Hristovski, K. Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (17), 6757–6763.
- (12) Windler, L.; Lorenz, C.; von Goetz, N.; Hungerbühler, K.; Amberg, M.; Heuberger, M.; Nowack, B. Release of titanium dioxide from textiles during washing. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (15), 8181–8188.
- (13) Kaegi, R.; Voegelin, A.; Sinnet, B.; Zuleeg, S.; Hagedorfer, H.; Burkhardt, M.; Siegrist, H. Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (9), 3902–3908.
- (14) Geranio, L.; Heuberger, M.; Nowack, B. The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (21), 8113–8118.
- (15) Kim, B.; Park, C.; Murayama, M.; Hochella, M. F. Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (19), 7509–7514.
- (16) Tiede, K.; Boxall, A. B. A.; Wang, X. M.; Gore, D.; Tiede, D.; Baxter, M.; David, H.; Tear, S. P.; Lewis, J. Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of

- silver nanoparticles in activated sludge. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25* (7), 1149–1154.
- (17) Limbach, L. K.; Bereiter, R.; Müller, E.; Krebs, R.; Gälli, R.; Stark, W. J. Removal of oxide nanoparticles in a model wastewater treatment plant: Influence of agglomeration and surfactants on clearing efficiency. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (15), 5828–5833.
- (18) Nowack, B. Nanosilver revisited downstream. *Science* **2010**, *330* (6007), 1054–1055.
- (19) Choi, O.; Deng, K. K.; Kim, N.-J., Jr.; Ross, L.; Surampalli, R. Y.; Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* **2008**, *42* (12), 3086–3074.
- (20) Sheng, Z.; Liu, Y. Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water Res.* **2011**, *45* (18), 6039–6050.
- (21) Shoults-Wilson, W. A.; Reinsch, B. C.; Tsyusko, O. V.; Bertsch, P. M.; Lowry, G. V.; Unrine, J. M. Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*). *Nanotoxicology* **2011**, *5* (3), 432–444.
- (22) Croteau, M. N.; Misra, S. K.; Luoma, S. N.; Valsami-Jones, E. Silver bioaccumulation dynamics in a freshwater invertebrate after aqueous and dietary exposures to nanosized and ionic Ag. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (15), 6600–6607.
- (23) Lowry, G. V.; Espinasse, B. P.; Badireddy, A. R.; Richardson, C. J.; Reinsch, B. C.; Bryant, L. D.; Bone, A. J.; Deonaraine, A.; Chae, S.; Therezien, M.; Colman, B. P.; Hsu-Kim, H.; Bernhardt, E. S.; Matson, C. W.; Wiesner, M. R. Long-term transformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (13), 7027–7036.
- (24) Li, L.; Leopold, K.; Schuster, M. Effective and selective extraction of noble metal nanoparticles from environmental water through a noncovalent reversible reaction on an ionic exchange resin. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (73), 9165–9167.
- (25) Liu, J.-F.; Liu, R.; Yin, Y.-G.; Jiang, G.-B. Triton X-114 based cloud point extraction: a thermoreversible approach for separation/concentration and dispersion of nanomaterials in the aqueous phase. *Chem. Commun.* **2009**, *12*, 1514–1516.
- (26) Liu, J.-F.; Chao, J.-B.; Liu, R.; Tan, Z.-Q.; Yin, Y.-G.; Wu, Y.; Jiang, G.-B. Cloud point extraction as an advantageous preconcentration approach for analysis of trace silver nanoparticles in environmental waters. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (15), 6496–6502.
- (27) Chao, J.-B.; Yu, S.-J.; Feng, Y.-D.; Tan, Z.-Q.; Liu, R.; Yin, Y.-G. Speciation analysis of silver nanoparticles and silver ions in antibacterial products and environmental waters via cloud point extraction-based separation. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (17), 6875–6882.
- (28) Seeger, H. The history of German waste water treatment. *Eur. Water Manage.* **1999**, *2* (5), 51–56.
- (29) Hartmann, G.; Hutterer, C.; Schuster, M. Ultra-trace determination of silver nanoparticles in water samples using cloud point extraction and ETAAS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *28*, 567–572.
- (30) Levard, C.; Reinsch, B. C.; Michel, F. M.; Oumahi, C.; Lowry, G. V.; Brown, G. E. J. Sulfidation processes of PVP-coated silver nanoparticles in aqueous solution: impact on dissolution rate. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (12), 5260–5266.
- (31) Liu, J.; Sonshine, D. A.; Shervani, S.; Hurt, R. H. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano* **2010**, *4* (11), 6903–6913.
- (32) Glover, R. D.; Miller, J. M.; Hutchison, J. E. Generation of metal nanoparticles from silver and copper objects: Nanoparticle dynamics on surfaces and potential sources of nanoparticles in the environment. *ACS NANO* **2011**, *5* (11), 8950–8957.
- (33) Jin, X.; Li, M. H.; Wang, J. W.; Marambio-Jones, C.; Peng, F. B.; Huang, X. F.; Damoiseaux, R.; Hoek, E. M. V. High-throughput screening of silver nanoparticle stability and bacterial inactivation in aquatic media: Influence of specific ions. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (19), 7321–7328.
- (34) Liu, J. Y.; Hurt, R. H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (6), 2169–2175.
- (35) Kittler, S.; Greulich, C.; Diendorf, J.; Köller, M.; Epple, M. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chem. Mater.* **2012**, *22* (16), 4548–4554.
- (36) Maurer, F.; Christl, I.; Hoffmann, M.; Kretzschmar, R. Reduction and reoxidation of humic acid: Influence on speciation of cadmium and silver. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (16), 8808–8816.
- (37) Shafer, M. M.; Overdier, J. T.; Armstrong, D. E. Removal, partitioning, and fate of silver and other metals in wastewater treatment plants and effluent-receiving streams. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17* (4), 630–641.
- (38) Domingos, R. F.; Tufenkji, N.; Wilkinson, K. J. Aggregation of titanium dioxide nanoparticles: Role of a fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (5), 1282–1286.
- (39) Petosa, A.; Jaisi, D. P.; Quevedo, I. R.; Elimelech, M.; Tufenkji, N. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: Role of physicochemical interactions. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (17), 6532–6549.
- (40) Drinking Water: Regulation on Drinking Water and Water for Food Companies GFEA BGBI; Drinking Water Regulations 111 2126-1-7; Germany Federal Environment Agency (GFEA), 1990. <http://www.amthor.de/Wasser-Infos/tvo.jsp> (accessed June 18, 2013).

Supporting Information

Quantification of Nanoscale Silver Particles Removal and Release from Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany

Lingxiangyu Li[†], Georg Hartmann[†], Markus Döblinger[‡], and Michael Schuster^{†,*}

[†] Department of Chemistry, Technische Universität München, Garching 85747, Germany.

[‡] Department of Chemistry and Center for NanoScience (CeNS), University of Munich, Munich 81377, Germany.

Total pages: 10 pages

1 Figure

5 Tables

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: michael.schuster@ch.tum.de; Fax: (+49) 89 28913186.

