



Umwelt- und Gesundheitsaspekte der Nanotechnologie



analytik



Umwelt- und Gesundheitsaspekte der Nanotechnologie

Impressum

Umwelt- und Gesundheitsaspekte der Nanotechnologie
Fachtagung des LfU am 27.10.2015

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)
Bürgermeister-Ulrich-Straße 160
86179 Augsburg
Tel.: 0821 9071-0
Fax: 0821 9071-5556
E-Mail: poststelle@lfu.bayern.de
Internet: www.lfu.bayern.de

Redaktion:

LfU Referat 12

Bildnachweis:

Bayerisches Landesamt für Umwelt / Autoren

Druck:

Eigendruck Bayer. Landesamt für Umwelt
Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier.

Stand:

Oktober 2015

Der Tagungsband steht auch als PDF-Datei zum kostenfreien Download zur Verfügung: www.bestellen.bayern.de (Kategorie Umwelt und Verbraucherschutz).

Diese Druckschrift wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Sofern in dieser Druckschrift auf Internetangebote Dritter hingewiesen wird, sind wir für deren Inhalte nicht verantwortlich.

Inhaltsverzeichnis

Regulierung von Nanomaterialien (Stand Oktober 2015)	5
Dr. Anke Jesse, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit, Berlin	
Der Weg zu zuverlässigen Resultaten in der Nanotoxikologie	8
Dr. Matthias Rösslein, Empa – Materials Science and Technology, St. Gallen (Schweiz)	
Cloud Point Extraktion als Schlüssel für die Bestimmung von Silber-Nanopartikeln in Umweltproben	11
Prof. Dr. Michael. Schuster, Technische Universität München	
Mobilität von Nanopartikeln in der Umwelt	19
Dr. Marina Maier, Bayerisches Landesamt für Umwelt, Augsburg	
Vorkommen von Nanopartikeln in wässrigen Umweltproben	21
Dr. Martin Wegenke, Bayerisches Landesamt für Umwelt, Augsburg	
Umweltverhalten und -effekte von Kohlenstoffnanoröhrchen (CNT) und Nano-Titandioxid (Nano-TiO₂)	23
Andreas Schäffer, Michael P. Hennig, Stefan Rhiem, Anne Simon, Anne Wyrwoll, Hanna Maes, RWTH Aachen University	
Nanoabfälle – gibt es ein Problem?	26
Dr. Julia Vogel, Umweltbundesamt	
Vergleichende Inhalationstoxizität verschiedener Nanopartikel	29
Lan Ma-Hock, Volker Strauß, Sibylle Gröters, Bennard von Ravenzwaay, Robert Landsiedel, Experimentelle Toxikologie und Ökologie, BASF SE	
Nanopartikel in Lebensmitteln und Kosmetika	32
Richard Winterhalter, Silvio Dietrich, Wolfgang Matzen, Marina Sysoltseva und Hermann Fromme, Bayer. Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)	
Tagungsleitung / Referenten	34

Regulierung von Nanomaterialien (Stand Oktober 2015)

Dr. Anke Jesse, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit, Berlin

Die Nanotechnologie als breit eingesetzte Querschnittstechnologie sinnvoll zu regulieren, stellt an die Europäische Kommission, das Europäische Parlament und die Mitgliedstaaten mit ihren vollziehenden Behörden eine Herausforderung dar, der es sich zu stellen gilt.

Die europäische Chemikalienverordnung REACH

Während in sektoralen Bereichen wie dem Kosmetik- und Lebensmittelbereich die Regulierung fortgeschritten ist, fehlt bislang im zentralen Stoffsicherheitsbereich in der europäischen Chemikalienverordnung REACH die Anpassung an Nanomaterialien (NM) völlig.

Die ist umso misslicher, als nunmehr eine rechtsverbindliche Regulierung für die letzte und niedrige Tonnage 2018 nicht mehr erreicht werden kann. Ob dies bewusst von der Europäischen Kommission (KOM) gewollt ist, kann nicht mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit gesagt werden. Die Mitgliedstaaten, die sich für eine zeitnahe Anpassung der europäischen Chemikalienverordnung ausgesprochen hatten, sind verwundert. Vorschläge einzelner Mitgliedstaaten und Behörden, wie eine Anpassung erfolgen könnte, liegen der KOM seit mehreren Jahren vor. Das lange Zögern der KOM ist umso erstaunlicher, als man sich einig ist, dass REACH grundsätzlich geeignet ist, auch NM zu regulieren.

Mangels eines offiziellen Vorschlags der KOM hat eine Ressortabstimmung zur notwendigen Anpassung bisher nicht stattfinden können. Aus Sicht der deutschen Bundesoberbehörden UBA, BAuA und BfR, die der KOM einen Textvorschlag zu Anpassung für die Diskussion vorgelegt haben, sind die folgenden Punkte notwendig:

- Aufnahme der Definition (mindestens in die Anhänge)
- Nanomaterialien sind eine besondere Form eines Stoffes (keine eigenständigen Stoffe)
- Transparente Darstellung der einzelnen Nanoformen im Dossier und Stoffsicherheitsbericht
- Umfangreiche Charakterisierung der physikalisch-chemischen Eigenschaften
- Vereinfachte Registrierung ab 100t/a (Daten zur physikalisch-chemischen Eigenschaften)
- Vorziehen von Information Anforderungen auf nächstniedrige Tonnagegrenze, eher Information über Langzeitwirkung
- Stoffsicherheitsbericht ab 1t/a

Was die KOM letztendlich vorlegen wird, bleibt abzuwarten. Ob das – wie von ihr mehrfach angekündigt – noch in 2015 erfolgen wird, ist unwahrscheinlich.

Eine nicht zu unterschätzende Herausforderung ist die rechtliche Einstufung von gecoateten und oberflächenfunktionalisierten NM sowie von völlig neu designten NM, die insbesondere im Medizin Bereich eingesetzt werden. Hier drängt sich die Frage nach einer Einstufung als Stoff „sui generis“ auf. Eine Antwort dazu ist bislang offen.

Stoffbewertung unter REACH

Die deutschen Bundesoberbehörden planen für die kommenden Jahre die Stoffbewertungen von ZnO, MWCNT, CeO₂. Holland führt eine Stoffbewertung für Siliziumdioxid (SiO₂) und Silber (Ag) durch. Frankreich hat die Stoffbewertung von Titandioxid (TiO₂) angemeldet, wartet noch auf die Ergebnisse der Bewertung durch die ECHA hinsichtlich der Vollständigkeit der Daten im Dossier.

Die Registranten von SiO₂ und TiO₂ haben Widerspruch gegen die Entscheidung der ECHA zu weiteren Datenanforderungen für SiO₂ und TiO₂ erhoben. Der Widerspruchsbescheid der ECHA wird bezüglich der Datenanforderungen wegweisend sein.

Andere Verordnungen der KOM

In der Biozid Verordnung ist die Definitionsempfehlung der Kommission übernommen worden. Es besteht eine Kennzeichnungspflicht und gesonderte Bewertung von NM. Auch in der Kosmetik Verordnung besteht eine Kennzeichnungspflicht.

In der Pflanzenschutz Verordnung besteht keinerlei Vorgaben hinsichtlich NM. Dies gilt auch für die Tier- und Humanarzneimittel.

Im Bereich der Medizinprodukte wird derzeit eine Regulierung bezüglich NM, in der Novel Food Verordnung die Definition verhandelt. Die Lebensmittelinformationsverordnung hat eine Definition und Kennzeichnungspflicht für NM aufgenommen. Hier besteht allerdings eine besondere Herausforderung hinsichtlich der Definition.

Herausforderung Nanodefinition

Rechtssicherheit beginnt mit einer verbindlichen Definition.

Die KOM hatte Ende 2011 eine Definitionsempfehlung mitgeteilt und eine Überprüfung für 2014 angekündigt. Ob diese noch in diesem Jahr erfolgen wird und Änderungen vorgenommen werden, ist offen.

In einigen Regelwerken ist diese Empfehlung übernommen worden, in anderen wird die rechtsgültige Definition an die Empfehlung angepasst. Dies ist insbesondere deshalb notwendig, um nicht in einem Sektor eine Substanz als Nanomaterial laut Definitionsempfehlung vorliegen zu haben und in einem anderen Sektor bei Einsatz der Substanz laut Definition des Sektors dasselbe Material nicht mehr als Nanomaterial bewerten zu können. Das ist derzeit in der Lebensmittelinformationsverordnung der Fall. So ist zum Beispiel E 551 (Silica in nanoskaliger Form) laut Definitionsempfehlung der Kommission ein Nanomaterial, während es nach der Definition der eben genannten Verordnung nicht als Nanomaterial gewertet werden kann. Damit unterliegt es dann nicht der Kennzeichnungspflicht. Dieses Ergebnis ist weder für die Industrie, Behörden noch Verbraucher kommunizierbar und kann nicht gewollt sein. Wie die künftige Definition bei der derzeit in Abstimmung befindlichen Novel Food Verordnung ausfallen wird, bleibt abzuwarten.

Markttransparenz der KOM

Das Europäische Parlament forderte 2009 die KOM auf, vor Juni 2011 ein öffentlich zugängliches Verzeichnis der Arten von NM und ihrer Anwendungen auf dem europäischen Markt aufzustellen. Daraufhin beauftragte die KOM eine Folgenabschätzung.

Die Signale der Generaldirektion Growth deuten heute darauf hin, dass es kein Register eher eine „Beobachterstelle“ geben wird, die aktiv Daten zusammen trägt.

Nationale Register

Nationale Register gibt es bisher in Frankreich, Dänemark und Belgien. Bisher hat Italien ein freiwilliges im Gespräch. Schweden entwickelt derzeit einen Vorschlag für ein nationales Register. Die Niederlande sprechen sich für ein europäisches Register aus, um Doppelpflichten zu vermeiden.

In Deutschland forderte im Juli 2013 der Bundesrat die Bundesregierung auf, sich nachdrücklich für die Schaffung einer Nano-Produktdatenbank auf EU-Ebene einzusetzen. Ein eigenes nationales Register ist in Deutschland nicht durchsetzbar.

Messmethoden und Analytik

Trotz bestehender Regulationen und Kennzeichnungspflichten besteht die Herausforderung in der Entwicklung und Anwendung von geeigneten, einheitlichen Mess- und Analyseverfahren. Nur damit sind die Voraussetzungen geschaffen, die rechtlichen Verpflichtungen durchzusetzen.

Fazit

NM stellen auch in den kommenden Jahren eine nicht zu unterschätzende Herausforderung auf allen Ebenen dar.

Der Weg zu zuverlässigen Resultaten in der Nanotoxikologie

Wie erhält man robuste und vergleichbare Ergebnisse bei Nano-Bio-Tests?

Dr. Matthias Rösslein, Empa – Materials Science and Technology, St. Gallen (Schweiz)

Die neuartigen Eigenschaften von Nanomaterialien, die dank intensiver Forschungs- und Entwicklungsarbeiten schrittweise in verschiedensten Anwendungsgebieten eingesetzt werden, erfordern eine umfangreiche und zielgerichtete Abklärung allfälliger gesundheitlicher Risiken. Dementsprechend entwickelt sich die Erforschung der Sicherheit von Nanopartikeln in eines der Trendgebiete der Naturwissenschaften. Damit einhergehend ist ein drastischer Anstieg an wissenschaftlichen Publikationen zu beobachten, die aber keinen Erkenntnisgewinn mit sich bringen, im Gegenteil mit ihren sich widersprechenden Aussagen für Verwirrung sorgen¹. Dies verursacht eine generelle Verunsicherung der am Einsatz von Nanomaterialien forschenden Industrie und der breiten Öffentlichkeit, was entsprechend die Weiterentwicklung des Gebiets zurückbindet. Zudem verhindern die sich widersprechenden Forschungsergebnisse eine effektive Regulierung dieser zukunftssträchtigen Materialien mit vielversprechenden neuen Eigenschaften.

In mehreren Veröffentlichungen¹⁻⁴ wurden die möglichen Ursachen der widersprüchlichen Resultate untersucht und besprochen. Dabei wurden unterschiedliche Ursachen aufgedeckt, die über gezielte Maßnahmen behoben werden sollten. Bereits durchgesetzt hat sich die von Krug & Wick⁵ geforderte, umfangreiche Charakterisierung der untersuchten Nanomaterialien. Die Liste der physikalischen und chemischen Parameter ist umfangreich, da bis anhin der Zusammenhang zwischen den einzelnen Parametern und deren Einfluss auf biologische Systeme sich nicht mit einfachen Gleichungen beschreiben lässt. Zudem lässt sich nicht schlüssig zeigen, dass die bis anhin gemessenen Parameter ausreichend sind.

Die Veröffentlichungen zeigten zudem, dass bei vielen der durchgeführten *in vitro* Experimente zur akuten Toxikologie der Nanopartikel wichtige Kontrollen fehlen. Dies verhindert eine eindeutige Beurteilung der Funktionstüchtigkeit der entsprechenden Analyse, was für Experimente mit lebenden Krebszelllinien entscheidend ist. Diese Methoden lassen sich nur beschränkt standardisieren, da sie komplexen, biologischen bedingten Schwankungen unterliegen.

