



André Nogowski, Michael Stintz

UMSICHT - Abschätzung der Umweltgefährlichkeit durch Silber-Nanomaterialien: vom chemischen Partikel bis zum technischen Produkt

Fachlicher Abschlussbericht

Forschungseinrichtung:	Technische Universität Dresden Fakultät Maschinenwesen Institut für Verfahrenstechnik und Umwelttechnik Arbeitsgruppe Mechanische Verfahrenstechnik
Förderkennzeichen:	03X0091E
Projektzeitraum:	01.05.2010 – 31.07.2013
Projektleitung:	Prof Dr.-Ing. habil. Michael Stintz Telefon: 0351 463 35176 E-Mail: michael.stintz@tu-dresden.de
Projektbearbeiter:	Dipl.-Ing. André Nogowski

Dresden, 2014

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des *Bundesministeriums für Bildung und Forschung* unter dem Förderkennzeichen 03X0091E gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der durchführenden Forschungseinrichtung und der beteiligten Mitarbeiter.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
I. Kurze Darstellung	4
1 Aufgabenstellung.....	4
2 Vorhabensvoraussetzung.....	4
3 Planung und Ablauf des Vorhabens	5
4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, auf den aufgebaut wurde.....	7
5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	7
II. Eingehende Darstellung	9
1 Einzelergebnisdarstellung, Ergebnis-Ziel Gegenüberstellung	9
1.1 Charakterisierung der Nanomaterialien (AP 1.1.2).....	9
1.2 Herstellung stabiler NM-300k-Suspensionen (AP 1.2.1).....	12
1.3 Charakterisierung von Silbernanopartikeln (AP 1.2.2).....	13
1.4 Verhalten von Silbernanopartikeln in komplexen Medien (AP 2.2.3)	30
2 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens.....	40
3 Erfolgte Veröffentlichungen.....	42
Literaturverzeichnis	43
Anhang	46
A. SOP zur Herstellung und Handhabung von Silbernanopartikel-Suspensionen.....	46
B. SOP zur Charakterisierung von Silbernanopartikel-Suspensionen mit dem UV/Vis-Spektrometer	56
C. Ergebnisse zum Verhalten von Silbernanopartikeln in einfachen Medien	65
D. Ergebnisse zu den Boden-Wasser-Untersuchungen	67
E. Verantwortung	70

I. Kurze Darstellung

1 Aufgabenstellung

Das zentrale Ziel des Projektes war es, grundlegende Daten zu Verhalten, Verbleib und Wirkung von Silbernanopartikel (AgNP) in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen zu gewinnen. Weiterhin sollte unter Berücksichtigung der Vorgehensweise nach REACH eine exemplarische Risikoabschätzung durchgeführt werden.

Im Rahmen des Projektes sollten zum einen AgNP verwendet werden, die sich durch klar definierte Eigenschaften auszeichnen, und zum anderen welche, die in realen Produkten, wie Textilien, Anwendung finden. Dabei sollten für die physikalische und chemische Charakterisierung der AgNP in einfachen und komplexen Medien bekannte sowie neu zu entwickelnde Messmethoden und Untersuchungsvorschriften verwendet werden, um das ökotoxikologische Gefährdungspotenzial zu beurteilen.

Folgende drei Teilziele wurden in dem Projekt verfolgt:

1. Die Identifikation von Zusammenhängen zwischen spezifischen Nanomaterialeigenschaften und dem Verhalten sowie der Wirkung von AgNP zur Erarbeitung von generellen Aussagen. Hierfür sollten zum einen AgNP mit spezifischen Eigenschaften hergestellt und chemisch-physikalisch charakterisiert werden. Zum anderen sollte das Verhalten und die Wirkung dieser in Wasser, Sediment und Boden untersucht werden.
2. Die Untersuchung des Verbleibs, der Exposition und der Wirkung von Silber in Verbrauchsprodukten anhand von produktspezifischen Silbernanomaterialien. Dafür sollten nutzungsrelevante Szenarien simuliert werden und die Exposition sowie die biologischen Effekte charakterisiert werden.
3. Basierend auf den Ergebnissen aus den ersten beiden Teilzielen sollte eine Gefährdungs- und Risikoabschätzung für Silbernanomaterialien erfolgen. Hierbei sollte die Abschätzung an spezifischen, idealisierten Szenarien und unter Berücksichtigung der Variabilität von AgNP und Produkten durchgeführt werden.

2 Vorhabensvoraussetzung

Silber wird aufgrund seiner antibakteriellen Wirkung vermehrt in Produkten des täglichen Lebens, wie z. B. Textilien (Sportbekleidung oder Wischlappen) oder Deodorants, und der Medizin eingesetzt. Ob es sich in diesen Fällen um Silber in gelöster, kolloidaler oder nanopartikulärer Form handelt, ist oftmals nicht klar, beziehungsweise unterliegt dem Produktgeheimnis des Herstellers. Auch wenn dies klar wäre, lässt diese Information nicht zwangsläufige Rückschlüsse auf die Form des Austrags und deren Konzentration zu. In der Studie von Hund-Rinke et al. [7] wurde festgestellt, dass 2007 bereits jährlich 1.100 kg Nanosilber eingesetzt wurden und mit einem zunehmenden Anstieg auf 8.800 kg bioziden Silbers im Jahre 2015, wovon ein Großteil auf Nanosilber entfällt, zu rechnen ist. Es wurde weiterhin darauf hingewiesen, dass zu diesem Zeitpunkt die Datenlage für eine Risikoabschätzung hinsichtlich des Einsatzes und dem Verbleib von Silber in der Umwelt noch zu gering ist [7].

Basierend auf diesem Kenntnisstand wurde zur Ausschreibung „NanoNature: Nanotechnologien für den Umweltschutz - Auswirkungen synthetischer Nanomaterialien auf die Umwelt“ das Vorhaben „UMSICHT - Abschätzung der **U**mweltgefährdung durch **S**ilber-Nanomaterialien: vom **ch**emischen Partikel zum **t**echnischen Produkt“ eingereicht.

3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben UMSICHT war ein Verbundprojekt bestehend aus Partnern aus den Bereichen Forschung, Regulierungs- und Umweltbehörden sowie Industrie. Es wurde vom Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologien der Universität Bremen durch den Partner ÖKO koordiniert. Die einzelnen Partner sind in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Projektpartnern des Verbundprojektes UMSICHT

Partner	Kürzel
Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, FB Boden als Ressource – Stoffeigenschaften und Dynamik	BGR
Bremer Umweltinstitut GmbH	BUI
CHT R. Beitlich GmbH	CHT
BPI Hohenstein e.V., Abteilung Textile Dienstleistungen und Innovationen	HI
Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie	IME
Stiftung Institut für Werkstofftechnik, Abteilung Verfahrenstechnik	IWT
Europäische Kommission: Joint Research Centre	JRC
Universität Bremen, UFT Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologien, Allgemeine und Theoretische Ökologie	ÖKO
Ostthüringische Materialprüfgesellschaft für Textil und Kunststoffe mbH	OMPG
Rent-a-Scientist GmbH	RAS
Technische Universität Dresden, Institut für Verfahrenstechnik und Umwelttechnik, Arbeitsgruppe Mechanische Verfahrenstechnik	TUDr
Umweltbundesamt, FG IV 2.1	UBA
Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Physik, Arbeitsgruppe Biophotonik	UM
Universität Bremen, Verfahrenstechnik der Wertstoffrückgewinnung	VdW

Durch das Einbeziehen von unterschiedlichen Partnern sollte in diesem Vorhaben eine Brücke zwischen Grundlagenerarbeitung und Praxisrelevanz geschlagen werden.

Entsprechend der Zielstellung wurde das Vorhaben in drei Hauptarbeitspakete gegliedert:

1. Identifikation von Zusammenhängen zwischen spezifischen Nanomaterialeigenschaften und deren Verhalten und Wirkung
2. Verbleib, Exposition und Wirkung von Silber in Verbrauchsprodukten
3. Gefährdungs- und Risikoabschätzung für Silbernanomaterialien an spezifischen, idealisierten Szenarien

In der folgenden Tabelle 2 sind die einzelnen Arbeitspakete der Arbeitsgruppe Mechanische Verfahrenstechnik der TU Dresden und die daran beteiligten Partner aufgeführt. Der fett unterlegte Partner war der Arbeitspaketkoordinator.

Tabelle 2: Planmäßige Arbeitspakete der TUDr sowie deren zeitlicher Verlauf und die daran beteiligten Partner (fett unterlegte Partner = Arbeitspaketkoordinator)

AP	Beschreibung	Partner	2010	2011	2012	2013
1.1.2	Charakterisierung der Nanomaterialien	IWT TUDr UM		●	→	
1.2.1	Erarbeitung/Empfehlung zur Herstellung stabiler Applikationslösungen	IWT TUDr UM	●	→		
1.2.2	Begleitanalytik zu AP 1.2.3, 2.3.1 u. 2.3.2	IWT TUDr UM VdW	●	→		
2.2.3	Erfassung der Exposition in Flüssigkeiten, Suspensionen	TUDr		●	→	

Im AP 1.1.2 „Charakterisierung der Nanomaterialien“ sollten die im AP 1.1.1 hergestellten Partikelsysteme umfangreich analysiert werden. Es wurden Ringversuche zwischen den Messlaboren zur Qualitätssicherung der eingesetzten Messmethoden und Geräte organisiert.

Das im OECD Sponsoring-Programm „Working Party on Manufactured Nanomaterials“ enthaltene Silber-Nanomaterial NM-300k, welches für das Verbundprojekt als Beispiel für das technische Produkt gewählt wurde, lag den Partnern als eine hochkonzentrierte Suspension vor. Mittels der in AP 1.2.1 „Erarbeitung/Empfehlung zur Herstellung stabiler Applikationslösungen“ entwickelten Standardvorgehensanweisung (*engl.: Standard Operating Procedure, SOP*) sollte eine einheitliche Vorgehensweise zur Verwendung dieser

Suspension innerhalb des Projektes gewährleistet werden. In diesem AP war die TUDr federführend.

Mit dem AP 1.2.2 „Begleitanalytik“ sollten die umfangreichen Untersuchungen zum Verbleib und der Exposition durch die Messlabore unterstützt und ergänzt werden. Hierbei wurden von den Partnern SOPs für häufig verwendeten Messmethoden wie der Dynamischen Lichtstreuung (DLS, VdW federführend), der UV/Vis-Spektroskopie (TUDr federführend) und der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS, VdW federführend) erstellt. Des Weiteren wurden vor allem das IME und die BGR hinsichtlich der Anwendung der DLS zur Bestimmung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers beraten sowie das UBA bei der Bestimmung und Auswertung von UV/Vis-Spektren von aquatischen Systemen unterstützt.

In dem AP 2.2.3 „Erfassung der Exposition in Flüssigkeiten, Suspensionen“ sollten AgNP in natürlicher Umgebung charakterisiert werden.

4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, auf den aufgebaut wurde

In der Arbeitsgruppe Mechanische Verfahrenstechnik (AG MVT) der TU Dresden liegen jahrelange Erfahrungen auf dem Gebiet der Partikeltechnologie vor. Ein wichtiger Forschungsschwerpunkt ist die Charakterisierung von Suspensionen und Emulsionen – insbesondere auch im kolloidalen Größenbereich. Darüber hinaus werden Arbeiten zur Entwicklung, aber auch Weiterentwicklung optischer und elektroakustischer Messmethoden für Anwendungen in flüssigen Medien und Gasen geleistet.

Frühere Forschungsprojekte untersuchten u.a. die Eignung elektroakustischer Messprinzipien zur Charakterisierung kolloidaler Stoffsysteme [1], die Grobpartikeldetektion in Nanopartikelsuspensionen [2], die Charakterisierung nanoskaliger fraktaler Aggregate [46], die Onlinecharakterisierung mit spektroskopischen Verfahren [3], die Feinstaubmessung in Umweltaerosolen [4] und zur Nanopartikelfreisetzung [5].

Die AG MVT kann dabei auf ein breites messtechnisches Instrumentarium zurückgreifen. So stehen verschiedene Messgeräte zur Partikelgrößenanalyse in Suspensionen und Emulsionen zur Verfügung, darunter eine Optische Analysenzentrifuge, ein Ultraschallspektrometer, ein Photonen-Korrelationsspektrometer, ein Photonen-Kreuzkorrelationsspektrometer und ein Laserbeugungsspektrometer. Außerdem ist die AG MVT in Besitz eines Rasterelektronenmikroskops und kann auf langjährige Erfahrungen bei hierfür benötigten Probenpräparationen zurückgreifen (s. auch [6]).

5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Innerhalb des Projektes wurden fünf Projekttreffen abgehalten, bei denen die unterschiedlichen Partner von ihren Fortschritten berichteten und mittels themenbezogenen Vorträgen (z. B. zur Partikelmesstechnik oder Herstellung von Textilien) den Partnern näheren Einblick in ihre Forschungsgebiete gegeben haben. Zusätzlich zu diesen halbjährlichen Treffen wurden die DaNa-Clustertreffen zum Informationsaustausch unter den Partnern und anderen Projekten genutzt. Weiterhin fanden themenbezogene Treffen zwischen einzelnen Partnern statt. In der Tabelle 3 sind alle Treffen, an denen die TUDr teilgenommen hat, aufgeführt.

Tabelle 3: Projekttreffen und Zusammenkünfte mit den Partnern

Datum	Inhalt
10.06.2010	Kickoff-Meeting beim Partner ÖKO/VdW an der Universität Bremen
29.07.2010	Treffen zur Partikelgrößenbestimmung mittels Dynamischer Lichtstreuung mit dem Partner IME an der Technischen Universität Dresden
10./11.02.2011	Projekttreffen beim Partner UM an der Universität Marburg
22.02.2011	Treffen zur Dynamischen Lichtstreuung mit den Partnern UM und VdW an der Technischen Universität Dresden
10./11.05.2011	1. DaNa-Clustertreffen bei der DECHEMA in Frankfurt (Main)
28.-30.09.2011	Projekttreffen mit anschließendem Doktorandentreffen beim Partner BGR in Hannover
12./13.10.2011	Treffen zum Messgerätevergleich von UV/Vis-Spektrometern beim Partner IME in Schmallenberg
13./14.03.2012	2. DaNa-Clustertreffen bei der DECHEMA in Frankfurt (Main)
27./28.09.2012	Projekttreffen an der Technischen Universität Dresden
14./15.01.2013	3. DaNa-Clustertreffen bei der DECHEMA in Frankfurt (Main)
14./15.03.2013	Abschließendes Projekttreffen beim Partner UBA in Berlin

Neben der im Projektplan vorgesehenen Zusammenarbeit in den einzelnen AP gab es weitere Kooperationen mit den Partnern BGR, BUI und HI – siehe Tabelle 4.

Tabelle 4: Weitere Zusammenarbeit mit den Partnern

Partner	Arbeiten
BGR	Abgleich von ICP-MS und UV/Vis-Spektroskopie zur Bestimmung der Konzentration von unterschiedlichen AgNP-Suspensionen
BUI	Beratung beim Aufbau eines Aerosolmessstands
HI	Bestimmung der Partikelgröße und Konzentration von AgNP: a) in Wasch- und Spülflüssigkeiten b) von verschiedenen Herstellern

II. Eingehende Darstellung

1 Einzelergebnisdarstellung, Ergebnis-Ziel Gegenüberstellung

Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse in vier Unterkapiteln nach den in Tabelle 2 aufgeführten AP zusammengestellt. Es sei aber darauf hingewiesen, dass es während der Projektlaufzeit zu zeitlichen und inhaltlichen Überschneidungen zwischen den AP kam.

1.1 Charakterisierung der Nanomaterialien (AP 1.1.2)

Ziel dieses AP war es, die im AP 1.1.1 synthetisierten AgNP umfangreich zu charakterisieren. Die Bewertung sollte dabei von den teilnehmenden Partnern UM (federführend), IWT und TUDr hinsichtlich der Größe, Struktur, Stabilität und den funktionellen Eigenschaften der AgNP vorgenommen werden. Die Charakterisierung der AgNP im trockenen Zustand sollte zur Auflösung der Größe und Struktur beitragen. Hierfür wurden verschiedene Methoden wie BET, TEM, HRTEM, EELS, XRD und Elementanalyse in Betracht gezogen. Die Charakterisierung in Flüssigkeit dient ebenfalls zur Bestimmung der Größe aber auch der kolloidalen Stabilität der AgNP. Dazu sollten unterschiedliche Techniken wie HPLC, Gelelektrophorese, UV/Vis-Spektroskopie, DLS und dynamische Ultramikroskopie (DUM) eingesetzt werden. Weiterhin sollten auch die eingebauten funktionellen Eigenschaften der AgNP untersucht werden. Zur Charakterisierung war daher eine Untersuchung der Fluoreszenz von speziell im AP 1.1.1 ausgerüsteten AgNP vorgesehen. Durch die begleitende Analytik sollte die laufende Qualität der Partikelsuspensionen sichergestellt werden.

Seitens der TUDr wurden drei unterschiedliche Methoden der Größenbestimmung eingesetzt. Zum einen wurde auf die bewährten Methoden der DLS und der optischen Sedimentationszentrifuge zurückgegriffen. Zum anderen wurde die UV/Vis-Spektroskopie mit Hilfe des im AP 1.2.2 entwickelten Auswerteprogramms zur Bewertung von Extinktionsspektren eingesetzt. Die DLS-Versuche wurden mit dem HPPS der Fa. Malvern bei einem Rückstreuwinkel von 173° durchgeführt. Mit der geräteeigenen Software kann aus den gemessenen Korrelationsfunktionen mittels Kumulantenanalyse eine mittlerer Partikelgröße x_{DLS} , welche das harmonische Mittel der intensitätsgewichteten Größenverteilung darstellt, und deren Polydispersitätsindex Pdl ermittelt werden. Eine zweite, weit verbreitete Methode, ist die Bestimmung einer Partikelgrößenverteilung mittels NNLS-Algorithmus (*engl.: Non-Negative Least Squares*). Die Sedimentationsmessungen wurden mit der Analysenzentrifuge LUMiSizer der Fa. L.U.M. durchgeführt und ebenfalls mit der geräteeigenen Software hinsichtlich des volumengewichteten Medianwertes x_{SED} bewertet. Ein Einsatz der DUM war für die hergestellten Nanomaterialien nicht möglich, da das im Winkel von 90° gestreute Licht für eine Detektion nicht ausreichte. Auch eine Bewertung mittels REM an der AG MVT war aufgrund der geringen Partikelgröße nicht möglich.

Innerhalb des Projektes wurden im AP 1.1.1 vom Partner UM i) Goldnanopartikel (AuNP) und ii) AgNP mit jeweils einer definierten Polymerschicht sowie vom Partner IWT iii) Titandioxidnanopartikel mit 5 % AgNP (TiO₂/Ag5%) mittels Flammen-Sprüh-Pyrolyse hergestellt. In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Partikelgrößenanalyse für alle drei Stoffsysteme aufgeführt.

Tabelle 5: Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung für die Nanomaterialien der verschiedenen Projektpartner im AP 1.1.2

Partikelfraktion	x_{TEM}^1 nm	x_{DLS} nm	Pdl -	x_{SED} nm	$x_{UV/Vis}$ nm
AuNP (UM)	4,59	19,7 ± 0,94	0,301 ± 0,038	~ 3	< 10
AgNP (UM)	4,2	26,3 ± 1,62	0,370 ± 0,022	n.b. ²	54
TiO ₂ /Ag5% (IWT)	3	167 ± 2,72	0,273 ± 0,022	k.A.	n.b. ²

¹ Angabe des Projektpartners UM bzw. IWT, ² n.b. – nicht bestimmbar

Für die AuNP hat die UM eine mittlere Partikelgröße von 4,6 nm (bestimmt mittels TEM, x_{TEM}) angegeben. Die Untersuchungen mittels DLS (x_{DLS}) ergaben eine Partikelgröße von 20 nm. Der mittels NNLS berechnete volumengewichtete Medianwert ($x_{50,3}$) lag bei 14 nm. Im Gegensatz hierzu wurde mit der Zentrifuge für die volumengewichtete Partikelgrößenverteilung ein Medianwert $x_{SED} = 3$ nm bestimmt. Bei der UV/Vis-Spektroskopie ($x_{UV/Vis}$) kann eine Unterscheidung der Partikelgrößen im Bereich kleiner 10 nm nicht mehr vorgenommen werden, da unterhalb dieser Grenze die Extinktion größenunabhängig ist. Somit konnte bei der spektroskopischen Analyse nur festgehalten werden, dass der Hauptanteil der Partikel kleiner 10 nm ist. Zudem zeigte der Verlauf der Transmission (Abbildung 1), dass die gemessene Kurve deutlich breiter am Plasmonenresonanzpeak verläuft als die für monodisperse AuNP berechnete. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die umhüllende Polymerschicht, welche für eine zusätzliche Absorption sorgt. Zusätzlich können auch vereinzelte größere Partikel zu einer Verbreiterung der Plasmonenbande führen.

Die AgNP von UM wurden in einer vergleichbaren Größe zu den AuNP hergestellt. Die Partikel wurden ebenfalls mit einer ~ 4 nm dicken Polymerschicht umgeben (Angabe von der Universität Marburg). Mittels DLS wurde eine Partikelgröße von $x_{DLS} = 26$ nm und $x_{50,3} = 10$ nm ermittelt. Mit Hilfe der Sedimentation im Zentrifugalfeld (2.300 x g) konnte

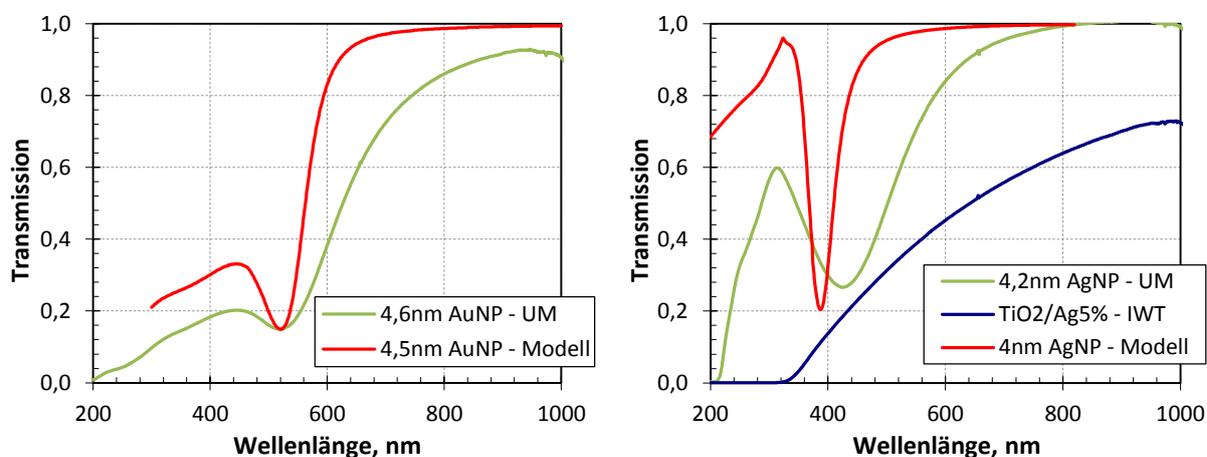


Abbildung 1: Gemessene UV/Vis-Spektren der im AP 1.1.1 hergestellten: links) AuNP von UM und rechts) AgNP von UM sowie TiO₂/Ag5% von IWT

keine Partikelgröße bestimmt werden. Neben der geringen Größe der Partikel ist hierfür die für die Sedimentation maßgebliche niedrige mittlere Dichte infolge der umhüllenden Polymerschicht verantwortlich. Nach Angaben von UM beträgt der mittlere Durchmesser 4,2 nm und die Polymerschicht 4 nm, damit weist das Polymer einen um rund 25-mal höheren Volumenanteil als das Silber auf.

Aus dem Transmissionsverlauf konnte für die AgNP ein Plasmonenresonanzpeak bei $\lambda_{\text{SPR}} = 425 \text{ nm}$ bestimmt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben des Projektpartners UM überein. Zum Vergleich ist in der Abbildung 1 der theoretische Verlauf von einer Suspension mit 4 nm monodispersen AgNP aufgetragen. Der Plasmonenresonanzpeak unterscheidet sich deutlich von dem der gemessenen Suspension. Da die Silberpartikel mit einer streuenden und absorbierenden Polymerschicht umhüllt sind, kann das entwickelte Modell zur Berechnung von Partikelgröße und Konzentration aus gemessenen Transmissionsprofilen hier nur bedingt angewendet werden. Für derartige Berechnungen sind eine Erweiterung des Modells und detaillierte Angaben zum Brechungsindex des Polymers notwendig.

Von der Universität Bremen wurde der aus der spezifischen Oberfläche resultierende äquivalente Durchmesser von Titandioxid (TiO_2) mit 11,3 nm und der für die dotierten Silbernanopartikel mit 3 nm (elektron-optisch bestimmte Größe) angegeben.

Für die Untersuchungen war die Herstellung von stabilen Suspensionen notwendig. In deionisiertem Wasser neigen die $\text{TiO}_2/\text{Ag}5\%$ -Partikel zur Agglomeration, dagegen konnte mit Natriumhexametaphosphat ($\text{Na}_6\text{P}_6\text{O}_{18}$) ein geeigneter Stabilisator gefunden werden. Für die Partikelgrößenbestimmungen wurden die Suspensionen daher mit Hilfe von Ultraschall (200 W, Ultraschallsonotrode UDS 751, Topas GmbH) in 1 %-iger $\text{Na}_6\text{P}_6\text{O}_{18}$ -Lösung dispergiert. Die DLS-Messungen ergaben eine mittlere Partikelgröße $x_{\text{DLS}} = 167 \text{ nm}$. Mittels der UV/Vis-Spektroskopie wurde der Transmissionsverlauf für die $\text{TiO}_2/\text{Ag}5\%$ -Suspension aufgenommen. Der für Silber typische Plasmonenresonanzpeak um 400 nm Wellenlänge konnte nicht detektiert werden. Zum Vergleich ist in Abbildung 1 (rechts) der theoretische Verlauf der Transmission über der Wellenlänge von einer Suspension mit monodispersen AgNP ($x \leq 10 \text{ nm}$, rote Kurve) aufgetragen. Der Anteil an AgNP im Vergleich zum TiO_2 ist für diese Charakterisierungsmethode zu gering.