Chemicals and Materials

All reagents were of analytical grade and used as received without further purification. Sodium borohydride (NaBH_4) and AgNO_3 were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Mercaptosuccinic acid (MSA), sodium hydroxide, hydrochloric acid, nitrate acid, sodium citrate dehydrate, sodium sulfide, sodium thiosulphate, sodium acetate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), acetic acid, Triton X-114 (TX-114) and 25 mm syringe filter with 0.45 μm pores used in this study were purchased from VWR International (Leuven, Belgium). The Amberlite IRN-78 (particle size 500 μm , matrix: styrene divinylbenzene copolymer, functional group: trimethylammonium) was supplied by Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Methanol, ethanol and formic acid were of analytical grade.

Sample Analysis

The pH of the samples was measured using a Qph 70 pH-meter (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany). UV-vis spectra were recorded between 325 and 700 nm using a Cary 50 Scan UV-vis spectrophotometer. The concentration of silver was determined using an AAnalyst800 GFAAS spectrometer (Perkin-Elmer, Überlingen, Germany), equipped with Zeeman-effect background correction, a transversally heated graphite atomizer (THGA) and an AS-800 auto-sampler. The total organic carbon (TOC) concentration was measured with an Elementar High TOC analyzer (Elementar, Hanau, Germany) after separation from inorganic carbon achieved by addition of hydrochloric acid. The ultracentrifugation was operated in the optima Max-E ultracentrifuge (Beckman, CA, USA) using a TLA-45 rotor. The element analysis of the wastewater samples was conducted by total reflection x-ray fluorescence (TXRF, Atomika 8010, Unterschleißheim, Germany). Transmission electron microscopy (TEM) and energy dispersive x-ray spectroscopy (EDX) were carried out on a FEI Titan 80-300 (Eindhoven, The Netherlands) instrument operated at 300 kV.

Ag-NPs Synthesis

The Ag-NPs were prepared by the method of Jana et al.¹ with minor modification. A 99 mL solution containing 0.06 % sodium citrate and 0.094 mM AgNO₃ was prepared in UPW and stirred vigorously. As 1 mL of 2 M NaBH₄ was added into the mixture, the solution turned to yellow, indicating formation of the Ag-NPs. The Ag-NPs stock suspension at 10.0 mg/L was stored at 4 °C. The particle characterization such as size, shape, size distribution, and zeta potential was shown in our previous study.²

Ag₂S-NPs Synthesis

Ag₂S-NPs were prepared according to the method of Choi et al.³ with minor modifications. In the present study, Ag₂S-NPs with different ratios of Ag to S were prepared, namely 1:4, 1:2, 1:1, and 2:1. Different volumes (25, 50, 100 and 200 μL) of 0.01 M Na₂S solution were added to 10 mL of freshly prepared Ag-NPs solutions and stirred vigorously for 3 h. Afterwards, the Ag₂S-NP suspensions were stored at 4 °C and were used as stock solutions for the present study. The Ag₂S-NPs as well as Ag-NPs hydrosols were analyzed by UV-vis spectrometry (Figure S1a) and TEM-EDX (Figure S1b, c and d). For example, the atomic ratio of Ag to S for the synthesized Ag₂S-NPs using 200 μL of 0.01M Na₂S was measured by EDX at four sample positions to an average value of 2.08 ± 0.28. This is reasonably close to a ratio of 2.0 as expected for Ag₂S.

Effect of Coexisting Ag⁺ on Analysis of n-Ag-Ps in Water Samples by IER Method

For the IER method, it is of importance to investigate the effect of coexisting Ag⁺ on the determination of n-Ag-Ps in water samples. In the present study, the samples containing different concentrations of Ag⁺, Ag-NPs and Ag₂S-NPs with MSA were passed through the column. The concentrations of Ag⁺, Ag-NPs and Ag₂S-NPs in each sample are given in the Table S4. The concentration of silver in the filtrate was measured, to understand how much of the silver loaded onto the resin. Afterwards, the elution procedure was operated according to the above-mentioned way.

Finally, in order to differentiate between n-Ag-Ps and Ag⁺ in the concentrated solution, the concentration of silver in the concentrated solution was measured before and after ultracentrifugation (45000 rpm, 30 min).

Estimation of n-Ag-Ps Loading via Discharge of Effluent

When we make estimations of silver loading via discharge of effluent, we used the following equation (1).

$$Q = \frac{V_c \times C_e}{1000} \quad (1)$$

where Q is the daily n-Ag-Ps load entering water environment through effluent discharge (g/d), V_c is the maximum treatment capacity of each WWTP (kt/d) and, C_e is the concentration of n-Ag-Ps in the effluents (ng/L).

References for Supporting Information

- (1) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio. *Chem. Commun.* 2001, 617-618.
- (2) Li, L.; Leopold, K.; Schuster, M. Effective and selective extraction of noble metal nanoparticles from environmental water through a noncovalent reversible reaction on an ionic exchange resin. *Chem. Commun.* 2012, 48, 9165-9167.
- (3) Choi, O.; Clevenger, T. E.; Deng, B.; Surampalli, R. Y.; Jr., Ross, L.; Hu, Z. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Research* **2009**, *43* (7), 1879-1886.

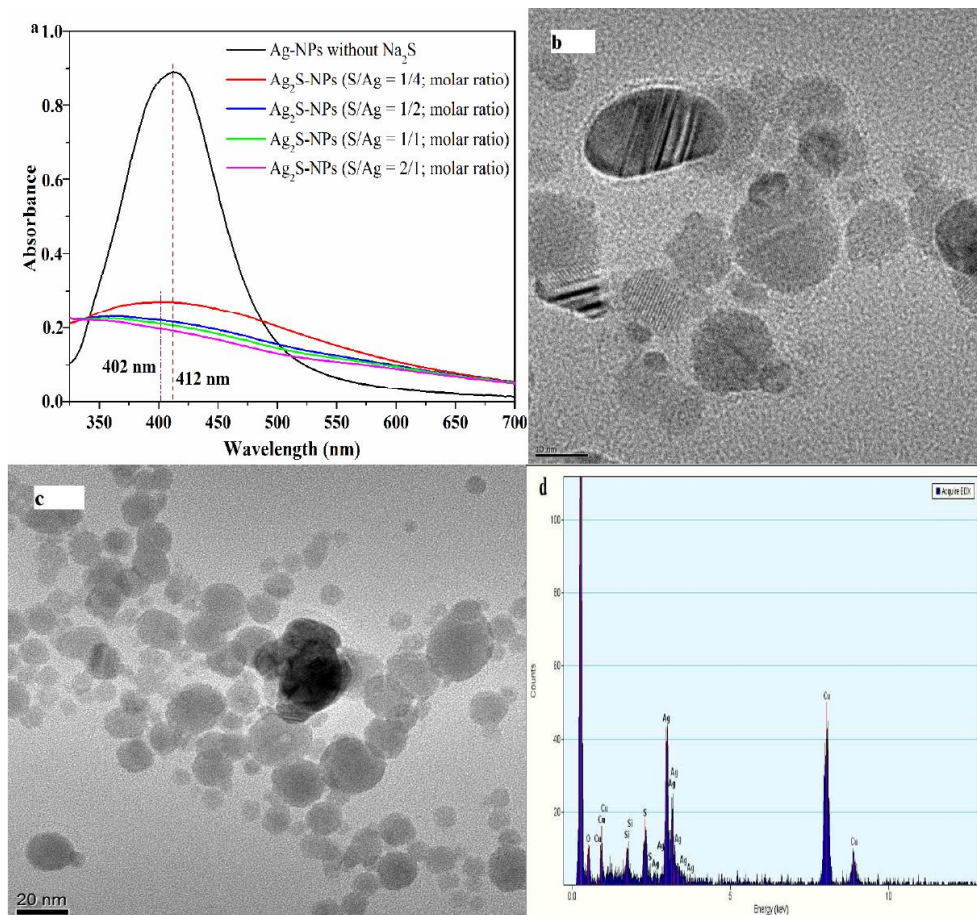


Figure S1. a) The UV-vis spectra of Ag-NPs and Ag₂S-NPs prepared in this study. b) TEM image of prepared Ag-NPs in this study, bar: 10 nm. c) TEM image of prepared Ag₂S-NPs (S/Ag = 1/2) in this study, bar: 20 nm. d) EDX of the prepared Ag₂S-NPs (S/Ag = 1/2) in this study.

