



nanolab

Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit



LGL

Analytik von Nanomaterialien

Stand der Technik, Schwierigkeiten und Perspektiven mit Fokus
auf Analytik in Lebensmitteln und Lebensmittelkontaktmaterialien

Richard Winterhalter

Gliederung

Anforderungen an die Analytik von Nanomaterialien

Größe, Form, Größenverteilung, chemische Zusammensetzung

Methoden zur Charakterisierung von Nanomaterialien

Abbildende Methoden, Lichtstreuungsmethoden, Trennmethoden, Elementspezifische Methoden

Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden, Grenzen, Einsatzbereich

Probenvorbereitung

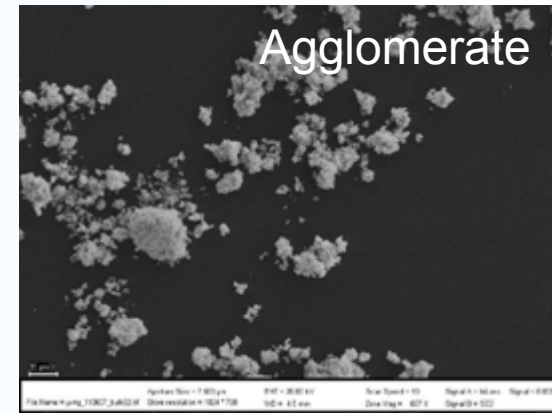
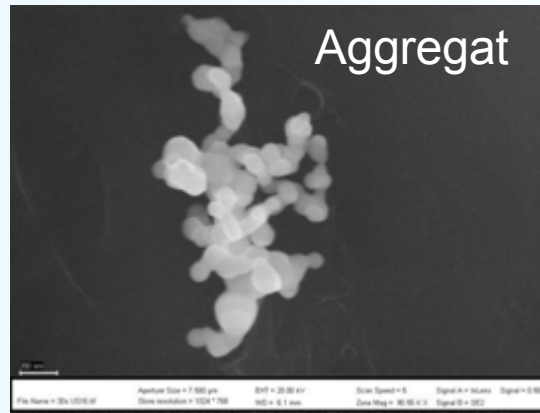
Trennung der Nanopartikel von der Matrix, Dispersion der Nanopartikel

Zusammenfassung und Perspektiven

Anforderungen an die Analytik von Nanomaterialien

Was soll bestimmt werden?

- Größe, Anzahlgrößenverteilung
- Primärpartikel, Aggregate, Agglomerate



- Chemische Zusammensetzung (natürlich vs. synthetisch, anorganische „harte Partikel“ vs. organische „weiche Partikel“ (Mizellen))

Anforderungen an die Analytik von Nanomaterialien

Methodenabhängige Größen

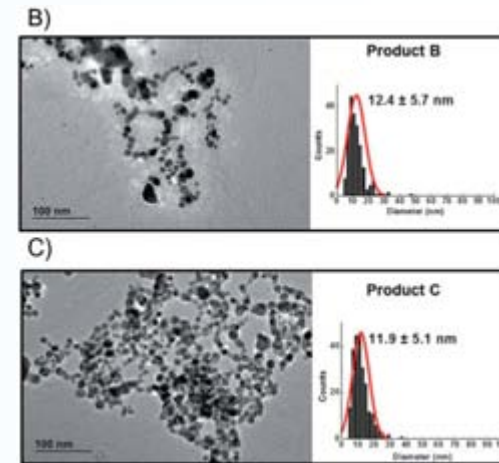
- Geometrischer Durchmesser (Abbildung im Elektronenmikroskop)
- Hydrodynamischer Durchmesser (D_h); Beweglichkeit der NP in Lösung (Dynamische Lichtstreuung)
- Trägheitsradius, Gyrationradius R_g (statische Lichtstreuung)

Anforderungen an die Analytik von Nanomaterialien

Größenverteilungen

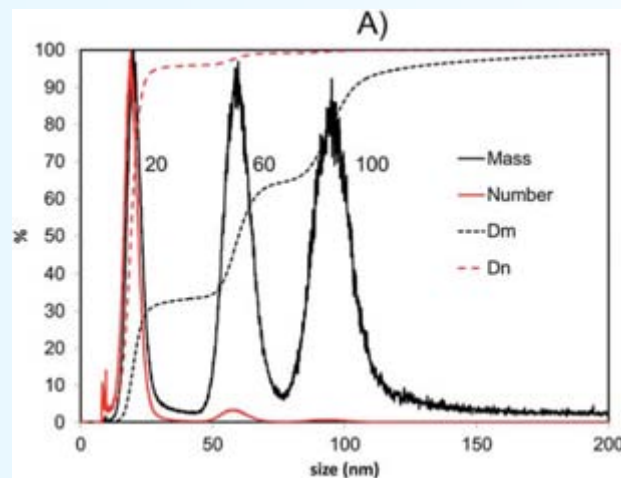
➤ Anzahlverteilung

- kann mit Elektronenmikroskop direkt bestimmt werden
- Einzelpartikel-ICP-MS bei kugelförmigen Partikeln