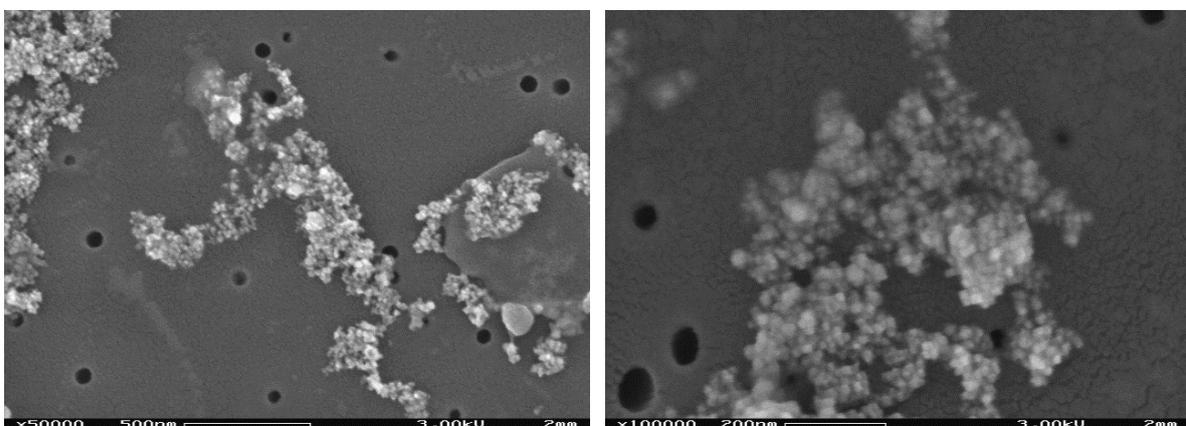


Abbildung 2: REM-Aufnahmen von den mit AgNP dotierten TiO_2 ($\text{TiO}_2/\text{Ag}5\%$); hergestellt mittels Flammen-Sprüh-Pyrolyse

Aus dem Ergebnis der DLS und den REM-Aufnahmen (siehe Abbildung 2) geht hervor, dass die mit AgNP beladenen TiO₂-Partikel nicht als Primärpartikel, sondern als kompakte Aggregate größer 100 nm vorliegen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die TiO₂-Primärpartikel bei der Herstellung in der Flamme bereits zu diesen Strukturen versintern. In den REM-Aufnahmen sind nur die TiO₂-Partikel zu erkennen, für die 3 nm großen AgNP ist die Auflösung des Mikroskops nicht ausreichend.

Die Unterschiede der Ergebnisse der mittleren Partikelgröße (bei der TUDr) lassen sich auf die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften, derer sich die Messmethoden zur Bestimmung der Größe bedienen, zurückführen. So muss beachtet werden, dass bei einer optischen Messung wie der DLS oder Spektroskopie große Partikel mehr Licht streuen als kleine. Dadurch werden wenige große Partikel bei diesen Methoden deutlich stärker gewichtet als kleinere Partikel. Bei der Sedimentation hingegen kann die Diffusion aufgrund von Molekülstößen eine wichtige Rolle spielen. Bei sehr kleinen Teilchen und/oder Partikeln mit geringer Dichte kann es so zu einer deutlichen Behinderung des Sedimentationsprozesses kommen. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass die wahre Partikelgröße größer als die vom Messgerät bestimmt ist.

1.2 Herstellung stabiler NM-300k-Suspensionen (AP 1.2.1)

Ein wichtiger Schritt hin zu reproduzierbaren und vergleichbaren Ergebnissen (in einem Verbundprojekt wie diesem) ist die Einführung von Vorgehensanweisungen für die Herstellung und die Analyse der Applikationslösungen. Ziel des AP 1.2.1 war aus diesem Grund die Erarbeitung einer Prozedur zur Herstellung von definierten Applikationslösungen für alle Projektpartner. Dabei lag der Schwerpunkt vor allem auf der Dispergierung und der Stabilisierung der AgNP NM-300k in den wässrigen Phasen. Dadurch sollte eine möglichst gute Vergleichbarkeit in den anschließenden Experimenten gewährleistet werden.

Die Ausgangssuspension NM-300k liegt den Partnern in 15 mL Glasgefäßen (Ampullen) mit einer Probenmenge von 2000 mg und einer Konzentration $c_m = 10,16$ Gew.-% vor. Da jedoch eine Anwendung in sehr geringen Konzentrationen (ppm-Bereich) und mehreren Millilitern vorgesehen war, wurde eine Anweisung zur Herstellung von stabilen und reproduzierbaren Applikationslösungen mit folgenden Teilschritten erstellt:

1. Vorbehandlung der Ausgangssuspension
2. Verdünnung auf Anwendungskonzentration
3. Charakterisierung der Applikationslösung

Für die reproduzierbare Herstellung von NM-300k-Suspensionen wurde u.a. der Einfluss der Dispergierung mittels Ultraschallwanne und Ultraschallsonotrode untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass bei einer 15 minütigen Behandlung der Proben in einer Ultraschallwanne keine (signifikanten) Änderungen der Partikelgröße messbar sind. Demgegenüber führten 10 Sekunden Dispergierung mit einer 200 W Ultraschallsonotrode bereits zu einer messbaren Erhöhung der mittleren Partikelgröße. Weiterhin wurde untersucht, bei welchem pH-Wert und Salzgehalt die Silber-Suspensionen noch stabil sind. Dafür wurden der pH-Wert über einen Bereich von 2 - 10 und der Ionenhintergrund von $1 - 10^{-5}$ mol/L NaCl variiert. Unterhalb eines pH-Wertes von 4 und oberhalb einer Salzkonzentration von 0,1 mol/L NaCl neigen die Silber-Partikel zur Destabilisierung.

Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen wurde eine „SOP zur Herstellung und Handhabung von AgNP-Suspensionen“ erarbeitet und den Projektpartnern zur Verfügung gestellt (siehe Anhang A).

1.3 Charakterisierung von Silbernanopartikeln (AP 1.2.2)

Ziel des AP 1.2.2 war die genaue Charakterisierung und quantitative Analytik der untersuchten AgNP über die gesamte Projektlaufzeit. Dabei standen folgende Aspekte im Mittelpunkt der analytischen Fragestellungen: i) die Charakterisierung der Nanopartikel in den Testmedien bevor diese mit den biologischen Testsystemen in Kontakt kommen, ii) die Charakterisierung der Nanopartikel aus den verschiedenen Testmatrizes nachdem die Nanopartikel mit biologischen Systemen in Kontakt waren und iii) die Entwicklung von geeigneten Methoden, um NP in Umweltmedien nachweisen und charakterisieren zu können.

Für die Identifizierung als auch größenspezifische Charakterisierung von AgNP in Flüssigkeiten wurden unter der Leitung von ÖKO/dW SOPs für die DLS (Größe und Zeta-Potenzial), AAS und UV/Vis-Spektroskopie (siehe Abschnitt 1.3.1) entwickelt. Hierfür wurden die im AP 1.1.1 hergestellten Nanopartikelsysteme und ausgewählten Kalibrierstandards sowie Referenzstoffsyste me verwendet. Diese Methoden wurden anschließend zur Bewertung des Verhaltens von unterschiedlich stabilisierten AgNP in Lösungen mit definiertem Ionenhintergrund (Abschnitt 1.3.2) und biologischen Testmedien (Abschnitt 1.3.3) eingesetzt.

1.3.1 Identifizierung und Charakterisierung von Nanopartikeln mittels UV/Vis-Spektroskopie

Bei der UV/Vis-Spektroskopie wird die Abschwächung des Lichts durch Atome und Moleküle in einer Messzone mit einer definierten Schichtdicke in Abhängigkeit von der Wellenlänge detektiert. Die Anregung von Elektronen (sowohl die Einzel- als auch die Kollektiv-Anregung) führt zur Absorption von ultraviolettem und sichtbarem Licht. Die dominante kollektive Anregung von freien Elektronen in Metallen wird als (Partikel-)Plasmonen- bzw. Oberflächenplasmonenresonanz bezeichnet und stellt eine Kollektivschwingung der Leitungsbandelektronen dar. Die Lage des charakteristischen Partikelplasmons wird durch mehrere Faktoren, wie intrinsische Eigenschaften der Partikel (Größe, Form, Material), dielektrische Eigenschaften des umgebenden Mediums, physikalische oder chemische Wechselwirkungen auf der Partikeloberfläche, Oberflächenladung, interpartikuläre Abstände und Aggregation, beeinflusst [8].

Abbildung 3 (links) zeigt den partikelgrößenabhängigen Plasmonenresonanzpeak¹ (λ_{SPR}) für AgNP in einem Partikelgrößenbereich von 10 – 100 nm. Anhand der gemessenen Transmissionsverläufe kann die Verschiebung der Lage des λ_{SPR} in Abhängigkeit von der Partikelgröße bei konstanter Feststoffkonzentration c_m beobachtet werden. Mit steigender Partikelgröße nimmt die Wellenlänge, an der die größte Absorption erfolgt, zu und es kommt zu einer Verbreiterung der Plasmonenbande. Weiterhin kann beobachtet werden, dass die maximale optische Konzentration mit steigender Partikelgröße für konstante c_m

¹ In den Transmissionsspektren äußert sich dieser in Form eines lokalen Minimums. Bei Darstellung der Extinktion ist dieser ein Maximum.

abnimmt, was sich in einer steigenden minimalen Transmission zeigt. Die Partikelgrößenabhängigkeit der Plasmonenresonanz resultiert vor allem aus der Dämpfung und den Retardierungseffekten [9].

Die Partikelkonzentration hat (bei verdünnten Systemen ohne Mehrfachstreuung) keinen wellenlängenspezifischen Einfluss auf die Lage des λ_{SPR} , vielmehr kann anhand der Transmission und der eingestellten Schichtdicke auf die Konzentration zurückgeschlossen werden (Abbildung 3, rechts).

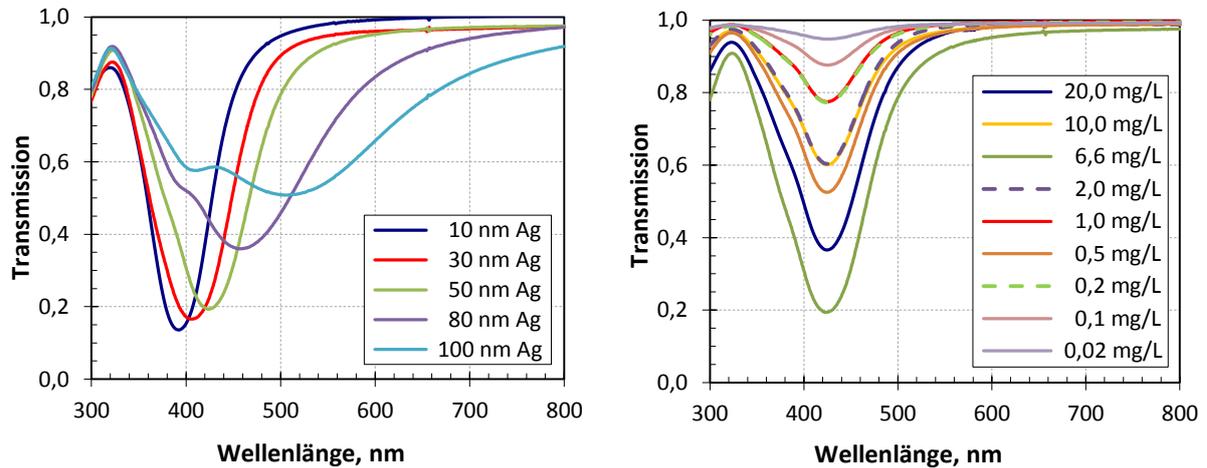


Abbildung 3: Gemessene UV/Vis-Spektren von AgNP links) zw. 10 und 100 nm bei $c_m = 6,64 \text{ mg/L}$ und rechts) von 0,02 bis 20 mg/L für 50 nm AgCitrate, wobei der abgedeckte Konzentrationsbereich mit Hilfe von unterschiedlichen Küvetten (Schichtdicken: 2, 10, 50, 100 mm) erreicht wurde

Eine Auswertung der Transmissionsprofile der UV/Vis-Spektroskopie ist auf zwei Wege möglich, zum einen mit Hilfe des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes auf molekularer Ebene und zum anderen in Verbindung mit der Streulicht-Theorie (MIE-Theorie) auf der partikulären Ebene.

Das LAMBERT-BEER'sche Gesetz beschreibt die Abschwächung der Lichtintensität beim Durchdringen einer Flüssigkeit mit einem absorbierenden Stoff in Abhängigkeit zu dessen Konzentration und der Weglänge L :

$$A = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = -\lg T = \varepsilon \cdot c_{mol} \cdot L$$

Dabei ist I_1 die Intensität des transmittierten Lichts und I_0 die Intensität des transmittierten Lichts ohne den zu messenden, absorbierenden Stoff, deren Verhältnis die Transmission abbildet und über den dekadischen Logarithmus mit der Absorption A verbunden ist. Des Weiteren ist ε der dekadische, molare Extinktionskoeffizient und c_{mol} die molare Konzentration des absorbierenden Stoffes in mol/L. Die molare Konzentration entspricht der Stoffmengenkonzentration c_n erweitert um das Verhältnis der Anzahl der Atome N_{Atom} des Feststoffes zur Anzahl der daraus gebildeten Partikel $N_{Partikel}$, welche als Makromoleküle angesehen werden:

$$c_{mol} = \frac{N_{Partikel}}{N_{Atom}} \cdot c_n = \frac{c_N}{N_A}$$

Damit kann bei bekanntem molarem Extinktionskoeffizienten und bekannter Schichtdicke aus der gemessenen Transmission die Konzentration des absorbierenden Stoffes bestimmt werden.

Der Abfall der Lichtintensität kann aber auch mittels einer Exponentialfunktion beschrieben werden:

$$E = -\ln T = c_N \cdot C_{ext} \cdot L,$$

wobei c_N die Anzahlkonzentration und C_{ext} der Extinktionsquerschnitt ist. Dieser setzt sich anteilig aus einem Absorptions- C_{abs} und einem Streuquerschnitt C_{str} zusammen und kann nach MIE berechnet werden. Die MIE-Theorie stellt dabei eine spezielle Form der MAXWELL-Gleichungen (sphärische Randbedingung) dar [10].

$$C_{ext} = C_{abs} + C_{str}, \quad \text{mit:} \quad C_{abs} = -3 \cdot k \cdot V_p \cdot \text{Im} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)$$

$$C_{str} = \frac{3}{2\pi} \cdot k^4 \cdot V_p^2 \cdot \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2$$

Für absorbierende Partikel im Rayleigh-Bereich ist der Extinktionsquerschnitt proportional zur 3. Potenz der Partikelgröße, wogegen der Streuquerschnitt proportional zur 6. Potenz der Partikelgröße ist. Dies bedeutet, dass bei kleinen Partikeln (gegenüber der Wellenlänge) der Anteil der Absorption gegenüber der Streuung vernachlässigt werden kann.

Der zuvor beschriebene Zusammenhang zwischen Partikelgröße und optischem Extinktionsverhalten wurde zur Auswertung der Transmissionsspektren verwendet. Ein entsprechender Algorithmus wurde unter MATLAB[®] implementiert. Der entwickelte Auswertalgorithmus wurde anhand von kommerziellen Gold- und Silbernanopartikeln (AuTannic, AgCitrate) der Fa. nanoComposix (San Diego, USA) in einem Bereich von 10 – 100 nm, Gold-Referenzmaterialien vom „National Institute of Standards and Technology“ (NIST) sowie NM-300k erprobt. In der folgenden Tabelle 6 sind die berechneten Partikelgrößen für monodisperse Partikelsysteme $x_{UV/Vis}$ und Konzentrationen $c_{m,UV/Vis}$ den Angaben des Herstellers gegenübergestellt. Weiterhin wurden die Proben vom Projektpartner BGR mittels optischer Emissionsspektroskopie nach Ionisierung im induktiv gekoppelten Plasma (ICP-OES) hinsichtlich ihrer Konzentration $c_{m,ICP-OES}$ bewertet.

Die zertifizierten AuNP von NIST wurden mit Hilfe des Algorithmus in ihrer Größe und Konzentration exakt wiedergegeben. Für die citrat-stabilisierten AgNP (AgCitrate) zeigen die Ergebnisse, dass mit Ausnahme der kleinsten Partikelfraktion die anzahlgewichtete Partikelgröße $x_{UV/Vis}$ im Vergleich zu dem jeweiligen TEM-Ergebnis des Herstellers ebenfalls in guter Näherung bestimmt wurde. Im Gegensatz dazu wurden die gerbsäure-stabilisierten AuNP (AuTannic) von nanoComposix deutlich kleiner als angegeben interpretiert. Eine mögliche Erklärung hierfür sind die doch recht breit gemessenen Plasmonenbanden, welche auf verschiedene Gründe wie z. B. Einfluss des Stabilisators, eine breite Partikelgrößenverteilung oder Verschmutzung zurückgeführt werden können.

Tabelle 6: Ergebnisse der Gold- und Silbernanopartikelfractionen der Fa. nanoComposix, des NIST und NM-300k mit nominal 20 mg/L

Partikelfraktion	X_{TEM}^1 nm	$C_{m, ICP}^{1,2}$ mg/L	X_{DLS} nm	monodisperse PG		LNVT			$C_{m, ICP-OES}^3$ mg/L
				$X_{UV/Vis}$ nm	$C_{m, UV/Vis}$ mg/L	$X_{50,UV/Vis}$ nm	σ_{In} -	$C_{m, UV/Vis}$ mg/L	
10 nm AgCitrate	8,2 ± 1,2	20	9,4 ± 0,90	26,4 ± 0,00	15,6 ± 0,40	18,1 ± 1,11	0,31 ± 0,018	16,7 ± 0,45	18,4 ± 0,24
30 nm AgCitrate	34,4 ± 3,4	20	24,3 ± 0,23	39,4 ± 0,71	15,8 ± 0,33	37,1 ± 1,33	0,18 ± 0,031	17,3 ± 0,23	20,0 ± 0,30
50 nm AgCitrate	53,1 ± 4,1	20	52,8 ± 0,40	57,6 ± 0,27	20,9 ± 0,86	57,1 ± 0,29	0,02 ± 0,022	20,8 ± 0,79	19,4 ± 0,14
80 nm AgCitrate	77,9 ± 7,9	20	84,9 ± 0,66	82,3 ± 1,89	21,8 ± 0,95	83,2 ± 2,11	0,07 ± 0,005	23,0 ± 1,15	20,8 ± 0,20
100 nm AgCitrate	99,1 ± 8,2	20	107 ± 0,44	107 ± 0,9	24,0 ± 0,84	108 ± 1,0	0,05 ± 0,005	24,8 ± 0,98	21,9 ± 0,29
10 nm AuTannic	9,1 ± 0,8	50	20,3 ± 1,96	10 ± 0,00	46,0 ± 0,69	15,0 ± 0,00	0,01 ± 0,000	45,9 ± 0,67	57,7 ± 0,51
30 nm AuTannic	28,8 ± 3,3	50	31,0 ± 0,27	23,3 ± 0,05	50,4 ± 0,63	24,8 ± 0,31	0,11 ± 0,041	54,7 ± 0,78	50,7 ± 0,35
50 nm AuTannic	48,1 ± 4,2	50	45,0 ± 0,32	36,8 ± 0,00	54,8 ± 0,21	34,4 ± 1,77	0,23 ± 0,001	55,8 ± 1,17	51,3 ± 0,87
80 nm AuTannic	78,3 ± 6,0	50	79,9 ± 0,40	64,8 ± 0,00	54,3 ± 0,38	57,4 ± 0,01	0,23 ± 0,001	58,9 ± 0,44	57,4 ± 0,21
100 nm AuTannic	100,9 ± 12,1	50	103 ± 1,32	89,0 ± 0,78	45,6 ± 0,30	87,2 ± 0,98	0,17 ± 0,008	53,1 ± 0,25	55,5 ± 0,35
30 nm Au NIST	27,6 ± 2,1	48,2 ± 0,33 ⁴	23,8 ± 0,35	38,0 ± 0,00	44,7 ± 0,02	27,5 ± 3,44	0,33 ± 0,034	47,0 ± 1,07	-
60 nm Au NIST	56,0 ± 0,5	51,9 ± 0,64 ⁴	64,2 ± 0,98	57,7 ± 1,25	50,0 ± 0,49	52,5 ± 2,81	0,18 ± 0,032	51,6 ± 0,96	-
NM-300k (20mg/L)	5,4 / 15,0	20	43,1 ± 3,31	46,9 ± 0,20	15,7 ± 0,04	47,0 ± 0,27	0,02 ± 0,020	15,8 ± 0,06	16,9 ± 0,50 ⁵

¹ Angaben des Herstellers, ² ICP-MS oder OES, ³ Analyse der BGR, ⁴ in µg/g, ⁵ Analyse von ÖKO/VdW, Titration nach Volhard [12]

Die Konzentration $c_{m, UV/Vis}$ wurde sowohl für Silber als auch für Gold mit einem maximalen Fehler von $\pm 10\%$ (Ausnahme 30 nm AgCitrate) im Vergleich zu den Ergebnissen der BGR mittels ICP-OES $c_{m, ICP-OES}$ bestimmt. Hierbei lässt sich für Silber ein partikelgrößenabhängiger Trend erkennen, kleine Partikel wurden zu niedrig und große Partikelfractionen zu groß berechnet.

Für NM-300k wurde eine mittlere Partikelgröße von 47 nm bei einem Plasmonenpeak von $\lambda_{SPR} = 413$ nm ermittelt. Die DLS-Untersuchungen zeigten eine mittlere Partikelgröße $x_{DLS} = 43$ nm in diesem Größenbereich. Die Werte sind deutlich größer als die im JRC-Bericht [11] angegebenen TEM-Ergebnisse. Die Konzentration von NM-300k wurde umfangreich von den Partnern ÖKO/dW und BGR untersucht [12]. Dabei konnte festgestellt werden, dass trotz größter Sorgfalt mit den unterschiedlichsten Methoden lediglich eine Feststoffkonzentration von 15 bis 16,9 mg/L, für Proben (verdünnt auf nominell 20 mg/L) aus verschiedenen Ampullen bestimmt wurde. Dies entspricht einer Wiederfindungsrate von maximal 84,4 % bezogen auf die Originalkonzentration. Die mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie ermittelte Feststoffkonzentration befindet sich mit 15,7 mg/L im selben Größenbereich.

In der Natur liegen Partikelsysteme nicht in Form einer einzelnen Partikelgröße (monodispers), sondern vielmehr als Verteilung vor. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurde der Algorithmus um die Funktion einer Partikelgrößenverteilung (Mittelwert und Verteilungsbreite) erweitert. Eine in der Partikelmesstechnik häufig verwendete Form für Partikelgrößenverteilungen ist die Logarithmische Normalverteilung (LNVT), welche aus der linearen Normalverteilung (GAUß'sche Fehlerfunktion) abgeleitet ist. Die LNVT lässt sich durch einen Medianwert x_{50} der Verteilung und deren Standardabweichung σ_{ln} beschreiben. Der Medianwert und die Standardabweichung haben einen signifikanten Einfluss auf die Lage des Plasmonenpeaks (sowohl auf die Wellenlänge als auch die Höhe der Transmission), und nehmen somit ebenfalls Einfluss auf die Bestimmung der Feststoffkonzentration (siehe Abbildung 4).

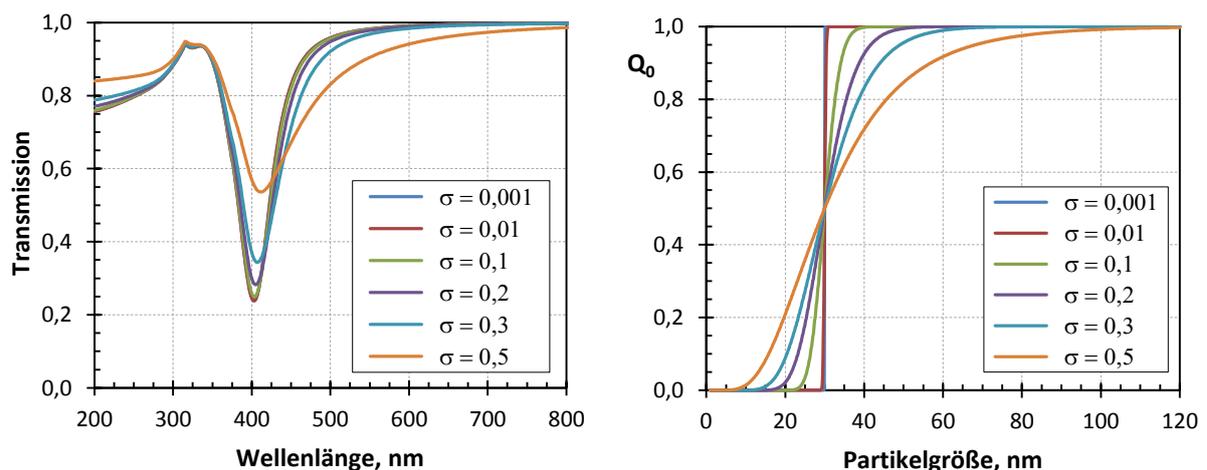


Abbildung 4: Theoretischer Transmissionsverlauf (links) für AgNP-Suspensionen mit unterschiedlichen Partikelgrößenverteilungen (rechts, LNVT: $x_{50,0} = 30$ nm, Standardabweichung σ) bei konstanter Feststoffkonzentration

Die in der Tabelle 6 aufgeführten Ergebnisse für die Berechnungen mit einer LNVT zeigen, dass es aufgrund der Beachtung einer möglichen Polydispersität zu einem leichten Anstieg der berechneten Feststoffkonzentration kommt. Es kann gezeigt werden, dass sowohl die referenzierten NIST-Partikel als auch die AgNP mit einer Standardabweichung der mittleren Partikelgröße $< 0,1$ quasi-monodisperse Partikelsysteme sind. Im Gegensatz dazu werden für die AuNP σ_{in} im Bereich von 0,2 und größer berechnet.