Table S1. Elements analysis of the wastewater samples

Sample	Influent (mg/L)			Semi-treated (mg/L)			Effluent (mg/L)			
	S	K	Ca	S	K	Ca	S	K	Ca	Fe
Mun	10.3 ± 1.3	16.4 ± 1.1	90.6 ± 3.1	11.5 ± 3.3	15.8 ± 1.7	88.4 ± 4.0	12.6 ± 1.4	16.6 ± 1.7	87.8 ± 2.2	0.06 ± 0.02
Gar	18.5 ± 0.7	17.0 ± 3.1	72.4 ± 1.6	14.3 ± 2.1	13.2 ± 3.1	67.5 ± 1.9	38.6 ± 0.5	9.2 ± 2.7	82.9 ± 0.9	0.19 ± 0.10
Reg	11.4 ± 3.9	15.4 ± 2.1	98.1 ± 4.8	9.1 ± 0.5	15.0 ± 1.2	78.7 ± 0.4	6.3 ± 0.7	8.7 ± 1.3	48.2 ± 0.6	0.07 ± 0.02
Aug	11.0 ± 0.5	13.4 ± 0.4	71.0 ± 1.0	12.1 ± 4.3	12.3 ± 0.7	62.3 ± 2.6	10.2 ± 2.1	6.6 ± 1.1	42.9 ± 3.7	0.10 ± 0.04
Lan	7.0 ± 0.0	10.2 ± 2.7	74.2 ± 0.4	1.8 ± 0.2	8.8 ± 2.1	54.2 ± 0.3	5.4 ± 0.5	4.4 ± 1.2	38.2 ± 0.4	0.15 ± 0.05
Ulm	1.5 ± 0.0	3.9 ± 0.2	37.7 ± 0.2	3.0 ± 1.6	3.5 ± 0.8	36.7 ± 4.1	5.2 ± 0.8	6.1 ± 1.7	57.5 ± 2.7	0.01 ± 0.00
Ing	6.9 ± 1.1	16.8 ± 2.1	91.8 ± 2.5	8.9 ± 2.1	15.4 ± 2.9	83.9 ± 1.7	12.0 ± 1.2	17.6 ± 2.3	81.4 ± 3.0	0.48 ± 0.17
Fre	14.3 ± 3.2	10.2 ± 3.2	67.1 ± 1.3	6.5 ± 2.0	10.4 ± 2.3	66.1 ± 0.5	6.9 ± 0.6	8.1 ± 2.6	47.1 ± 0.0	0.04 ± 0.02
Moo	6.1 ± 1.6	4.1 ± 2.7	65.6 ± 7.0	5.0 ± 2.2	4.5 ± 0.9	67.3 ± 0.7	4.5 ± 1.4	6.7 ± 1.9	49.8 ± 1.1	0.08 ± 0.05

Table S2. Graphite Furnace Temperature Program for the Measurement of Silver in Concentrated Samples after IER

Process	Temperature (°C)	Ramp time (s)	Hold time (s)	Argon flow rate (s)
Drying I	60	1	30	250
Drying II	130	15	30	250
Pyrolysis	800	10	20	250
Atomisation ^a	1700	0	5	0
Clean-out	2450	1	3	250

^a Read step

Table S3. Graphite Furnace Temperature Program for the Measurement of Silver in TX-114-rich Samples Dissolved in Ethanol after CPE

Process	Temperature (°C)	Ramp time (s)	Hold time (s)	Argon flow rate (s)
Drying I	80	5	20	250
Drying II	130	10	20	250
Pyrolysis	600	20	20	250
Cooling	300	1	5	250
Atomisation ^a	1800	0	5	0
Clean-out	2450	1	3	250

^a Read step

Table S4. Spiked Concentrations of Ag⁺, Ag-NPs, and Ag₂S-NPs in the Samples Which Were Used in the Study of Selective Extraction of n-Ag-Ps versus Ag⁺ by IER Method

Sample	Spiked Ag ⁺ (µg/L)	Spiked Ag-NPs (µg/L)	Spiked Ag ₂ S-NPs (µg/L)
a	150	150	150
b	1600	150	150
c	4500	150	150

Table S5. Determined Concentrations of Total Silver with and without Filtration and n-Ag-Ps, and the Calculated Concentration of Free Ag⁺, as well as the Ratio of Free Ag⁺ to n-Ag-Ps in the Nine Field-Collected Wastewater Semi-treatment Samples (Mean ± s, n = 3)

Sample	Total silver concentration (µg/L)		n-Ag-Ps concentration (µg/L)	Calculated free Ag ⁺ (µg/L) ^a	Ratio of Ag ⁺ to n-Ag-Ps
	Unfiltered	Filtrated (0.45 µm)			
Mun	1.82 ± 0.06	1.21 ± 0.09	1.15 ± 0.05	0.06 ± 0.09	0.06 ± 0.07
Gar	0.29 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.03	1.35 ± 0.10
Reg	0.36 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.01	1.82 ± 0.39
Aug	0.34 ± 0.06	0.15 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.02	4.28 ± 0.75
Lan	0.30 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.73 ± 0.29
Ulm	0.31 ± 0.07	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.08 ± 0.08
Ing	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.03 ± 0.00	0.25 ± 0.02	8.44 ± 0.70
Fre	0.47 ± 0.07	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.06 ± 0.10
Moo	0.32 ± 0.07	0.23 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.17 ± 0.02	2.91 ± 0.77

^a Calculated by equation: total silver concentration (filtrated) – n-Ag-Ps concentration.

8.2. Materialien

8.2.1. Verwendete Geräte

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

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

Beheiztes Wasserbad *W 600* (Mettler, Schwabach)

Fourier-Transform Infrarot Spektrometer *FTS 570 C* (BioRad, Hercules, USA) mit *MIRacle* ATR-Einheit (PIKE Technologies, Madison, USA)

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

Heizschrank *U 40* (Mettler, Schwabach)

Hohlkathodenlampen Typ *P921C* (Gold) und *P951C* (Silber) (Photron, Narre Warren, Australien)

Partikelfreie Lagerbox *5000NV* (Captair, Pont de l'Arche, Frankreich)

Partikelladungs-Messgerät *Mütek PCD 03 pH* (BTG Industries, Herrsching am Ammersee)

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

Quarzglas Ausdämpfapparatur (H. Kürner Analysetechnik, Rosenheim)

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

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

Totalreflektions-Röntgenfluoreszenz Analysator *TXRF 8010* (Atomika, Oberschleißheim)

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

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

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

Zentrifuge *Z 206 A* (Hermle Labortechnik, Wehingen)

Zentrifuge *Biofuge 15* (Heraeus Sepatech, Hanau)