Dieser Vortrag zeigt auf, wie mit Hilfe der Grundsätzen der Metrologie^a, die in anderen Fachbereichen, wie der analytischen Chemie, bereits sehr erfolgreich eingesetzt werden, die Funktionstüchtigkeit und damit die Robustheit und Vergleichbarkeit der Resultate von *in vitro* akut toxikologischen Experimenten erreicht werden kann.

Abbildung 1 (wg. fehlender Bildrechte nicht vorhanden) zeigt die drei Grundlagen der Metrologie; Rückführbarkeit⁶, Messunsicherheit⁷ und Validierung⁸. Der dreibeinige Stuhl symbolisiert weiter, dass zwischen diesen drei Grundlagen ein enger Zusammenhang besteht. Ohne Rückführbarkeit und Validierung kann keine Messunsicherheit abgeschätzt werden, während eine Beurteilung der Ergebnisse aus der Validierung nicht ohne Rückführbarkeit und Messunsicherheit möglich ist. Die Rückführbarkeit führt in

^a Def.: Wissenschaft vom Messen und ihre Anwendung

einer Messung die Skala ein und erlaubt die eigentliche Quantifizierung. Die Messunsicherheit schätzt den Bereich ab, wo die Ergebnisse von wiederholten Messungen liegen können. Dieser Bereich an Messwerten bildet die Voraussetzung für den Vergleich von Messresultaten. Während bei der Validierung eines Messverfahrens umfassend untersucht wird, dass die direkten Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern der Gleichung der Messgröße und der Messgröße selber gegeben sind und keine signifikanten Störungen vorliegen. Oder in anderen Worten formuliert, dass wirklich das gemessen wird, was gemessen werden sollte.

Diese drei Grundsätze werden am Beispiel des MTS-Assays^b, dessen Durchführung schematisch in Abbildung 2 (wg. fehlender Bildrechte nicht vorhanden) zusammengefasst ist, einzeln ausgeführt. Die Rückführung einer Messung auf die Grundeinheiten des Internationalen Einheitensystems war bis anhin eine wenig beachtete Anforderung für *in vitro* Experimente. Der Dosis-Wirkungs-Zusammenhang wird bei einer Untersuchung von kleinen Molekülen über die Reinheit der Verbindung automatisch auf die Grundeinheit der Menge (Mol) zurückgeführt. Damit ist eine der Grundvoraussetzungen für die Vergleichbarkeit von Messergebnissen gegeben. Dies ist bei den komplexen nicht biologischen Systemen, wie sie Nanopartikel darstellen, nicht der Fall. Bis anhin gibt es keine Kombination von analytisch chemischen und physikalischen Messverfahren, die eindeutig die Identität von verschiedenen Produktionschargen von Nanopartikeln zweifelsfrei belegen lässt. Die vollständige Titration der Positivkontrolle eines Assays bietet eine einfache und pragmatische Lösung. Der EC50 Wert der chemischen Kontrolle führt den Assay, wie bei Messungen mit kleinen Molekülen auf die Basiseinheit Mol zurück und erlaubt gleichzeitig eine Überprüfung des korrekten Funktionierens der Bestimmung. Zusätzlich liefert der Ansatz eine erste Abschätzung der Messunsicherheit, die um weitere Faktoren aus der im Vergleich von kleinen Molekülen schwierig zu berechnenden Dosierung der Nanopartikel erweitert werden muss. Außerdem erlaubt die regelmäßige Bestimmung des EC50 Werts einer bekannten Verbindung eine Teilvalidierung der aktuellen Bestimmung. Diese Kontrolle muss für den eindeutigen Nachweis, dass die Messung keinen Artefakten unterliegt, um eine Serie von Interferenzkontrollen erweitert werden.

Der ganze Lösungsansatz wurde mit Hilfe einer Ursachen- und Wirkungs-Analyse^{9,10} ausgearbeitet und in einem speziellen Plattenlayout umgesetzt. Anschließend wurde die Wirksamkeit der Lösung in einem weltweiten Ringversuch überprüft. In Zukunft gilt es diese Lösung, die am Beispiel des MTS-Assays ausgearbeitet wurde, wie die bereits umgesetzte umfangreiche Charakterisierung der Nanopartikel, in allen Fällen einzufordern. Nur so können Messergebnisse von gleichen oder unterschiedlichen Nanopartikeln für gleiche Endpunkten miteinander verglichen werden und so in einer realistischen Risikobeurteilung zusammengefügt werden. Dies bildet die Grundlage für eine breite Akzeptanz der Nanotechnologie und erlaubt der Industrie die nachhaltige Entwicklung neuer Produkte mit revolutionären Eigenschaften fortzuführen.

Referenzen

1. KRUG, H. F. Nanosicherheitsforschung–sind wir auf dem richtigen Weg? *Angewandte Chemie* (2014). doi:10.1002/ange.201403367
2. HRISTOZOV, D. R. *et al.* A weight of evidence approach for hazard screening of engineered nanomaterials. *Nanotoxicology* **8**, 72–87 (2014).
3. HIRSCH, C., ROESSLEIN, M., KRUG, H. F. & WICK, P. Nanomaterial cell interactions: are current in vitro tests reliable? *Nanomedicine (Lond)* **6**, 837–847 (2011).

^b 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

4. ROESSLEIN, M., HIRSCH, C., KAISER, J.-P., KRUG, H. F. & WICK, P. Comparability of in vitro tests for bioactive nanoparticles: a common assay to detect reactive oxygen species as an example. *Int J Mol Sci* **14**, 24320–24337 (2013).
5. KRUG, H. F. & WICK, P. Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 1260–1278 (2011).
6. ELLISON, S. L. R. *et al.* *Traceability in Chemical Measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement* 1–43 (Eurachem, 2003).
7. EURACHEM, CITAC, WORKINGGROUP. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. *EURACHEM / CITAC Guide CG 4* 1–141 (2013).
8. THOMPSON, M., ELLISON, S. & WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). in **74**, 835–855 (2002).
9. ELLISON, S. & BARWICK, V. J. Estimating measurement uncertainty: reconciliation using a cause and effect approach. *Accreditation and quality assurance* (1998). doi:10.1007/s007690050198
10. ROESSLEIN, M. *et al.* Use of Cause-and-Effect Analysis to Design a High-Quality Nanocytotoxicology Assay. *Chem. Res. Toxicol.* **28**, 21–30 (2015).

Cloud Point Extraktion als Schlüssel für die Bestimmung von Silber-Nanopartikeln in Umweltproben

Zusammenfassung des Vortrags

Prof. Dr. Michael. Schuster, Technische Universität München

Problemstellung

Die Nanotechnologie gehört wegen ihrer zahlreichen Anwendungsfelder in technischen, medizinischen und Konsumprodukten noch immer zu einer der am schnellsten wachsenden Hochtechnologien unserer Zeit. Durch Anwendung und Entsorgung dieser Produkte rückt zunehmend der Verbleib künstlicher ENM (engl. *Engineered Nanomaterial*) in der Umwelt in den Fokus. Mittlerweile gibt es mehr als 1.600 registrierte, auf der Nanotechnologie basierende Produkte, von denen 23 % Silber-Nanopartikel (AgNP) enthalten (YIN, Y.; YU, S.; LIU, J.; JIANG, G. **2014**, Environ. Sci. Technol. (5), 2671–2679). Letztere werden aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung in Gebrauchsgegenständen und medizinischen Produkten z. B. Textilien, Wundpflaster, Deo-Sprays, Pflegeprodukten, Verpackungsmaterialien, zur Beschichtung medizinischer Werkzeuge und von Kühlschränken u. v. m. eingesetzt. Ein nicht unerheblicher Teil dieser künstlich hergestellten AgNP gelangt laut Lebenszyklusanalysen über Abwasserströme letztlich in Kläranlagen. Simulationen im Labormaßstab zufolge findet dort eine Abreicherung (> 90 %) der eingeleiteten AgNP statt, die im Klärschlamm angereichert werden.

Bisher sind keine realen Belastungen des aquatischen Systems durch AgNP bekannt, weil keine allgemein anwendbaren analytischen Verfahren existieren, die eine selektive Messung von AgNP unter realen Bedingungen gestatten. Dies gilt auch für den Zulauf von Kläranlagen, der zwar vergleichsweise hohe Konzentrationen an AgNP enthält, aber auch eine äußerst komplexe Matrix darstellt, die extreme Anforderungen an die Selektivität eines analytischen Verfahrens stellt. Bisher existieren lediglich Abschätzungen auf der Basis mathematischer Modelle, die eine Konzentration von AgNP in Fließgewässern im unteren zweistelligen ng L^{-1} -Bereich prognostizieren (z. B. MUELLER und NOWACK **2008**. "Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment." Environ. Sci. Technol. 42 (12): 4447-4453). Gleichzeitig belegen viele Studien die Ökotoxizität von Silbernanopartikeln und Silberionen auf Mikroorganismen, Algen und Fische. Auch für Menschen stuft die Weltgesundheitsorganisation (WHO) Silber als giftig ein (WHO-Reihe Nr. 12, 2007), für Trinkwasser gilt in Deutschland z. B. ein Grenzwert von 0,01 mg Ag/L. Diese Einschätzung gilt nur für Silber allgemein, eine Spezifizierung ausschließlich für AgNP existiert nicht.

In zwei vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) geförderten Projekten sollten deshalb analytische Voraussetzungen geschaffen werden, die es gestatten, AgNP (und andere Metallnanopartikel) auch in hochkomplexen Realproben mit gängiger Analysetechnik richtig zu bestimmen. Dies sollte nicht nur mit künstlich hergestellten AgNP mit bekannter Oberflächenbelegung (engl. *Coating*) möglich sein, wie in nahezu allen in der Literatur beschriebenen Verfahren, sondern auch für Partikel gelten, die chemische Transformationen im Abwassersystem und in natürlichen Gewässern erfahren haben. Dazu wurden entsprechende Partikel synthetisiert, mit in der Natur vorkommenden bzw. naturnahen Verbindungen modifiziert und mit modernen bildgebenden und anderen Verfahren charakterisiert. Für diese Partikel und für Partikel mit den üblichen ENM Coatings, die zu deren Stabilisierung eingesetzt werden, wurden dann effiziente Verfahren zur selektiven Abtrennung und Anreicherung von AgNP aus Realproben untersucht und validiert. Eine solche selektive und gleichzeitig informationserhaltende Anreicherung von Nanopartikeln eröffnet die Möglichkeit, gängige routinefähige Bestimmungstechniken einzusetzen und sind damit der Schlüssel für eine routine-

fähige Bestimmung von Nanopartikeln in komplexen Umweltproben. Im Rahmen dieser Untersuchungen hat sich insbesondere die Cloud Point Extraktion (CPE) als einfach anwendbare und überaus wirksame Methode zur Anreicherung von AgNP herausgestellt.

Cloud Point Extraktion als Anreicherungsmethode für Silbernanopartikel

Bei der Cloud Point Extraktion (CPE) werden die Nanopartikel in Mizellen eingeschlossen, die dann thermisch zur Koagulation gebracht und durch Zentrifugation oder schwerkraftgetrieben abgetrennt werden. Das Prozedere dazu ist bemerkenswert einfach und hocheffektiv. Der Nanopartikel-haltigen Lösung wird unter definierten Bedingungen eine Tensidlösung mit einer Konzentration oberhalb der CMC (engl. *Critical Micellar Concentration*) zugesetzt, die Temperatur geringfügig erhöht und so eine Koagulation der Mizellen eingeleitet. Im Falle von Triton X-114, das für die Versuche ausgewählt wurde, genügt eine Tensidkonzentration von 0,2 Gewichtsprozenten und eine Temperatur von 40°C, um optimale Bedingungen für die Anreicherung zu erhalten. Nach der Zentrifugation verbleibt ein kleiner Tensidtropfen am Gefäßboden, der die angereicherten Silber-Nanopartikel enthält. Er wird in 100-200 µl Ethanol gelöst und direkt mittels ET-AAS (Elektrothermale Atomabsorptionsspektrometrie) analysiert. Die ET-AAS besitzt eine hohe Nachweisstärke für Silber, hat einen geringen Probenbedarf (20µL) und ermöglicht eine geräteinterne Veraschung potenziell störender Probenbestandteile vor der Atomisierung. Sie besitzt damit im Vergleich zu zerstäuberbasierten Techniken wie der ICP-MS klare Vorteile, die Probleme mit der Verarbeitung konzentrierter Tensidphasen haben, bzw. diese nur nach einer drastischen Verdünnung verarbeiten können. Aus moderaten Ausgangsvolumina von 40 ml lassen sich mit der ET-AAS so Anreicherungen um den Faktor 80-100 erreichen. Speziesselektivität lässt sich relativ einfach erzielen, indem man gelöstes Silber mit EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) in negativ geladene Komplexverbindungen überführt, die aufgrund ihrer hohen Polarität nicht in die Tensidphase übergehen. Anhand dieser leicht durchzuführenden und schnellen Partikelanreicherung wird für AgNP eine sehr gute Nachweisgrenze (0,2-0,7 ng L⁻¹) bei hoher Toleranz ubiquitärer Störstoffe erzielt. Die Größenverteilung der AgNP bleibt durch die Anreicherung unverändert. Interessanterweise nimmt die Extraktionseffizienz für Partikel > 100 nm stark ab [1]. Dieser Effekt ist durchaus erwünscht, da so große Partikel, die nicht mehr unter die Definition für Nanopartikel fallen, ausgeblendet werden können. Details der analytischen Optimierung bzw. Untersuchungen zur Matrixtoleranz sind in den Publikationen [1]-[3] beschrieben.