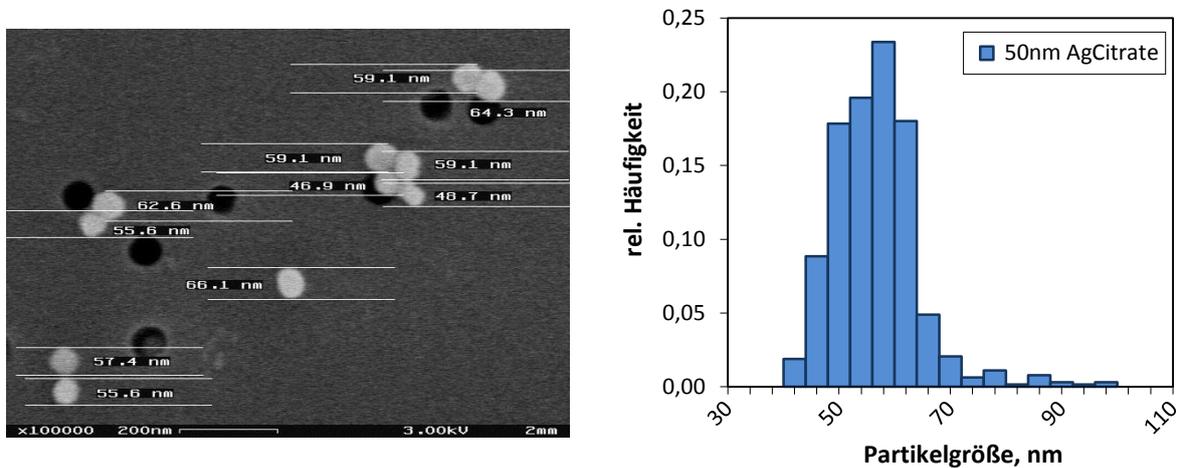


Abbildung 5: links) REM-Aufnahme von 50 nm AgCitrate, rechts) Partikelgrößenverteilung der 50 nm AgCitrate mittels REM

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Berechnung ist der komplexe Brechungsindex. In der Literatur können mehrere, sich leicht voneinander unterscheidende wellenlängenabhängige Verläufe sowohl für Silber als auch Gold gefunden werden [13], [14], [15].

Neben der Bestimmung von Partikelgröße und Konzentration können mit Hilfe des Auswertalgorithmus auch die Stoffeigenschaften bestimmt werden. Hierfür muss die Partikelgrößenverteilung für das untersuchte Stoffsystem vorgegeben werden. Dies wurde beispielhaft mit Hilfe von umfangreichen REM-Untersuchungen für die Größenverteilung an 50 nm AgCitrate durchgeführt. In Abbildung 5 ist die anhand von 623 Einzelpartikeln bestimmte Größenverteilung dargestellt.

Abbildung 6 zeigt den Verlauf des komplexen Brechungsindex von Silber nach Palik [13], Johnson und Christy [14], Hagemann [15] sowie den aus Messergebnissen bestimmten Verlauf im ultravioletten und sichtbaren Bereich. Die Werte für den mit Hilfe des Algorithmus berechneten Brechungsindex befinden sich zwischen denen von Palik und Hagemann. Theoretische Untersuchungen der einzelnen Anteile des Brechungsindex zeigten, dass der Realanteil nur auf die Höhe der Intensität der Lichtschwächung und der Imaginäranteil sowohl auf die wellenlängenabhängige Lage als auch auf die Höhe des Plasmonenpeaks Einfluss nimmt. Vor allem für den Imaginäranteil, welcher die wellenlängenspezifische Absorption des Materials kennzeichnet, können im sichtbaren Wellenlängenbereich deutliche Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Literaturangaben festgestellt werden. Die Angaben sind somit kritisch zu betrachten.

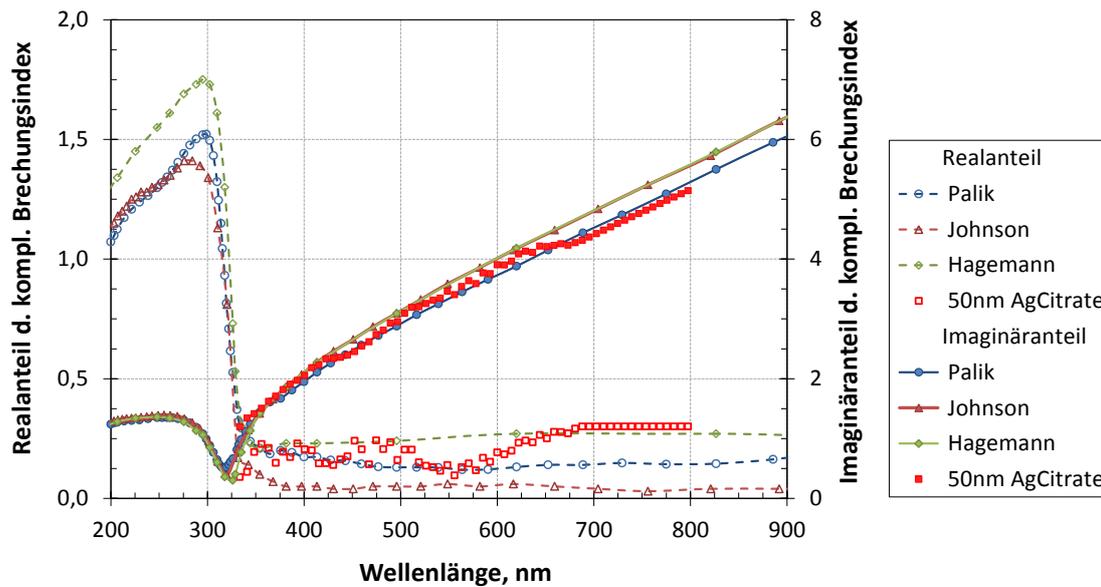


Abbildung 6: Vergleich des komplexen Brechungsindex aus der Literatur mit den berechneten Werten für 50 nm AgCitrate

□ **Fazit**

Für die Anwendung der UV/Vis-Spektroskopie innerhalb des Projektes wurde eine SOP erstellt (siehe Anhang B). Darin werden der richtige Umgang mit den unterschiedlichen Gerätetypen, die Wahl geeigneter Messküvetten, die Erstellung von Kalibriergeraden und allgemeine Hinweise zur Messdurchführung beschrieben. Des Weiteren wurden den Partnern Silberreferenzproben zur Überprüfung der Geräte bereitgestellt.

Folgende Aussagen können für die Analyse von AgNP mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie festgehalten werden:

- AgNP und AuNP zeigen eine größen- und materialspezifische Plasmonenbande ab 400 nm bzw. 520 nm Wellenlänge, welche zur Identifizierung und Charakterisierung genutzt werden kann.
- AgNP-Fractionen in einem Größenbereich von 10 – 100 nm und einer Konzentration von 0,02 – 20 mg/L können ohne Verdünnung mit Hilfe eines Auswerteprogramms eindeutig bewertet werden.
- Der entwickelte Algorithmus kann weiterhin zur Bestimmung des komplexen Brechungsindex (z. B. für beschichtete Partikelsysteme) genutzt werden.

1.3.2 Verhalten von Silbernanopartikeln in einfachen Medien

Die kolloidale Stabilität und somit das Verhalten von Partikeln in Flüssigkeiten ist eine Funktion vielfältiger Faktoren, wie der Art und Menge des Stabilisators an der Partikeloberfläche sowie der umgebenden Umweltbedingungen (pH-Wert, Ionenstärke und Zusammensetzung des Elektrolythintergrundes). In Vorbereitung zu den Untersuchungen in komplexen Medien wurde aus diesem Grund das Agglomerationsverhalten von AgNP in Lösungen mit definiertem Ionenhintergrund bewertet.

Stabilisatoren sind Chemikalien, welche bei der Synthese von Nanopartikeln verwendet werden, um die Agglomeration durch elektrostatische Abstoßung und/oder sterische Ab-

stoßung zu verhindern und gleichzeitig den Partikeln einen spezifischen Charakter (z. B. hydrophile bzw. hydrophobe Eigenschaften) für die weitere Verwendung zu geben. Um ein breites Spektrum mit den Untersuchungen abzubilden, wurden daher verschiedene AgNP-Systeme verwendet: zum einen das mit Tween 20 sterisch stabilisierte NM-300k, welches als Referenzsystem im Verbundprojekt UMSICHT verwendet wurde, und zum anderen zwei mit Citrat bzw. Gerbsäure ladungsstabilisierte AgNP – AgCitrate und Ag-Tannic – mit einer quasi monodispersen Partikelgrößenverteilung um die 50 nm.

Mit Hilfe der DLS wurde für die AgNP-Suspensionen jeweils die mittlere Partikelgröße über einen Zeitraum von maximal 4 Wochen bestimmt. Des Weiteren wurde der Agglomerationsfortschritt mittels UV/Vis-Spektroskopie sowie die Struktur und Morphologie anhand von REM-Aufnahmen bewertet. Für die Untersuchungen wurden 5 mg/L Silber in NaCl-, CaCl₂- und NaNO₃-Lösungen über einen Konzentrationsbereich von 0,1 – 100 mmol/L angesetzt.

Anhand der Änderung des spektroskopischen Verlaufes kann zwischen zwei Phänomenen unterschieden werden: einem Auflösen des partikulären Silbers, wobei die Extinktion am Plasmonenpeak (λ_{SPR}) abnimmt (Abbildung 7, links), und der Agglomeration der Partikel, welche durch eine Abnahme der Extinktion beim λ_{SPR} mit gleichzeitiger Zunahme bei höheren Wellenlängen gekennzeichnet ist (Abbildung 7, rechts).

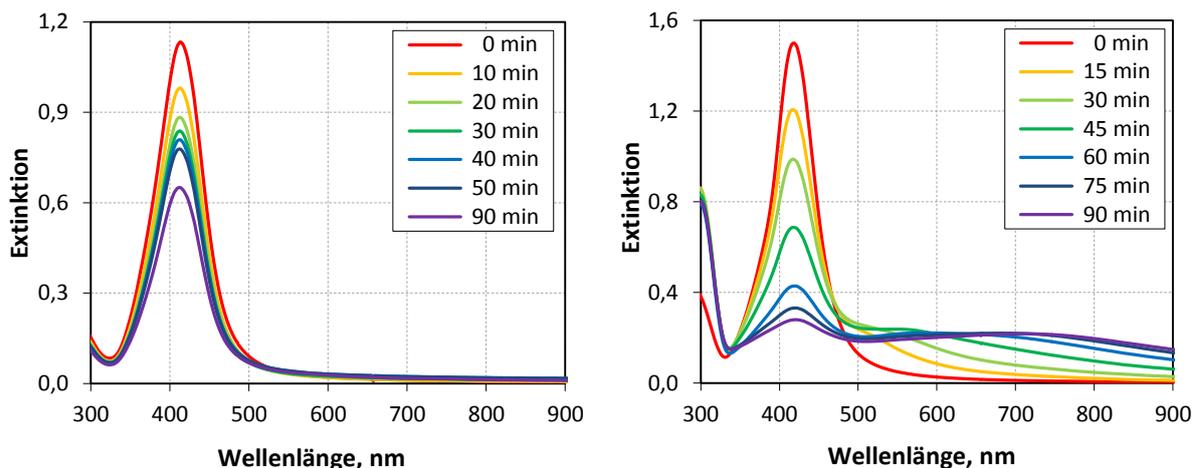


Abbildung 7: Änderung der Extinktion in Folge von Auflösung (links) und Agglomeration (rechts) der AgNP

Bei der Agglomeration kommt es anfänglich zur Bildung von kleinen Clustern wie 2er- und 3er-Agglomeraten (Dubletten und Tripletten). Vor allem die Bildung von 2er-Agglomeraten, welche einem Stäbchen gleichen, kann für größere monodisperse AgNP sehr gut in Form einer Rotverschiebung und der Ausbildung einer zweiten, der sogenannten longitudinalen Plasmonenbande beobachtet werden. Aufgrund des starken Struktureinflusses auf die Spektren kann der Agglomerationsfortschritt mit dem Auswertalgorithmus, welcher nur die Dipol-Wechselwirkung beachtet, nicht nachgestellt werden. Aufwendige Multipolberechnungen, wie sie beispielsweise mit dem DDSCAT-Programm (*engl.: Discrete Dipole Approximation for Scattering and Absorption of Light by Irregular Particles*) von Draine und Flatau [16] möglich sind, würden zwar die Spektren deutlich besser nachstellen, benötigen aber einen erhöhten Rechen- und somit Zeitaufwand. Zudem müssten diese für jede Agglomeratstruktur einzeln berechnet und hinsichtlich ihrer Anteile gewichtet werden.

Aus diesem Grund wurde die Bewertung anhand der Änderung der Primärpartikel durchgeführt. Hierfür wurde die Transmission in die Extinktion umgerechnet und die Änderung an der Stelle des Plasmonenpeaks der Primärpartikel $E(\lambda_{\text{SPR}})$ auf den Ausgangszustand zum Zeitpunkt $t = 0$ $E(\lambda_{\text{SPR},0})$ normiert. Dadurch kann in erster Näherung die Wiederfindungsrate der Primärpartikel, d. h. die prozentuale Änderung der Konzentration der Primärpartikel, über die Zeit aufgezeigt werden. Da so aber zwischen einer Abnahme der Primärpartikel aufgrund eines Lösungsprozesses und einer Agglomeration nicht unterschieden werden konnte, wurde zudem die wellenlängenspezifische Änderung des Plasmonenpeaks bezogen auf den Ausgangszustand zur Bewertung herangezogen (hier nicht gezeigt). Nur in Kombination beider Ergebnisse konnte zweifelsfrei auf die in den Lösungen stattfindenden Prozesse zurückgeschlossen werden.

Die in Abbildung 8 zusammengestellten Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie zeigen, dass es beim Überschreiten der kritischen Salzkonzentration zu einer (teilweise schlagartigen) Reduktion des Primärpartikelanteils kommt. Für ladungsstabilisierte Partikel kann davon ausgegangen werden, dass entsprechend der DLVO-Theorie bei steigender Elektrolytzugabe die Oberflächenladungen stärker abgeschirmt werden und es daher aufgrund einer komprimierten Doppelschicht zu einer Koagulation/Agglomeration kommt. Generell zeigte sich, dass es in Gegenwart von NO_3^- zu einer Destabilisierung bzw. Agglomeration kommt, wogegen sich bei den Versuchen mit Cl^- die Prozesse der Agglomeration und des Lösens abhängig vom Stabilisator der AgNP und der Salzkonzentration überlagern.

Für NM-300k wurde bei einer Konzentration von 0,1 mol/L NaNO_3 -Lösung eine Destabilisierung festgestellt, welche zu einer langsamen Agglomeration über den kompletten Beobachtungszeitraum von vier Wochen führte. Dies konnte anhand des Anstiegs von x_{DLS} , den Agglomeraten mittels REM-Aufnahmen und in Form einer Gelbfärbung an der Probengefäßwand aufgrund von Partikelablagerung beobachtet werden. Dagegen nahm die Extinktion am λ_{SPR} ohne die Verschiebung seiner Lage hin zu höheren Wellenlängen bzw. die Ausbildung eines zweiten Peaks/Schulter nur leicht ab. Eine mögliche Erklärung ist der Stabilisator, welcher einen Mindestabstand zwischen den Partikeln trotz Agglomeration aufrecht erhält. Wenn die Partikel nicht nahe genug beieinander sind, wirken sie weiterhin wie Einzelpartikel und es kommt nicht zu den oben beschriebenen Multipolwechselwirkungen.

Im Gegensatz dazu konnte bei den ladungsstabilisierten AgNP AgCitrate und AgTannic bereits ab 0,02 mol/L NaNO_3 -Lösung eine Agglomeration beobachtet werden. In 0,1 mol/L verlief für beide AgNP-Fraktionen die Destabilisierung innerhalb einer Stunde ab. Dabei konnte die Bildung einer zweiten Plasmonenbande bei 550 nm sehr gut beobachtet werden. Diese Bande verändert im Verlauf der Agglomeration ihre Lage hin zu höheren Wellenlängen. Die Bildung von Agglomeraten kann auch anhand der DLS-Messungen verfolgt werden. Dabei nimmt anfänglich die mittlere Partikelgröße ab und steigt anschließend wieder an. Das Phänomen dieser scheinbaren Verkleinerung von x_{DLS} hängt mit der sich rasch ändernden Streulichtintensität aufgrund von Rotationsbewegungen kleiner (2er- und 3er-) Agglomerate zusammen, welche vergleichbar mit Stäbchen je nach Orientierung mehr oder weniger Licht in Richtung Detektor zurückstreuen. Schnelle Änderungen in der Autokorrelationsfunktion werden als hohe Diffusionsgeschwindigkeiten interpretiert, wie sie bei Systemen mit kleinen Partikeln (oder Partikeln in Flüssigkeiten mit

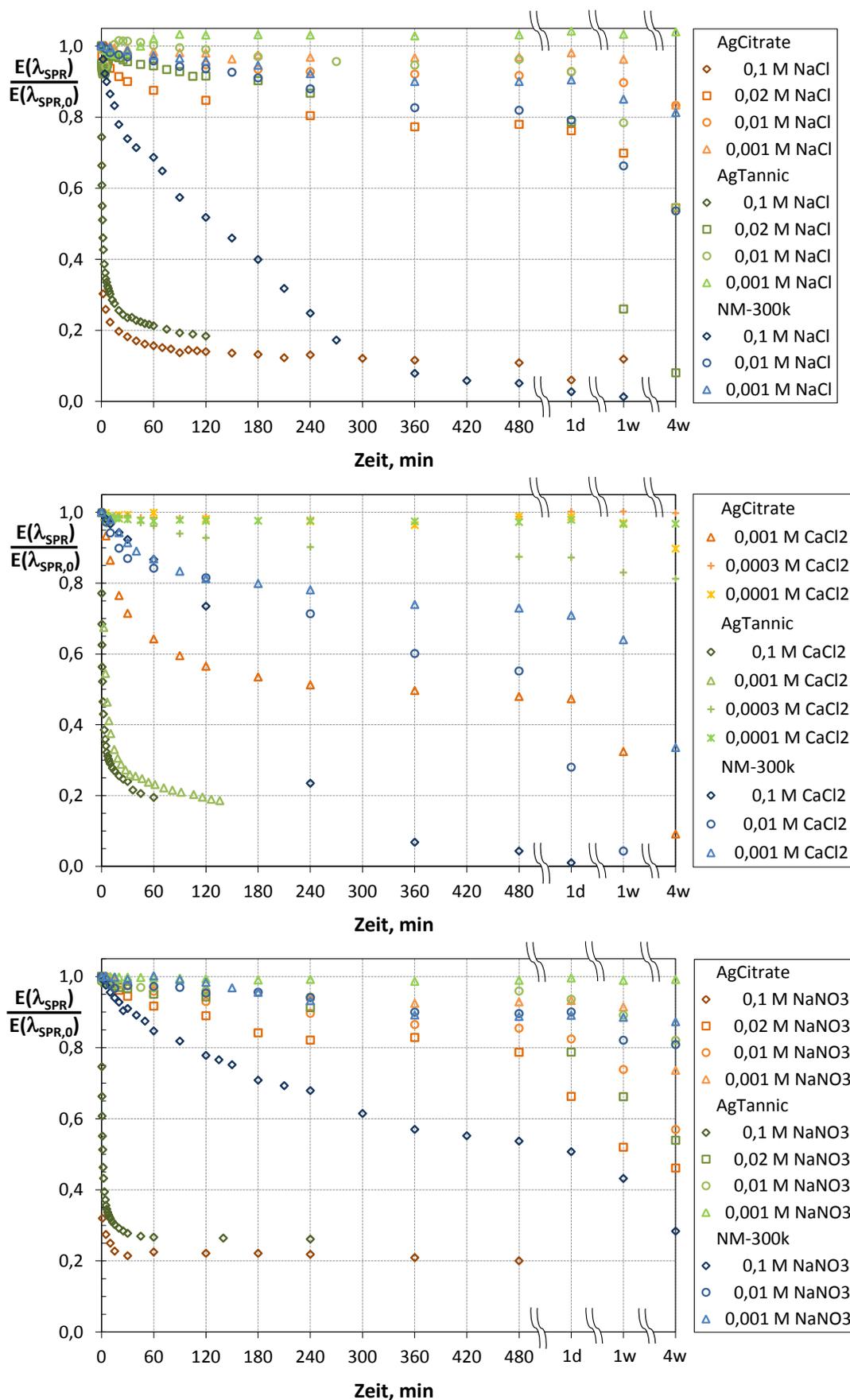


Abbildung 8: Agglomerationsfortschritt anhand der norm. Änderung des Plasmonenpeaks der Primärpartikel für AgCitrate, AgTannic und NM-300k in NaCl- (oben), CaCl₂- (mitte) und NO₃-Lösungen (unten)

geringer Viskosität) auftreten. Im weiteren Verlauf steigt die Größe der Agglomerate an und die „schnelle“ Änderung der Streulichtintensität aufgrund der Form nimmt ab.

Während es in NaNO_3 -Lösungen zu einer Agglomeration kommt, überlagern sich teilweise die Prozesse der Agglomeration und des Auflörens im Beisein von Chloridionen für die ladungsstabilisierte AgNP. Bei einer Salzkonzentration von 0,1 mol/L NaCl bildeten sich sofort Agglomerate und die Extinktion nahm kontinuierlich über den gesamten Beobachtungszeitraum aufgrund des Übergangs von partikulärem Silber in die ionare Phase ab. Für 0,02 und 0,01 mol/L NaCl konnte nur eine geringe Änderung der normierten Extinktion detektiert werden. Erst nach längerer Zeit (ein bzw. vier Wochen) konnte eine deutliche Änderung durch Lösungsprozesse beobachtet werden. In 0,001 mol/L NaCl-Lösung konnte keine Reaktion beobachtet werden. Dagegen wurde für beide ladungsstabilisierte AgNP-Systeme (AgCitrate und AgTannic) in 0,001 molarem CaCl_2 eine rasche Agglomeration und über den gesamten Zeitraum verteilt eine Reduktion des Silbers beobachtet. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die Art bzw. Wertigkeit der Kationen ebenfalls Einfluss auf die Stabilität der AgNP hat, ähnliche Beobachtungen wurden von Baalousha [21] dokumentiert.

Im Gegensatz dazu konnte für NM-300k nur eine Reduktion des partikulären Silbers anhand der Abnahme der Extinktion am Plasmonenpeak und einer Verschiebung des Peaks hin zu kleineren Wellenlängen beobachtet werden. Im Beisein von NaCl konnte für 0,001 mol/L keine und für 0,01 mol/L nur eine geringe zeitliche Änderung beobachtet werden. Dagegen löste sich bei 0,1 mol/L das Silber innerhalb von 6 h auf. Im Vergleich dazu konnte für CaCl_2 sowohl bei 0,001 sowie 0,01 mol/L eine langsame Veränderung beobachtet werden. Bei 0,1 mol/L CaCl_2 wurde eine vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeit wie bei 0,1 mol/L NaCl festgestellt, obwohl sich die Ionenstärke um den Faktor drei unterscheidet.

Die Proben wurden weiterhin mit Hilfe des REM hinsichtlich ihrer Partikelgröße und -struktur am Ende des Beobachtungszeitraums bewertet. In Abbildung 9 sowie im Anhang C sind beispielhaft REM-Aufnahmen von den unterschiedlichen AgNP-Systemen in den untersuchten Salzlösungen gegenübergestellt.

In Gegenwart von Chloridionen kommt es zur Bildung von Silberchlorid (AgCl), welches oberhalb einer Löslichkeitsgrenze von $1,5 \text{ mg}_{\text{AgCl}}/\text{L}$ (bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$) [17] zu AgCl -Kristallen ausfällt. Diese Bildung von AgCl führt zu einer Reduktion der Silberionen, welche sich in einem Gleichgewicht mit der partikulären Silberphase befindet, weshalb es zu einer kontinuierlichen Nachbildung von Silberionen zu Lasten der Partikel kommt und ein „Auflösen“ der Silber-(Nano)partikel beobachtet werden kann. Mit Hilfe von REM-Aufnahmen (Abbildung 9) konnten typische kubische AgCl -Cluster erfasst werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass sich die Citrat- und Gerbsäure-stabilisierten Partikel im Beisein von NaCl und CaCl_2 nicht vollständig auflösten, sondern teilweise miteinander „verschmolzen“ und Brücken bildeten. Die so entstandenen Strukturen bestanden sowohl aus Primärpartikeln als auch AgCl -Kristallen. Derartige Änderungen in der physikalisch-chemischen Natur der Partikeloberfläche wurden ebenfalls von Li [18] beschrieben.