8.2.2. Verwendete Chemikalien

Name	Information	Qualität	Hersteller	Artikelnummer
11-Mercapto-undecansäure	95%	zur Synthese	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	450561-5G
Ammoniumchlorid		Ph.Eur.	Merck KGaA, Darmstadt	1.01145.0500
Ammoniumthiocyanat		zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.01213.0500
Citronensäure	Monohydrat	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.00244.1000
D-(+)-Glucose	Monohydrat	für Biochemische Zwecke	Merck KGaA, Darmstadt	1.04074.0500
di-Natriumhydrogen-orthosphat	wasserfrei	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.06586.0500
EDTA	Dinatriumsalz, Dihydrat	reinst, Ph.Eur.	AppliChem GmbH, Darmstadt	A3234,0250
Eilles Gourmet Café	gemahlen		J.J. Darboven GmbH, Hamburg	
Eisen(III)chlorid	wasserfrei	zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt	8.03945.0500
Essigsäure	99-100 %	zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt	8.18755.1000
Ethanol	vergällt	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.02428.2500
Gold Nanopartikel (10 nm)			BBIinternational, Cardiff, GB	EM.GC10
Gold Nanopartikel (150 nm)			BBIinternational, Cardiff, GB	EM.GC150
Gold Nanopartikel (2 nm)			BBIinternational, Cardiff, GB	EM.GC2
Gold Nanopartikel (20 nm)			BBIinternational, Cardiff, GB	EM.GC20
Gold Nanopartikel (40 nm)			BBIinternational, Cardiff, GB	EM.GC40
Gold Nanopartikel (80 nm)			BBIinternational, Cardiff, GB	EM.GC80
Gold-Nanopartikel	ohne Additive in UPW		Particular GmbH, Langenhagen	-
Gold-Standardlösung	1000 mg/L Au in 2 mol/L HCl		Merck KGaA, Darmstadt	1.70216.0500
Huminsäure	Natriumsalz	depur	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	7824.1
L-Cystein		für Biochemische Zwecke	Merck KGaA, Darmstadt	1.02838.0025
L-Lysin	Monohydrat	für Biochemische Zwecke	Merck KGaA, Darmstadt	1.12233.0100
Mercaptobernsteinsäure	98%	zur Synthese	Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe	B23301
Natriumacetat	wasserfrei	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.06268.0250
Natriumborhydrid		zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt	8.06373.0025
Natriumchlorid		zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.06404.1000
Natriumdihydrogenphosphat	Dihydrat	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.06342.1000

Name	Information	Qualität	Hersteller	Artikelnummer
Natriumhydroxid	Plätzchen	zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1551,1000
Natriumnitrat		zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.06537.0500
Natriumsulfid	Nonahydrat	zur Synthese	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	208043-100G
Natriumthiosulfat	Pentahydrat	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.06516.0500
Nordic Reservoir NOM	RO Isolierung		International Humic Substances Society, St. Paul, USA	1R108N
Polyvinylpyrolidon	10000 g/mol		Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	101171235
Rinderalbumin	Fraktion V, ≥ 98%	für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	8076.1
Salpetersäure	65%	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.00452.2500
Salzsäure	37%	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.13386.2500
Schwefelsäure	95-97 %	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.00731.1011
Silber-Nanopartikel	ohne Additive in UPW		Particular GmbH, Langenhagen	-
Silber-Nanopartikel	PVP-funktio- nalisiert		Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	576832-5G
Silbernitrat		zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.01512.0100
Silber-Standardlösugn	1000 mg/L Ag in 0,5 mol/L HNO ₃		Merck KGaA, Darmstadt	1.19797.0500
Stärke	löslich	zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.01252.0100
Suwannee River NOM	RO Isolierung		International Humic Substances Society, St. Paul, USA	1R101N
Titan(IV)oxid-Partikel	Mittlerer Durchmesser: 5 µm		Strem Chemicals Inc., Newburyport, USA	22-1400
Triton X-114			AppliChem GmbH, Darmstadt	A3848,0500

8.2.3. Verwendete Verbrauchsmittel

AAS Probengefäße, 1,2 mL, aus Polypropylen (PerkinElmer Singapore Ltd., Singapur, Art.Nr.: B0510397)

Dialysemembran-Schlauch *ZelluTrans*, nominaler MWCO: 3.500 Da, aus recycelter Cellulose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art.Nr.: E656.1)

Maßkolben, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 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, 15 mL, mit Schraubdeckel, aus Polypropylen (VWR International GmbH, Art.Nr.: 525-0149)

Zentrifugenröhrchen, 50 mL, mit Schraubdeckel, aus Polypropylen (VWR International GmbH, Art.Nr.: 10-9502N)

8.2.4. Verwendete Software

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

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

OriginPro, Version 8.6G 32 Bit (OriginLab Corp., Northampton, USA)

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

8.3. Statistische Grundlagen

8.3.1. Mittelwert und Standardabweichung

Der Mittelwert \bar{x} , oder genauer das arithmetische Mittel, von n Einzelwerten $x_0 \dots x_i \dots x_n$ berechnet sich nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{\sum_i^n x_i}{n} \quad [174]. \quad (4)$$

Ist die Anzahl der Werte groß genug, stellt \bar{x} eine gute Näherung für den Mittelwert der zugrunde liegenden Grundgesamtheit dar. Die Standardabweichung σ ist dabei ein wichtiges Charakteristikum für die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert. Es gilt

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad [174]. \quad (5)$$

8.3.2. Kenndaten einer Kalibrierfunktion

Bei der Durchführung einer Kalibrierung mit N_c Kalibrierstandards und n Wiederholmessungen für jeden Kalibrierstandard erhält man N Wertepaare (x_i, y_i) . Daraus lässt sich der Mittelwert aller x - und y -Werte, \bar{x} und \bar{y} , berechnen. Anhand einer linearen Regression erhält man dann die Steigung b der resultierenden Kalibriergeraden nach Gleichung 6::

$$b = \frac{\sum_i^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2} \quad [32]. \quad (6)$$

Der entsprechende Achsabschnitt a berechnet sich folgendermaßen:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad [32]. \quad (7)$$

Aus der Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade lässt sich die Reststandardabweichung s_y berechnen:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_i^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}} \quad [32]. \quad (8)$$

Dabei ist \hat{y}_i der – aus der Geradengleichung – berechnete y-Wert zum Wert x_i . Anhand dessen können anschließend die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} und die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} berechnet werden. Dabei ist

$$s_{x0} = \frac{s_y}{b} \quad \text{und} \quad (9)$$

$$V_{x0} = \frac{s_{x0}}{\bar{x}} \cdot 100(\%) \quad [32]. \quad (10)$$

Aus den Fehlern der Steigung und des Achsabschnitts ergibt sich der Fehler $\Delta\hat{y}_k$ für jeden Wert \hat{y}_k (zu den Grundlagen der Fehlerfortpflanzung siehe Kapitel 8.3.5.)

$$\Delta\hat{y}_{ki} = t(P, N-2) \cdot s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(x_k - \bar{x})^2}{\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad [174]. \quad (11)$$

Dabei ist $t(P, N-2)$ der Tabellenwert der t-Verteilung mit der statistischen Sicherheit P und N-2 Freiheitsgraden. Trägt man $\hat{y}_k \pm \Delta\hat{y}_k$ für alle x_k auf, erhält man den Vertrauensintervall der Kalibriergeraden.