Extraktionseffizienz der Cloud Point Extraktion in Abhängigkeit von der Partikeloberfläche

In der Realität liegen AgNP, was die Partikelgröße und Form sowie deren Oberflächenbeschichtung betrifft, in einer unüberschaubaren Vielfalt vor. Es ist daher nicht ausreichend – wie vielfach in der Literatur beschrieben – eine Sorte selbst hergestellter oder gekaufter Partikel in einfach zusammengesetzten Lösungen anzureichern und zu bestimmen. Im Rahmen der Validierung der CPE wurden daher nicht nur Matrixeinflüsse untersucht, sondern auch unterschiedlich beschichtete Partikel hergestellt, aufwändig gereinigt, spektroskopisch und elementanalytisch charakterisiert und deren CPE-Eigenschaften, insbesondere die Extraktionseffizienz bestimmt. Dabei wurden u. a. anorganisch beschichtete Partikel hergestellt (Chlorid, Sulfid, Phosphat), elektronenmikroskopisch visualisiert und hinsichtlich der Elementzusammensetzung mittels EDX charakterisiert. Neben den umweltrelevanten anorganischen Beschichtungen wurden auch zahlreiche organische Beschichtungen und „reine“ Silberpartikel untersucht, die durch Laserablation von Silber in Reinstwasser hergestellt wurden. Als organische Beschichtung wurden Polymere wie Polyvinylpyrrolidon (PVP), das auch in technisch eingesetzten AgNP zur Stabilisierung der Partikel verwendet wird und Stärke als natürliches Polymer untersucht. Aufgrund der hohen Thiophilie des Silbers wurden häufig eingesetzte schwefelhaltige Liganden

wie Mercaptobernsteinsäure und 12-Mercaptoundekansäure sowie die schwefelhaltige Aminosäure Cystein zur Beschichtung der Partikel verwendet. Des Weiteren wurden Citrat- und Lysin-funktionalisierte Partikel hergestellt und ihre Eigenschaften hinsichtlich der CPE Anreicherung untersucht. Alle synthetisierten Partikel wurden vorab dialysiert, um überschüssige Silberionen und überschüssige niedermolekulare Reagenzien zu entfernen, und zusätzlich mehrfach abzentrifugiert, um sicher zu stellen, dass keine nicht partikular gebundenen Spezies die CPE bzw. die ATR-FT-IR (Abgeschwächte Totalreflexions-Fourier-Transform-Infrarotspektrometrie) Charakterisierung verfälschen, die zum Nachweis der erfolgreichen Modifizierung eingesetzt wurde. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die CPE tatsächlich in der Lage ist, praktisch alle Silbernanopartikel weitgehend unabhängig von deren Oberflächenbeschaffenheit anzureichern. Details zur Herstellung und Charakterisierung der oberflächenmodifizierten AgNP sind in der Publikation [2] näher beschrieben.

Extraktionseffizienz der Cloud Point Extraktion in Abhängigkeit von der Matrix

Neben der ausführlichen Untersuchung der Extraktionseffizienz in Abhängigkeit von der Partikeloberfläche wurde auch eine Abhängigkeit der Extraktionseffizienz von der Matrix untersucht. Umweltrelevante anorganische Matrixbestandteile (Ammonium, Chlorid, Phosphat, Nitrat) haben im Konzentrationsbereich von 0 bis 100 mmol L⁻¹ keinen Einfluss auf die Extraktionseffizienz der CPE. TiO₂-Partikel werden bis zu Konzentrationen von 100 mg L⁻¹ toleriert. Um den Einfluss von „Natürlicher Organischer Materie“ (NOM) im Hinblick auf die Extraktionseffizienz zu bestimmen, wurde die CPE von AgNP in verschiedenen Arten von NOM-Standards untersucht. Die Konzentration wurde so gewählt, dass die maximale NOM-Konzentration in realen Umweltproben erreicht, bzw. sogar überschritten wird (Konzentrationsbereich von 0 bis 100 mg L⁻¹). Auch hier wurde kein Einfluss auf die Extraktionseffizienz der CPE festgestellt. In diesem Zusammenhang konnte beiläufig auch die in situ Bildung von AgNP aus Silberionen nachgewiesen werden. Ag⁺ wird in Gegenwart von NOM offenbar sehr schnell in AgNP umgewandelt. Diese in situ Bildung von AgNP konnte mittels CPE und elektronenmikroskopischer Visualisierung der Partikel nachgewiesen werden. Die CPE ist daher auch ein sehr interessantes Werkzeug zur Untersuchung der Bildung von AgNP in der Natur und unter kontrollierten Laborbedingungen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Detail in Publikation [2] aufgeführt.

Validierung der Cloud Point Extraktion in Realproben

Um komplexe Matrices wie Kläranlagenzuläufe zu untersuchen, wurden neben den bereits erwähnten Matrixvalidierungen zahlreiche Aufstockungs- und Wiederfindungs-Experimente in Realmatrices durchgeführt und die CPE mit einer zweiten chemisch vollständig unabhängigen Anreicherungs-methode validiert. Als unabhängige Validierungsmethode hat sich die Festphasenanreicherung mit Ionenaustauschern bewährt, einer weiteren im Verlauf der StMUV Projekten entwickelten Anreicherungs-methode, die in der Publikation [5] näher beschrieben ist. Durch das völlig andere chemische Anreicherungsprinzip, kann sie zur Überprüfung der Richtigkeit der CPE eingesetzt werden [4].

Bestimmung von Nanosilber in Klärwerken

Die optimierte CPE-ET-AAS Kopplung erlaubt nun erstmals, den Zulauf, den Ablauf und Schritte innerhalb der Klärprozesse mit realen Partikeln, die das Kanalsystem und die darin ablaufenden chemischen und physikalischen Prozesse durchlaufen haben, zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden an neun unterschiedlich großen und unterschiedlich arbeitenden süddeutschen Kläranlagen durchgeführt. Bisher waren mangels analytischer Möglichkeiten nur Untersuchungen mit vorheriger massiver Zudotierung synthetisch erzeugter AgNP möglich. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in der Publikation [4] zusammengefasst. Sie lassen auch eine erste Abschätzung der AgNP-Frachten in

Umgebungsgewässer zu. Das Klärwerk München Nord (ca. 520.000 t/d) hat z. B. zur Zeit der Probenahmen ca. 4 g AgNP pro Tag emittiert. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass die CPE für die Summenbestimmung von AgNP in unterschiedlichen Wasserproben bis hin zu hochbelasteten Abwässern sehr gut geeignet ist. Da Messungen bis in den Ultraspurenbereich möglich sind, kann in einigen Fällen auch der natürliche geogene Hintergrund an AgNP gemessen werden.

Aufbauend auf diesen Arbeiten wurden dann am Beispiel der Klärwerke Gut Marienhof (Großstadt München) und Garching (Kleinstadt) in regelmäßigen Zeitabständen Proben genommen und mittels CPE-ET-AAS hinsichtlich der AgNP-Fracht analysiert. Bei allen Proben handelte es sich um 24-Stunden-Mischproben, die über einen längeren Zeitraum und bei unterschiedlichen Wetterbedingungen/Jahreszeiten gesammelt wurden. Das Klärwerk Garching verwendet als erste biologische Reinigungsstufe ein Belebtschlammverfahren, die zweite biologische Reinigungsstufe erfolgt hier allerdings mit einem Tropfkörperverfahren. Das Klärwerk wurde wegen letzterem ausgewählt, um zu klären, ob und in welchem Umfang auch dieses Verfahren in der Lage ist, nanopartikuläres Silber zurückzuhalten. Die Untersuchungen ergaben, dass der überwiegende Teil der AgNP-Fracht in den Klärwerken zurückgehalten wird. In beiden Klärwerken wurde eine Rückhaltung von mindestens 94 % der gesamten AgNP-Fracht gemessen.

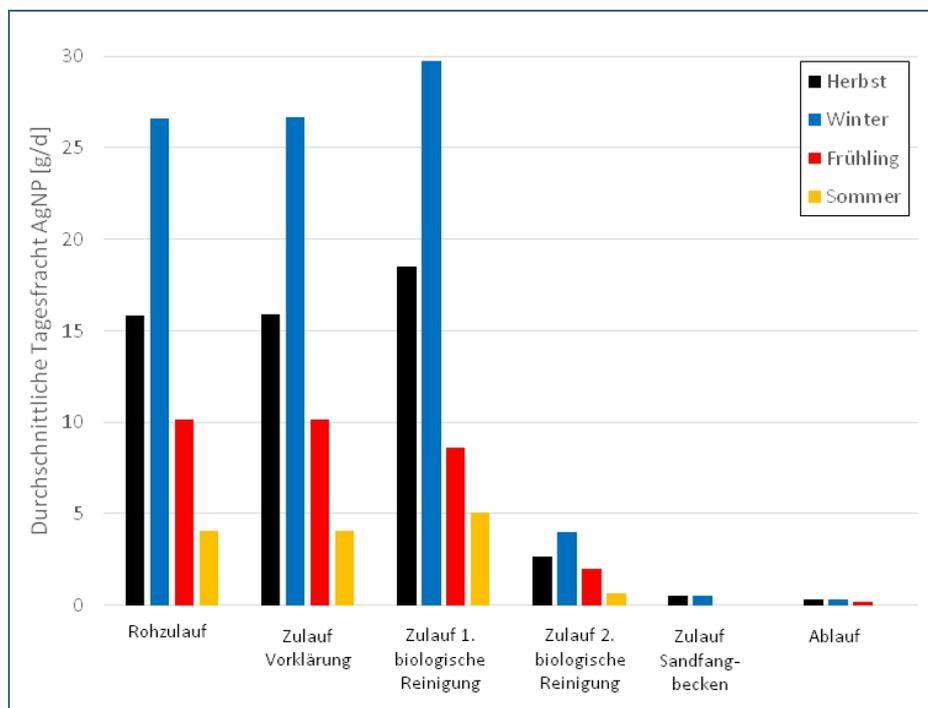


Abb. 1:
AgNP-Tagesfrachten (gemittelt, Jahr 2014) vom Klärwerk Gut Marienhof zu unterschiedlichen Jahreszeiten.

Als entscheidende Stufe zur Rückhaltung von AgNP innerhalb der Kläranlagen konnten die biologischen Reinigungsstufen identifiziert werden, wobei das Belebtschlammverfahren effektiver als das Tropfkörperverfahren ist. Abbildung 1 zeigt gemittelte AgNP-Tagesfrachten vom Klärwerk Gut Marienhof zu unterschiedlichen Jahreszeiten.

Bestimmung von Nanosilber in der Isar und im Mittleren Isarkanal

Am Beispiel der Isar wurde ein Fließgewässer von der Quelle bis zur Mündung beprobt. Es sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob und in welchem Umfang z. B. eine Großstadt wie München eine messbare anthropogene AgNP Belastung erzeugt, die oberhalb des geogenen Untergrunds liegt.