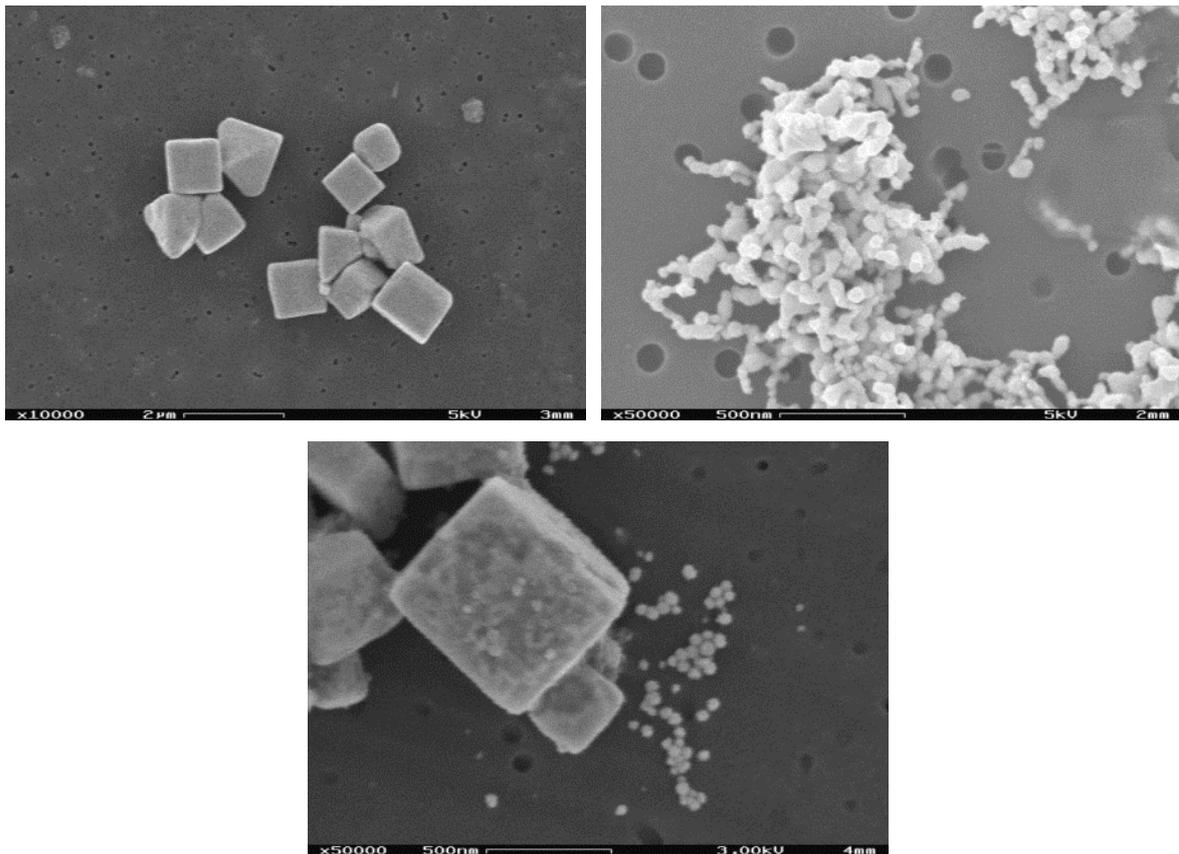


Abbildung 9: REM-Aufnahmen des Rückstands von NM-300k (links ob.), AgCitrate (rechts ob.) und AgTannic (unten) in 0,1 molarer NaCl-Lösung

Die REM-Aufnahmen der AgNP in NaNO_3 -Lösung zeigten keine Anzeichen von Kristallen. Wie in Abbildung 23 (Anhang C) unten am Beispiel von 0,1 molarer Lösung zu sehen, lagen die Partikel in ihrer Ausgangsgröße in Form von größeren Verbänden (Agglomeraten) vor.

□ **Fazit**

Die Untersuchungen zur Stabilität von AgNP in Lösungen mit definiertem Ionenhintergrund (Ionenart und Konzentration) weisen darauf hin, dass:

- mit steigender Ionenstärke eine stärkere Änderung der Probe beobachtet werden kann, wobei dies für jede Ionenart und AgNP-Beschichtung spezifisch ist – die ladungsstabilisierten AgCitrate und AgTannic Partikel waren generell weniger stabil und neigten somit stärker zur Agglomeration als die sterisch stabilisierten Partikel NM-300k,
- zwischen zwei Phänomenen unterschieden werden kann: i) der Reduktion des partikulären Silbers in Verbindung mit der Bildung von Silberverbindungen wie AgCl sowie ii) der Destabilisierung und Agglomeration der AgNP,
- es in der Gegenwart von Cl^- zur Bildung von AgCl kommt, wobei es im Fall von NM-300k zu einer fast vollständigen Umwandlung des Silbers zu kubischen Kristallen kam, wohingegen AgCitrate und AgTannic sowohl zur Bildung von Kristalle als auch zur Verschmelzungen zwischen den Primärpartikeln neigte,

- das zweiwertige Kation Ca^{2+} bei ladungsstabilisierten Partikeln einen um mindestens Faktor 10 (bezogen auf die Ionenstärke) stärkeren Einfluss auf die Agglomeration der AgNP im Vergleich zu dem einwertigen Kation Na^+ hat,
- sich in Anwesenheit von NO_3^- abhängig von der Konzentration Agglomerate bilden, wobei die Primärpartikel in ihrer Größe erhalten bleiben.

1.3.3 Verhalten von Silbernanopartikeln in biologischen Testmedien / Einsatz der Ionenselektiven Elektrode

Im Folgenden werden die Ergebnisse zum Verhalten von AgNP in biologischen Testsystemen vorgestellt, wobei nicht nur die partikuläre Phase, sondern auch der gelöste Silberanteil bewertet wurde.

Für die Bestimmung der Menge des ionaren Silbers gibt es in der Literatur unterschiedliche Ansätze, welche in dem Verbundprojekt UMSICHT von den verschiedenen Partnern untersucht und miteinander verglichen wurden. Zum einen kann die Konzentration an Silberionen im (silber-)partikelfreiem Überstand mittels AAS oder durch Massenspektroskopie bzw. optischer Emissionsspektroskopie nach Ionisierung im induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS/OES) bestimmt werden und zum anderen mit Hilfe einer ionenselektiven Elektrode (ISE). Der Vorteil einer ISE-Messung liegt darin, dass die Ionenkonzentration im Beisein der Silberpartikel gemessen werden kann. Dadurch ist eine Aufbereitung der zu untersuchenden Suspensionen, wie beispielsweise Filtration und/oder Zentrifugation, nicht notwendig. So können eventuelle Kontaminationen oder Zeiteinflüsse, welche bei der Herstellung des partikelfreien Überstandes entstehen, reduziert werden. Zudem ist es in Bezug auf die alternativen Möglichkeiten eine kostengünstige und schnelle Methode. Andererseits gibt es auch Nachteile. So ist die untere Detektionsgrenze im Vergleich zu den spektroskopischen Methoden höher und die Genauigkeit wird von den Herstellern um die 5 % angegeben [19]. Im Folgenden wird kurz die Funktionsweise einer Ionenselektiven Elektrode erklärt, weiterführende Informationen können der Literatur entnommen werden.

Ionenselektiven Elektroden bzw. deren Messketten bestehen aus zwei Halbzellen: einer ionenselektiven Messelektrode und einer potenzial-konstanten Bezugslektrode. Die ionenspezifische Messelektrode liefert ein Potenzial gegenüber der Referenzelektrode, welches abhängig ist von der Konzentration der zu untersuchenden Ionen. Ändert sich die Ionenkonzentration in der Messprobe so ändert sich die Anzahl der Ionen an der Membranoberfläche, die sie aufladen, und die ISE zeigt dies durch eine Potenzialänderung an. Mit Hilfe der NERNST'schen Gleichung kann der mathematische Zusammenhang zwischen dem gemessenen elektrochemischen Potenzial und der Ionenkonzentration in der Probe beschrieben werden. Für eine direkte Anwendung muss die ISE vor der Messung mittels zweier oder mehrerer Standards kalibriert werden.

Die Untersuchungen wurden mit einer Silber/Sulfid-Einstabmesskette Ag/S 801 der Firma WTW GmbH & Co. KG durchgeführt. Die Messkette wurde jeden Tag neu kalibriert. Hierfür wurde diese mit Brückenelektrolyt befüllt, 10 Minuten in deionisiertem Wasser (DI-Wasser) und danach 2 Stunden in verdünnte Standardlösung ($1 \text{ mg}_{\text{Ag}^+}/\text{L}$) getaucht. Anschließend wurde eine 3-Punkt-Kalibrierung mit 10, 1 und $0,1 \text{ mg}_{\text{Ag}^+}/\text{L}$ einer AgNO_3 -Lösung durchgeführt. Die Messkette wurde vor jeder Messung, wie vom Hersteller empfohlen, für ca. 5 Minuten in verdünnte Standardlösung gestellt. Anschließend wurde

sie in DI-Wasser kurz gespült, mit einem fusselfreien Tuch getrocknet und in die zu untersuchende Lösung eingetaucht.

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Reproduzierbarkeit der Sonde und das Verhalten von gelöstem Silber in Form von AgNO_3 in Abhängigkeit von der Umgebung (Aufbewahrungsgefäß: Glas und Polyethylen (PE)) und der Konzentration bewertet. Die Untersuchungen wurden in einem Bereich zwischen 1 und 0,1 $\text{mg}_{\text{Ag}^+}/\text{L}$ durchgeführt. Die untere Grenze ist durch die Messsonde gegeben, da sich bei niedrigeren Ionenmengen die gemessenen Potenziale kaum noch von einander unterscheiden und die Ergebnisse der ISE nicht reproduzierbar und ungenau sind.

Die Ergebnisse für die Silberionenkonzentrationen von 1, 0,5 und 0,1 $\text{mg}_{\text{Ag}^+}/\text{L}$ sind in Abbildung 10 aufgeführt. Es wurde keine signifikante Änderung der Konzentration über die Zeit für beide Gefäßtypen beobachtet. Es ist jedoch festzuhalten, dass mit abnehmender Silbermenge innerhalb der Lösung die Abweichungen gegenüber der nominalen Konzentration zunehmen. Die Messergebnisse für PE-Gefäße liegen dabei systematisch näher an der vorgegebenen Konzentration als die der Glasgefäße. Am 4. Messtag (nach 72 Stunden) wurde, abweichend von den anderen Messtagen, bei allen Proben nur ungefähr 80 % der Ausgangskonzentration wiedergefunden. Diese Abweichung der Messwerte ist wahrscheinlich auf eine ungenaue Kalibrierung der ISE zurückzuführen und zeigt die Fehleranfälligkeit der Messmethode dahingehend.

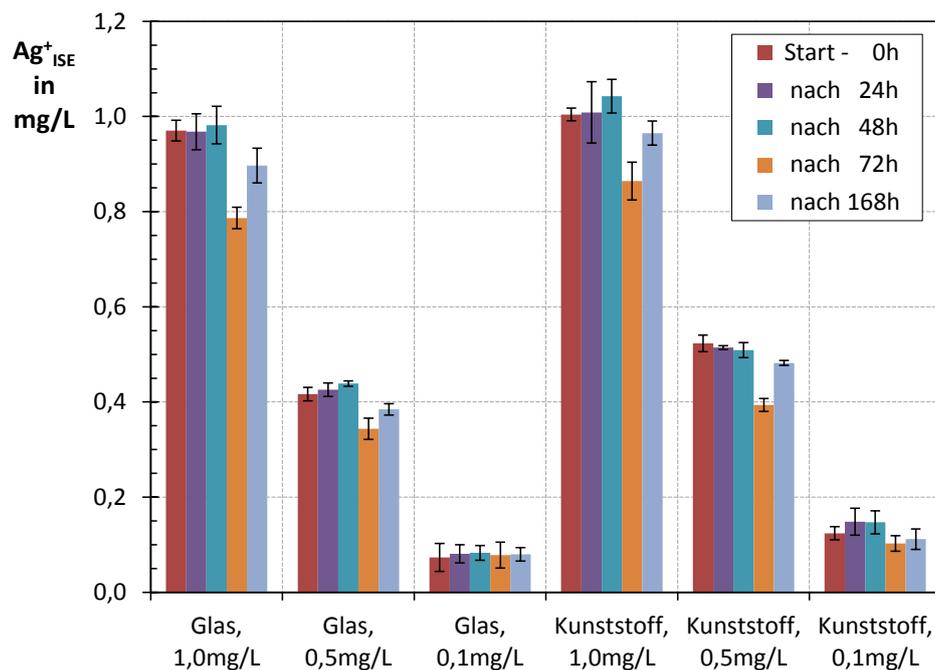


Abbildung 10: Gelöster Silberanteil für 1, 0,5 und 0,1 $\text{mg}_{\text{Ag}^+}/\text{L}$ einer AgNO_3 -Lösung über 7 Tage in Glas und Kunststoffgefäßen, basierend auf $n = 3$ unabhängigen Messungen mit der ISE

Das zeitliche Verhalten (Änderung des partikulären und gelösten Anteils) von AgNP in der Umwelt wurde anhand von 10 mg/L NM-300k in ausgewählten biologischen Testmedien (siehe Tabelle 7) untersucht. Alle verwendeten Testmedien wurden vom Projektpartner ÖKO/VdW angesetzt und zur Verfügung gestellt. Die Messungen mit der ISE wurden im reinen Testmedium, direkt nach der Zugabe von NM-300k, nach einem, zwei, drei und

sieben Tagen bzw. am Ende der Testlaufzeit für jedes Medium durchgeführt. Parallel wurden die mittlere Partikelgröße und Konzentration der Nanopartikel mittels UV/Vis-Spektroskopie und DLS bestimmt. Die Proben wurden über den gesamten Versuchszeitraum im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Tabelle 7: Verwendete biologische Testmedien und deren Bestandteile [12]

Medium	Zusammensetzung	Testlaufzeit
<i>Arthrobacter-Medium</i> (<i>Arthrobacter globiformis</i> , Bodenbakterium)	NaCl, Glucose, Proteine	2 Stunden
<i>Daphnien-Medium</i> (Elendt M7 nach OECD 202)	CaCl ₂ , NaHCO ₃ , MgSO ₄ , NaNO ₃	2 Tage
<i>Zellkultur-Medium</i> (RPMI Zellkulturmedium)	NaCl, Natriumphosphat-Puffer, NaHCO ₃ , Glucose, KCl, Aminosäuren, Proteine	2 Tage
<i>Algen-Medium</i> (<i>Pseudokirchneriella</i> nach OECD 201)	NaHCO ₃ , NH ₄ Cl, CaCl ₂ , MgSO ₄	3 Tage
<i>Lemna-Medium</i> (kleine Wasserlinse, nach OECD 221)	KNO ₃ , Kaliumphosphat-Puffer, Ca(NO ₃) ₂	7 Tage

Für eine optimale Messung wird vom Hersteller eine Probenvorbereitung mit 2 %-iger ISA-Lösung (*engl.: Ionic Strength Adjustor*) empfohlen, wodurch eine konstante Ionenstärke in der Probe eingestellt werden soll. Um aber die zu untersuchenden Medien nicht mit Fremdionen zu verfälschen, wurde auf die Zugabe verzichtet und somit eine geringere Sensitivität akzeptiert.

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse für 10 mg_{Ag}/L NM-300k in den untersuchten Testmedien und DI-Wasser dargestellt. Sowohl in DI-Wasser als auch im Lemna-Medium konnten gelöste Silberanteile von 0,2 bis 0,4 mg_{Ag+}/L nachgewiesen werden. Für alle anderen Medien (*Arthrobacter*-, *Daphnien*-, *Zellkultur*- und *Algen*-Medium) wurden keine bzw. nur sehr geringe Messwerte, deutlich unterhalb der durchgeführten Kalibrierung, aufgezeichnet. Vergleichbare Ergebnisse für NM-300k konnten bei den beiden Projektpartnern ÖKO/VdW und BGR [12] bei ihren Untersuchungen des Überstands mittels AAS und ICP-MS bestimmt werden. Theoretische Berechnungen vom Projektpartner ÖKO/VdW mit der Software PHREEQC erlauben Aussagen zum Verbleib der verschiedenen Silberspezies in den unterschiedlichen Medien. So konnte festgestellt werden, dass Glucose (*Arthrobacter*- und *Zellkultur*-Medium) und Ammonium (*Algen*-Medium) beispielsweise reduzierend auf die Silberionen wirken, wohingegen es im Beisein von Chloridionen zur Ausfällung von AgCl (z. B. *Daphnien*-Medium) kommt [12].

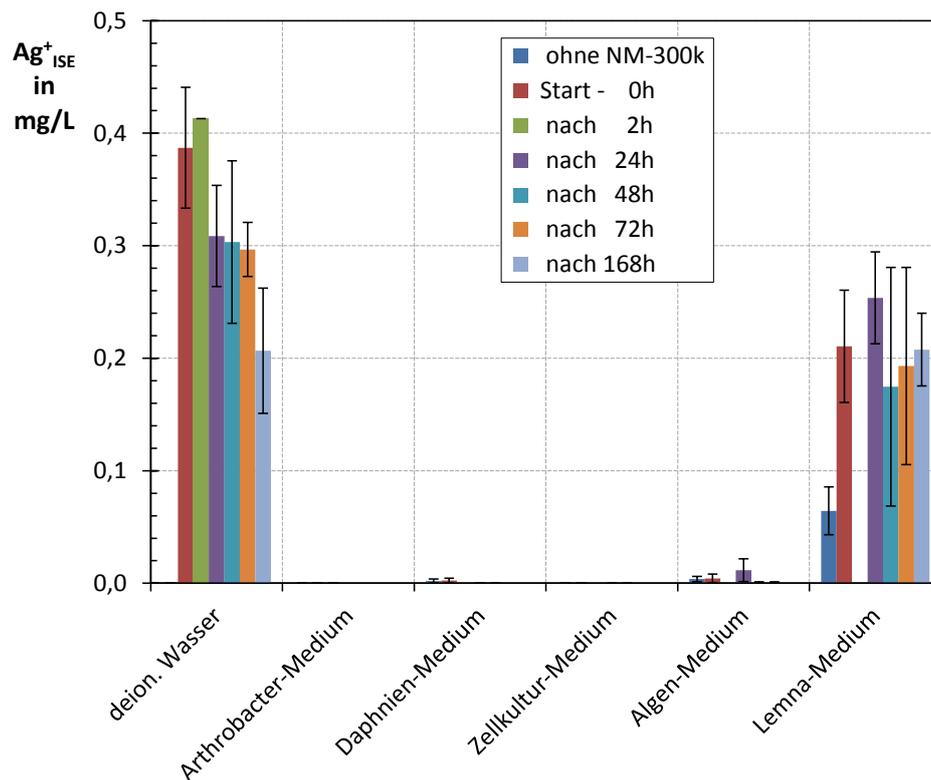


Abbildung 11: Gelöster Silberanteil für 10 mg_{Ag+}/L NM-300k in DI-Wasser und biologischen Testmedien, basierend auf $n \geq 2$ unabhängigen Messungen mit der ISE

Die Wiederfindungsrate des partikulären Silbers ist in Abbildung 12 dargestellt und wurde anhand des Plasmonenresonanzpeaks von NM-300k ($\lambda_{SPR} = 413 \text{ nm}$) mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Die Messungen erfolgten zeitgleich zu den ISE-Untersuchungen. Alle Messwerte sind auf die gemessene Ausgangskonzentration im DI-Wasser normiert (7,9 mg/L). Mit Ausnahme des Algen-Mediums konnte in allen anderen biologischen Testmedien eine geringe und im Zellkultur-Medium sogar eine deutliche Abnahme der Konzentration über den Untersuchungszeitraum bestimmt werden. Eine mögliche Erklärung ist eine Veränderung des UV/Vis-Spektrums der Medien über die Zeit aufgrund von biologischen Organismen/Veränderungen. So weisen die UV/Vis-Spektren des Zellkultur-Mediums eine deutliche Veränderung im Wellenlängenbereich von 550 nm auf.

Abbildung 13 zeigt die mittlere intensitätsgewichtete Partikelgröße (Kumulantenanalyse, DLS) für NM-300k in den Testmedien. Es konnte keine signifikante Partikelgrößenänderung über den Beobachtungszeitraum in allen Medien bestimmt werden. Dieses Ergebnis wird von den spektroskopischen Messungen bestätigt, die Lage des Plasmonenpeaks änderte sich nicht.

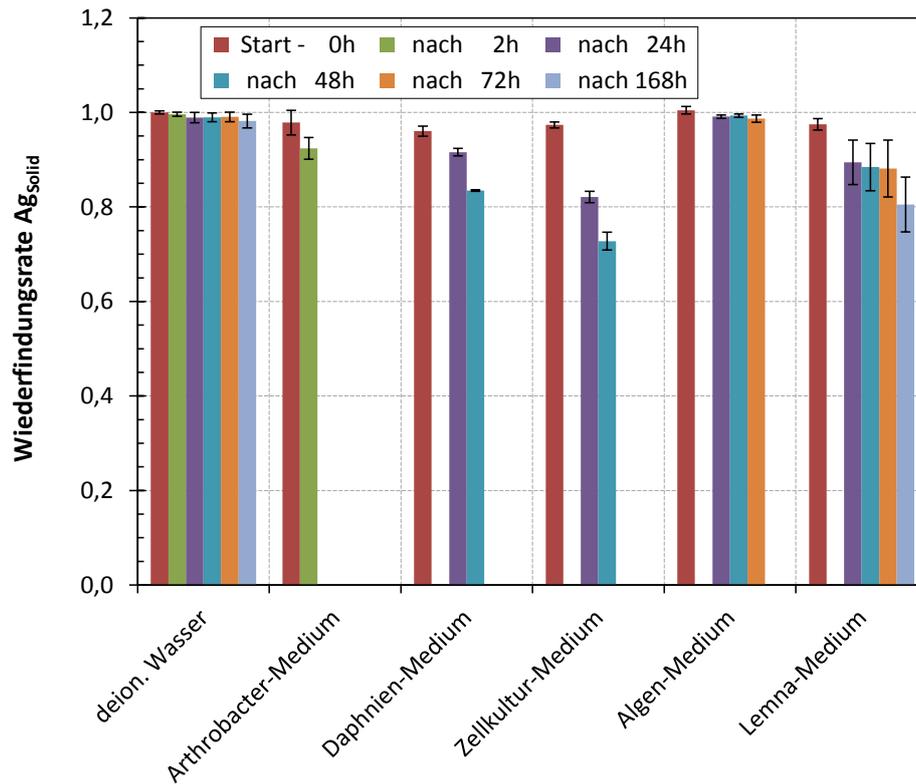


Abbildung 12: Wiederfindungsrate des partikulären Silbers in DI-Wasser und biologischen Testmedien, basierend auf $n \geq 2$ unabhängigen Messungen mit dem UV/Vis-Spektrometer

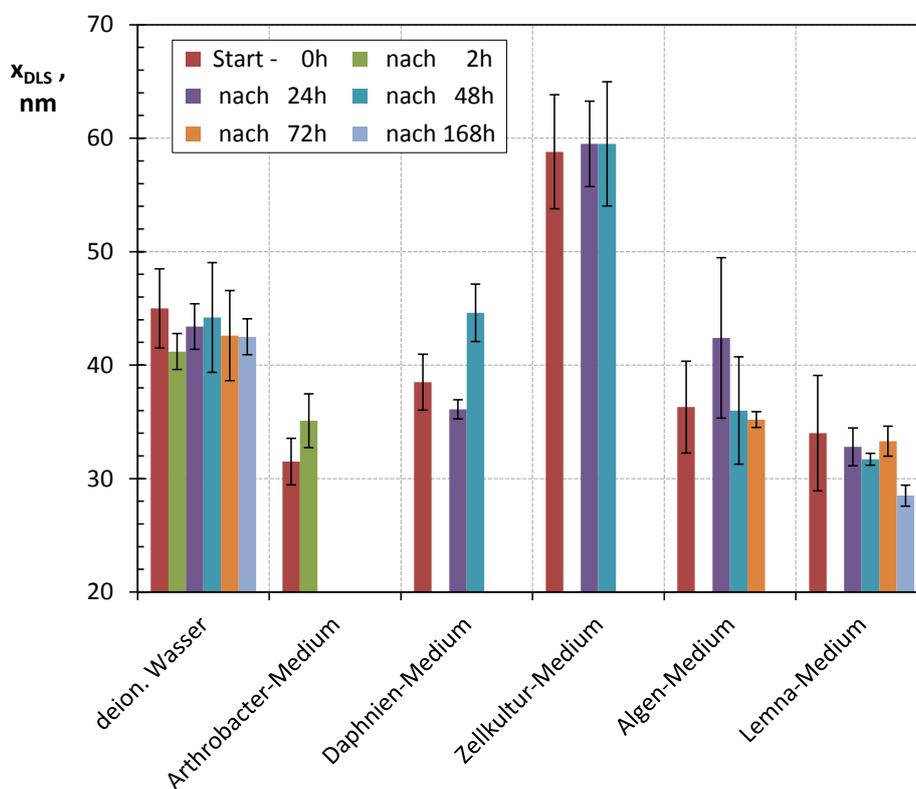


Abbildung 13: Mittlere intensitätsgewichtete Partikelgröße (x_{DLS}) von 10 mg/L NM-300k in DI-Wasser und biologischen Testmedien

Weiterhin wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum sowohl die Leitfähigkeit als auch der pH-Wert kontrolliert. Für alle Testmedien konnten keine zeitlichen Veränderungen dieser Größen festgestellt werden.

□ **Fazit**

Die Untersuchungen zum Verhalten von NM-300k in den ausgewählten biologischen Testmedien haben gezeigt, dass:

- die Messung des ionaren Anteils mit Hilfe einer ISE möglich ist, aber eine untere Nachweisgrenze um $100 \mu\text{m}_{\text{Ag}^+}/\text{L}$ den Einsatz beschränkt,
- in Medien mit u. a. Glucose und Ammonium eine Reduktion von Silberionen erfolgt,
- Chloridionen zur Ausfällung von AgCl führen und somit ebenfalls freie Silberionen binden,
- eine Bewertung der UV/Vis-Spektren durch Veränderung der biologischen Medien aufgrund von Organismen erschwert wird und
- es zu keiner Änderung der partikulären Phase (z. B. Agglomeration) in dem Beobachtungszeitraum kommt.