Wird – etwa bei der Messung einer Realprobe – bei der n-fachen Bestimmung des y-Wertes der Mittelwert \tilde{y} erhalten, kann daraus anhand der Regressiongeraden der entsprechende x-Wert berechnet werden. Dessen Unsicherheit, die oft als der Vertrauensbereich bezeichnet wird, kann berechnet werden nach

$$\Delta\hat{x} = s_{x0} \cdot t(P, N-2) \cdot \sqrt{\frac{1}{N_c} + \frac{1}{n} + \frac{(\tilde{y} - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_i^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad [32]. \quad (12)$$

Trägt man $\hat{x} \pm \Delta\hat{x}$ für alle y-Werte auf erhält man den Prognoseintervall der linearen Regression.

Ein Maß dafür, wie gut die Messwerte mit dem gewählten Regressionsmodell übereinstimmen, liefert die Korrelationsanalyse. Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist definiert als

$$R^2 = \left(\frac{\sum_i^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2 \sum_i^N (y_i - \bar{y})^2}} \right)^2 \quad [174]. \quad (13)$$

8.3.3. Nachweisgrenze

Aus den ,wie oben gezeigt erhaltenen, Kenngrößen einer Kalibrierfunktion kann auch die Nachweisgrenze der zugrunde liegenden Methode berechnet werden, also derjenige x-Wert x_{NWG} , dessen zugehöriger Messwert y_p zuverlässig von Null unterschieden werden kann. Dabei entspricht y_p dem Schnittpunkt des oberen Vertrauensintervalls mit der y-Achse und lässt sich gemäß DIN 32645 nach der Formel

$$x_p = s_{x0} \cdot t(P, N - 2) \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_p - \bar{y})^2}{b^2 \left(\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2 \right)}} \quad [175] \quad (14)$$

berechnen wobei y_p ein Hilfwert ist, der nach der Formel

$$y_p = a + s_y \cdot t(P, N - 2) \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (15)$$

ermittelt wird.

8.3.4. Standardadditionsverfahren

Bei der Durchführung eines Standardadditionsverfahrens werden einzelne Teilproben mit einer jeweils unterschiedlichen, bekannten Menge Analyt versetzt und anschließend dem Analyseverfahren unterzogen. Damit lassen sich bestimmte systematische Fehler, wie etwa Matrixeinflüsse, eliminieren. Die Auswertung erfolgt, indem die Signalintensität über die zugegebene Menge an Analyt aufgetragen wird. Der Schnittpunkt der interpolierten Gerade mit der x-Achse entspricht dann der ursprünglichen Analytkonzentration in Probe [32].

8.3.5. Fehlerfortpflanzung

Oft sind bei der Ermittlung einer Größe anhand einer auf mehreren Variablen x_i , (mit $i = 1 \dots n$) beruhenden Funktion $f(x_1, \dots, x_n)$ eine oder mehrere dieser Variablen mit Fehlern Δx_i behaftet. Der resultierende Fehler Δf der zu ermittelnden Größe lässt sich dann nach der allgemeinen Formel

$$\Delta f = \sum \left| \frac{\partial f}{\partial x_i} \cdot \Delta x_i \right| \quad (16)$$

berechnen [174]. Diese Formel wird als *Gauß'sche* Fehlerfortpflanzungsformel bezeichnet und gilt nur dann, wenn die eingehenden Werte voneinander unabhängig sind. Davon kann jedoch im Falle von Messfehlern aus unterschiedlichen Einzelmessungen oder bei Einwaage- oder Pipettierfehlern ausgegangen werden.

8.4. Literaturverzeichnis

- [1] F. Gottschalk, E. Kost, B. Nowack; *Environmental Toxicology and Chemistry*, **32** (2013) 1278 - 1287.
- [2] C. Toumey; *Nature Nanotechnology*, **6** (2011) 393 - 394.
- [3] *ISO/TS 27687:2008 Nanotechnologies - Terminology and Definitions for Nano-Objects - Nanoparticle, Nanofibre and Nanoplate*, **2008**.
- [4] Europäische Union, *Empfehlung der Kommission zur Definition von Nanomaterialien*, **2011**.
- [5] C. Buzea, I.I.P. Blandino, K. Robbie; *Biointerphases*, **2** (2007) 17 - 172.
- [6] M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G.V. Lowry, J.-P. Jolivet, M.R. Wiesner; *Nature Nanotechnology*, **4** (2009) 634 - 641.
- [7] R.D. Handy, F. van der Kammer, J.R. Lead, M. Hassellöv, R. Owen, M. Crane; *Ecotoxicology*, **17** (2008) 287 - 314.
- [8] D.J. Barber, I.C. Freestone; *Archaeometry*, **32** (1990) 33 - 45.
- [9] P.N. Njoki, I.-I.S. Lim, D. Mott, H.-Y. Park, B. Khan, S. Mishra, R. Sujakumar, L. Luo, C.-J. Zhong; *Journal of Physical Chemistry C*, **111** (2007) 14664 - 14669.
- [10] J.W. Alexander; *Surgical Infections*, **10** (2009) 289 - 292.
- [11] E. Ruska; *Physikalische Blätter*, **43** (1987) 271 - 281.
- [12] N. Taniguchi; *Bulletin of the Japan Society of Precision Engineering*, **40** (1974) 18 - 23.
- [13] R. Freeman, I. Willner; *Chem. Soc. Rev.*, **41** (2012) 4067 - 4085.
- [14] H. Cong, J.A. Porco; *ACS Catalysis*, **2** (2012) 65 - 70.
- [15] P. Serp, K. Philippot (Eds.), *Nanomaterials in Catalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [16] A. Khan, M. Qamar, M. Muneer; *Chemical Physics Letters*, **519 - 520** (2012) 54 - 58.
- [17] X. Luo, A. Morrin, A.J. Killard, M.R. Smyth; *Electroanalysis*, **18** (2005) 319 - 326.
- [18] I.L. Medinitz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, H. Mattoussi; *Nature Materials*, **4** (2005) 435 - 446.
- [19] B. Bhushan, Y.C. Jung, M. Nosonovsky in: B. Bhushan (Ed.), *Springer Handbook of Nanotechnology*, Springer, Heidelberg, **2010**.
- [20] R. Langer, D.A. Tirrell; *Nature*, **428** (2004) 487 - 492.
- [21] M.E. Davis, Z. Chen, D.M. Shin; *Nature Reviews Drug Discovery*, **7** (2008) 771 - 782.