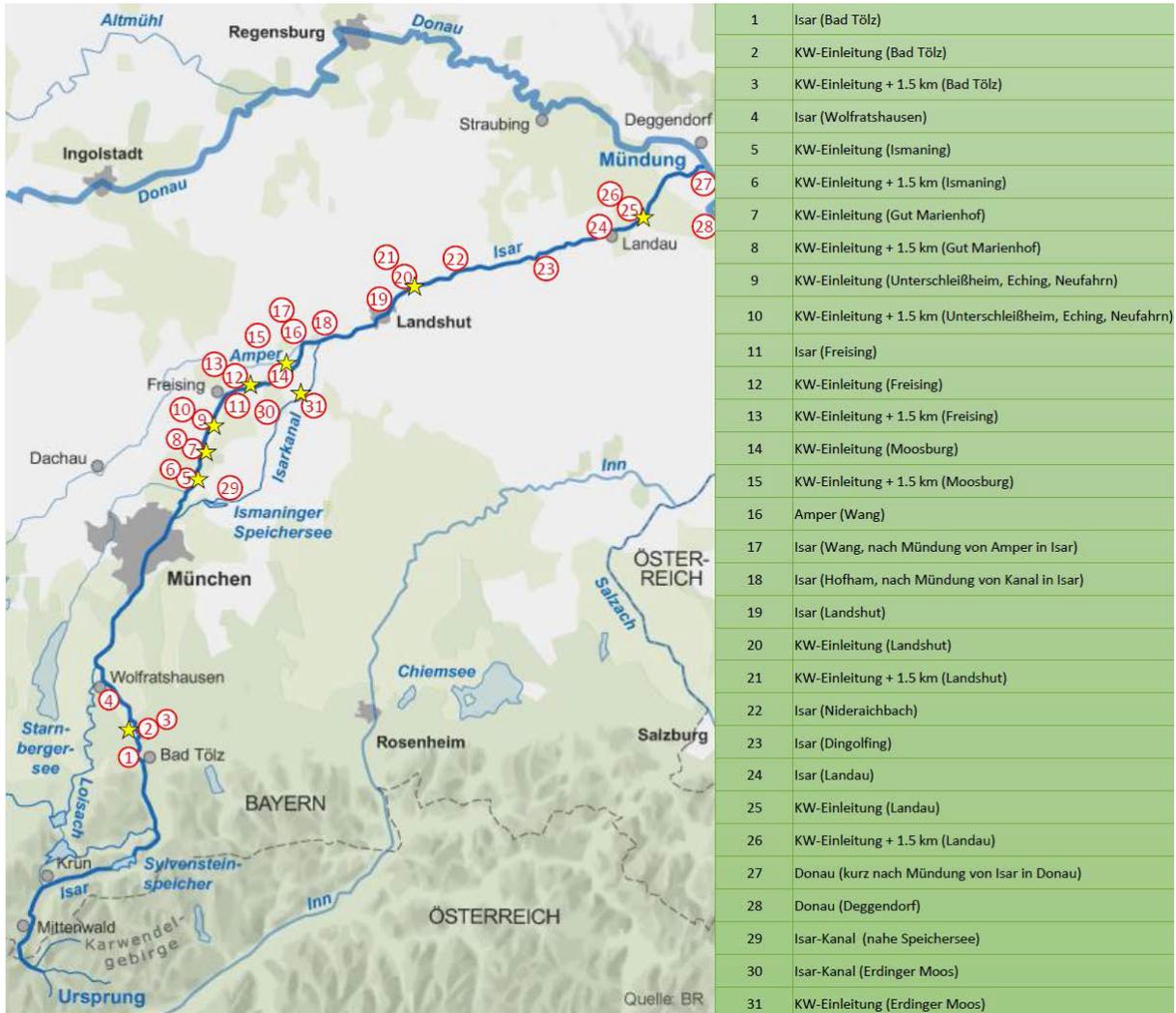


Abb. 2: Probenahmestellen für die Untersuchung von Isar-Wasser. Sternsymbole geben die Standorte der Klärwerke an.

Die Wasserproben aus der Isar wurden entlang des gesamten Flusses von kurz nach der Quelle bei Scharnitz in Österreich bis zur Mündung in die Donau bei Deggendorf entnommen und hinsichtlich ihres AgNP Gehalts analysiert. In München wird von der Isar der Isarkanal abgezweigt. Dieser durchfließt den Speichersee und mündet vor Landshut wieder in die Isar. Das Klärwerk München Nord leitet seinen Abfluss in den Speichersee ein. Daher wurde auch das Wasser des Speichersees und des Isarkanals untersucht. Die Probenahmen (nach DIN 38402-15) erfolgten im Frühjahr 2015.

Zusätzlich wurden Wasserproben der Isar direkt an den Klärwerkseinleitungen und jeweils 1,5 km flussabwärts genommen. Abbildung 2 zeigt die Orte der Probenahme; Abbildung 3 zeigt die gemessenen AgNP-Konzentrationen in Fließrichtung der Isar.

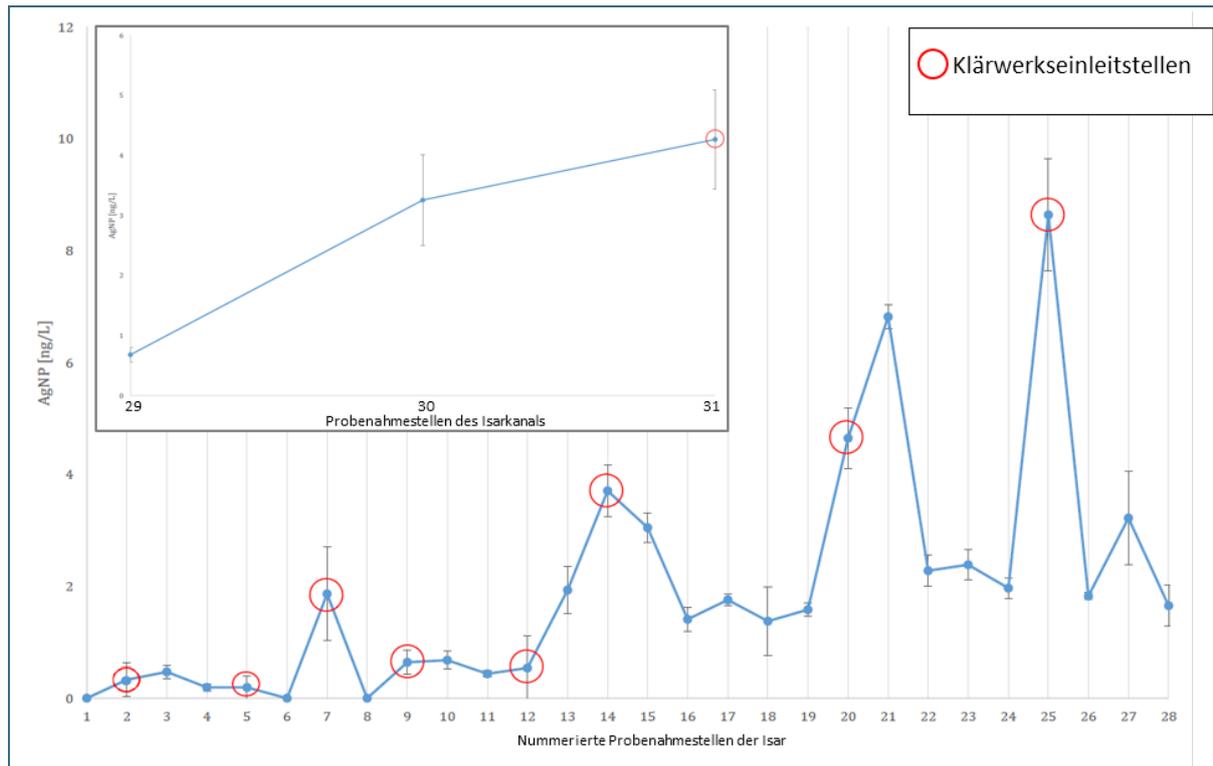


Abb. 3: Verlauf der AgNP Konzentration in Fließrichtung der Isar von Bad Tölz bis zur Mündung in die Donau bei Deggendorf. Die Nummerierung entspricht der Legende aus Abbildung 2.

Abbildung 3 macht deutlich, dass die Klärwerke einen entscheidenden Einfluss auf die Konzentration an AgNP im Flusswasser haben. Nahezu an jeder Einleitstelle der Klärwerke steigt die Konzentration sprunghaft an und sinkt bis zur nächsten Einleitung wieder ab. Damit ist zweifelsfrei gezeigt, dass die Klärwerke an der Isar zu einem Anstieg der Konzentration an nanopartikulärem Silber beitragen und dass AgNP im Flusswasser demnach zum größten Teil anthropogener Natur sind. Die AgNP-Konzentration liegt dabei aber abseits von Einleitungsstellen mit maximal 3 ng L^{-1} weit unterhalb von kritischen oder umweltschädlichen Konzentrationen. In der eingangs erwähnten, sehr häufig zitierten Arbeit von Mueller und Nowack wird ein Wert von 30 ng L^{-1} für AgNP in Gewässern prognostiziert, der für die Isar trotz der Einleitung einer Großstadt und zahlreicher weiterer Einleitungen nicht erreicht wird.

Elution von Nanosilber aus Klärschlamm

Moderne Klärwerke halten um die 90% der in das Werk eintretenden AgNP im Klärschlamm zurück. Da Klärschlamm auch zur Düngung landwirtschaftlicher Flächen eingesetzt wird, stellt sich die Frage, ob und unter welchen Bedingungen AgNP wieder aus dem Schlamm freigesetzt werden. Um diese Fragen zu klären, wurde Trockenschlamm (eine Klärschlammart mit etwa 30 % Feststoffgehalt, die im letzten Schritt des Klärwerksprozesses anfällt) diesbezüglich untersucht. Dazu wurden sowohl Schüttel- als auch Säulenelutionen eingesetzt und die Eluate mittels der CPE-ET-AAS-Kopplung auf Nanosilber untersucht. Der Trockenschlamm der Kläranlage Garching enthält bis zu 2 mg kg^{-1} Silber (Gesamtsilbergehalt) bezogen auf die Trockenmasse. Insgesamt sind davon $170 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ Silber eluierbar, wovon $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ AgNP sind. In Anlehnung an DIN 19527 wurde eine Schüttel- elution der Klärschlammproben mit Reinstwasser über 24 h durchgeführt (3 g Klärschlamm auf 200 mg Reinstwasser). Es wurden aber auch chemische (pH-Änderung) und mechanische Einflüsse (Ultradispersierung, Quarzzusatz) während der Schüttel- elution untersucht, die zu einer stärkeren Freisetzung von AgNP aus dem Klärschlamm führen. Wird die Elutionsmischung ultra-fein dispergiert, werden bis zu

150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AgNP eluiert. Der Zusatz von Quarzsand zur Elutionsmischung verdoppelt die Masse eluierbarer AgNP auf 200 $\mu\text{g/kg}$. Hohe pH-Werte führen ebenfalls zu einer Erhöhung der Masse eluierbarer AgNP von ursprünglich 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ auf 350 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (bezogen auf Schlamm-trockenmasse). Zeta-Potenzial-Messungen hatten zuvor ergeben, dass AgNP im basischen stark negativ geladen sind (bis -35 mV), was die erhöhte Freisetzung durch elektrostatische Abstoßung erklärt. CPE-sp-ICP-MS-Messungen in den Trockenschlamm-Eluaten zeigen, dass vor allem sehr kleine AgNP um 14 nm aus dem Klärschlamm eluiert werden. Neben den Schüttelversuchen wurden mit dem Trockenschlamm auch Säulenversuche durchgeführt, um die zeitabhängige Elution von AgNP leichter und realitätsnäher verfolgen zu können. Diese Art der Elution führt zu einer wesentlich geringeren AgNP Freisetzung, die ca. 5 % der durch Schüttel-elution freisetzbaren Masse an AgNP beträgt.

Elution von Nanosilber aus klärschlammgedüngten Bodenproben

Da Klärschlamm zum Teil als organischer Dünger auf Felder ausgebracht wird, besteht die Möglichkeit, dass über den Klärschlamm AgNP in die Umwelt freigesetzt werden. Eine über 20 Jahre mit Klärschlamm gedüngte landwirtschaftliche Nutzfläche wurde daher stichprobenartig bis zu einer Tiefe von 40 cm beprobt (maximale Pflugtiefe 20 cm). Die Bohrkern wurden in Schichten von jeweils 3 cm Dicke zerlegt, die dann einer Schüttel-elution nach DIN 19527 (feuchter Boden : Eluat = 1 : 1) unterworfen wurden. In den Eluaten wurde dann mittels CPE-ET-AAS die AgNP Konzentration bestimmt. Eine Abhängigkeit der gefundenen AgNP-Konzentrationen von der Bodentiefe konnte nicht festgestellt werden. Die Werte schwanken zwischen 6 und 334 ng AgNP je Kilogramm Bodenmaterial (Trockenmasse). Es fällt aber auf, dass in der obersten Bodenschicht mit zunehmendem Pflanzenbewuchs weniger AgNP gefunden werden. Die Vermutung liegt daher nahe, dass Pflanzen AgNP aufnehmen und so aus dem Boden entfernen.

Ausblick

Eine relativ neue Entwicklung, die sp-ICP-MS (engl. *single particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) erlaubt es, die Größenverteilung anorganischer Nanopartikel im Spurenbereich zu messen. In komplexen Realproben treten jedoch zahlreiche Störungen auf, die keine direkten Messungen erlauben. Systembedingt können bisher auch nur Nanopartikel > 20 nm gemessen werden. In Verbindung mit einer selektiven Anreicherung der Partikel mittels CPE hat diese Methode jedoch ein enormes Potenzial für die größenselektive Quantifizierung von Nanopartikeln in Umweltproben. Durch die selektive Anreicherung konnte bereits die Nachweisgrenze für AgNP deutlich gesenkt und auch Partikel < 20 nm sicher bestimmt werden. Die CPE-sp-ICP-MS Kopplung wird daher zusammen mit der CPE-ET-AAS Kopplung weiterentwickelt, mit dem Ziel, eine routinefähige, größenselektive Bestimmung von AgNP in Umweltproben zu ermöglichen, die eine Grundvoraussetzung für ein effektives Umweltmonitoring ist.