1.4 Verhalten von Silbernanopartikeln in komplexen Medien (AP 2.2.3)

Ziel des AP 2.2.3 war es, das Verhalten von AgNP unter natürlichen Umweltbedingungen zu bewerten. Hierbei sollten die AgNP in sogenannten komplexen Medien wie Boden- (siehe Abschnitt 1.4.1) und Waschwasser (Abschnitt 1.4.2) untersucht werden, was eine große Herausforderung an die Messtechnik stellt und/oder eine besondere Vorbehandlung der Untersuchungsmedien erfordert. Für die Umsetzung der Aufgabenstellung war daher immer eine, an die Ausgangsbedingungen speziell angepasste Herangehensweise, notwendig.

1.4.1 Verhalten von Silbernanopartikeln in Boden-Wasser-Gemischen

Da eine (optische) Charakterisierung von Nanopartikeln im Beisein von Mikrometer- und Submikrometerteilchen nur schwer bis gar nicht möglich ist, wurde für die Untersuchung von AgNP im Bodenmilieu eine eigene Prozedur zur Herstellung von Boden-Wasser-Gemischen entwickelt. Für die Untersuchungen wurden fünf Böden (Refesol, Gley, Gley-Podsol, Parabraunerde und Parabraunerde-Haftnässepseudogley) ausgewählt, welche sich in ihrer Zusammensetzung voneinander unterscheiden. Die Böden wurden vom Projektpartner BGR zur Verfügung gestellt und hinsichtlich ihrer Bodencharakteristik analysiert (siehe Tabelle 8). Sie wurden ebenfalls in den Untersuchungen der BGR [20] verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Böden und deren Charakteristika nach [20]

Boden	C_{ges}¹	Tongehalt	Leitfähigkeit	pH (H₂O)	Ionenstärke
	%	%	μS/cm	-	mmol/L
<i>Refesol</i>	0,94	5 ²	105	5,46	
<i>Gley</i>	0,93	8,6	83,2	6,37	3,25
<i>Gley-Podsol</i>	0,10	0,8	25,5	5,83	1,25
<i>Parabraunerde</i>	1,77	39,2	282	7,34	2,50
<i>Parabraunerde-Haftnässepseudogley</i>	0,14	26,9	64,0	5,17	1,50

¹ gesamter Kohlenstoffanteil, ² Analyse Fraunhofer IME

Das Boden-Wasser-Gemisch wurde in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 106 zur Bestimmung von Adsorption/Desorption nach einer Schüttelmethode hergestellt. Aufgrund der Silber-Chlor-Wechselwirkungen (siehe Abschnitt 1.3.3) wurde auf die Verwendung von CaCl₂ verzichtet. Die Böden, auf eine Partikelgröße ≤ 2 mm vom Projektpartner vorkonditioniert, wurden im Massenverhältnis 1:5 mit DI-Wasser versetzt und für 24 h mit einem Horizontalschüttler intensiv geschüttelt. Anschließend wurden die groben Bestandteile durch Absetzen und Dekantieren von der Flüssigphase getrennt. Die so gewonnene Flüssigkeit war aufgrund der Schwebestoffe für eine optische Charakterisierung ungeeignet. In weiteren Aufreinigungsschritten (0,45 μm Spritzenfilter, 0,1 μm PVDF-Spritzenfilter und 3000 MWCO² Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin 20), wurden Bestandteile im Submikrometerbereich stufenweise aus den Boden-Wasser-Gemischen entfernt, so dass in erster Linie gelöste bzw. nanoskalige Materialien (z. B. Salze, Huminstoffe) verblieben. Vor allem der Gley-Boden zeigte eine starke und die Parabraunerde eine leichte Braunfärbung nach der Aufreinigung mittels Spritzenfilter (siehe Anhang D). Diese Dunkelfärbung ist hauptsächlich auf die organischen Bestandteile, welche in unterschiedlichen Anteilen in den Böden vorliegen, zurückzuführen. Mit Hilfe der Zentrifugalkonzentratoren, welche eine theoretische Trenngröße von ca. 30 nm hatten, konnte der Großteil der makromolekularen Huminstoffe aus den Gemischen entfernt werden.

Für die Untersuchungen wurden die bereits in Abschnitt 1.3.2 vorgestellten AgNP NM-300k, 50 nm AgCitrate und 50 nm AgTannic verwendet. Die gewonnenen Bodeneluate wurden mit den vorher auf gleiche Silberkonzentrationen verdünnten AgNP-Suspensionen versetzt und über einen Zeitraum von vier Wochen mittels DLS und UV/Vis-Spektroskopie beobachtet. Die Gesamtkonzentration der untersuchten Proben betrug 5 mg/L Silber. Das zeitliche Verhalten von NM-300k in Bodenwasser ist in Abbildung 14 anhand der Änderung des normierten Plasmonenresonanzpeaks sowie in Abbildung 15 anhand der mittleren Partikelgröße x_{DLS} für die fünf unterschiedlichen Böden und deren verschiedenen

² Molecular Weight Cut Off; definiert die minimale Molekülmasse, welche zu 90 % zurückgehalten wird; Einheit: Dalton

Aufreinigungsstufen dargestellt. Für AgCitrate (AgCi) und AgTannic (AgTa) sind die entsprechenden Abbildungen im Anhang aufgeführt.

Die sterisch stabilisierten NM-300k sowie die mit Gerbsäure ladungsstabilisierten AgTannic zeigten im Bodeneluat von Refesol, Gley-Podsol und Parabraunerde Haftnäse-pseudogley keine Veränderung. Im Gley-Eluat kam es bei beiden Partikelfractionen zu einem geringen, um 48 Stunden verzögerten Agglomerationsverhalten. Demgegenüber zeigte das AgCitrate in den Bodenlösungen von Refesol, Gley und Parabraunerde Haftnäse-pseudogley ein deutliches Agglomerationsverhalten, das ebenfalls um 48 h verzögert eintrat. Allein im Eluat vom Gley-Podsol-Boden blieb das AgCitrate über vier Wochen stabil.

Das Bodeneluat der Parabraunerde war das reaktivste Medium. Bei AgTannic und AgCitrate trat direkt nach der Zugabe eine Destabilisierung ein, wobei die Reaktion bei AgTannic mit Abstand am schnellsten ablief und eine schlagartige Agglomeration zeigte. Bereits nach 2 h waren quasi keine Primärpartikel mehr zu beobachten. Im Gegensatz dazu trat bei NM-300k erst ein um 48 h verzögertes aber dann deutliches Agglomerationsverhalten auf. Anhand der Ergebnisse von NM-300k kann festgehalten werden, dass die Agglomeration unabhängig vom Filtrationszustand des Eluats war.

Die DLS-Messungen bestätigten die Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie. Wenn anhand des Abfalls der normierten Extinktion ein Agglomerationsverhalten identifiziert wurde, konnte dies anhand des Anstiegs der mittleren Partikelgröße x_{DLS} nachvollzogen werden. Die gemessene mittlere Partikelgröße ist abhängig von der Reinheit des Mediums: je mehr Inhaltsstoffe nach der Aufreinigung zurückgeblieben sind, desto größer war x_{DLS} . So wurde beispielsweise für ein und dieselben AgNP NM-300k im Gley-Medium nach der Filtration mit 0,45 μm Maschenweite eine Partikelgröße x_{DLS} von 165 nm bestimmt. Eine Verringerung der Maschenweite auf 0,1 μm bzw. 3000 Dalton resultierte in einer ebenfalls verringerten Partikelgröße von 60 nm bzw. 45 nm.

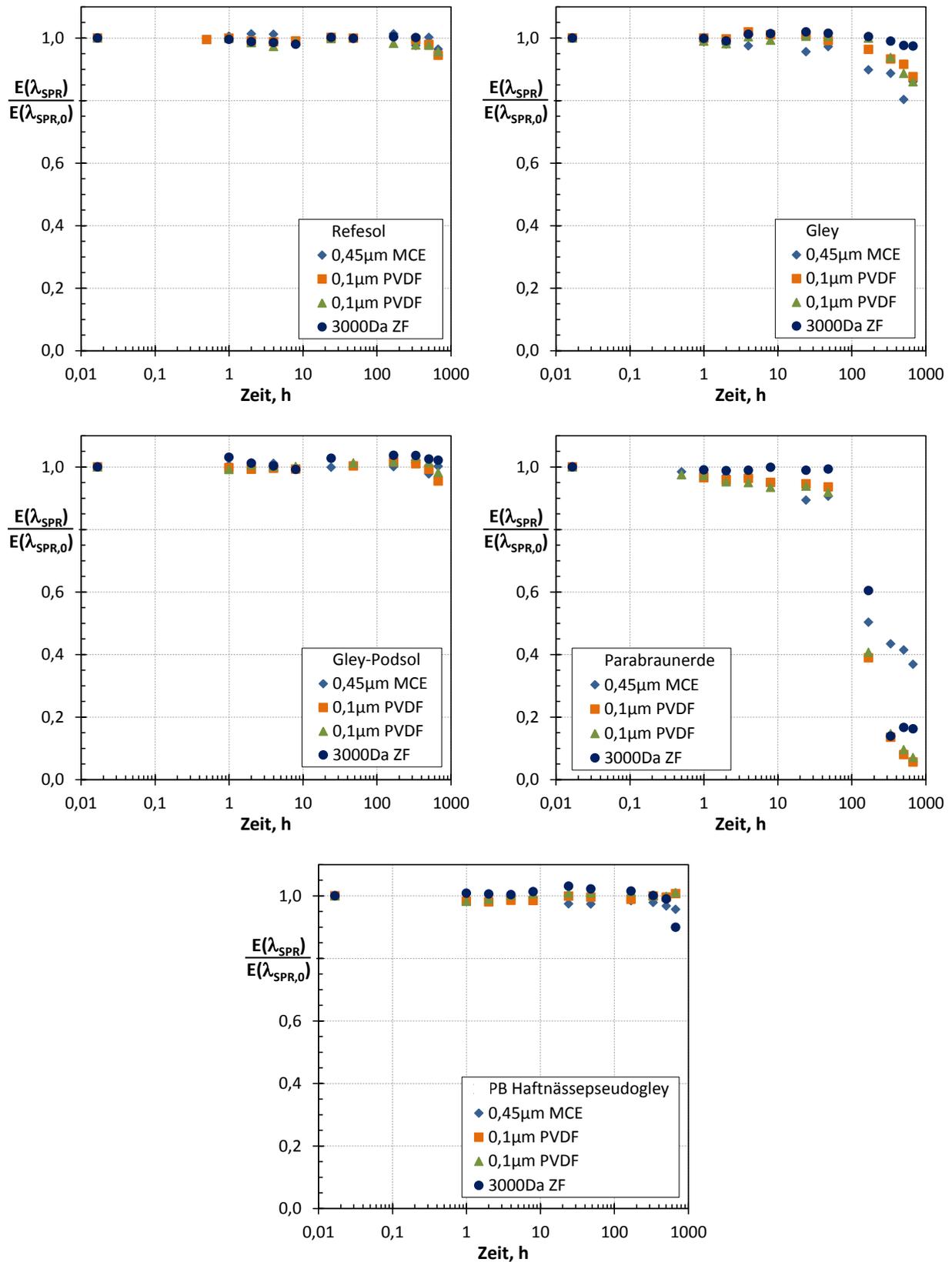


Abbildung 14: Verhalten von NM-300k in den fünf verschiedenen Bodeneluaten nach unterschiedlichen Aufreinigungsschritten anhand der Änderung des Plasmonenpeaks der Primärpartikel

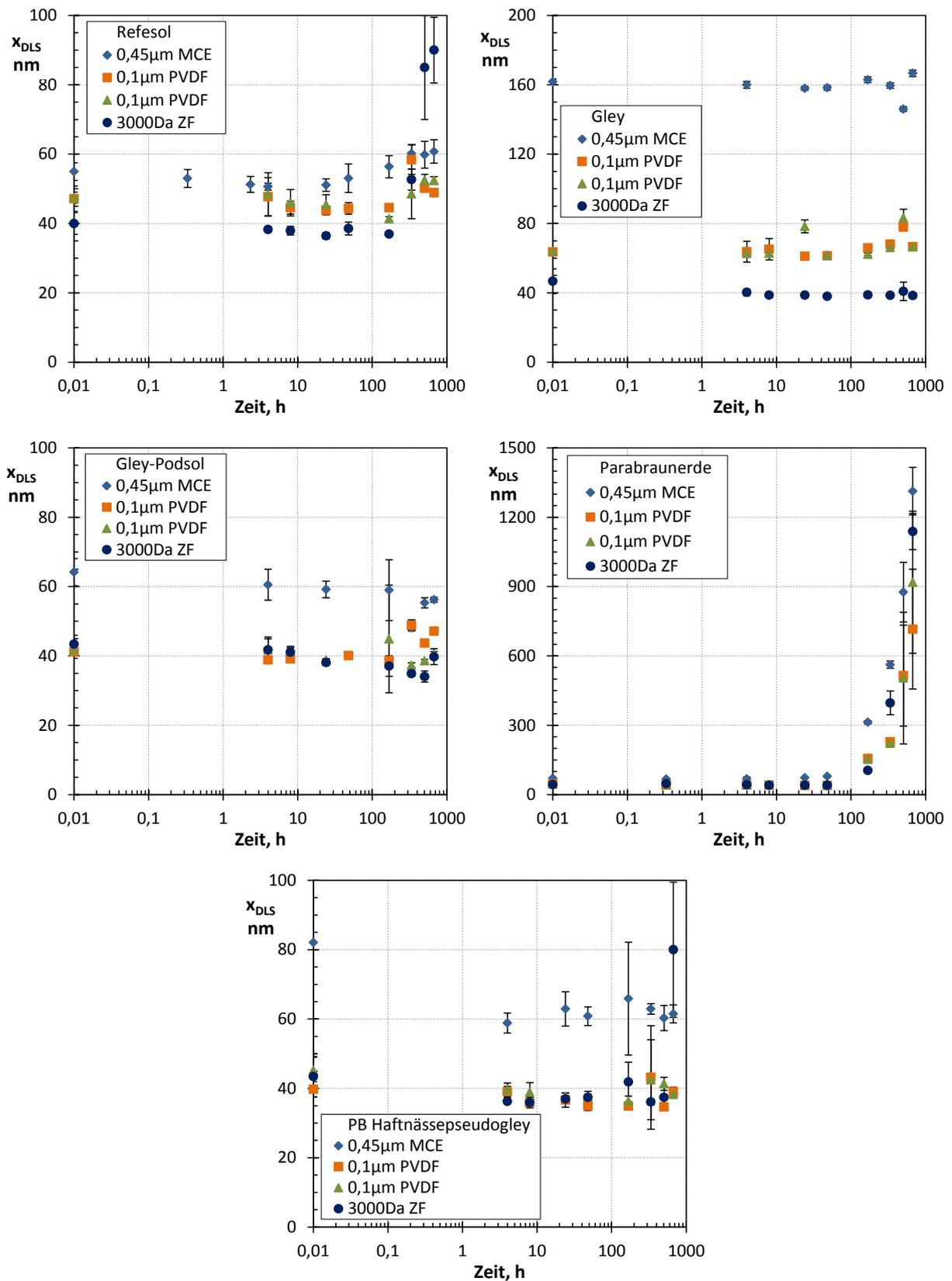


Abbildung 15: Verhalten von NM-300k in den fünf verschiedenen Bodeneluaten nach unterschiedlichen Aufreinigungsschritten anhand der mittleren intensitätsgewichteten Partikelgröße x_{DLS}

□ **Fazit**

Zusammenfassend konnte anhand der Untersuchungen zum Boden-Wasser-Gemisch gezeigt werden, dass:

- das Verhalten der AgNP abhängig vom Bodentyp ist,
- die sterisch stabilisierten NM-300k AgNP stabiler sind als die mit Gerbsäure und diese wiederum deutlich stabiler als die mit Citrate stabilisierten AgNP,
- innerhalb der ersten 48 h für NM-300k bei allen untersuchten Böden keine Destabilisierung erfolgte und sich danach für den Gley-Boden eine schwache sowie für die Parabraunerde eine starke Änderung zeigte,
- die mit Gerbsäure stabilisierten Partikel sofort im Bodeneluat der Parabraunerde agglomerierten, im Eluat des Gley-Bodens eine um mindestens 48 h verzögerte Aggregation (wie bei NM-300k) auftrat,
- die mit Citrate stabilisierten AgNP lediglich im Gley-Bodeneluat über vier Wochen nicht agglomerierten und
- die Aufreinigung mit Spritzenfiltern und Zentrifugalkonzentratoren keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität von NM-300k hatte.

1.4.2 Nachweis von Silbernanopartikeln im Wasch- und Spülwasser

Die von den Projektpartnern UBA und IME erstellte Risikobewertung in diesem Verbundprojekt erfolgte entlang der textilen Kette. Dabei kommt vor allem dem Waschprozess und der darüber in die Kläranlage ausgetragenen Silber(nanopartikel)fracht eine gewichtige Rolle zu. Im Folgenden werden die Vorgehensweise zur Untersuchung sowie die Ergebnisse der Messungen an Wasch- und Spülwasser am Beispiel eines Testsystems, welches vom Partner HI unter definierten Bedingungen hergestellt wurde, beschrieben. Das verwendete Testsystem, ein Baumwolltextil mit einer Beladung von 250 ppm Nanosilber³, ist ein „worst-case“-Szenario. Das Baumwolltextil war mit Silber überladen und das verwendete Bindersystem nicht angepasst, wodurch die Bindung zwischen Textil, Silber und Bindersystem nicht ausreichend war. Das Testsystem diente hier ausschließlich der Erprobung der Methode.

Ein häufiger Ansatz zur Charakterisierung von Nanopartikeln in komplexen Medien ist in Abbildung 16 gezeigt. Dabei müssen die Nanopartikel zuerst aus der komplexen Matrix separiert werden. Zu diesem Zweck stehen den Anwendern zum einen physikalische Trennmethode wie die Filtration, Zentrifugation oder das Dekantieren und zum anderen chemische Präparationsmethoden wie das Lösen zur Verfügung. Im Anschluss daran muss die Probe für die Messtechnik gegebenenfalls weiter aufbereitet werden. Hierzu zählen Arbeitsschritte wie Verdünnen bzw. Aufkonzentrieren, Fraktionieren oder Dispergieren. All diese Arbeitsschritte können Einfluss nehmen auf die Nanopartikel und ihre Stabilität. Abschließend können die aufbereiteten System mit der entsprechenden Messtechnik hinsichtlich ihrer Größe, Struktur und Material charakterisiert werden. In dem vorliegenden Fall wurden alle Proben sowohl mittels DLS als auch mittels UV/Vis-Spektroskopie bewertet. Hierfür wurden die Proben nach kurzem Aufschütteln in ihrem Ausgangszustand

³ Angabe vom HI

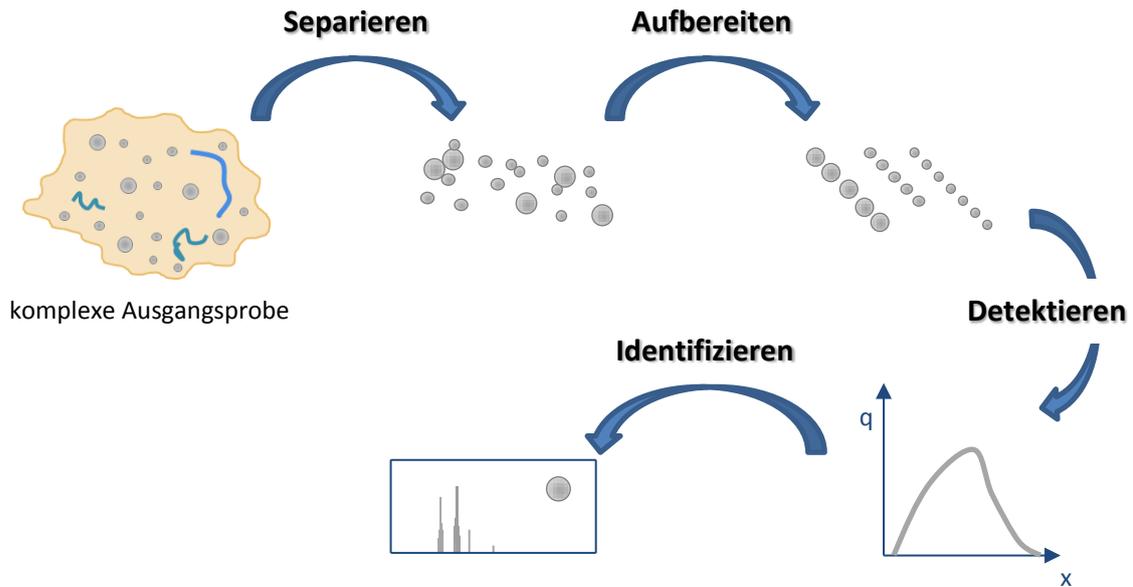


Abbildung 16: Allgemeiner Ansatz zur Identifikation und Detektion von Nanopartikeln in komplexen Medien

und nach verschiedenen Filtrationsstufen vermessen. Für die Filtration wurden 0,45 μm und 0,22 μm MCE-Spritzenfilter (Mixed Cellulose Ester) sowie 0,1 μm PVDF-Spritzenfilter verwendet. Die spektroskopischen Untersuchungen wurden je nach optischer Konzentration in einer 4, 10, 50 bzw. 100 mm Quarzglasküvette durchgeführt.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der DLS (die mittlere intensitätsgewichtete Partikelgröße x_{DLS} und Pdl) sowie die der UV/Vis-Spektroskopie (Wellenlänge $\lambda(T_{\text{min,Ag}})$ und der Wert $T_{\text{min,Ag}}$ des Minimums der Transmission beim Oberflächenplasmonenpeak) für die unterschiedlichen Wässer des Testsystems aufgeführt. Die DLS-Ergebnisse der Ausgangsproben vom Wasch- und Spülwasser lagen für x_{DLS} zwischen 123 nm und 275 nm. Die relativ großen Schwankungen im Messsignal und die daraus resultierenden hohen Standardabweichungen von x_{DLS} (bis zu 38 %) und des Pdl deuten darauf hin, dass die Proben einzelne größere Teilchen wie Fasern enthielten. Nach dem ersten Filtrationsschritt (0,45 μm Porenweite) lag die mittlere Partikelgröße nur noch zwischen 40 nm und 82 nm, die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Proben waren gering. Die weiteren Filtrationsschritte haben nur noch eine geringe aber stete Änderung hin zu kleineren Partikelgrößen (35 nm – 58 nm) zur Folge. Dabei werden die restlichen groben Partikel zurückgehalten. Der abfiltrierte Anteil ist jedoch sehr gering, wie auch die Messungen mit dem UV/Vis-Spektrometer belegen.

Gleichwohl werden bei der Filtration immer auch Partikel kleiner der theoretischen Trenngröße aufgrund von z. B. Kuchenfiltration und dem Anhaften der feinen Partikel an den größeren (hier Schwebestoffen) zurückgehalten. So wurde eine für Silber typische Gelbfärbung bei der Verwendung einer 1 μm Kernspurmembraan nach der Filtration einer Waschflüssigkeit beobachtet (siehe Abbildung 17). Auf den dazugehörigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 17, links) konnten dagegen keine Silber(nano)partikel eindeutig identifiziert werden, was jedoch auch daran lag, dass sich ein kompakter Filterkuchen mit wenig Kontrast ausgebildet hatte und dadurch eine Demaskierung einzelner Partikel oder Partikelfractionen nicht möglich war.