- [22] H. Song, E.R. Carraway; *Environmental Science & Technology*, **39** (2005) 6237 - 6245.
- [23] D. O'Carroll, B. Sleep, M. Krol, H. Boparai, C. Kocur; *Advances in Water Resources*, **51** (2013) 104 - 122.
- [24] G. Pappert, M. Rieger, R. Nießner, M. Seidel; *Microchim. Acta*, **168** (2010) 1 - 8.
- [25] A. Kaur, U. Gupta; *Journal of Materials Chemistry*, **19** (2009) 8279 - 8289.
- [26] M. Knauer, N.P. Ivleva, R. Nießner, C. Haisch; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **402** (2011) 2663 - 2667.
- [27] G. Schmid, *Nanoparticles*, Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [28] T.M. Tolaymat, A.M. El Badawy, A. Genaidy, K.G. Scheckel, T.P. Luxton, M. Suidan; *Science of the Total Environment*, **408** (2010) 999 - 1006.
- [29] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier; *Discussions of the Faraday Society*, **11** (1951) 55 - 75.
- [30] N. Bärtsh, J. Jakobi, S. Weiler, S. Barcikowski; *Nanotechnology*, **20** (2009) 445603.
- [31] M. Crichton, *Prey*, HarperCollins, New York, **2002**.
- [32] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim, **1992**.
- [33] H. Wolinsky; *EMBO reports*, **7** (2006) 858 - 861.
- [34] L. Phillips; *Nature*, **488** (2012) 576 - 579.
- [35] Europäische Union, *Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 ("REACH-Verordnung")*, **2006**.
- [36] K. Leopold, M. Foulkes, P. Worsfold; *Analytica Chimica Acta*, **663** (2010) 127 - 138.
- [37] E. Dopp, L.M. Hartmann, A.-M. Florea, A.W. Rettenmeier, A.V. Hirner; *Critical Reviews in Toxicology*, **34** (2004) 301 - 333.
- [38] M. Hassellöv, J.W. Readman, J.F. Ranville, K. Tiede; *Ecotoxicology*, **17** (2008) 344 - 361.
- [39] J.M. Pettibone, J. Gigault, V.A. Hackley; *ACS Nano*, **7** (2013) 2491 - 2499.
- [40] S. Chernousova, M. Eppeler; *Angewandte Chemie International Edition*, **52** (2013) 1636 - 1653.
- [41] Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, W. Jahnen-Dechent; *Small*, **3** (2007) 1941 - 1949.
- [42] P.M.G. Nair, S.Y. Park, J. Choi; *Chemosphere*, **92** (2013) 592 - 599.
- [43] R. Kaveh, Y.-S. Li, S. Ranjbar, R. Tehrani, C.L. Brueck, B. van Aken; *Environmental Science & Technology*, doi: 10.1021/es402209w (2013)

- [44] R. van Aerle, A. Lange, A. Moorhouse, K. Paszkiewicz, K. Ball, B.D. Johnston, E. de-Bastos, T. Booth, C.R. Tyler, E.M. Santos; *Environmental Science & Technology*, **47** (2013) 8005 - 8014.
- [45] E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg, R. Behra; *Environmental Science & Technology*, **42** (2008) 8959 - 8964.
- [46] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster; *Environmental Health Perspectives*, **113** (2005) 823 - 839.
- [47] World Health Organization, *Guidelines for Drinking-water Quality (3rd Edition)*, **2008**.
- [48] *Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch*, **2001**.
- [49] F. Gottschalk, B. Nowack; *Integrated Environmental Assessment and Management*, **9** (2013) 79 - 86.
- [50] A. Kahru, H.-C. Dubourguier; *Toxicology*, **269** (2010) 105 - 119.
- [51] A.M. Alkilany, C.J. Murphy; *Journal of Nanoparticle Research*, **12** (2010) 2313 - 2333.
- [52] J.P. García-Camero, M. Núñez García, G. Díaz López, A. López Herranz, L. Cuevas, E. Pérez-Pastrana, J.S. Cuardal, M.R. Castellort, A. Castano Calvo; *Chemosphere*, doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.074 (2013)
- [53] K.E. Wilkinson, L. Palmberg, E. Witas, M. Kupczyk, N. Feliu, P. Gerde, G.A. Seisenbaeva, B. Fadeel, S.-E. Dahlen, V.G. Kessler; *ACS Nano*, **5** (2011) 5312 - 5324.
- [54] A. Speranza, K. Leopold, M. Maier, A.R. Taddei, V. Scoccianti; *Environmental Pollution*, **158** (2010) 873 - 882.
- [55] I.K. Kalavrouziotis, P.H. Koukoulakis; *Water, Air, and Soil Pollution*, **196** (2009) 393 - 402.
- [56] P. Boscolo, V. Bellante, K. Leopold, M. Maier, L. di Giampaolo, A. Antonucci, I. Iavicoli, L. Tobia, A. Paoletti, M. Montalti, C. Petrarca, N. Qiao, E. Sabbioni, M. di Gioacchino; *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, **24** (2010) 207 - 214.
- [57] T. Benn, B. Cavanagh, K. Hristovski, J.D. Posner, P. Westerhoff; *Journal of Environmental Quality*, **39** (2010) 1875 - 1822.
- [58] B. Nowack, J.F. Ranville, S. Diamond, J.A. Gallego-Urrea, C. Metcalfe, J. Rose, N. Horne, A.A. Koelmans, S.J. Klaine; *Environmental Toxicology and Chemistry*, **31** (2012) 50 - 59.
- [59] F. Gottschalk, T. Sun, B. Nowack; *Environmental Pollution*, **181** (2013) 287 - 300.

- [60] B. Nowack, Präsentation auf der *8th International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials*, Aix-en-Provence, **2013**.
- [61] G.V. Lowry, K.B. Gregory, S.C. Apte, J.R. Lead; *Environmental Science & Technology*, **46** (2012) 6893 - 6899.
- [62] B. Nowack; *Science*, **330** (2010) 1054 - 1055.
- [63] C. Levard, B.C. Reinsch, F.M. Michel, C. Oumahi, G.V. Lowry, G.E. Brown; *Environmental Science & Technology*, **45** (2011) 5260 - 5266.
- [64] R. Kaegi, A. Voegelin, C. Ort, B. Sinnet, B. Thalmann, J. Krismer, H. Hagendorfer, M. Elumelu, E. Müller; *Water Research*, **47** (2013) 3866 - 3877.
- [65] B. Thalmann, R. Kaegi, A. Voegelin, E. Morgenroth, Präsentation auf der *8th International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials*, Aix-en-Provence, **2013**.
- [66] O. Choi, T.E. Clevenger, B. Deng, R.Y. Surampalli, L. Ross, Z. Hu; *Water Research*, **43** (2009) 1879 - 1886.
- [67] D. Mahl, C. Greulich, W. Meyer-Zaika, M. Köller, M. Eppeler; *Journal of Materials Chemistry*, **20** (2010) 6176 - 6181.
- [68] D.R. Bae, W.S. Han, J.M. Lim, S. Kang, J.Y. Lee, D. Kang, J.H. Jung; *Langmuir*, **26** (2009) 2181 - 2185.
- [69] S. Mandal, A. Gole, N. Lala, R. Gonnade, V. Ganvir, M. Sastry; *Langmuir*, **17** (2001) 6262 - 6268.
- [70] D. Walczyk, F. Baldelli Bombelli, M.P. Monopoli, I. Lynch, K.A. Dawson; *Journal of the American Chemical Society*, **132** (2010) 5761 - 5768.
- [71] D.P. Stankus, S.E. Lohse, J.E. Hutchison, J.A. Nason; *Environmental Science & Technology*, **45** (2011) 3238 - 3244.
- [72] A.K. Suresh, D.A. Pelletier, W. Wang, J.L. Morrell-Falvey, B. Gu, M.J. Doktycz; *Langmuir*, **28** (2012) 2727 - 2735.
- [73] J. Fabrega, S.R. Fawcett, J.C. Renshaw, J.R. Lead; *Environmental Science & Technology*, **43** (2009) 7285 - 7290.
- [74] T.P.J. Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe, F. von der Kammer, E.H. Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede, S. Weigel; *Food Chemistry*, **138** (2013) 1959 - 1966.
- [75] H. Weinberg, A. Galyean, M. Leopold; *Trends in Analytical Chemistry*, **30** (2011) 72 - 83.