Publikationen

- [1] G. HARTMANN, M. SCHUSTER, Species selective preconcentration and quantification of gold nanoparticles using cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 761 (2013) 27-33.
- [2] G. HARTMANN, T. BAUMGARTNER, M. SCHUSTER, Influence of particle coating and matrix constituents on the cloud point extraction efficiency of silver nanoparticles (AgNPs) and application for monitoring the formation of AgNPs from Ag(+), *Anal. Chem.*, 86 (2014) 790-796.
- [3] G. HARTMANN, C. HUTTERER, M. SCHUSTER, Ultra-trace determination of silver nanoparticles in water samples using cloud point extraction and ETAAS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 28 (2013) 567.
- [4] L. LI, G. HARTMANN, M. DOBLINGER, M. SCHUSTER, Quantification of nanoscale silver particles removal and release from municipal wastewater treatment plants in Germany, *Environ. Sci. Technol.*, 47 (2013) 7317-7323.
- [5] LINGXIANGYU LI, KERSTIN LEOPOLD, MICHAEL SCHUSTER, Effective and selective extraction of noble metal nanoparticles from environmental water through a noncovalent reversible reaction on an ionic exchange resin, *Chemical Communications* 48 (2012) 9165-9167.

Mobilität von Nanopartikeln in der Umwelt

Dr. Marina Maier, Bayerisches Landesamt für Umwelt, Augsburg

Zum Verhalten von anthropogenen Nanopartikeln in den Umweltkompartimenten liegen bislang nur wenige Informationen vor. Daher ist es schwierig, Anreicherung, Transportwege und Bioverfügbarkeit dieser Nanopartikel in Böden, Sedimenten und Wasser abzuschätzen. Entsprechende Erkenntnisse sind aber für die Bewertung des Umweltrisikos wichtig.

Insbesondere für den Bereich Boden – Grundwasser liegen kaum Kenntnisse zur Mobilität von anthropogenen Nanopartikeln vor. Die meisten vorhandenen Daten basieren auf Säulenversuchen mit gestörtem Boden ohne Berücksichtigung der natürlichen Bodenstruktur. Diese Ergebnisse lassen sich nur eingeschränkt auf reale Systeme übertragen. Um die Mobilität von künstlichen Nanopartikeln beurteilen zu können, müssen die Untersuchungen unter realitätsnahen Bedingungen durchgeführt werden, d. h. die natürliche Lagerung des Bodens sollte weitgehend erhalten bleiben.

Aus diesem Grunde wurde für die Untersuchungen unbelasteter, natürlich gelagerter Boden gewählt. Dafür wurden zwei Bodenmonolithe (Durchmesser 30 cm, Höhe 60 cm) aus einem unbelasteten Gelände entnommen. Die Untersuchungen wurden in einem klimatisierten Raum als Doppelversuche durchgeführt.

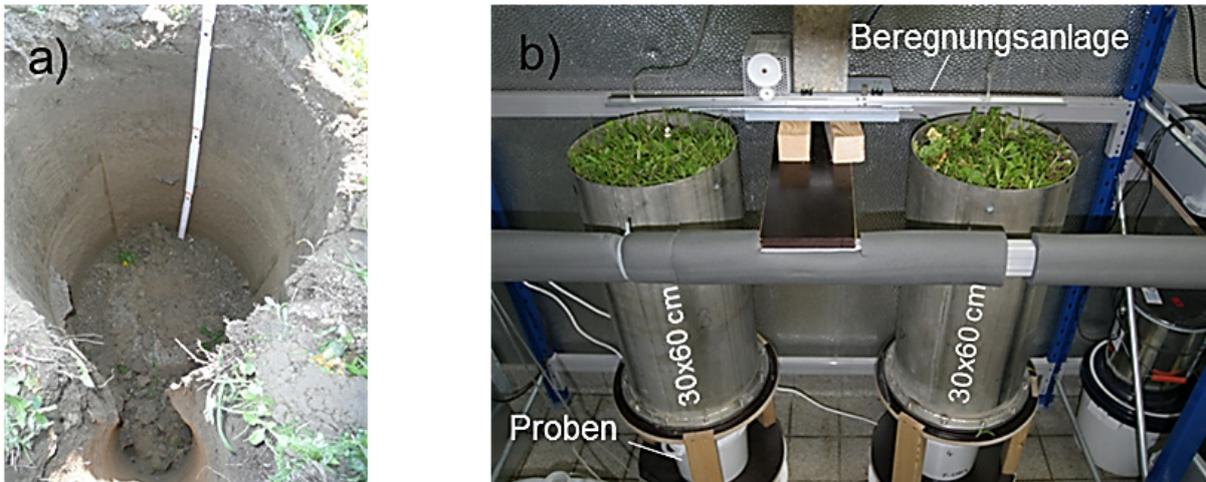


Abbildung: a) Bodenprofil, b) Versuchsanlage

Als Testsubstanzen wurden kommerziell erhältliche Platin-, Ceroxid- und Silber-Nanopartikel eingesetzt. Über den Lysimetersäulen wurde eine automatische Beregnungsanlage installiert. Zur Vermeidung von Randeffekten wurde der äußere Rand (2 cm) des Bodens bei der Beregnung ausgespart. Die Lysimeter wurden so weit möglich unter gleichen Bedingungen betrieben.

Die Untersuchungen wurden über 117 Tage durchgeführt. In diesem Zeitraum wurde die durchschnittliche jährliche Niederschlagsmenge für München aufgebracht (800 mm).

Zur Analytik der Perkolate wurde eine asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4) mit einem Massenspektrometer (ICP-MS) gekoppelt. Diese Methode ermöglicht die Fraktionierung der Partikel nach ihren Größen mit anschließender Elementbestimmung in den Fraktionen. Für einzelne Fragestellungen wurde die ICP-MS im sogenannten „single particle-Modus (SP-ICP-MS) mit AF4 kombiniert.

Nach einer Beregnungsdauer von 14 Tagen konnten von allen Testpartikeln geringe Mengen in den Perkolaten nachgewiesen werden. Dies könnte auf den Transport von Testsubstanzen über präferentielle Flusswege hindeuten. Nach ca. 100 Tagen war keine Elution der Testnanopartikel mehr festzustellen. Bis zum Versuchsende wurden 8,5-16,6 % (Nano-Ag), 14,3-16,1 % (Nano-Pt) bzw. 7-7,5 % (Nano-CeO₂) der aufgebrauchten Mengen im Perkolat gefunden.

Um zu überprüfen, wie fest die in der Säule verbleibenden Nanopartikel an die Bodenmatrix gebunden sind, wurden die Bodenmonolithe zerstört und in Säulenperkolationsversuchen untersucht. Dieser Vorgang kann mit der Behandlung von Ackerboden verglichen werden. Dadurch werden die Struktur und das Verhalten des Bodens geändert, was sich auf die Mobilität von Stoffen auswirken kann.

Die obere (0-30 cm) und die untere Bodenschicht (30-60 cm) wurden getrennt untersucht. In den Perkolaten der oberen Bodenschicht wurden 5,6-6,4 % (Nano-Ag), 5,4-5,7 % (Nano-Pt) bzw. 5,8-6,1 % (Nano-CeO₂) der am Anfang aufgegebenen Mengen gefunden. In der unteren Bodenschicht betragen die Frachten 0,1-0,6 % (Nano-Ag), 0,4-2 % (Nano-Pt) bzw. 0,3-1,8 % (Nano-CeO₂).

Die Untersuchungen zeigen, dass die Testnanopartikel im Boden mobil sind, wenn auch nur in eher geringem Ausmaß. Von den auf ungestörten Boden aufgetragenen Partikeln wurden weniger als 20 % (Nano-Ag, Nano-Pt) bzw. weniger als 10 % (CeO₂) eluiert. Bei Störung der Bodenstruktur war nur eine geringe zusätzliche Mobilisierung der in der Bodenmatrix verbliebenen Testpartikel festzustellen.

Vorkommen von Nanopartikeln in wässrigen Umweltproben

Dr. Martin Wegenke, Bayerisches Landesamt für Umwelt, Augsburg

Nanomaterialien (NM) können auf verschiedenen Wegen in die Umwelt gelangen, als wahrscheinlichste Eintrittspfade werden Abwasser und Abfall angesehen. Quantitative Angaben zum Vorkommen von NM in der Umwelt liegen kaum vor. Risikoabschätzungen basieren in der Regel auf Annahmen und Modellrechnungen und sind daher mit erheblichen Unsicherheiten behaftet. Um belastbare Daten zum Vorkommen von NM in der Umwelt zu erhalten, wurde die Analytik zum Nachweis metallischer Nanopartikel (NP) in Wasser etabliert und für Untersuchungen wässriger Umweltproben eingesetzt. Um einen ersten Überblick über die Gehalte von NP im aquatischen Bereich zu gewinnen, wurden Zu- und Abläufe von Kläranlagen sowie bayerische Seen und Grundwasser untersucht.

Analytik

Nanopartikel wurden mittels asymmetrischer Fluss-Feld-Flussfraktionierung (AF4) von den ionischen Bestandteilen abgetrennt und nach ihrer Größe aufgetrennt. In den Fraktionen wurden die Elemente mit ICP-MS oder single-particle-ICP/MS bestimmt. Nano-Silber aus Kläranlagenproben wurde vor der Analyse mittels Cloud-Point-Extraction angereichert.

Nanopartikel in Zu- und Abläufen von Kläranlagen

Bei den Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob im Einzugsbereich potenzieller NP-Emittenten erhöhte NP-Gehalte im Abwasser auftreten. Dazu wurde eine Kläranlage untersucht, in deren Einzugsbereich verschiedene Unternehmen angesiedelt sind, die NM verarbeiten („industriell beeinflusste Kläranlage“, IKA). Zum Vergleich wurden Messungen in einer kommunalen KA (KKA) durchgeführt, bei der von einem geringen Eintrag von Nanomaterialien aus industriellen Aktivitäten auszugehen ist.

In Zu- und Ablauf der IKA wurde nano-Silber in deutlich höheren Konzentrationen gefunden als in entsprechenden Proben aus der KKA. Die Konzentrationen an nano-Silber in der KKA sind relativ konstant, wohingegen sie in der IKA wesentlich stärkeren Schwankungen unterliegen. Noch deutlicher wird der Unterschied zwischen beiden Kläranlagen, wenn man die Frachten an nano-Silber vergleicht (Abb.).

Neben nano-Silber waren in Abläufen beider Kläranlagen Chrom, Zink, Kupfer, Eisen, Nickel und Titan in nano-Form nachweisbar. Die mit Abstand höchsten Frachten entfallen bei beiden Kläranlagen auf nano-Eisen. Dies ist vermutlich auf die Verwendung von Eisensalzen zur Phosphatfällung zurückzuführen. Vergleicht man die Anteile der verschiedenen NP an der NP-Gesamtfracht, ergeben sich charakteristische Unterschiede zwischen den Kläranlagen: Auffällig sind die vergleichsweise hohen Anteile von nano-Zink und nano-Titan im Ablauf der KKA. Dagegen wurden im Ablauf der IKA hohe Frachten an nano-Chrom und nano-Kupfer gefunden. Die Gründe für diese Unterschiede sind bislang nicht bekannt.

Nanopartikel im Grundwasser

Durch Untersuchungen von Grundwasserproben sollte festgestellt werden, ob NP nachweisbar sind, die möglicherweise auf anthropogene Aktivitäten zurückzuführen sind. In Betracht zu ziehen sind z. B. nanopartikuläre Emissionen aus dem Kfz-Verkehr (Platingruppenelemente aus Katalysatoren, Antimon aus Bremsabrieb), aber auch andere häufig in nano-Form verwendete Elemente wie Silber, Titan und Zink. Die Proben wurden an Grundwassermessstellen in der Nähe stark befahrener Straßen genommen, um einen möglichen Eintrag von Platingruppenelementen zu erfassen.

An allen fünf Messstellen waren Eisen, Calcium und Chrom in nano-Form nachweisbar. Die höchsten Konzentrationen wurden für nano-Eisen und nano-Calcium ermittelt, die Gehalte dieser Nanopartikel lagen überwiegend im Bereich 6–10 µg/l. Nano-Chrom war an allen Standorten nur in vergleichsweise geringen Konzentrationen nachweisbar (< 0,5 µg/l). Das in einer Probe in geringer Konzentration enthaltene nano-Uran lässt sich auf geogenes Uran zurückführen. Nanopartikel, die im Kfz-Verkehr emittiert werden (Platin, Palladium, Antimon) konnten ebenso wie Silber, Titan und Zink in keiner Grundwasserprobe nachgewiesen werden.

Nanopartikel in bayerischen Seen

Um das Vorkommen von NP in Oberflächengewässern untersuchen, wurden Proben aus 22 bayerischen Seen untersucht. Da diese Seen zum Baden genutzt werden, wurde auch der Frage nachgegangen, ob sich die Badesaison auf den Gehalt an nano-Titandioxid (nano-TiO₂) auswirkt. Nano-TiO₂ ist als UV-Filter in Sonnencremes enthalten und könnte beim Baden ins Wasser gelangen. Die Wasserproben wurden zu Beginn und gegen Ende der Badesaison genommen.

Die höchsten NP-Gehalte wurden für nano-Eisen und nano-Aluminium gemessen. Die Konzentrationen lagen überwiegend zwischen 2 und 5 µg/l. Andere Nanopartikel wie Kupfer, Zink und Titan lagen deutlich unter 1 µg/l. nano-TiO₂ war nur in vier Seen nachweisbar. Die Konzentrationen gegen Ende der Badesaison waren deutlich erhöht gegenüber den im Frühjahr gemessenen Werten, so dass von einer Freisetzung während des Badens auszugehen ist.