Tabelle 9: Ergebnisse der DLS und der UV/Vis-Spektroskopie für Wasch- und Spülwasser eines Testsystems, in Klammern ist die optische Weglänge in mm der spektroskopischen Messung (Küvettdicke) angegeben

Baumwolltextil mit AgNP	DLS - Kumulantenanalyse		UV/Vis-Spektroskopie		Interpretation	
	x_{DLS} nm	Pdl -	$\lambda(T_{min,SPR})$ nm	$T_{min,SPR}$ -	$x_{UV/Vis}$ nm	$c_{m, UV/Vis}$ mg/L
Waschwasser - Ausgangszustand	123 ± 27,1	0,765 ± 0,160	410	16,9 (4)	44	14,43
0,45 µm MCE-Filter	40,3 ± 0,35	0,512 ± 0,005	410	30,3 (4)	44	9,71
+ 0,22 µm MCE-Filter	39,1 ± 0,29	0,478 ± 0,007	410	30,5 (4)	44	9,66
+ 0,1 µm PCDF-Filter	34,9 ± 0,53	0,463 ± 0,027	410	29,3 (4)	44	9,96
1. Spülwasser - Ausgangszustand	221 ± 84,1	0,610 ± 0,170	410	15,3 (50)	44	1,22
0,45 µm MCE-Filter	66,4 ± 2,40	0,496 ± 0,019	410	23,3 (50)	44	0,95
+ 0,22 µm MCE-Filter	52,4 ± 1,31	0,467 ± 0,028	410	23,6 (50)	44	0,94
+ 0,1 µm PCDF-Filter	38,6 ± 0,47	0,439 ± 0,036	410	25,1 (50)	44	0,90
2. Spülwasser - Ausgangszustand	275 ± 40,6	0,824 ± 0,168	406	53,8 (100)	40	0,19
0,45 µm MCE-Filter	81,5 ± 4,02	0,498 ± 0,064	412	79,2 (100)	46	0,08
+ 0,22 µm MCE-Filter	71,3 ± 5,79	0,470 ± 0,080	411	79,1 (100)	45	0,08
+ 0,1 µm PCDF-Filter	57,5 ± 6,53	0,380 ± 0,113	410	79,9 (100)	44	0,07

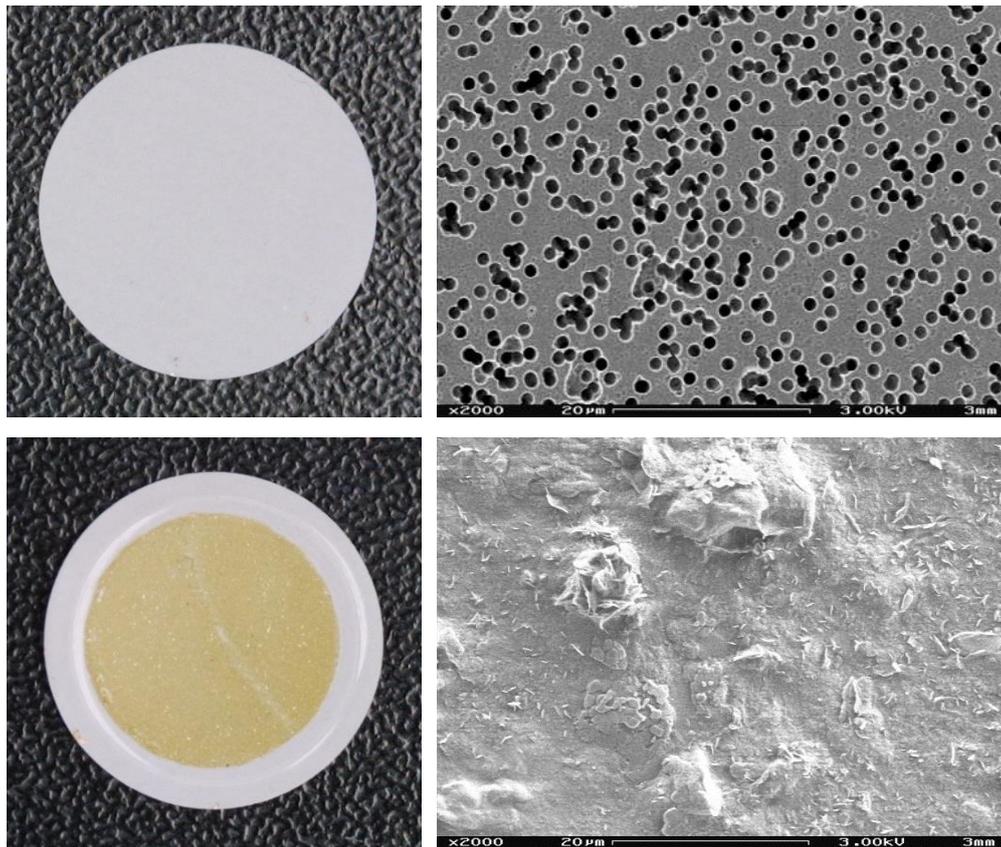


Abbildung 17: links) Foto und rechts) REM-Aufnahmen einer 1 μm Kernspurmembran (13 mm Durchmesser); oben) unbenutzten und unten) nach der Filtration von einer mit AgNP beladenen Waschwasserprobe

Die Untersuchungen mittels UV/Vis-Spektroskopie zeigten, dass bereits bei der Ausgangssuspension der charakteristische Plasmonenpeak von Silber wiederzufinden war. Dieser liegt bei allen Probenzuständen bei einer Wellenlänge von 410 nm, was einer mittleren Partikelgröße von 44 nm entspricht. Der Vergleich zwischen der unfiltrierten und filtrierten Probe zeigt, dass der Verlauf der UV/Vis-Spektren des reinen Silbers von der Absorption der Schwebstoffe überlagert wird. Durch die Filtration werden diese entfernt, was vor allem an der Änderung der Transmission im Bereich höherer Wellenlängen zu erkennen ist (siehe Abbildung 18). Die Transmission am Plasmonenpeak erhöht sich in Folge der Filtration mit einem 0,45 μm MCE-Spritzenfilter von 16,9 % auf 30,2 % bei einer optischen Weglänge von jeweils 4 mm. Der größte Anteil der Änderung lässt sich auf die Schwebstoffe zurückführen und nur ein geringer Teil auf die Austragung von AgNP. Mit abnehmender Maschenweite des Filters nimmt daher auch immer die Transmission leicht zu.

Aus der Lage des Plasmonenpeaks kann mit Hilfe des entwickelten Berechnungsprogramms für UV/Vis-Spektren die theoretische Partikelgröße und Konzentration berechnet werden. Danach ergeben sich für die filtrierte Washlösung beispielsweise Konzentrationen von 9,7 mg/L (0,45 μm MCE-Filter), 9,7 mg/L (0,22 μm MCE-Filter) und 10,0 mg/L (0,1 μm PVDF-Filter) unter der Annahme monodisperser AgNP.

Vergleichbare Untersuchungen wurden an dem 1. und 2. Spülwasser des Testsystems vorgenommen, die entsprechenden Ergebnisse sind in der Tabelle 9 sowie der Abbildung 18 aufgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass nach dem Waschprozess AgNP in den Wasch-

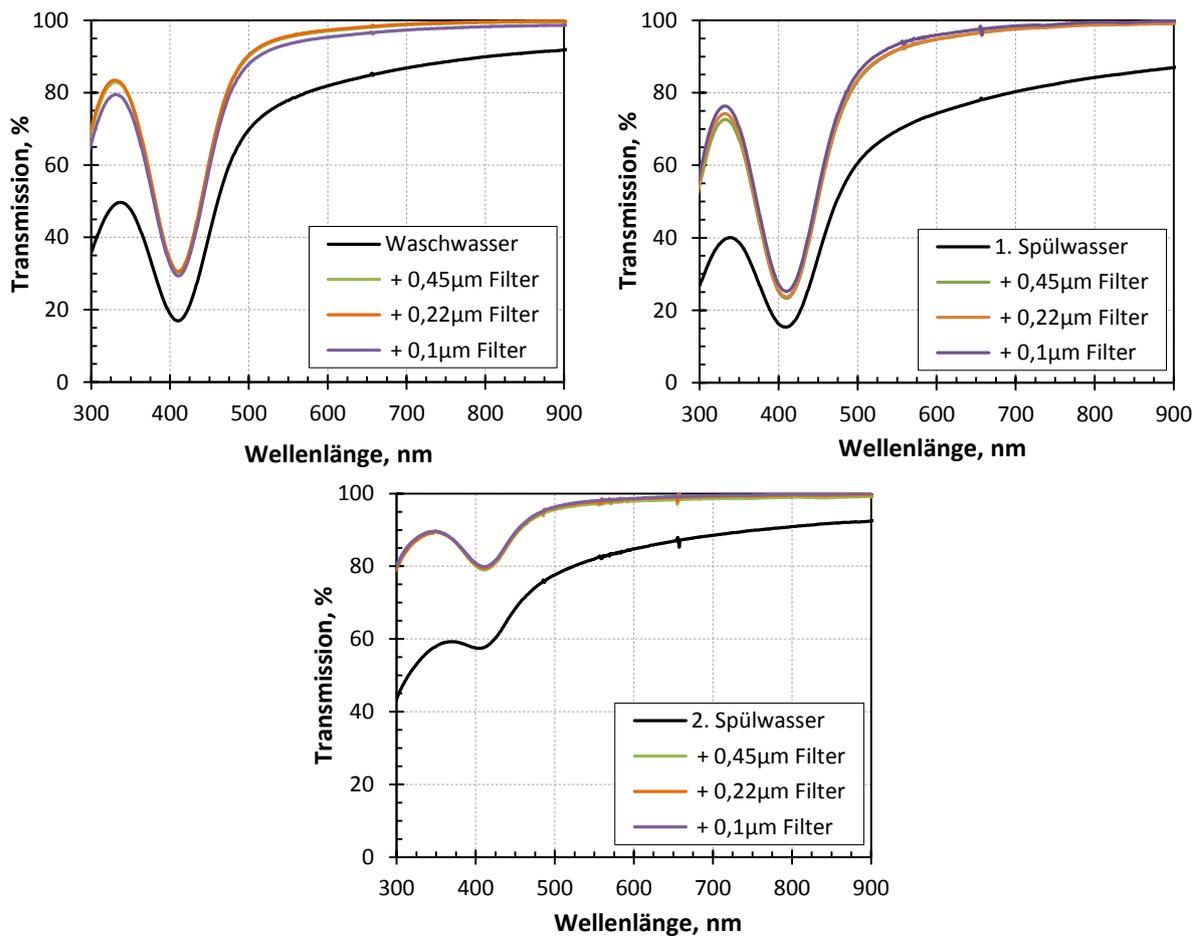


Abbildung 18: Gemessene UV/Vis-Spektren von Waschwasser (links ob.), Wasser nach dem 1. Spülgang (rechts ob.) und dem 2. Spülgang (unten); sowohl unbehandelt als auch nach der Aufbereitung durch Filtration

und Spülwässern enthalten sind. Dabei nahm die Silberbelastung mit dem Fortschritt des Waschprozesses ab. Im Waschwasser konnten noch ca. 10 mg/L partikuläres Silber nachgewiesen werden, wohingegen sich bereits im 1. Spülwasser die Konzentration auf ca. 1 mg/L und im 2. Spülwasser auf weniger als 0,1 mg/L reduziert hatte.

□ **Fazit**

Die Untersuchungen von Flüssigkeiten des Waschprozesses zeigten, dass:

- zur sicheren Detektion von Nanopartikeln eine Probenaufbereitung wie Filtration notwendig ist, dabei aber auch ein Austrag von den Nanopartikeln möglich ist,
- eine Identifizierung und Charakterisierung von AgNP mittels UV/Vis-Spektroskopie ab 100 µg/L möglich ist,
- eventuelle Fällungsprodukte wie AgCl oder Ag₂S, welche sich aufgrund der Waschmittelzusammensetzung bilden können, nicht von der UV/Vis-Spektroskopie detektiert werden und
- die DLS anfällig für Submikrometerpartikel (z. B. Fasern, Verschmutzung) ist und nur bedingt ohne Probenaufbereitung eingesetzt werden kann.

2 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens

Auf dem Gebiet der Charakterisierung und Exposition von Silber-Nanopartikeln in die Umwelt kann eine hohe nationale als auch internationale Aktivität beobachtet werden. Während der Projektlaufzeit wurden zahlreiche Studien publiziert. Im Folgenden sind relevante Studien und Artikel angeordnet nach: i) Stabilität und Verhalten von AgNP in einfachen Flüssigkeiten, ii) Stabilität und Verhalten von AgNP in komplexen Umweltmedien und iii) Freisetzung von Silberionen.

Stabilität und Verhalten von AgNP in einfachen Flüssigkeiten

- Baalousha et al. [21] untersuchte den Einfluss von verschiedenen Elektrolytarten (mono- und divalent) auf das Aggregationsverhalten von Citrat-beschichteten Silber-Nanopartikel. In dieser Studie wurde sowohl UV/Vis-Spektroskopie als auch dynamischen Lichtstreuung verwendet. Es wird explizit hervorgehoben, dass durch die zusätzliche Verwendung von UV/Vis-Spektren eine Verbesserung der Datenqualität und Interpretation im Vergleich zu anderen Studien erreicht wurde.

Zweiwertige Kationen (es wurde CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaSO_4 , MgCl_2 und MgSO_4 verwendet) haben einen um 50 – 65-fach stärkeren Einfluss auf die Aggregation der AgNP im Vergleich zu einwertige Kationen (hier: NaCl , NaNO_3 , Na_2SO_4). Bei Elektrolyten mit einwertigen Kationen gab es keine spezifische Ionenwirkung von Nitrat- und Sulfat-Anionen. Weiterhin wurde von Baalousha et al. festgestellt, dass Suwannee River Fulvosäure die Stabilität der verwendeten Citrat-AgNP erhöht und die kritischen Koagulationskonzentrationen zu höheren Elektrolytkonzentrationen für alle Arten von Elektrolyten verschiebt.

- Die Ergebnisse von Zhang et. al. [22] zeigen, dass die Aggregation von AgNP durch das Vorhandensein von gelöstem Sauerstoff im Flüssigkeitsmedium beeinflusst werden kann. Die Oxidation von Silber führt zu einem höheren Maß an Aggregation als ohne gelösten Sauerstoff. Dies wurde an verschiedenen Primärpartikelgrößen und Konzentrationen von Silber gezeigt. Diese Erkenntnisse sind wichtig für das Verständnis des Verhaltens von AgNP in aquatischen Umweltmedien, welche eine Vielzahl an gelösten Stoffen aufweisen.

Stabilität und Verhalten von AgNP in komplexen Umweltmedien

- Tejamaya et al. [23] untersuchte das Verhalten von unterschiedlich stabilisierten AgNP in künstlichen Umweltmedien in Bezug auf die akute und chronische Toxizität für Daphnien. Hierfür wurden die monodispersen 10 nm AgNP mit Citrat, Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Polyethylenglycol (PEG) beschichtet und deren zeitliche Änderung über 21 Tage mit Hilfe eines UV/Vis-Spektrometers verfolgt. Die ladungsstabilisierten Citrat-Silberpartikel waren generell weniger stabil und neigten somit stärker zur Agglomeration als die sterisch stabilisierten Partikel. Aufgrund der möglichen Silber-Chlor-Wechselwirkungen wurde ein Teil der Experimente unter Austausch von Chlor durch Nitrat bzw. Sulfat durchgeführt. Dies führte jedoch wiederum zu einer stärkeren Änderung der Partikelform und des Lösungsverhaltens. PVP-stabilisierte AgNP sind von den untersuchten Partikelsystemen die stabilsten und zeigten innerhalb des untersuchten Zeitraums keine Änderung der Partikelgröße, -form und Konzentration in 10-fach verdünntem Umweltmedium.

- Das Wasserforschungsinstitut des ETH-Bereiches (Eawag, Schweiz) hat unter dem Titel „Charakterisierung und Bilanzierung von Silberpartikeln in Abwasserreinigungsanlagen“ eine Studie über den Einfluss verschiedener Formen von Silber auf die Nitrifikationsleistung (Ammoniumabbau) von Belebtschlamm und das Verhalten in einer realen Abwasserreinigungsanlage durchgeführt [24], [25]. Diese Studie gehört zu einer Reihe von Untersuchungen (z. B.: Nanosilber in Fassadenbeschichtungen [26], Silberchlorid im Abwasser einer Wäscherei: Ökotoxikologische Beurteilung [27]) zur Einschätzung des potenziellen Risikos für Mensch und Umwelt (hier speziell für aquatische Systeme) durch das erhöhte Aufkommen von nanoskaligem Silber.

In den Versuchen wurden 1 und 100 mg/L Silber in unterschiedlichen Formen (Silbernitrat, metallisches Silber, partikuläres Silberchlorid und Nanosilber) zu Belebtschlamm aus realen Abwasserreinigungsanlagen gegeben. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Zugabe von 1 mg/L keinen, dagegen 100 mg/L für alle Silberformen einen signifikanten Effekt auf die ammoniumabbauenden Mikroorganismen bis hin zur vollständigen Hemmung der Nitrifikation hat. Die Autoren gehen davon aus, dass freie Silberionen durch Chlorionen, reduzierte Schwefelgruppen und organische Komplexbildner gebunden werden.

- Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Studie von Choi et.al. [28], bei der eine deutliche Hemmung der Nitrifikation bereits bei einer Silberkonzentration von 1 mg/L festgestellt wurde. Es muss jedoch beachtet werden, dass in diesem Fall aufgereinigter Belebtschlamm (ohne Chloride und Sulfide) verwendet wurde.
- In dem von Geranio et. al. [29] veröffentlichten Artikel wird der Einfluss von pH-Wert, grenzflächenaktiver Stoffe und Oxidanzien auf das Verhalten von AgNP während des Waschens diskutiert. Die Untersuchungen zeigen, dass unter für das Waschen typischen Bedingungen (pH 10), 10-mal geringere Mengen gelöst werden als bei pH 7. Allerdings können Bleichmittel wie Wasserstoffperoxid oder Peroxyessigsäure zu einem stark beschleunigten Auflösen des Silbers führen.

Freisetzung von Silberionen

- In dem Artikel von Zhang et. al. [30] wird der Einfluss der Partikelgröße von AgNP (beschichtet mit Citrat) auf die freigesetzte Menge an Silberionen untersucht. Dabei ließ sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Silberionenkonzentration zeigen – je kleiner die Partikel sind, desto größer ist die Freisetzungsrate an Silberionen.
- Von Beer et al. [31] diskutieren den Einfluss von Silberionen in Verbindung mit AgNP auf die Toxizität von kultivierten humanen Lungenzellen A549. Die Untersuchungen zeigten, dass Suspensionen mit einem höheren Anteil an Silberionen giftiger sind. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass bei hohen Silberionen-Fraktionen $\geq 5,5\%$ der partikelfreie Überstand dieselbe Toxizität wie die AgNP-Suspension aufweist, während bei niedrigem Silberionenanteil ($\leq 2,6\%$) die Suspensionen toxischer sind als ihre Überstand.
- Koch et al. [32] untersuchten ebenfalls den Einfluss von Silberionen und AgNP auf die Morphologie von A549-Zellen. Bei den Untersuchungen wurde eine Silberionen-selektive Elektrode eingesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass im Zellmedium die

Ionen durch schwefelhaltige Gruppen gebunden wurden, was sich in einer reduzierten Ionenaktivität an der Elektrode bemerkbar machte. Ab einer Ionenkonzentration von 30 μM wird die Zellmorphologie beeinflusst, dagegen konnte dies bei partikulärem Silber erst ab einer Konzentration von 200 μM festgestellt werden.

3 Erfolgte Veröffentlichungen

Das konzeptionelle Vorgehen sowie die gewonnenen Erkenntnisse aus dem Vorhaben wurden bisher als Bestandteil verschiedener Poster und Vorträge national als auch international präsentiert:

Tabelle 10: Poster (P) und Vorträge (V)

Datum	Veranstaltung	Titel
10./11.05.2011	1. DaNa-Clustertreffen, Frankfurt (Main)	Charakterisierung von Silber- Nanopartikeln in Flüssigkeiten (P)
13./14.03.2012	2. DaNa-Clustertreffen, Frankfurt (Main)	Charakterisierung von Silber- Nanopartikeln in Flüssigkeiten mittels UV/Vis-Spektroskopie (P)
28./29.02.2012	FA Partikelmesstechnik, Bad-Dürkheim	Charakterisierung von Nanopartikeln in Flüssigkeiten mittels UV/Vis-Spektroskopie (V)
14./15.01.2013	3. DaNa-Clustertreffen, Frankfurt (Main)	Kolloidale Stabilität von beschichteten Silber-Nanopartikeln in Flüssigkeiten (P)
23.-25.04.2013	PARTEC 2013, Nürnberg	Characterisation of size and stability of colloidal silver suspensions with uv/vis-spectroscopy (P)
12.12.2013	nanoForum 2013, Bönningheim	Partikelmesstechnik zur Charakterisierung von Waschwasser von mit Nanosilber ausgerüsteten Textilien (V)

Die Ergebnisse zu den Bodenversuchen werden im Rahmen des Jahrestreffens der ProcessNet-Fachgruppen „Partikelmesstechnik“ und „Grenzflächenbestimmte Systeme und Prozesse“ vom 1.-2. April 2014 in Form eines Vortrages dem interessierten Publikum vorgestellt.

Des Weiteren sind zu den Ergebnissen Beiträge in Fachzeitschriften (Environmental Science and Technology, Particle & Particle System Characterization, Journal of Nanoparticle Research oder dgl.) geplant. Erste Entwürfe hierzu sind bereits in Bearbeitung.

Literaturverzeichnis

- [1] F. Babick, A. Richter: Sound attenuation by small spheroidal particles due to visco-inertial coupling. *Journal of the Acoustical Society of America*, 119 (2006) 3, 1441-1448.
- [2] T. Kuntzsch, U. Witnik, M. Hollatz, M. Stintz, S. Ripperger: Characterization of slurries used for chemical-mechanical polishing (CMP) in the semiconductor industry. *Chemical Engineering & Technology*, 26 (2003) 12, 1235-1239.
- [3] S. Gabsch, B. Wessely, S. Ripperger, L. Steinke: *Dynamic Extinction Spectroscopy as a new method to investigate precipitation processes in micro scale*. In: VDI Berichte Nr. 1901, VDI Verlag GmbH, Düsseldorf; Band 1901.2 (2005), 1189-1193.
- [4] L. Hillemann, A. Zschoppe, R. Caldow, G. Sem, A. Wiedensohler: Ultrafine particle monitor for size-resolved number concentration measurements in atmospheric aerosols. *Journal of Aerosol Science*, 68 (2014), 14-24.
- [5] M. Vorbau, L. Hillemann, M. Stintz: Method for the characterization of the abrasion induced nanoparticle release into air from surface coatings. *Journal of Aerosol Science*, 40 (2009) 3, 209-217.
- [6] P. Fiala, D. Göhler, E. Buhr, T. Dziomba, T. Klein: *Realisierung und Optimierung von Präparationsmethoden für zuverlässige Größenmessungen mit AFM und TSEM*. DIN-INS Report, Technische Universität Dresden, Physikalisch-Technische Bundesanstalt Braunschweig, 2011.
- [7] K. Hund-Rinke, F. Marscheider-Weidemann, M. Kemper: *Beurteilung der Gesamtumweltexposition von Silberionen aus Biozid-Produkten*. Forschungsbericht 360 04 020 - UB-FB 001212, 2008.
- [8] V. Amendola, M. Meneghetti: Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV-vis Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C*, Vol. 113 (2009), pp. 4277-4285.
- [9] U. Kreibig, M. Vollmer: *Optical Properties of Metal Clusters*. Springer Verlag, Berlin 1995.
- [10] C.F. Bohren, D.R. Huffman: *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. John Wiley & Sons, New York, 1998.
- [11] C.L. Klein C.L., et al.: *NM 300 Silver Characterisation, Stability, Homogeneity*. JRC-Scientific and Technical Reports, Europäische Union, Luxemburg, 2011.
- [12] J. Köser, M. Engelke, A. Kück, E. Lesnikov, J. Arning, J. Thöming, J. Filser: *Ab-schätzung der Umweltgefährdung durch Silber-Nanomaterialien: vom chemischen Partikel zum technischen Produkt*. UMSICHT-Abschlussbericht von ÖKO/VdW, Bremen, 2013.
- [13] E.D. Palik: *Handbook of Optical Constants of Solids*. Academic Press, Boston, 1985.

- [14] P.B. Johnson, R.W. Christy: Optical Constants of the Noble Metals. *Physical Review B*, 6 (1972) 12, pp. 4370-4379.
- [15] H.J. Hagemann, W. Gudat, C. Kunz: Optical constants from the far infrared to the x-ray region. *Journal of the Optical Society of America*, 65 (1975) 6, 742-744.
- [16] B.T. Draine, P.J. Flatau: Discrete dipole approximation for scattering calculations. *Journal of the Optical Society of America A*, 11 (1994), 1491-1499.
- [17] R. Kaltofen, R. Opitz, K. Schumann, J. Ziemann: *Tabellenbuch Chemie*. Verlag Harri Deutsch, 13. Auflage, 1998.
- [18] Y. Li, J.J. Lehnhart, H.W. Walker: Aggregation Kinetics and Dissolution of Coated Silver Nanoparticles. *Langmuir*, 28 (2012), 1095-1104.
- [19] *ISE-Fibel: Die ionenselektive Messtechnik (ISE)*. Wissenschaftlich-technische Werkstätten (WTW) GmbH, Weilheim.
- [20] M. Hoppe, J. Utermann, G. Guggenberger, R. Mikutta, W. Duijnsveld: *Untersuchungen zur kolloidalen Stabilität und Retention von Silbernanopartikeln in Böden*. UMSICHT-Abschlussbericht der BGR, Hannover, 2014.
- [21] M. Baalousha, Y. Nur, I. Römer, M. Tejamaya, J.R. Lead: Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 454-455 (2013), 119-131.
- [22] W. Zhang, Y. Yao, K. Li, Y. Huang, Y. Chen: Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles. *Environmental Pollution*, 150 (2011), 3757-3762.
- [23] M. Tejamaya, I. Römer, R.C. Merrifield, J.R. Lead: Stability of citrate, PVP, and PEG coated Silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science & Technology*, 46 (2012), 7011-7017.
- [24] S. Zuleeg, M. Burkhardt, M. Boller, R. Kägi, B. Sinnet, J. Eugster, H. Siegrist: *Charakterisierung und Bilanzierung von Silberpartikeln in Abwasserreinigungsanlagen*. Abschlussbericht, 04/2010.
- [25] M. Burkhardt, S. Zuleeg, R. Kägi, B. Sinnet, J. Eugster, M. Boller, H. Siegrist: Verhalten von Nanosilber in Kläranlagen und dessen Einfluss auf die Nitrifikationsleistung in Belebtschlamm. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 22 (2010), 529-540.
- [26] M. Burkhardt, S. Zuleeg, J. Eugster, M. Boller, R. Kägi, B. Sinnet, H. Siegrist, R. Vonbank, S. Brunner, H. Simmler: *Nanosilber in Fassadenbeschichtungen: Auswaschung im Vergleich mit Titandioxid und organischen Bioziden*. Abschlussbericht, 12/2009.
- [27] D. Tropiano, C. Kienle, A. Gerhardt, S. Zulegg, M. Burkhardt, M. Boller: *Silberchlorid im Abwasser einer Wäscherei: Ökotoxikologische Beurteilung*. Abschlussbericht, 07/2009.

-
- [28] O. Choi, K.K. Deng, N.-J. Kim, L. Ross, R.Y. Surampalli, Z.Hu: The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42 (2008) 12, 3066-3074.
- [29] L. Geranio, M. Heuberger, B. Nowack: The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing. *Environmental Science & Technology*, 43 (2009), 8113-8118.
- [30] W. Zhang, Y. Yao, N. Sullivan, Y. Chen: Modeling the primary size effects of citrate-coated silver nanoparticles on their ion release kinetics. *Environmental Science & Technology*, 45 (2011), 4422-4428.
- [31] C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D.S. Sutherland, H. Autrup: Toxicity of silver nanoparticles - Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters*, 208 (2012), 286-292.
- [32] M. Koch, S. Kiefer, C. Cavalius, A. Kraegeloh: Use of a silver ion selective electrode to assess mechanisms responsible for biological effects of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 14 (2012) 2, 646-656.