- [76] F. von der Kammer, P.L. Ferguson, P.A. Holden, A. Maison, K.R. Rogers, S.J. Klaine, A.A. Koelmans, N. Horne, J.M. Unrine; *Environmental Toxicology and Chemistry*, **31** (2012) 32 - 49.
- [77] R.F. Domingos, M.A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M.M. Reid, N. Tufenkji, J.R. Lead, G.G. Leppart, K.J. Wilkinson; *Environmental Science & Technology*, **43** (2009) 7277 - 7284.
- [78] E. Tomaszewska, K. Soliwoda, K. Kadizola, B. Tkacz-Szczesna, G. Calichowski, M. Cichomski, W. Szmaja, J. Grobelny; *Journal of Nanomaterials*, doi: 10.1155/2013/313081 (2013)
- [79] P.K. Jain, K.S. Lee, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed; *Journal of Physical Chemistry B*, **110** (2006) 7238 - 7248.
- [80] H. Hagendorfer, R. Kaegi, M. Parlinska, B. Sinnet, C. Ludwig, A. Ulrich; *Analytical Chemistry*, **84** (2012) 2678–2685.
- [81] C. Degueldre, P.-Y. Favarger; *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **217** (2003) 137 - 142.
- [82] A. Ulrich, S. Losert, N. Bendixen, A. Al-Kattan, H. Hagendorfer, B. Nowack, C. Adlhart, J. Ebert, M. Lattuada, K. Hungerbuhler; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **27** (2012) 1120-1130.
- [83] J. Touriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv; *Analytical Chemistry*, **84** (2012) 3965 - 3972.
- [84] R.B. Reed, C.P. Higgins, P. Westerhoff, S. Tadjiki, J.F. Ranville; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **27** (2012) 1093 - 1100.
- [85] D.M. Mitrano, E.K. Leshner, A. Bednar, J. Monserud, C.P. Higgins, J.F. Ranville; *Environmental Toxicology and Chemistry*, **31** (2012) 115 - 121.
- [86] P. Krystek, A. Ulrich, C.C. Garcia, S. Manohar, R. Ritesema; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **26** (2011) 1701 - 1721.
- [87] B. Meermann, A.-L. Fabricius, L. Duester, F. Vanhaecke, T. Ternes; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, doi: 10.1039/c3ja50179e (2013)
- [88] A. Al-Ammar, A. Siripinyanond, R.M. Barnes; *Spectrochimica Acta Part B*, **56** (2001) 1951 - 1962.
- [89] G. Lespes, J. Gigault; *Analytica Chimica Acta*, **692** (2011) 26 - 41.
- [90] A. Helferich, W. Brüchert, J. Bettmer; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **21** (2006) 431 - 434.
- [91] S.P. Radko, A. Chrambach; *Electrophoresis*, **23** (2002) 1957 - 1972.

- [92] X. Xu, K.K. Caswell, E. Tucker, S. Kabisatpathy, K.L. Brodhacker, W.A. Scrivens; *Journal of Chromatography A*, **1167** (2007) 35 - 41.
- [93] M. Hanauer, S. Pierrat, I. Zins, A. Lotz, C. Sönnichsen; *Nano Letters*, **7** (2007) 2881 - 2885.
- [94] U. Schnabel, C.-H. Fischer, E. Kenndler; *Journal of Microcolumn Separations*, **9** (1997) 529 - 534.
- [95] F.-K. Liu; *Chromatographia*, **66** (2007) 791 - 796.
- [96] F.-K. Liu, F.-H. Ko, P.-W. Huang, C.-H. Wu, T.-C. Chu; *Journal of Chromatography A*, **1062** (2005) 139 - 145.
- [97] N. Surugau, P.L. Urban; *Journal of Separation Science*, **32** (2009) 1889 - 1906.
- [98] A.I. López-Lorente, B.M. Simonet, M. Valcárcel; *Trends in Analytical Chemistry*, **30** (2011) 58 - 71.
- [99] J.C. Giddings; *Separation Science*, **1** (1966) 123 - 125.
- [100] J.C. Giddings; *Science*, **260** (1993) 1456 - 1465.
- [101] http://s2.postnova.com/tl_files/postnova/content/Allgemein/images/FFFprincip le_G01_low_res.jpg, abgerufen am 27.08.2013.
- [102] S.K. Ratanathanawongs Williams, J.R. Runyon, A.A. Ashames; *Analytical Chemistry*, **83** (2011) 634–642.
- [103] B. Schmidt, K. Loescher, N. Hadrup, A. Mortens, J.J. Sloth, C. Bender Koch, E.H. Larsen; *Analytical Chemistry*, **83** (2011) 2461–2468.
- [104] H. Hagendorfer, R. Kaegi, J. Traber, S.F.L. Mertens, R. Scherrers, C. Ludwig, A. Ulrich; *Analytica Chimica Acta*, **706** (2011) 367–378.
- [105] T.J. Cho, V.A. Hackley; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **398** (2010) 2003 - 2018.
- [106] E.P. Gray, T.A. Bruton, C.P. Higgins, R.U. Halden, P. Westerhoff, J.F. Ranville; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **27** (2012) 1532 - 1539.
- [107] M. Meier (Bayrisches Landesamt für Umwelt), persönliche Mitteilung, **2013**.
- [108] D.A. Skoog, J.J. Leary, *Principles of Instrumental Analysis*, Harcourt Brace College Publishers, Fort Worth, **1992**.
- [109] S. Podzimek, *Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation*, Wiley, **2011**.
- [110] A.M. Al-Somali, K.M. Krueger, J.C. Falkner, V.L. Colvin; *Analytical Chemistry*, **76** (2004) 5903 - 5910.

- [111] J.P. Novak, C. Nickerson, S. Franzen, D.L. Feldheim; *Analytical Chemistry*, **73** (2001) 5758 - 5761.
- [112] F.-K. Liu; *Chromatographia*, **72** (2010) 473 - 480.
- [113] G.-T. Wei, F.-K. Liu; *Journal of Chromatography A*, **836** (1999) 253 - 260.
- [114] A.M. Striegel, A.K. Brewer; *Annual Reviews of Analytical Chemistry*, **5** (2012) 15 - 34.
- [115] H. Small, M.A. Langhorst; *Analytical Chemistry*, **54** (1982) 892A - 898A.
- [116] K. Tiede, A.B.A. Boxall, X. Wang, D. Gore, D. Tiede, M. Baxter, H. David, S.P. Tear, J. Lewis; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **25** (2010) 1149 - 1154.
- [117] S.A. Pergantis, T.L. Jones-Lepp, E.M. Heithmar; *Analytical Chemistry*, **84** (2012) 6454 - 6462.
- [118] K. Tiede, A.B.A. Boxall, D. Tiede, S.P. Tear, H. David, J. Lewis; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **24** (2009) 964 - 972.
- [119] S.M. Majedi, B.C. Kelly, H.K. Lee; *Analytica Chimica Acta*, **789** (2013) 47 - 57.
- [120] L. Li, K. Leopold, M. Schuster; *Journal of Colloid and Interface Science*, **397** (2013) 199 - 205.
- [121] L. Li, K. Leopold; *Analytical Chemistry*, **84** (2012) 4340-4349.
- [122] L. Li, K. Leopold, M. Schuster; *Chemical Communications*, **48** (2012) 9165 - 9167.
- [123] L. Li, G. Hartmann, M. Döblinger, M. Schuster; *Environmental Science & Technology*, **47** (2013) 7317 - 7323.
- [124] C. Bordier; *Journal of Biological Chemistry*, **256** (1981) 1604 - 1607.
- [125] J.G. Pryde; *Trends in Biochemical Sciences*, **11** (1986) 160 - 163.
- [126] M. McCarroll, K. Toerne, v. Wandruszka; *Langmuir*, **14** (1998) 2965 - 2969.
- [127] M. Wolszczak, J. Miller; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **147** (2002) 45 - 54.
- [128] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen- und Kolloidchemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1994**.
- [129] U. Pfüller, *Mizellen-Vesikel-Mikroemulsionen*, Springer Verlag, Berlin, **1986**.
- [130] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Coredo, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández Laespada; *Journal of Chromatography A*, **902** (2000) 251 - 265.
- [131] G. Jia, C. Lv, W. Zhu, J. Qiu, X. Wang, Z. Zhou; *Journal of Hazardous Materials*, **159** (2008) 300 - 305.