Umweltverhalten und -effekte von Kohlenstoffnanoröhrchen (CNT) und Nano-Titandioxid (Nano-TiO₂)

Andreas Schäffer, Michael P. Hennig, Stefan Rhiem, Anne Simon, Anne Wyrwoll, Hanna Maes, RWTH Aachen University

Kohlenstoffnanoröhrchen

Kohlenstoffnanoröhrchen (Carbon Nano Tubes, CNT) gelten aufgrund ihrer ausgezeichneten elektrischen und thermischen Leitfähigkeit und ihrer mechanischen Flexibilität und Stabilität als Werkstoff mit Zukunfts- und Wachstumspotenzial. Die aus einfach und mehrfach gewandeten Graphenschichten bestehenden CNT werden zunehmend in Produkten, z. B. Kunststoffen, eingesetzt, um deren Eigenschaften zu optimieren. Wegen ihres möglichen Eintrags in die Umwelt bei der Herstellung, dem Gebrauch und vor allem der Entsorgung der Produkte ist zu überprüfen, ob CNT exponierte Organismen beeinträchtigen können, zumal bereits nachgewiesen wurde, dass CNT in Zellen von Organismen aufgenommen werden und dort in niedrigen Konzentrationen verbleiben. Allerdings scheint nach den meisten der bisher vorliegenden Ergebnisse keine akute Toxizität von CNT vorzuliegen. Allerdings wurden karzinogene Effekte „starrer, gerader“ CNT (in Analogie zu Asbest) in menschlichen Zelllinien berichtet.

Es gibt bisher keine analytische Methode, reine CNT, die ausschließlich das Element Kohlenstoff enthalten, in der Umwelt mit ihrem hohen natürlichen Kohlenstoffanteil quantitativ nachzuweisen. Daher haben wir eine Markierungstechnik gewählt, mit der CNT eindeutig zu analysieren sind: aus ¹⁴C-Benzol wurden durch Hochtemperaturgasphasenabscheidung mit einer Co-Legierung als Katalysator ¹⁴C-CNT hergestellt. Die hohe spezifische Radioaktivität (> 1 MBq/mg), die auf den markierten Anteil der Gerüstkohlenstoffatome in der Graphenstruktur zurückzuführen ist, ermöglicht eine quantitative Bilanz bei Aufnahme-, Umsetzungs- und Freisetzungsversuchen.

Bisher ist unbekannt, wie viel CNT aus Kunststoffkompositen, in denen CNT zur „Veredlung“ enthalten sind, bei sachgemäßem Gebrauch bzw. nach der Entsorgung durch Verwitterung freigesetzt werden und in die Umwelt gelangen. Wir untersuchten die Freisetzung von CNT aus Polycarbonatkomposit, das zunächst mit sonnenähnlichem Licht bestrahlt (1.000 MJ/m², entsprechend ca. ein Jahr Belichtung in Mitteleuropa) und anschließend verschiedenen denkbaren Umweltszenarien unterworfen wurde: mechanische Behandlung (Abklopfen), Ausschütteln (Wasser, gelöste Huminstoffe, simulierter saurer Regen, simuliertes Deponie-Eluat), Frost-Tau-Zyklen, Wärmebehandlung (bis 70 °C, entsprechend der möglichen Aufwärmung schwarzer Körper im Sonnenlicht).

Nach der Sonnenlichtbestrahlung ist die Freilegung von CNT Nanomaterial an der Kompositoberfläche und die anschließende Freisetzung nach den Umweltszenarien signifikant höher als bei Kompositen, die zuvor nicht bestrahlt wurden.

1 Gew.% der CNT Menge werden aus einem bestrahlten Polycarbonat-Kompositplättchen (Gewicht ca. 150 mg, CNT Gehalt 1 Gew.%) gegenüber 0,03 Gew.% in unbestrahlten Proben freigesetzt, entweder in Form freier CNT oder in Form von CNT-Kompositfragmenten. Entsprechende elektronenmikroskopische Untersuchungen werden derzeit durchgeführt. Aus den Untersuchungen lässt sich eine Freisetzungsrate von 18 mg CNT-Material pro m² Polycarbonat-Komposit pro Jahr abschätzen. Hierbei ist zu beachten, dass in der Umwelt durch Zusammentreffen mehrerer Abbauprozesse, längerer Bewitterungsdauer und Belichtung von allen Seiten des Materials höhere Freisetzungsraten möglich sind.

In einem weiteren Teil wurde untersucht, welche Auswirkungen die Exposition von Algen mit CNT Suspensionen hat bezüglich der Aufnahme, Elimination und physiologischer Effekte (RHIEM et al., 2015). Algen nehmen CNT auf: es wurde ein Biokonzentrationsfaktor von 5.000 L/kg Trockengewicht ermittelt. Werden die Algen in CNT freie Medien gesetzt, eliminieren sie einen großen Teil der aufgenommenen CNT, jedoch ein kleiner Rest verbleibt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die CNT in geringen Mengen im Zellinneren der Algen eingelagert sind.

Mittels FT-IR-Messungen (Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie) und Verschiebungen der Signale im Fingerprint-Bereich konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Algen bei CNT Exposition verändert wird, beispielsweise durch Lipidoxidation, die durch Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch CNT gefördert wird.

Auch Wasserflöhe (Daphnien) nehmen CNT auf und sind im Darm agglomeriert selbst mit lichtmikroskopischen Aufnahmen sichtbar. Sie scheiden einen Großteil der CNT nach Futterzugabe wieder aus, aber ein kleiner Teil – gemessen durch die verbleibende Radioaktivität – bleibt in den Organismen zurück. In Darmepithelzellen sind CNT-ähnliche Strukturen elektronenmikroskopisch nachweisbar. Werden Daphnien über längere Zeit CNT haltigen Medien ausgesetzt (1 mg/L), verändert sich die Populationsstruktur: es werden im Vergleich mit Kontrollen in CNT-freien Medien im Lauf der Inkubationszeit mehr neonate als adulte Daphnien beobachtet (Verjüngung der Population). Fische nehmen ebenfalls CNT auf und auch hier verbleibt nach der Elimination ein sehr geringer Anteil im Körper; die Bluthornschranke wird jedoch nicht überwunden (MAES et al., 2014).

Zusammenfassend ergibt sich das Bild, dass CNT aus Kunststoffen in der Umwelt freigesetzt werden, dass sie von Organismen aufgenommen werden und nach dem Ausscheiden geringe Mengen durch Aufnahme in Zellen verbleiben können. Nicht gezeigt wurde im Vortrag, dass CNT als Schadstoffträger bei bestimmten Konzentrationsbedingungen zu Effekten führen können, die die Schadstoffe bei den gleichen Konzentration allein nicht verursachen.

Bezüglich einer Umweltrisikobewertung ist allerdings zu berücksichtigen, dass alle gezeigten Versuche bei CNT Konzentration durchgeführt wurden (mg/L), die mehrere Größenordnungen oberhalb erwarteter Umweltkonzentrationen liegen, so dass das Umweltrisiko von CNT bei den sehr niedrigen Konzentrationen in Oberflächengewässern (niedrige Emissionsraten, rasche Bindung an Sediment) als sehr gering betrachtet werden kann.

Nano-Titandioxid (Nano-TiO₂)

Titandioxid-Nanomaterialien sind das mengenmäßig wichtigste industrielle Nanoprodukt, das zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten findet, z. B. in Kosmetika, Sonnencremes, Lebensmitteln, Beschichtungen. Ein Teil des Nano-TiO₂ gelangt durch Gebrauch der Produkte oder Verwitterung von Materialien in die Umwelt, so dass Sicherheitsuntersuchungen notwendig sind. In Oberflächengewässern wurden ng/L bis µg/L Konzentrationen abgeschätzt, in Böden bis zu einigen Hundert µg/kg bis mg/kg Trockengewicht, wenn sie mit Klärschlamm beschickt werden, in denen sich die Nanomaterialien anreichern. Mit der europäischen Chemikalienverordnung REACH wird bisher die Nano- und die Makroform (bulk chemical) ein und derselben Substanz nicht getrennt voneinander registriert. Zudem berücksichtigen vorgegebene Testbedingungen, z. B. der OECD, bisher nicht, dass relevante Expositionsszenarien wie z. B. der Einfluss von Sonnenlicht und das Vorliegen von Mischungen mit anderen Kontaminanten die Ökotoxizität von Nanomaterialien beeinflussen können. Beide Aspekte – der Einfluss des Lichts und die Mischungstoxizität – sind für Nano-TiO₂ relevant, da die Substanz photoaktiviert reaktive Sauerstoffspezies produziert und aufgrund der hohen Oberfläche sorptiv für organische und anorganische Schadstoffe wirkt.

Wir untersuchten den Einfluss der Größe von zwei Nano-TiO₂-Materialien und einem Produkt, das größere Abmessungen als die für Nanomaterialien festgelegte Maximalgröße (in einer Dimension) von 100 nm hat, auf die Toxizität für verschiedene aquatische und terrestrische Organismen, den Einfluss von Sonnenlicht auf die Toxizität sowie die Mischtoxizität der TiO₂-Materialien mit dem Biozid Triclocarban, das z. B. ebenso wie Nano-TiO₂ in Körperpflegeprodukten eingesetzt wird und beim Waschen oder Duschen in die Abwässer gelangt.

Sonnenlicht erhöht die toxische Wirkung von Nano-TiO₂-Materialien im Vergleich zu Laborlicht signifikant (WYRWOLL, 2015). Ursache ist die Menge an Hydroxyradikalen, die von TiO₂ unter Sonnenlichtbestrahlung produziert wird. Durch Nutzung verschiedener OH-Radikal Nachweismethoden konnte zwischen gelösten (freien) und an Organismen sorbierten Spezies unterschieden werden. So scheinen die Daten zu belegen, dass vor allem intermediäre Valenzbandlücken des TiO₂ und sorbierte OH-Radikale für die Toxizität verantwortlich sind, die u. a. zur Oxidation von Membranlipiden führen.

Die Ionenstärke der Testmedien zeigt ebenfalls einen Einfluss auf die Toxizität des Titandioxids, weil dadurch das Agglomerationsverhalten der Materialien beeinflusst wird. Dies ist eine generelle Schwierigkeit bei den experimentellen Untersuchungen dieses Nanomaterials: durch rasche Sedimentation verändert sich die Konzentration der suspendierten Partikel in der Wasserphase in Abhängigkeit der Testbedingungen rasch, so dass gemessene Toxizitätswerte nicht auf die (Nominal-)Konzentration, für die eine homogene Durchmischung angenommen wird, sondern auf die durch Sedimentation erheblich niedrigere Konzentration in der Wasserphase bezogen werden muss, die nach wenigen Minuten nur noch 10-20 % der Nominal-Konzentration entspricht. Dadurch ergeben sich zum Teil Vorsorgewerte im µg/L-Konzentrationsbereich. Solche Konzentrationen können tatsächlich in der Umwelt in Gewässern vorliegen.

Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (DABRUNZ et al., 2011) legen nahe, dass die Expositionszeit einen starken Einfluss auf die Toxizität von TiO₂ Nanopartikeln für Daphnien hat: mit zunehmender Expositionszeit steigen die Effekte – Endpunkte waren die Immobilität (Tod) und die Abnahme der Häutungsrates (durch Ablagerung der TiO₂-Nanopartikel auf der Daphnienhaut), ein bei Daphnien essentieller Wachstumsprozess.

Für die Umweltrisikobewertung von TiO₂-Nanopartikeln gilt, dass Toxizitätstests unter Bestrahlung mit Sonnenlicht durchgeführt werden sollten und sich bei Berücksichtigung der realen Konzentration in der Wasserphase (Abnahme durch rasche Sedimentation) für Wasserflöhe, eine wichtige Nahrungsquelle für höhere Organismen, auch bei umweltrelevanten Konzentrationen Toxizität auftritt. In Böden und Sedimenten, in denen die TiO₂ Konzentrationen durch Anreicherung erheblich höher sind, wurden keine Effekte auf Organismen (Sedimentwürmer und Regenwürmer) beobachtet.

Literatur

DABRUNZ A, DUESTER L, PRASSE C, SEITZ F, ROSENFELDT R, SCHILDE C, et al. (2011): Biological Surface Coating and Molting Inhibition as Mechanisms of TiO₂ Nanoparticle Toxicity in *Daphnia magna*. PLoS ONE 6, e20112.

MAES H, STIBANY F, GIEFERS S, DANIELS B, DEUTSCHMANN B, BAUMGARTNER W, SCHAEFFER A (2014): Accumulation and distribution of multiwalled carbon nanotubes in zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Sci. Technol. 48, 12256-12264.

RHIEM S, RIDING MJ, BAUMGARTNER W, MARTIN FL, SEMPLE KT; JONES KC, SCHAEFFER A, MAES HM (2015): Interactions of multiwalled carbon nanotubes with algal cells: quantification of association, visualization of uptake, and measurement of alterations in the composition of cells. Environ. Pollution 196, 431-439.