Anhang

A. SOP zur Herstellung und Handhabung von Silbernanopartikel-Suspensionen

SOP zur Herstellung und Handhabung von Silbernanopartikel-Suspensionen

Ausgabedatum: 06.07.2011

Inhalt

Ziel	3
Herstellung von Applikationslösungen.....	4
Vorbehandlung der Ausgangssuspension	4
Verdünnung auf Anwendungskonzentration	4
Charakterisierung der Applikationslösung	5
Hinweise	6
Allgemeine Hinweise	6
Spezielle Hinweise	6
Erkenntnisse	7
Vermeiden von Trocknungsagglomeraten	7
Einfluss der Salzkonzentration	7
Einfluss des pH-Wertes.....	9

Ziel

Ziel dieser Standard Operating Procedure (SOP) ist die Herstellung von stabilen, reproduzierbaren Silbernanopartikel-Suspensionen. Damit soll erreicht werden, dass die unterschiedlichen Öko-Tests an den im Verbundprojekt UMSICHT teilnehmenden Instituten miteinander vergleichbar sind. Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen liegt dabei auf dem vom JRC¹ für das Sponsorship-Programm WPMN² bereitgestelltem Material NM-300K.

Wichtig für eine SOP ist, dass die geforderten Maßnahmen von jedem einzelnen Partner umsetzbar sind. Aus diesem Grund soll eine einfache aber trotzdem robuste Methode zur Herstellung und Kontrolle der Suspension entwickelt werden.

Des Weiteren werden allgemeine und spezielle Hinweise für den Umgang und der Probenpräparation von (Silbernanopartikel-) Suspension gegeben.

Zusätzlich zu den in diesem Dokument empfohlenen Bestimmungen sind die Schutzmaßnahmen und Handlungsanweisungen vom Hersteller und dem JRC zu beachten – siehe MSDS.

¹ Joint Research Centre

² OECD's Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN)

Herstellung von Applikationslösungen

Zur Herstellung von stabilen und reproduzierbaren Applikationslösungen werden die folgenden Schritte empfohlen:

1. Vorbehandlung der Ausgangssuspension
2. Verdünnung auf Anwendungskonzentration
3. Charakterisierung der Applikationslösung

Es wird empfohlen, sich vor der Herstellung der Suspensionen einen Versuchsplan mit den entsprechenden Proben und Rückstellproben aufzustellen, um die einmal geöffnete Ausgangssuspension möglichst vollständig und effektiv zu nutzen.

Vorbehandlung der Ausgangssuspension

Die Ausgangssuspension ist dadurch gekennzeichnet, dass die Probe in einer geringen Menge (2000 mg) und hohen Konzentration (10,16 Gew.%) dem Anwender vorliegt. Wegen ihrer hohen Feststoffdichte, können sich die Silbernanopartikel trotz ihrer geringen Größe am Boden der Suspension absetzen. Weiterhin konnte beobachtet werden (siehe Bild), dass es z.B. zur Bildung von Agglomeraten an der Gefäßwand kommen kann. Daher empfiehlt es sich, die Ausgangssuspension einer Vorbehandlung zu unterziehen.

1.1. Verdünnen

Füllen Sie die Probe im Originalgebinde (braune 15 ml Glasfläschchen vom JRC) mit deionisiertem Reinstwasser auf 2 Gew.-% auf.

1.2. Homogenisieren

Verschrauben Sie die Probenflasche und homogenisieren Sie das Gemisch durch Schütteln. Anschließend dispergieren Sie die Probe für 15 Minuten in der Ultraschallwanne zum Lösen von lockeren Agglomeraten und Luftblasen.

Verdünnung auf Anwendungskonzentration

Die Applikationslösung sollte aus der vorbehandelten 2 Gew.-%-igen Ausgangssuspension hergestellt werden.

2.1. Aufrühren / Homogenisieren

Wenn zwischen der Herstellung der 2 %-igen Ausgangssuspension und der Herstellung der Applikationslösung mehrere Stunden oder gar Tage liegen, sollte die Ausgangssuspension mit einem Magnetrührer im Originalgebinde vorher homogenisiert werden. Wenn dies nicht möglich ist, dann wiederholen Sie Schritt 1.2.

2.2. Verdünnen

Nun kann die die Ausgangssuspension auf die gewünschte Anwendungskonzentration im gereinigten Becherglas mit dem gewünschten Milieu (synthetisches Abwasser, Porenwasser, Leitungswasser) verdünnt werden.

Charakterisierung der Applikationslösung

Die Applikationslösung sollte möglichst direkt vor und nach der Anwendung hinsichtlich:

- 3.1. pH-Wert
- 3.2. Leitfähigkeit
- 3.3. Partikelgrößenverteilung mittels DLS
- 3.4. Konzentration (UV/Vis-Spektroskopie, Atomabsorptionsspektroskopie - AAS)

bewertet werden.

Die Charakterisierung der Suspensionen sollte nach einem einheitlichen Protokoll vorgenommen und dokumentiert werden. Vor der Nutzung und Charakterisierung der Suspension sollte diese 15 Minuten zur Vereinheitlichung gerührt werden.

Hinweise

Allgemeine Hinweise

Obwohl es für die unterschiedlichsten Materialien, Proben und Anwendungen immer spezielle Protokolle geben wird, lassen sich doch einfache und allgemeingültige Regeln für den Umgang mit Suspensionen aufstellen:

- Benutzen Sie ausreichend Material!
- Benutzen Sie saubere Gefäße und Geräte!
- Überfüllen Sie keine Gefäße! Wenn es geht, nutzen Sie nicht mehr als $\frac{3}{4}$ des zur Verfügung stehenden Volumens.
- Lassen Sie Sorgfalt bei der Probenahme walten! Denn das Ziel der Probenahme ist die Auswahl und der Erhalten einer Probe des (Ausgangs-)Materials, so dass die Teilstichprobe repräsentativ für das gesamte Material ist. Die Probenahme ist oft eine Quelle des Irrtums und wenn eine nicht repräsentative Stichprobe genommen wird, kann die nachfolgende Analyse einen falschen Schluss zulassen.
- Lagern Sie die Proben in verschließbaren Behälter und vermeiden Sie extreme Temperaturen und Drücke!
- Bei vielen biologischen Tests wird als nicht partikuläre Kontrolle eine Silbernitratlösung mit vergleichbarem Silbergehalt mit getestet. Aufgrund der hohen Lichtempfindlichkeit dieser Lösung ist unbedingt darauf zu achten, dass die Applikationslösung mit AgNO_3 immer möglichst frisch angesetzt wird und wenn, dann nur wenige Tage und vor allem im Dunkeln gelagert wird! Es kann sonst zu teilweise erheblichen Abweichungen zwischen Nominal- und Realkonzentrationen in diesen Lösungen kommen.

Spezielle Hinweise

Für das Handling und die Herstellung von Silbernanopartikel-Suspensionen wurden mit Hilfe von Untersuchungen und aus dem Literaturstudium folgende ergänzende Ratschläge zusammengetragen:

- Schützen Sie die Proben vor Licht!
- Verwenden Sie keine extremen Salzkonzentrationen!
- Verwenden Sie die Probe nicht im (stark) sauren Bereich ($\text{pH} < 4$)!

Erkenntnisse

Im Folgenden sind die für die Erstellung der SOP herangezogenen Beobachtungen und Untersuchungen aufgeführt.

Vermeiden von Trocknungsagglomeraten

Der Ausgangsbatch von Fa. rent-a-scientist wurde im Auftrag vom JRC zu 2000 mg Proben für das WPMN vereinzelt und in 15 ml Schraubbechergläschen unter Argon-Atmosphäre abgefüllt. Trotz sorgfältigem Probenhandlings lassen sich nicht immer Verunreinigungen und Trocknungseffekte vermeiden. Wie im Bild zu erkennen ist, können sich durch Austrocknung am Glas bzw. Kunststoffdeckel Agglomerate bilden.



Abbildung 1: NM-300K in Originalbehälter vom JRC mit angetrockneten Agglomeraten am Glas oberhalb des Etiketts - zur Verdeutlichung wurde die Helligkeit und der Kontrast des Bildes (rechts) verändert

Daher sollte ein sorgfältiger und zügiger Umgang mit den Proben erfolgen.

Einfluss der Salzkonzentration

Der Einfluss der Salzkonzentration auf die Stabilität und das Sedimentationsverhalten wurde mit Hilfe des LUMiSizer der Fa. L.U.M. untersucht. Hierfür wurde über ein Bereich von 5 Dekaden ($1 - 10^{-5}$ molare NaCl-Lösung) die Salzkonzentration bei einer Feststoffkonzentration von 0,5 Gew.-% variiert. Zusätzlich dazu wurde eine Probe mit deionisiertem Wasser vermessen.

0,5 Gew.-% AgNP-Suspension Salzkonzentration	Küvette-Nr. (s. Abbildung 2)	X _{10,3}	X _{50,3}	X _{90,3}
1 M NaCl-Lösung	8	-	-	-
0,1 M NaCl-Lösung	9	12 nm	16 nm	32 nm
0,01 M NaCl-Lösung	10	12 nm	16 nm	30 nm
0,001 M NaCl-Lösung	11	11 nm	15 nm	32 nm
0,0001 M NaCl-Lösung	12	11 nm	15 nm	32 nm
DI-Wasser	7	11 nm	15 nm	31 nm

Die Silbernanopartikel-Suspension mit 1 molarer NaCl-Lösung konnte nicht analysiert werden, da sie bereits mit der Zugabe der Salzlösung sich destabilisierte und die Partikel aussedimentierten (siehe Abbildung 2). In der vorangestellten Tabelle sind die Ergebnisse der Sedimentationsanalyse aufgeführt. Es lassen sich an den vermessenen Proben keine Unterschiede bei der Partikelgröße

erkennen. Die mittlere volumengewichtete Partikelgröße beträgt ungefähr 15 nm. Nach der Sedimentation im Zentrifugalfeld konnte eine Rückvermischung aufgrund von Diffusion in allen Proben außer bei 1 molarer NaCl-Lösung beobachtet werden (Abbildung 3).

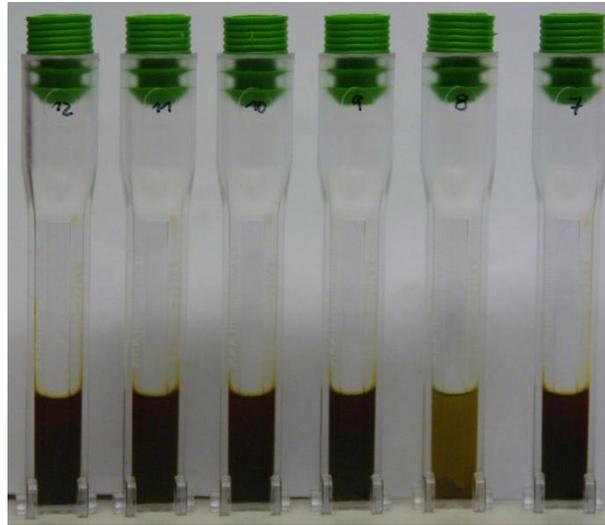


Abbildung 2: 0,5 Gew.-% Silbernanopartikel-Suspensionen (NM-300K) mit unterschiedlichem Salzgehalt (von links: 0,1 mM, 1 mM, 0,01 M 0,1 M, 1 M NaCl und DI-Wasser), vor der Zentrifugation - Proben in Messküvetten zur Partikelgrößenbestimmung durch Sedimentation im Zentrifugalfeld

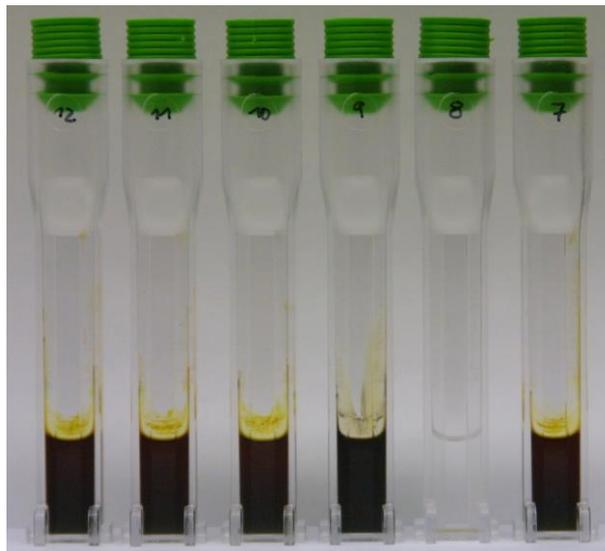


Abbildung 3: 0,5 Gew.-% Silbernanopartikel-Suspensionen (NM-300K) mit unterschiedlichem Salzgehalt (von links: 0,1 mM, 1 mM, 0,01 M 0,1 M, 1 M NaCl und DI-Wasser), Proben 1 Woche nach der Zentrifugation - Proben in Messküvetten zur Partikelgrößenbestimmung durch Sedimentation im Zentrifugalfeld

Anhand der Ergebnisse und des optischen Eindrucks kann festgehalten werden, dass Salze nur in sehr hohen Konzentrationsbereichen ($> 0,1$ molar) einen Einfluss auf die Silbernanopartikel (NM-300K) haben. Aufgrund der verringerten Doppelschicht können die Partikel agglomerieren und somit schneller sedimentieren – die Suspensionen sind in diesem Fall nicht mehr stabil.

Einfluss des pH-Wertes

Der Einfluss des pH-Wertes über einen Bereich von 2 – 10 auf die Stabilität der Silbernanopartikel wurde mit Hilfe des ZetaViews von der Fa. Particle Metrix bestimmt. Dafür wurde eine Ausgangssuspension von 1 mg/L in DI-Wasser hergestellt und probegeteilt. Der saure Bereich wurde mit HNO₃-Lösung und der basische Bereich mit LiOH-Lösung eingestellt. Der neutrale Bereich der Proben lag bei pH 4,9.

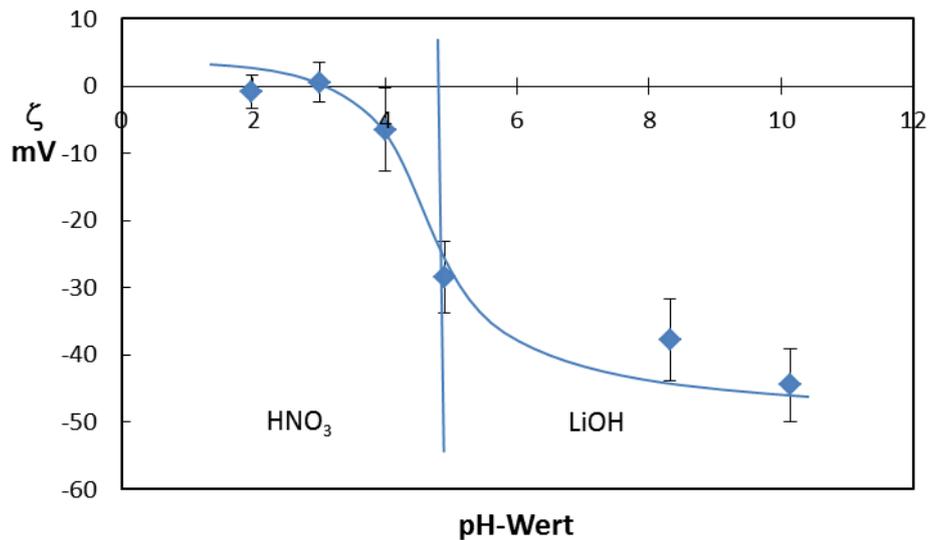


Abbildung 4: Silbernanopartikel-Suspensionen (NM-300K) bei unterschiedlichem pH-Wert durch Zugabe von HNO₃ bzw. LiOH, blaue, senkrechte Linie kennzeichnet den natürlichen Bereich ohne Zugabe von H⁺ oder OH⁻ Ionen

Es kann festgehalten werden, dass das Zeta-Potenzial der Silber-Suspensionen nach der Zugabe von H⁺ Ionen abnimmt und dadurch eine Destabilisierung der Proben zu erwarten ist.

B. SOP zur Charakterisierung von Silbernanopartikel-Suspensionen mit dem UV/Vis-Spektrometer

SOP zur Charakterisierung von Silbernanopartikel-Suspensionen mit dem UV/Vis-Spektrometer

Ausgabedatum: 10.02.2012

Inhalt

Inhalt	2
Spektroskopie und Plasmonenbande.....	3
Versuchsdurchführung	4
Messbedingungen	4
Wahl der geeigneten Messküvette	4
Mindestfüllhöhe einer Messküvette	6
Erstellung einer Kalibriergerade.....	6
Allgemeine Hinweise	8

Spektroskopie und Plasmonenbande

Bei der UV/Vis-Spektroskopie wird die Transmission von elektromagnetischen Wellen in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 200$ nm bis $\lambda \approx 1000$ nm (ultraviolettes und sichtbares Licht) gemessen. Die Transmission beschreibt das Verhältnis zwischen der Intensität des durchgelassenen (transmittierten) Lichtes zur Intensität des eingestrahlt Lichtes und ist abhängig vom Material und der Konzentration des suspendierten bzw. gelösten Stoffes.

Die in die Suspension eintretende Strahlung wird zum einen von den Partikeln absorbiert und zum anderen gestreut. Beim Auftreffen einer elektromagnetischen Welle auf das Partikel treten dessen Außenelektronen mit der Welle in Wechselwirkungen. Der absorbierte Anteil regt das Elektronengas auf der Oberfläche der Kolloidteilchen an. Es wird ein Wechselfeld induziert, welches die freien Elektronen im Leitungsband zum kollektiven Schwingen anregt (Plasmon). Die Partikel absorbieren das Licht einer bestimmten Wellenlänge in Abhängigkeit von ihrem Material, der Geometrie, Größe und dem Umgebungsmedium. Diese Absorption ist als sogenannte Plasmonenbande beobachtbar und gibt somit qualitativ Auskunft über die Partikelgröße.

In der folgenden Abbildung 1 sind beispielhaft gemessene Transmissionsspektren für Suspensionen mit unterschiedlich großen Silber-Nanopartikel bei gleicher Feststoffkonzentration abgebildet. Beim Vergleich der einzelnen Kurven kann sehr gut der Einfluss der Partikelgröße auf die Lage des Plasmonenresonanzpeaks (d.h. negativen Transmissionspeak) beobachtet werden.

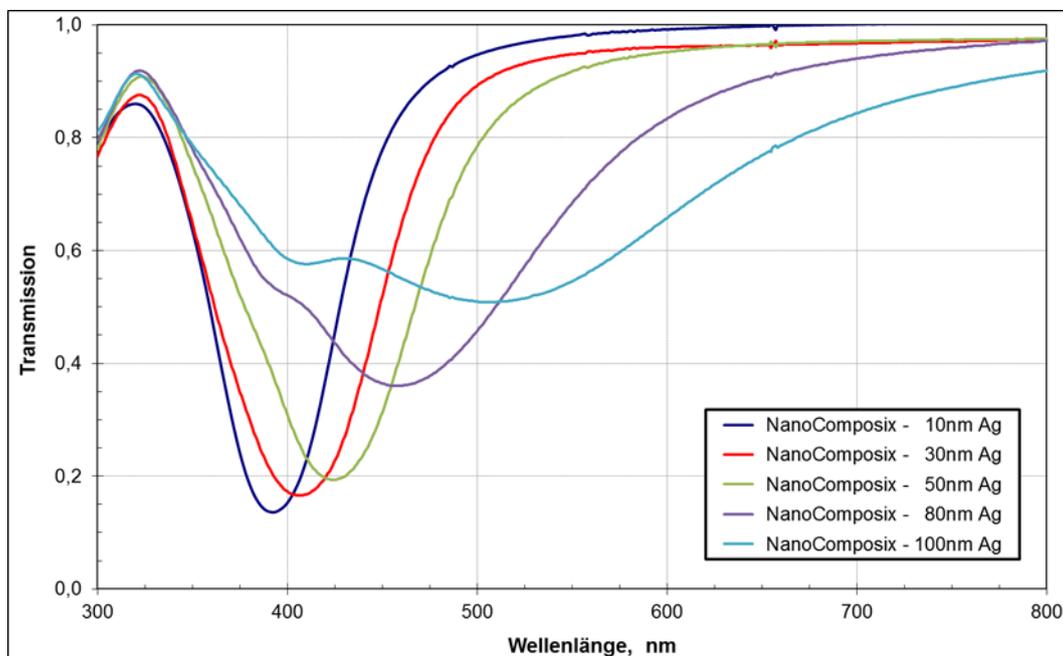


Abbildung 1: Transmissionsverlauf von Silber-Nanopartikelsuspensionen in Abhängigkeit von der Partikelgröße (10, 30, 50, 80 und 100 nm) bei konstanter Feststoffkonzentration (6,64 mg/L)

Versuchsdurchführung

Messbedingungen

Die Einstellmöglichkeiten und Messbedingungen sind stark vom eingesetzten Spektrometer und der Bediensoftware abhängig. Aus diesem Grund können hier nur Richtwerte angegeben werden.

Wellenlängenbereich λ :	mind. ab 300 nm bis 800 nm
Anzahl der Scans/Akkumulation:	mind. 100
Spaltbreite / Auflösung:	1 nm

Das Spektrometer und die Lichtquellen (üblicherweise gibt es für den UV- und den Vis-Bereich jeweils eine Quelle) sollten immer mindestens eine Stunde vor den geplanten Messungen angeschaltet werden (Aufwärmphase). Vor der Messung des Tages muss eine Dunkelmessung durchgeführt werden. Teilweise ist eine derartige Dunkelmessung, bzw. auch Basislinienbestimmung genannt, vor jeder Messung notwendig!

Es sollte stets eine Referenzmessung direkt zeitlich vor oder parallel (bei Zweistrahlphotometern) zu der Probenmessung erfolgen. Bei einem Einstrahlphotometer sollte die Referenzmessung und die Probenmessung mit der gleichen Küvette durchgeführt werden. Es ist darauf zu achten, dass dabei immer die Küvette in derselben Ausrichtung zur Strahlenquelle benutzt wird.

Als Referenzmedium sollte destilliertes Wasser verwendet werden. Wenn die Partikel in einer anwendungsspezifischen Flüssigkeit (Nährlösung, Waschwasser, synthetisches Abwasser, usw.) vermessen werden, sollte dies auf dem Protokoll vermerkt werden und die spezifische Flüssigkeit ohne Partikel (!) ebenfalls mit dem Spektrometer (Referenzmedium: destilliertes Wasser) vermessen werden.

Alle Messungen sollten möglichst bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Wenn möglich, sollte eine Angabe der Temperatur auf dem Messprotokoll erfolgen.

Wahl der geeigneten Messküvette

Zur Bestimmung von Transmissionsspektren im ultravioletten und sichtbaren Bereich eignen sich Küvetten aus Quarzglas (Kieselglas genannt). Einfache Glas- oder Kunststoffküvetten können nicht verwendet werden, da diese selbst Strahlen im ultravioletten Bereich absorbieren.

Um ein gut auswertbares Transmissionsspektrum zu erhalten, ist die Schichtdicke der Küvette geeignet zu wählen. Als Kriterium zur Festlegung des Einsatzbereiches von Küvetten mit unterschiedlichen Schichtdicken wurde die minimale Transmission im Bereich der Plasmonenbande verwendet. Dabei wurde festgelegt, dass ein gemessenes Spektrum im Bereich von $T(\lambda_{\min}) = 0,1$ und $0,9$ auswertbar ist. In diesem Bereich treten noch keine signifikanten Einflüsse durch Mehrfachstreuung auf und der Peak der Plasmonenbande ist deutlich bestimmbar. In der Abbildung 2 sind die Einsatzbereiche von Quarzglasküvetten mit typischen Schichtdicken (optische

Weglänge) von 2, 10 und 50 mm in Abhängigkeit von der zu erwartenden Größe und Konzentration bei Silberpartikeln in Wasser aufgetragen.

Messungen des Silbernanopartikel-Referenzmaterials (NM-300K) haben eine mittlere Partikelgröße mittels UV/Vis-Spektroskopie von 45 nm ergeben.