- [132] S.R. Sirimanne, J.R. Barr, D.G. Patterson, L. Ma; *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 1556 - 1560.
- [133] H. Hoshino, T. Saitoh, H. Taketomi, T. Yotsuyanagi, H. Watanabe, K. Tachikawa; *Analytica Chimica Acta*, **147** (1983) 339 - 345
- [134] C.B. Ojeda, F.S. Rojas; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **394** (2009) 759–782.
- [135] J.C.A. de Wuilloud, R.G. Wuilloud, B.B.M. Sadi, J.A. Caruso; *Analyst*, **128** (2003) 453 - 458.
- [136] J.F. Liu, J.B. Chao, R. Liu, Z.Q. Tan, Y.G. Yin, Y. Wu, G.B. Jiang; *Analytical Chemistry*, **81** (2009) 6496–6502.
- [137] G. Hartmann, C. Hutterer, M. Schuster; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **28** (2013) 567 - 572.
- [138] M.F. Nazar, S.S. Shah, J. Eastoe, A.M. Khan, A. Shah; *Journal of Colloid and Interface Science*, **363** (2011) 490 - 496.
- [139] G. Hartmann, M. Schuster; *Analytica Chimica Acta*, **761** (2013) 27 - 33.
- [140] J. Liu, J. Sun, G.B. Jiang; *Chinese Science Bulletin*, **55** (2010) 346 - 349.
- [141] S.M. Majedi, H.K. Lee, B.C. Kelly; *Analytical Chemistry*, **84** (2012) 6546 - 6552.
- [142] K. Cammann (Hrsg.), *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Analytischer Verlag, Heidelberg, **2010**.
- [143] B. Welz, M. Sperling, *Atomabsorptionsspektrometrie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
- [144] Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH, *4100 ZL Atomabsorptions-Spektrometer Benutzerhandbuch*, **1991**.
- [145] P. Zeeman; *Philosophical Magazine*, **43** (1897) 226 - 239.
- [146] M. Otto, *Analytische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [147] A. Walsh; *Spectrochimica Acta*, **7** (1995) 108 - 117.
- [148] K. Pytlakowska, V. Kozik, M. Dabioch; *Talanta*, **110** (2013) 202 - 228.
- [149] C.B. Ojeda, F.S. Rojas; *Microchimica Acta*, **177** (2012) 1 - 21.
- [150] C.D. Stalikas; *Trends in Analytical Chemistry*, **21** (2002) 343 - 355.
- [151] J.L. Manzoori, H. Abdolmohammad-Zadeh, M. Amjadi; *Microchim. Acta*, **159** (2007) 71 - 78.
- [152] D.L. Gallindo Borges, M.A. Mesquita Silva da Veiga, V.L.A. Frescura, B. Welz, A.J. Curtius; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **18** (2003) 501 - 507.
- [153] J.L. Manzoori, H. Abdolmohammad-Zadeh, M. Amjadi; *Journal of Hazardous Materials*, **144** (2007) 458 - 462.

- [154] M.A. Mesquita da Silva, V.L.A. Frescura, F.J.N. Aguilera, A.J. Curtius; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **13** (1998) 1369–1373.
- [155] R. Sardar, A.M. Funston, P. Mulvaney, R.W. Murray; *Langmuir*, **25** (2009) 13840–13851.
- [156] U. Kreibig, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer, Berlin, **1995**.
- [157] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz; *Journal of Physical Chemistry B*, **107** (2003) 668 - 677.
- [158] T.R. Jensen, M. Duval Manlinsky, C.L. Haynes, R.P. van Duyne; *Journal of Physical Chemistry B*, **104** (2000) 10549 - 10556.
- [159] W. Haiss, N.T.K. Than, J. Aveyard, D.G. Fernig; *Analytical Chemistry*, **79** (2007) 4215 - 4221.
- [160] K.E. van Holde, W.C. Johnson, P.S. Ho, *Principles of Physical Biochemistry*, Prentice Hall, Upper Saddle River, **1998**.
- [161] A. de Haan, H. Bosch, *Industrial Separation Processes*, de Gruyter, Berlin, **2013**.
- [162] H. Xie, Y. Gu, H.J. Ploehn; *Nanotechnology*, **16** (2005) 492 - 501.
- [163] S.L. Flegler, J.W. Heckman, K.L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**.
- [164] C. Colliex, *Elektronenmikroskopie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **2008**.
- [165] R. Erni, M.D. Rossel, C. Kisielowski, U. Dahmen; *Physical Review Letters*, **102** (2009) 096101-096101 - 096101-096104.
- [166] D. Mahl, C. Greulich, W. Meyer-Zaika, M. Köller, M. Eppeler; *Journal of Materials Chemistry*, **20** (2010) 6176 - 6181.
- [167] L. Garza-Ocañas, D.A. Ferrer, J. Burt, I.A. Diaz-Torres, M. Ramírez Cabrera, V. Tamez Rodríguez, R. Luján Rangel, D. Romanovicz, M. Jose-Yacaman; *Metallomics*, **2** (2010) 204 - 210.
- [168] P. Vasilieva, B. Donkova, I. Karadjova, C. Dushkin; *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **382** (2011) 203 - 210.
- [169] Y. Sun; *Journal of Physical Chemistry C*, **114** (2010) 2127 - 2133.
- [170] M. Maier, M. Letzel, M. Wegenke; *Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh*, **18** (2012) 62 - 65.
- [171] R. Kaegi, A. Voegelin, B. Sinnet, S. Zuleeg, H. Hagendorfer, M. Burkhardt, H. Siegrist; *Environmental Science and Technology*, **45** (2011) 3902 - 3908.

- [172] B. Greisen, "*Anreicherung und Nachweis von Palladium Nanopartikeln*" Master's Thesis, TU München, **2012**.
- [173] J.-f. Liu, R. Liu, Y.-g. Yin, G.-b. Jiang; *Chemical Communications*,doi: 10.1039/b821124h (2009) 1514-1516.
- [174] K. Doerffel, *Statistik in der analytischen Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim, **1984**.
- [175] K. Molt, U. Telgheder, *Berechnung der Verfahrensstandardabweichung und Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze aus einer Kalibrierung gemäß DIN 32645*, Universität Duisburg-Essen, **2010**.