WYRWOLL, A (2015) PhD Thesis, RWTH Aachen University: Environmental hazard of selected TiO₂ nanomaterials under consideration of relevant exposure scenarios.

Nanoabfälle – gibt es ein Problem?

Dr. Julia Vogel, Umweltbundesamt

Nanomaterialien (NM) sind Materialien, die einen Anteil von mindestens 50 % Partikel in der Größenordnung von 100 Nanometer oder weniger ($\approx 1 - 100 \text{ nm}$) in mindestens einer Dimension enthalten¹. Sie können natürlichen oder anthropogenen Ursprungs sein. Im Zusammenhang mit den Risiken der Nanomaterialien sind anthropogen hergestellte Nanopartikel im Fokus, diese werden häufig auch als ENP „engineered nanoparticles“ oder ENM „engineered nanomaterials“ bezeichnet. Neben der tatsächlichen physikalischen Gestalt der Partikel ist sowohl die chemische Zusammensetzung als auch die Funktionalität der Oberfläche der Partikel sehr variabel; NM lassen sich keiner einzelnen Stoffgruppe zuordnen und können deshalb nur schwer als eine einheitliche Gruppe betrachtet werden, so dass generelle Aussagen über das Verhalten praktisch unmöglich sind. Daher ist auch keine eindeutige Aussage über die potenzielle von Nanomaterialien ausgehende gesundheitliche Gefährdung oder Wirkung auf die Umwelt möglich.

Auch die Produkte in denen NM Anwendung finden sind sehr vielfältig^{2,3,4}, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich nanomaterialhaltige Abfälle (sog. Nanoabfälle) in vielen verschiedenen Abfallströmen wiederfinden. Allerdings gibt es keine einheitliche Definition des Begriffes Nanoabfall. In Anlehnung an das Nano Trust Dossier des Institutes für Technikfolgenabschätzung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften⁵ wird der Begriff Nanoabfall wie folgt definiert:

- die enthaltenen Nanomaterialien sind anthropogenen Ursprungs,
- Nanoabfall kann anfallen bei
 - der Produktion von NM,
 - der Produktion von Produkten, die NM enthalten,
 - des Gebrauchs von NM-haltigen Produkten,
- Nanoabfall entsteht beabsichtigt (durch den Entsorgungswillen des Erzeugers)

Im Gegensatz zum Nanoabfall wird noch der Begriff des Nano-Kontaminant definiert, welcher unbeabsichtigt entsteht.

Eine Mengenabschätzung für Nanoabfälle ist schwierig, da bisher keine Kennzeichnungspflicht für Nanomaterialien in Produkten besteht und selbst die in Produkten enthaltenen Nanomaterialien deklariert sind, werden keine Mengen angegeben.

Da Nanomaterialien inzwischen in verschiedensten Produkten enthalten sind, ist auch davon auszugehen, dass in allen Abfallbehandlungsanlagen (MVA, MBA, Recycling) und Deponien auch Nanoabfälle mitbehandelt/eingetragen werden.

Die Ziele der Abfallwirtschaft sind unter anderem der Schutz von Umwelt und Gesundheit, der Schutz der natürlichen Ressourcen und das Schließen von Materialkreisläufen. Eine weitere wichtige Funkti-

¹ Definition der EU Kommission

² http://www.bund.net/themen_und_projekte/nanotechnologie/einsatzbereiche/

³ http://www.nanowerk.com/nanotechnology_databases.php

⁴ <http://nanotechproject.org/cpi/products/>

⁵ GREßLER et al. 2014, Nano trust Dossiers Nr. 40, ITA der ÖAW

on liegt in der Ausschleusung von Schadstoffen aus Materialkreisläufen, um deren Anreicherung zu verhindern (Senkenfunktion).

Im Europäischen Abfallrecht gibt es bislang keine Regelungen, die sich auf Nanoabfälle beziehen.

Wie sich Nanomaterialien in Abfallbehandlungsanlagen verhalten und wie oder ob sie von dort in die Umwelt eingetragen werden, ist bisher weitgehend unbekannt. Es stellt sich also die Frage ob Abfallbehandlungsanlagen auch im Falle von Nanoabfällen in der Lage sind ihre Senkenfunktion zu erfüllen.

Die OECD „Working Party on Resource Productivity and Waste WPRPW“ veröffentlicht zum Thema Nanoabfälle vier miteinander verbundene Literaturstudien zu den vier Entsorgungspfaden: Recycling, thermische Entsorgung, Deponierung und Abwasser Behandlung. Diese beschäftigen sich detailliert mit den daraus möglicherweise resultierenden Emissionen in die Luft, das Abwasser und die festen Rückstände, sowie insbesondere im Bereich Recycling, mit der Arbeitssicherheit. Insgesamt wird in den Literaturstudien deutlich, dass noch wenig Informationen zum Thema Nanoabfälle und deren Entsorgung vorhanden sind.

Eine Studie der Prognos AG⁶ beschäftigt sich eingehend mit dem Recycling nanomaterialhaltiger Abfälle und identifiziert die relevanten Abfallströme: Elektronik, Papier, Metalle, Textilien, Elektrogeräte, Batterien, Kunststoffe und Gummi, wobei eine Mengenabschätzung der nanomaterialhaltigen Produkte im Recyclingkreislauf nicht möglich ist.

Erste Studien aus der Schweiz und Deutschland an Abfallverbrennungsanlagen zeigen, dass sich Nanomaterialien weitestgehend in den festen Rückständen der Verbrennung und den Filterstäuben wiederfinden⁷.

Im Rahmen eines UFOPLAN-Projektes des Umweltbundesamtes »Untersuchung möglicher Umweltauswirkungen bei der Entsorgung nanomaterialhaltiger Abfälle in Abfallbehandlungsanlagen« des Umweltbundesamtes soll durch systematische Versuche in Kleinf Feuerungsanlagen im Technikumsmaßstab und Messungen an einer realen Müllverbrennungsanlage das Verhalten von Nanomaterialien bei der Verbrennung untersucht werden. Dazu wird der gesamte Weg vom Input über Verbrennung, Abgasreinigung bis zu den Rückständen der Verbrennung betrachtet. Daraus sollen schließlich die Verteilungspfade des untersuchten Nanotitandioxides ermittelt und möglichst auch quantifiziert werden.

Im Rahmen dieses Projektes wurde Nanotitandioxid auf den Inputstrom Hausmüll aufgebracht und in verbrannt. Das Nanomaterial wurde als Titandioxid in allen Versuchen zugegeben, die Analytik erfasst aber den Gehalt an Titan. Die Messungen ergaben, dass der größte Anteil des Titans nach der Verbrennung in der Rostschlacke (~ 92 %) sowie der Flugasche (~ 5 %) zu finden ist. Die Titankonzentration des Rauchgases wird durch die Zugabe des Nanotitandioxides zum Input nicht erhöht und die Rauchgasreinigung den Titangehalt effektiv reduziert. Diese Ergebnisse stimmen mit denen einer Studie aus der Schweiz zur Verbrennung von Ceriumdioxid in einer Müllverbrennungsanlage überein.

Zusätzlich werden im dem UFOPLAN-Projekt auch Untersuchungen an einer Klärschlammverbrennungsanlage durchgeführt. Dabei soll u. a. der Einfluss der Feuerungstechnik – Wirbelschicht vs. Rostfeuerungs – untersucht werden, allerdings liegen die Ergebnisse noch nicht endgültig vor.

⁶ JUTTA STRUWE, EVA SCHINDLER: Bedeutung von Nanomaterialien beim Recycling von Abfällen, Arbeitspapier 270, November 2012, http://www.prognos.com/fileadmin/pdf/publikationsdatenbank/121100_Prognos_HansBoecklerStiftung_Bedeutung_von_Nanomaterialien.pdf

⁷ WALSER et al., "Persistence of engineered nanoparticles in a municipal solid-waste incineration plant", Nature Nanotechnology, Vol 7, August 2012

Das Projekt soll bis Ende 2016 abgeschlossen werden.

Nanoabfälle rücken erst langsam in den Fokus der Wissenschaft und es sind noch zu viele Fragen offen, um eine Antwort auf die Frage zu geben, ob Nanoabfälle ein Problem für Mensch und Umwelt sind. Deutsche Abfallverbrennungsanlagen, mit hohen Sicherheitsstandards, sind vermutlich in der Lage einen Großteil der Nanomaterialien aus dem Abluftstrom zurückzuhalten, allerdings gilt dies sicherlich nicht für Anlagen mit niedrigeren Standards, wie sie in anderen Ländern, insbesondere außerhalb der EU, üblich sind. Es bleibt festzustellen, dass mehr Forschung benötigt wird und Nanoabfälle als potenzielles Risiko im Blick behalten werden sollten, um ggf. handeln zu können, sollten sich negative Umweltauswirkungen oder gesundheitliche Risiken zeigen.

Vergleichende Inhalationstoxizität verschiedener Nanopartikel

Lan Ma-Hock, Volker Strauß, Sibylle Gröters, Bennard von Ravenzwaay, Robert Landsiedel, Experimentelle Toxikologie und Ökologie, BASF SE

Nanomaterialien (NM) können Stäube bilden, die eingeatmet werden können. Es ist seit langem bekannt, dass nicht-nanoskalige schwerlösliche Partikel nach Inhalation in der Lunge Entzündungen auslösen können (JOTTEN and KLOSTERKOTTER 1955). Es konnte gezeigt werden, dass Stäube aus schwerlöslichen NM sich grundsätzlich nicht anders verhalten als Feinstaubpartikel; Effekte jedoch bereits bei niedrigeren Massenkonzentration auftreten können (ARTS *et al.* 2007; ELDER *et al.* 2005; OBERDORSTER *et al.* 1994). Verschiedenen Formen und Freisetzungsszenarien von Stäuben aus NM können darüber hinaus zu Unterschieden in der Wirkung auf die Lunge führen (ARTS *et al.* 2007; ELDER *et al.* 2005; OBERDORSTER *et al.* 1994; REUZEL *et al.* 1991; WARHEIT *et al.* 2007). Aufgrund der Vielzahl der Oberflächenmodifikationen und Größenverteilungen der NM und ihrer Anwendungen ist es nicht möglich, jede einzelne NM umfassend tierexperimentell zu prüfen. Daher wurde vom European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) ein mehrstufiges Schema zur Gruppierung und Testung von NM entwickelt („decision-making framework for grouping and testing nanomaterials“, DF4nano; ARTS *et al.* 2015), das die Risikobewertung weitgehend aufgrund der Materialeigenschaften, der bio-physikalischen Interaktionen und der zellulären Effekte (in vitro) der NM vornimmt. Tierversuche sind nur in Ausnahmefällen nötig und werden als Kurzzeitinhalationsstudien (short-term inhalation studies, STIS) durchgeführt.

Darüber hinaus kann die Kurzzeitstudie im Rahmen des mehrstufigen Ansatzes zur Gruppierung von NM eingesetzt werden, um die getesteten Materialien gemäß ihrer Toxizität in den Gruppen einzuordnen. Diese ermöglicht die Priorisierung und Konzentrationswahl späterer sub-chronischer oder chronischer Studien. ECETOC hat hierzu ein mehrstufiges Gruppierungskonzept vorgestellt (ARTS *et al.* 2015),

Die Kurzzeitinhalationsstudie (STIS) an Ratten umfasst eine fünftägige Exposition und eine anschließende dreiwöchige Nachbeobachtungszeit. Die Tiere werden kurz nach der Exposition und nach der Nachbeobachtungszeit hinsichtlich folgender drei Aspekte untersucht:

1. Inhalationstoxizität:

Effekte der eingeatmeten Partikel werden durch histologische Untersuchungen des Respirationstraktes und die Untersuchung der Lungenspülflüssigkeit (BALF) aufgezeigt. Beide Untersuchungsmethoden sind komplementär: Die Histologie zeigt morphologische Veränderungen im gesamten Respirationstrakt, inklusive des oberen Traktes wie Nase und Larynx, an. In der BALF werden Summenparameter der Lungen gemessen. Diese Untersuchung zeigt empfindlich die frühen Veränderungen in der Lunge an, wohingegen die Histologie deren frühe morphologische Manifestation erkennt.

2. Reversibilität und Progression:

Histologie und BALF-Analyse werden zu zwei Zeitpunkten durchgeführt. Der Vergleich der Inzidenz und Schweregrade gibt Hinweise auf Reversibilität oder Progression der Effekte.

3. Deposition in der Lunge und ihre Abtransport:

Untersuchung der Lungenbeladung zu zwei Zeitpunkten ermöglicht eine Abschätzung der internen Exposition und der Clearance aus der Lunge. So können sowohl Hinweise auf Überladung der Lunge als auch Differenzierungen der biologisch löslichen und schwerlöslichen Partikel gewonnen werden.

Die Untersuchung zusätzlicher Effekte – beispielsweise extrapulmonaler Organe – kann in das Studienprotokoll aufgenommen werden.