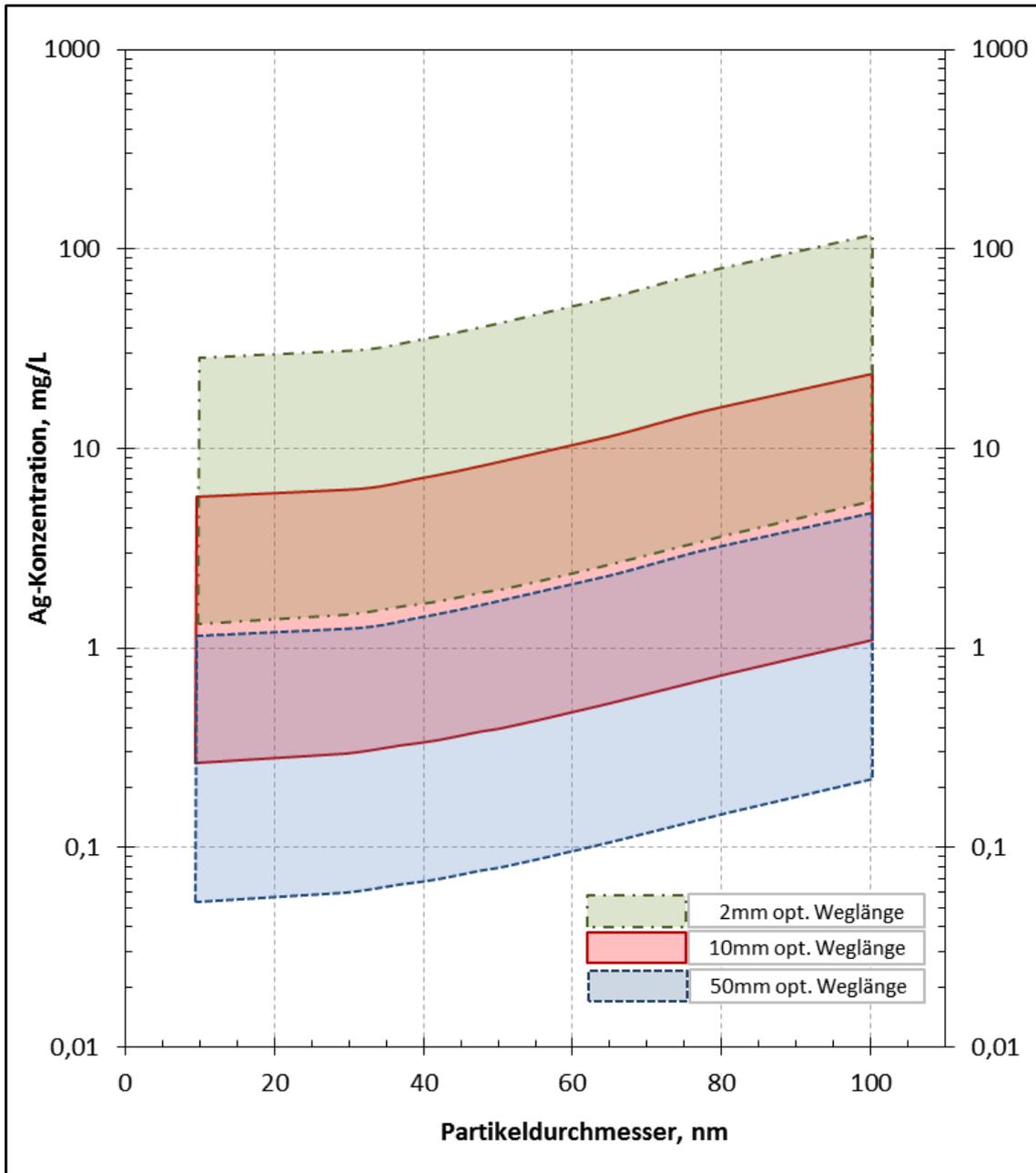


Abbildung 2: Einsatzbereich ($T(\lambda_{\min}) = 0,1 \dots 0,9$) von Quarzglasküvetten mit unterschiedlichen optischen Weglängen (Schichtdicke) in Abhängigkeit von der Konzentration und Größe der in Wasser dispergierten Silber-Nanopartikel

Mindestfüllhöhe einer Messküvette

Die Mindestfüllvolumen bzw. die Füllhöhe einer Küvette ist abhängig vom Messinstrument und dem darin gegebenen Strahlengang. Für eine fehlerfreie Messung muss der gesamte Messstrahl die Probe durchstrahlen. Geht nur ein Teil des Messstrahls durch die Probe führt das zum einen zu Ungenauigkeiten aufgrund von Beugungseffekten an der Flüssigkeitsoberfläche und zum anderen zu einer geringeren Transmission des Lichtes, da ein Teil des Messstrahls ungeschwächt die Probe passiert (siehe Abbildung 4).

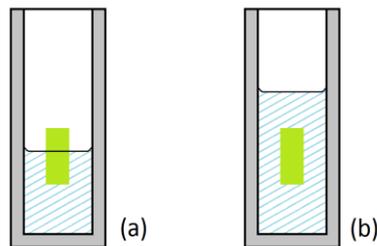


Abbildung 4: unzureichende (a) und ausreichende Füllhöhe (b) einer Messküvette für die Spektroskopie (grün ist der Querschnitt des Messstrahls)

Erstellung einer Kalibriergerade

Zur schnellen Bestimmung der Silber-Feststoffkonzentration aus den Transmissionsspektren (bzw. Extinktionsspektren) empfiehlt sich die Erstellung einer Kalibriergerade. Diese Methode ist jedoch nur sinnvoll, wenn sich die Partikelgröße (-verteilung) und damit das Spektrum der Silberpartikel nicht verändert.

Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgt jeweils für eine Stoffkombination (bestehend aus Feststoff, z.B. NM-300K und Flüssigkeit, z.B. Waschwasser nach ISO 15797) und eine Glasküvette. Dabei wird die Transmission bei mindestens 3 unterschiedlichen Konzentrationen in einem Bereich von $T(\lambda_{\min}) = 0,2$ bis $0,8$ gemessen. Die für Transmission $T(\lambda_{\min})$ in Abhängigkeit von der Konzentration erhaltenen Ergebnisse können mit einer Exponentialfunktion e^{Ax} angenähert werden. In der folgenden Abbildung ist dies beispielhaft für jeweils eine 2, 10 und 50 mm Quarzglasküvette und NM-300K suspendiert in deionisiertem Wasser abgebildet.

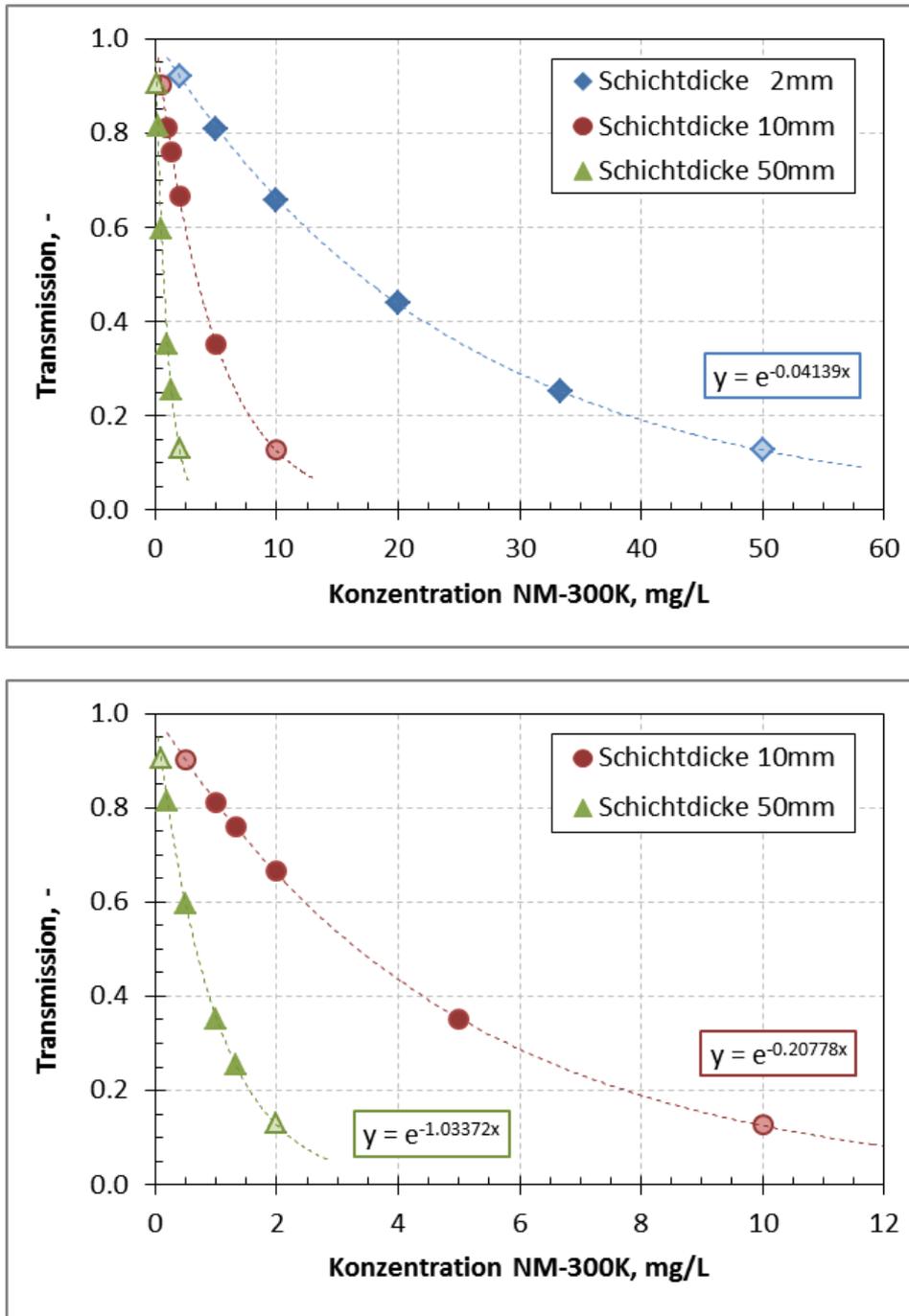


Abbildung 3: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Feststoffkonzentration von NM-300K (Silber-Nanopartikel) unter Verwendung von Quarzglasküvetten mit unterschiedlichen optischen Weglängen (Schichtdicke), Trends sind durch gestichelte Line dargestellt und ergeben sich aus den Messwerten im Bereich ($T(\lambda_{\min}) = 0,2 \dots 0,8$)

Allgemeine Hinweise

Um mögliche spätere Widersprüche ausschließen zu können, sollten vor den eigentlichen Messungen Voruntersuchungen/Messungen mit bekannten Stoffsystemen (Größe und Konzentration) durchgeführt werden. Die gemessenen Spektren können dann mit theoretischen Spektren verglichen und die Ergebnisse auf ihre Richtigkeit hin geprüft werden. Zudem kann dadurch der Umgang mit dem Gerät sowie der Messprozedur geübt werden.

Folgende Hinweise sollten zur Vermeidung von Fehlern durch optische Einflüsse wie z.B. Kratzern, Fingerabdrücken und Luftblasen weiterhin beachtet werden:

- Setzen Sie die Küvetten immer in derselben Ausrichtung in Bezug auf die Strahlungsquelle in die Halterung!
- Die Küvetten nicht an den optisch aktiven Flächen anfassen!
- Zur Vermeidung von Trocknungsrändern sollten die Küvetten stets mit fusselfreien, weichen Tüchern außen abgewischt werden!
- Es sollten Gasblasen und Niederschlag (z.B. durch Kondensation) in und an den Küvetten vermieden werden!
- Es sollten keine Küvetten mit Kratzern oder Defekten verwendet werden!

C. Ergebnisse zum Verhalten von Silbernanopartikeln in einfachen Medien

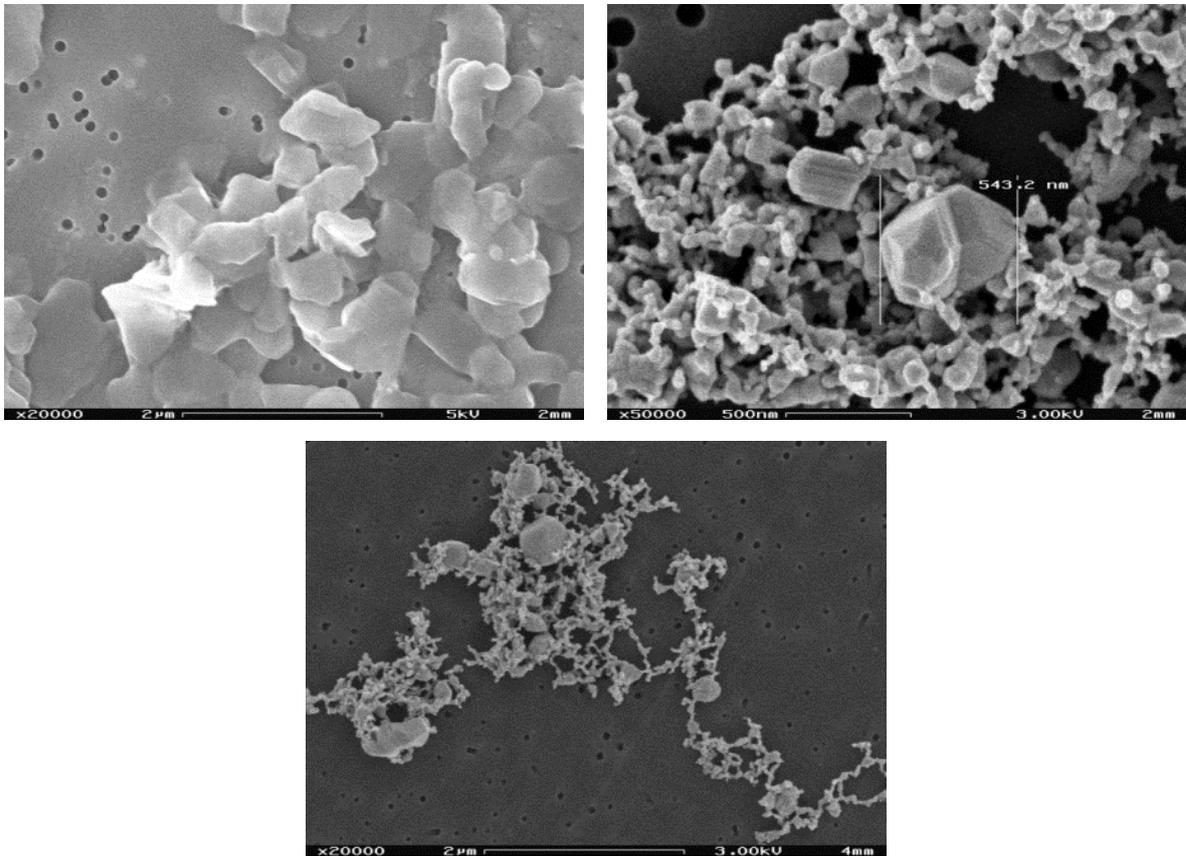


Abbildung 19: REM-Aufnahme des Rückstands von NM-300k (links ob.), AgCitrate (rechts ob.) und AgTannic (unten) in 0,1 molarer CaCl_2 -Lösung

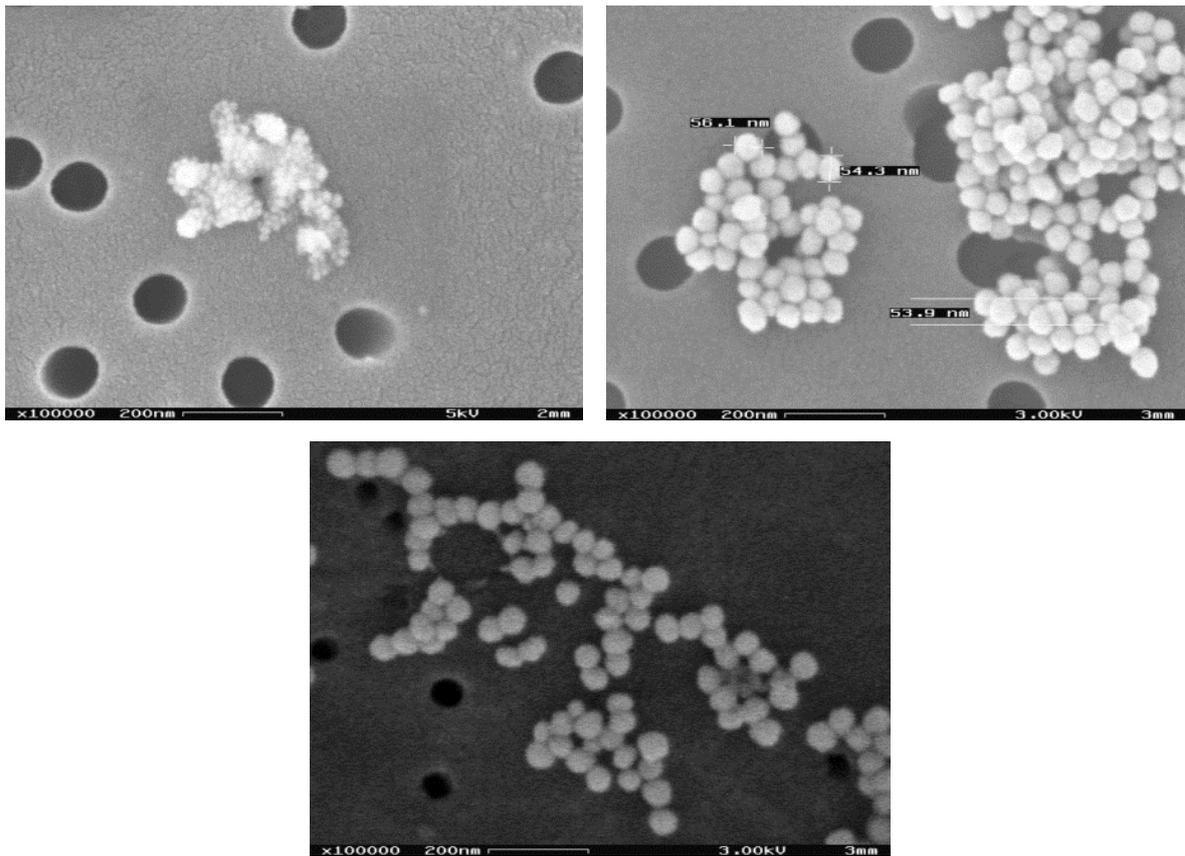


Abbildung 20: REM-Aufnahme des Rückstands von NM-300k (links ob.), AgCitrate (rechts ob.) und AgTannic (unten) in 0,1 molarer NaNO_3 -Lösung

D. Ergebnisse zu den Boden-Wasser-Untersuchungen



Abbildung 21: Bodeneluat nach den Aufreinigungsschritten mit (1) 0,45 μm MCE-, (2) 0,1 μm PVDF-Spritzenfilter und (3) 3000 dalton Zentrifugenkonzentrator; links ob.) Refesol, rechts ob.) Gley, links mi.) Gley-Podsol, rechts mit.) Parabraunerde und unten) Parabraunerde Haftenäsepsudogley

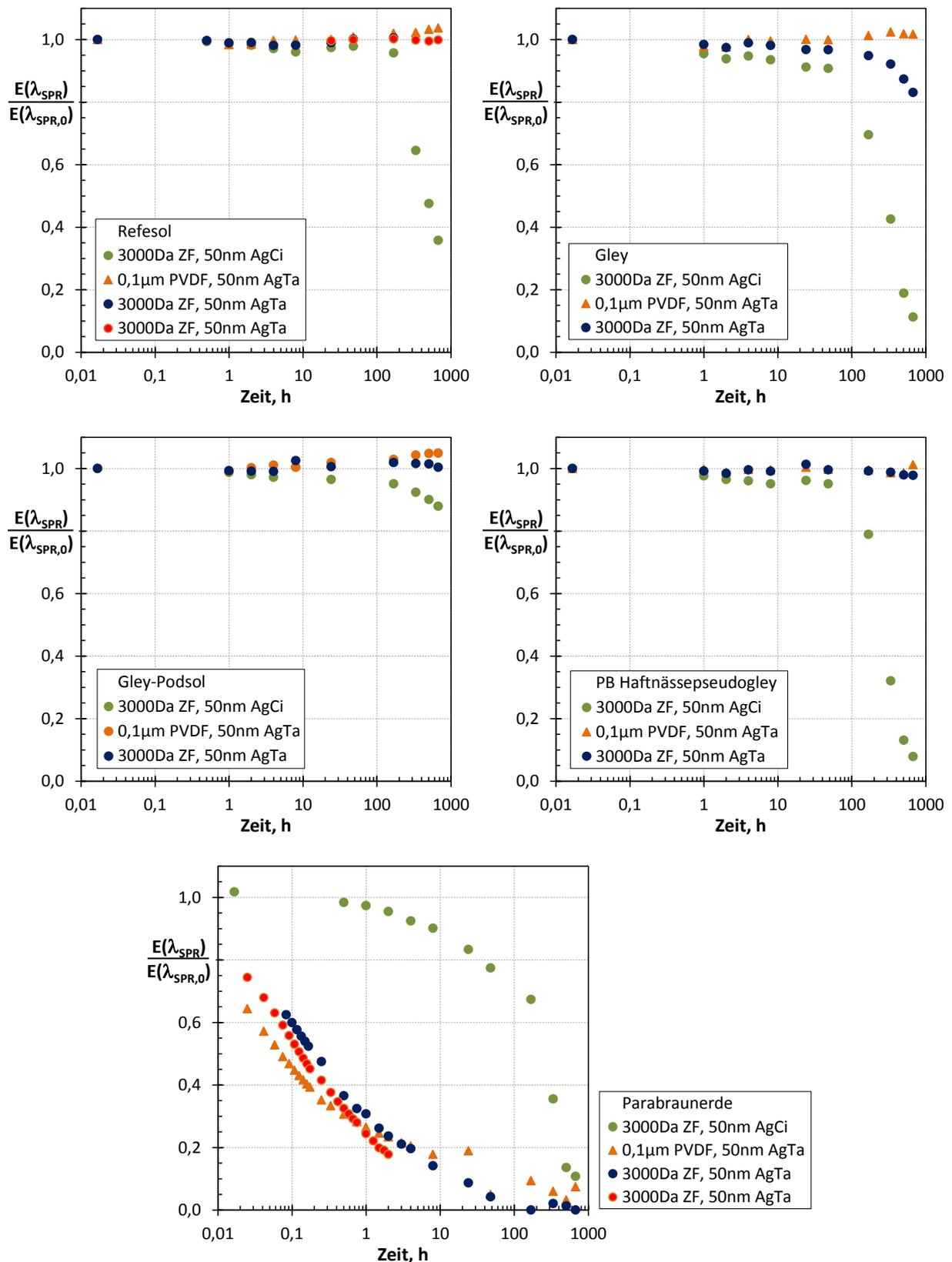


Abbildung 22: Verhalten von Citrat (AgCi) und Gerbsäure (AgTa) stabilisierten AgNP in den fünf verschiedenen Bodeneluat nach unterschiedlichen Aufreinigungsschritten anhand der Änderung des Plasmonenpeaks der Primärpartikel

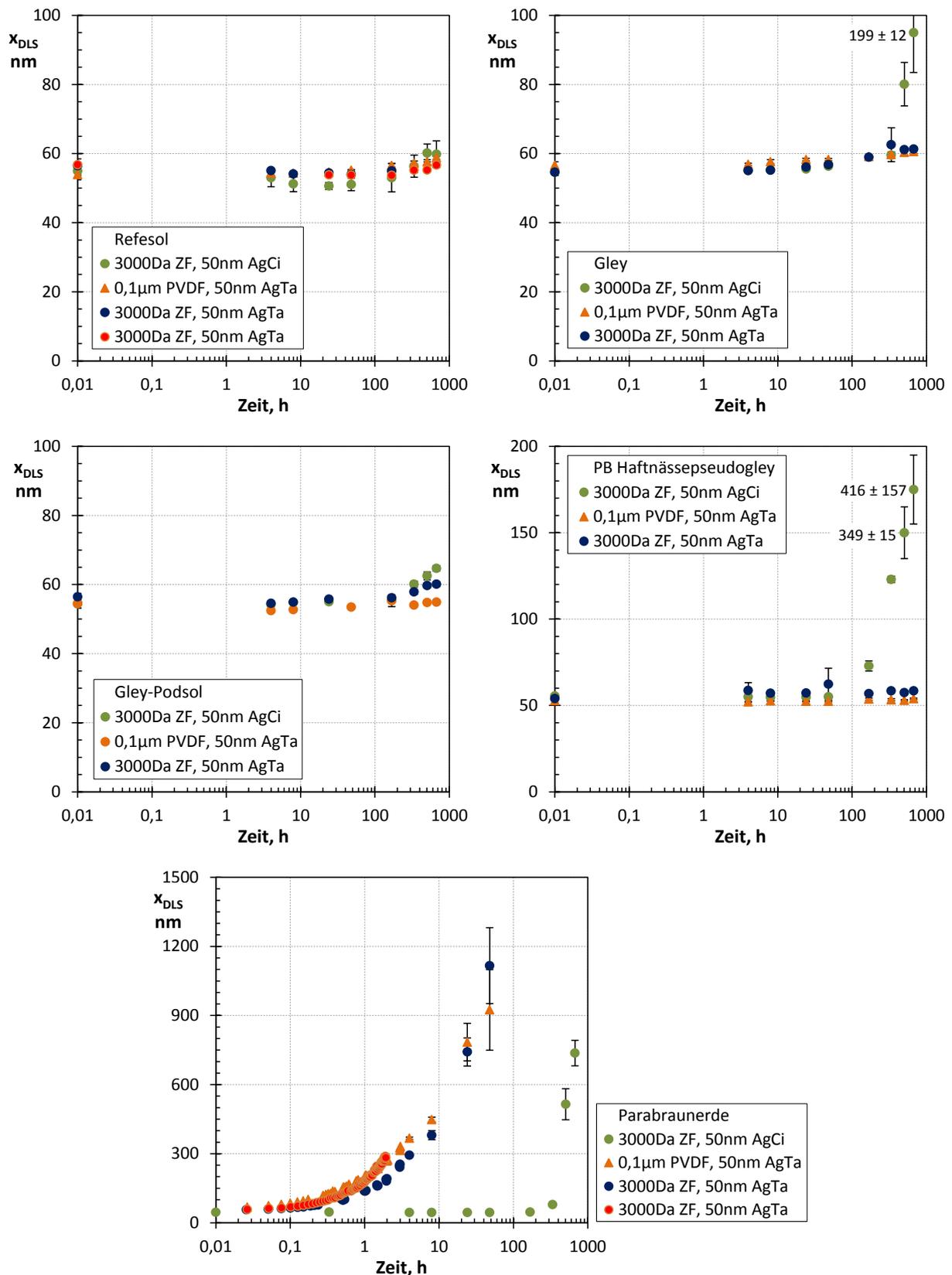


Abbildung 23: Verhalten von Citrat (AgCi) und Gerbsäure (AgTa) stabilisierten AgNP in den fünf verschiedenen Bodeneluat nach unterschiedlichen Aufreinigungsschritten anhand der mittleren intensitätsgewichteten Partikelgröße x_{DLS}

E. Verantwortung

Projektbearbeiter

Dipl.-Ing. André Nogowski

Projektleiter

Prof. Dr.-Ing. habil. Michael Stintz