Bislang wurden mehr als 40 NM in STIS an der Ratte geprüft. Ein Auszug der umfangreichen Daten zeigt, dass die Materialien sich in Bezug auf die oben erwähnten drei Aspekte zum Teil erheblich voneinander unterscheiden. Dies soll anhand der Ergebnisse der Testung dreier NM im STIS illustriert werden:

- 1) ZnO ist ein Beispiel für Partikel mit mäßiger Wasserlöslichkeit aber rascher Lösung in biologischen Systemen. In der STIS wurden Effekte am oberen und unteren Respirationstrakt beobachtet. Die Effekte sind überwiegend den freigesetzten Zinkionen zuzuordnen und waren reversibel innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums. Die Reversibilität lässt sich durch eine schnelle Clearance aus der Lunge durch Lösung und Abtransport der Ionen erklären (LANDSIEDEL *et al.* 2014).
- 2) CeO₂ (NM211 and 212) ist ein schwerlösliches partikuläres Material, das keine toxischen Ionen in relevantem Ausmaß freisetzt. In der STIS zeigten sich ausgeprägte Entzündungen in der Lunge und eine verringerte Clearance der Lunge bei Aerosolkonzentrationen oberhalb von 5 mg/m³ (KELLER *et al.* 2014), bei 0,5 mg/m³ wurden keine Entzündungen beobachtet und die Clearance aus der Lunge erfolgte mit ‚normaler‘ physiologischer Geschwindigkeit.
- 3) Nano-BaSO₄ (NM220) verursachte in der STIS keine Entzündung bei einer sehr hohen Aerosolkonzentration von 50 mg/m³; es wurde zudem rasch aus der Lunge entfernt (LANDSIEDEL *et al.* 2014). In einer Instillationsstudie und in Inhalationsstudien mit Expositionsdauer von vier und 13 Wochen wurde die schnelle Clearance bestätigt (KONDURU *et al.* 2014). Die schnelle Clearance lässt eine Teillöslichkeit des ansonsten unlöslichen Bariumsulfats *in vivo* vermuten.

Eine STIS misst die frühen Effekte in der Lunge, die häufig als Entzündung und oder beginnende histologische Veränderungen zu beobachten sind. Dies ermöglicht zum einen die Einschätzung der toxischen Potenz eines Staubes, zum andern ist eine anhaltende Entzündung die notwendige (aber möglicherweise nicht hinreichende) Voraussetzung für die Entstehung von Fibrosen und ggf. Tumoren in Rattenlungen (ILSI Risk Science Institute Workshop Participants 2000).

Im Rahmen des von ECETOC vorgeschlagenen DF4nano werden NM in 4 Hauptgruppen eingeteilt: Gruppe 1 lösliche NM, Gruppe 2 Fasern und faserähnliche NM, Gruppe 3 passive NM, Gruppe 4 aktive NM. Basierend auf den Materialeigenschaften, Bio-physikalischen Interaktionen und den Ergebnissen der STIS erfüllt ZnO die Kriterien für die Gruppe 1 der löslichen NM, CeO₂ der Gruppe 4 der aktiven NM und BaSO₄ ist aufgrund der geringen Inhalationstoxizität der Gruppe 3 der passiven NM, zu zuordnen. Basierend auf der Gruppierung und den Ergebnissen der STIS kann das Gefährdungspotenzial der NM bewertet werden.

Referenzliste

1. ARTS, J. H., HADI, M., IRFAN, M. A., KEENE, A. M., KREILING, R., LYON, D., MAIER, M., MICHEL, K., PETRY, T., SAUER, U. G., WARHEIT, D., WIENCH, K., WOHLLEBEN, W., and LANDSIEDEL, R. (2015). A decision-making framework for the grouping and testing of nanomaterials (DF4nanoGrouping). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71(2 Suppl), S1-27.
2. ARTS, J. H., MUIJSER, H., DUISTERMAAT, E., JUNKER, K., and KUPER, C. F. (2007). Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months. *Food Chem Toxicol* 45(10), 1856-1867.
3. ELDER, A., GELEIN, R., FINKELSTEIN, J. N., DRISCOLL, K. E., HARKEMA, J., and OBERDORSTER, G. (2005). Effects of subchronically inhaled carbon black in three species. I. Retention kinetics, lung inflammation, and histopathology. *Toxicol Sci* 88(2), 614-629.
4. ILSI RISK SCIENCE INSTITUTE WORKSHOP PARTICIPANTS (2000). The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhal Toxicol* 12(1-2), 1-17.
5. JOTTEN, K. W., and KLOSTERKOTTER, W. (1955). Coal dust pneumoconioses. *Arch. Hyg. Bakteriol.* 139(4), 314-324.
6. KELLER, J., WOHLLEBEN, W., MA-HOCK, L., STRAUSS, V., GROTERS, S., KÄTTLER, K., WIENCH, K., HERDEN, C., OBERDÖRSTER, G., and VAN RAVENZWAAY, B. (2014). Time course of lung retention and toxicity of inhaled particles: short-term exposure to nano-Ceria. *Archives of toxicology*, 1-27.
7. KONURU, N., KELLER, J., MA-HOCK, L., GROTERS, S., LANDSIEDEL, R., DONAGHEY, T. C., BRAIN, J. D., WOHLLEBEN, W., and MOLINA, R. M. (2014). Biokinetics and effects of barium sulfate nanoparticles. *Part Fibre. Toxicol.* 11, 55.
8. LANDSIEDEL, R., MA-HOCK, L., HOFMANN, T., WIEMANN, M., STRAUSS, V., TREUMANN, S., WOHLLEBEN, W., GROTERS, S., WIENCH, K. and VAN RAVENZWAAY, B. (2014). Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials. *Part Fibre. Toxicol.* 11, 16.
9. OBERDORSTER, G., FERIN, J., and LEHNERT, B. E. (1994). Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 5, 173-179.
10. REUZEL, P. G., BRUIJNTJES, J. P., FERON, V. J., and WOUTERSEN, R. A. (1991). Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats. *Food Chem Toxicol* 29(5), 341-354.
11. WARHEIT, D. B., WEBB, T. R., REED, K. L., FRERICHS, S., and SAYES, C. M. (2007). Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230(1), 90-104.

Nanopartikel in Lebensmitteln und Kosmetika

Richard Winterhalter, Silvio Dietrich, Wolfgang Matzen, Marina Sysoltseva und Hermann Fromme, Bayer. Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Im Rahmen des vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz geförderten Projekts „Lebensmittelsicherheit und Nanotechnologie (LENA)“ befasst sich das LGL mit verschiedenen Aspekten der Nanotechnologie im Lebensmittelbereich und entwickelt analytische Methoden zum Nachweis von Nanopartikeln in Lebensmitteln und Kosmetika.

Im Lebensmittelbereich werden Nanopartikel zum einen in der Verpackungsindustrie, aber auch in Lebensmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln eingesetzt. In Lebensmittelverpackungen wird z. B. Nanoton als Gasbarriere für Sauerstoff und Kohlendioxid in Kunststoffverpackungen eingesetzt. Bei der Herstellung von PET-Flaschen ermöglichen Titanitrid-Nanopartikel (TiN) ein schnelleres Aufheizen der PET-Rohlinge um diese aufzublasen und Nanosilber findet Anwendung als antimikrobielle Beschichtung in Kunststoffboxen. Im Rahmen des Projektes LENA durchgeführte Migrationsstudien zeigten allerdings, dass keine Nanopartikel auf Lebensmittel übertreten, da die Diffusion in der Kunststoffmatrix viel zu langsam ist und es somit auch zu keiner Exposition des Verbrauchers kommen kann.

In Lebensmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln werden nanoskalige Mizellen und Liposome in vielfältiger Weise eingesetzt z. B. für wasserunlösliche Substanzen in Limonaden oder zur besseren Bioverfügbarkeit von Vitaminen. Einige Lebensmittelzusatzstoffe wie amorphe Kieselsäure (SiO₂, E 551) enthalten ebenfalls nanoskalige Strukturen.

Im Bereich der Kosmetika werden Titandioxid (TiO₂) und Zinkoxid (ZnO) in Form von Nanopartikeln als UV-Schutz in Sonnencremes eingesetzt. Außerdem wird Carbon Black, das auch in nanoskaliger Form vorliegen kann, als schwarzer Farbstoff in dekorativer Kosmetik und Tätowierfarben verwendet.

Zur Information des Verbrauchers ist eine Kennzeichnungspflicht von Nanomaterialien in Lebensmitteln und Kosmetika in der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 bzw. 1223/2009 vorgesehen. Um in der Lage zu sein diese Kennzeichnungspflicht zu überwachen müssen analytische Methoden entwickelt werden, die alle Aspekte der jeweils zugrunde liegenden Definitionen von Nanomaterialien erfassen können.

Dazu ist eine vollständige Charakterisierung der Nanomaterialien notwendig, um die chemische Identität und die Anzahlgrößenverteilung zu bestimmen. Prinzipiell lassen sich die Methoden in Einzelpartikel- und Ensembletechniken unterteilen. Mit einer Einzelpartikelmethode wie Elektronenmikroskopie (REM) kann neben der Größe auch die Form von Nanopartikeln ermittelt werden, doch ist ein erheblicher Zeitaufwand nötig um eine hinreichend große Anzahl an Nanopartikeln zu vermessen, um eine repräsentative Größenverteilung zu erhalten. Bei den Ensembletechniken wie z. B. Lichtstreuung (DLS) wird in der Regel ein methodenabhängiger mittlerer Partikeldurchmesser bestimmt, der nur bedingt in eine Anzahlgrößenverteilung umgerechnet werden kann.

Zusätzlich können Nanopartikel durch Feldfluss-Fraktionierung (AF4) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dies ermöglicht zum einen die Größenbestimmung der Partikel, zum anderen können die Partikelfraktionen aufgefangen werden und mit dem REM weiter untersucht werden.

Die chemische Analyse anorganischer Nanopartikel kann mit Hilfe der Induktiv-gekoppeltes-Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) durchgeführt werden. Betreibt man ICP-MS im Einzelpartikel-Modus, kann damit auch die Anzahlgrößenverteilung der Nanopartikel bestimmt werden.

Anhand ausgewählter Beispiele werden die am LGL eingesetzten analytischen Methoden zur Charakterisierung von Nanopartikeln und Nanomaterialien (REM, AF4, DLS, ICP-MS) vorgestellt und Ergebnisse der Untersuchungen von TiO_2 in Sonnencreme, Carbon Black in Tätowierfarben, SiO_2 in Nahrungsergänzungsmitteln und Nanosilber in so genanntem „Silberwasser“ präsentiert.

Tagungsleitung / Referenten

Claus Kumutat
Präsident des LfU
Bayer. Landesamt für Umwelt
Bürgermeister-Ulrich-Straße 160
86179 Augsburg
Tel.: +49 (0)821 9071–5001
E-Mail: Claus.Kumutat@lfu.bayern.de

Dr. Marina Maier
Bayer. Landesamt für Umwelt
Bürgermeister-Ulrich-Straße 160
86179 Augsburg
Tel.: +49 (0)821 9071–5811
E-Mail: Marina.Maier@lfu.bayern.de

Dr. Martin Wegenke
Bayer. Landesamt für Umwelt
Bürgermeister-Ulrich-Straße 160
86179 Augsburg
Tel.: +49 (0)821 9071–5122
E-Mail: Martin.Wegenke@lfu.bayern.de

Dr. Anke Jesse
Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz,
Bau und Reaktorsicherheit
Head of Division IG II 6
Nanotechnologies
Federal Ministry for the Environment, Nature
Conservation, Building and Nuclear Safety
Krausenstraße 17 – 18
10117 Berlin
Tel.: + 49 (0)3018 305–2128
E-Mail: Anke.Jesse@bmub.bund.de

Dr. Lan Ma-Hock
Inhalation Toxicology
Postal Address: BASF SE, GB/TB - Z470
67056 Ludwigshafen
Tel.: +49 (0)621 60–59157
E-Mail: Lan.Ma-Hock@basf.com

Dr. Matthias Rösslein
Senior Scientist
Empa – Swiss Federal Laboratories for
Materials Science and Technology
Lerchenfeldstraße 5
CH-9014 St. Gallen
Tel.: +41 58 765–7784
E-Mail: Matthias.Roesslein@empa.ch

Prof. Dr. Andreas Schäffer
RWTH Aachen University
Institute for Environmental Research
Worringerweg 1
52074 Aachen
Tel.: +49 (0)241 8026678
E-Mail: Andreas.Schaeffer@bio5.rwth-aachen.de

Prof. Dr. Michael Schuster
Fachgruppe Analytische Chemie
Fakultät für Chemie
TU München
Lichtenbergstraße 4
85747 Garching
Tel.: + 49 (0)89 289–13763
E-Mail: Michael.Schuster@tum.de

Dr. Julia Vogel
Fachgebiet III 2.4 Abfalltechnik/Abfalltechnik-
transfer
Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel.: +49 (0)340 2103–2180
E-Mail: Julia.Vogel@uba.de

Dr. Richard Winterhalter
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und
Lebensmittelsicherheit
Sachgebiet Chemikaliensicherheit und Toxi-
kologie
Pfarrstraße 3
80538 München
Tel.: +49 (0)9131 6808–4239
E-Mail: Richard.Winterhalter@lgl.bayern.de