➤ Bei anderen Methoden wird Volumenverteilung, bzw. Massenverteilung gemessen

Berechnung der Anzahlverteilung bei sphärischen NP und bekannter Dichte möglich



Beide Abbildungen aus: Cascio et al. 2015: Detection, quantification and derivation of number size distribution of silver nanoparticles in antimicrobial consumer products, *J. Anal. At. Spectrom.* 30, 1255-1265

Methoden zur Charakterisierung von Nanomaterialien

Abbildende Methoden

- Elektronenmikroskopie (REM, TEM): Morphologie, „geometrischer“ Radius, Chemische Zusammensetzung (EDX)

Lichtstreuungsmethoden

- Statische Lichtstreuung (MALS): Trägheitsradius R_h
- Dynamische Lichtstreuung (DLS): Hydrodynamischer Radius R_h

Trennung nach Partikelgröße

- Feldflussfraktionierung (AF4, AF⁴)
- Scheibenzentrifuge, CLS (centrifugal liquid sedimentation)
- Hydrodynamische Chromatographie
- Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

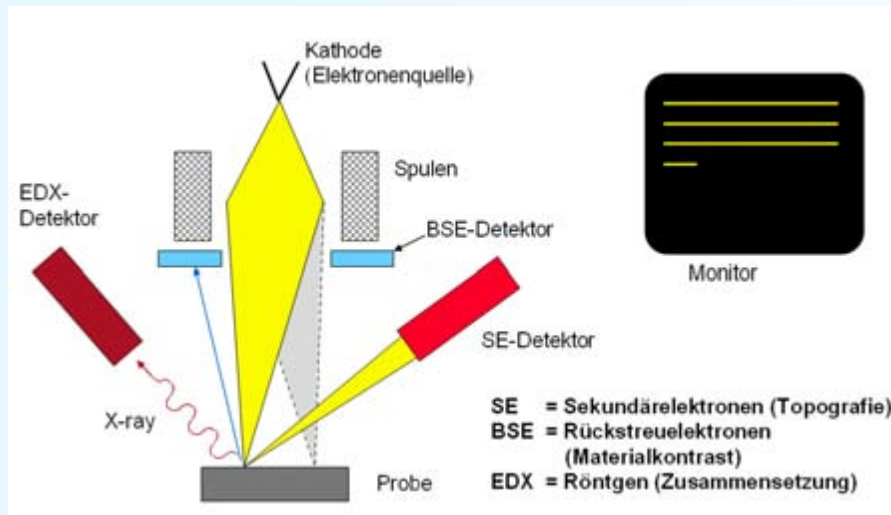
Chemische Analyse mit Massenspektrometrie

- ICP-MS, Einzelpartikel-ICP-MS

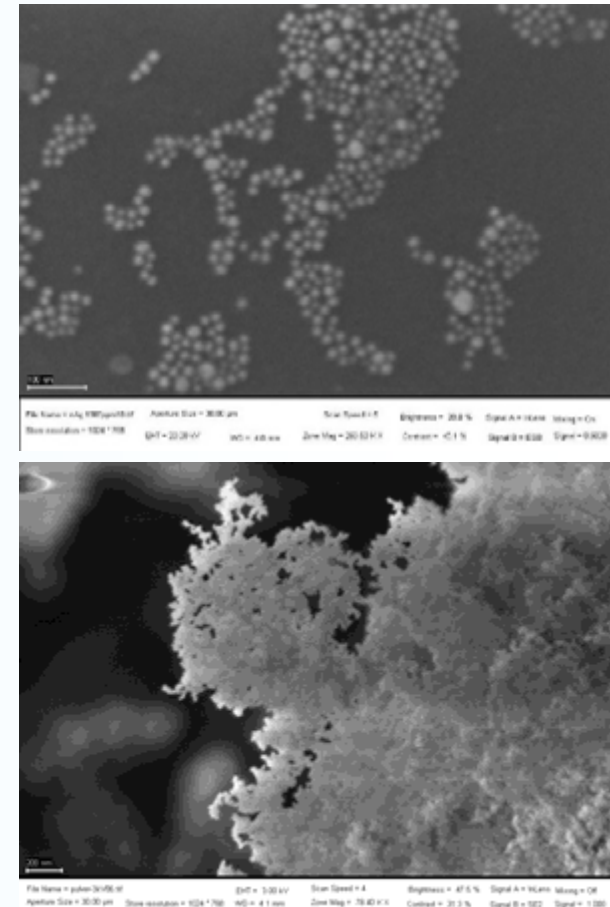
Abbildende Methoden

Rasterelektronenmikroskopie (REM, SEM)

- Morphologie, „geometrischer“ Radius, Chemische Zusammensetzung (EDX)
- Unterscheidung Primärpartikel von Aggregaten
- Nachteil: Zeitaufwändig, um genügend große Anzahl Partikel (> 500) zu untersuchen für repräsentative Größenverteilung



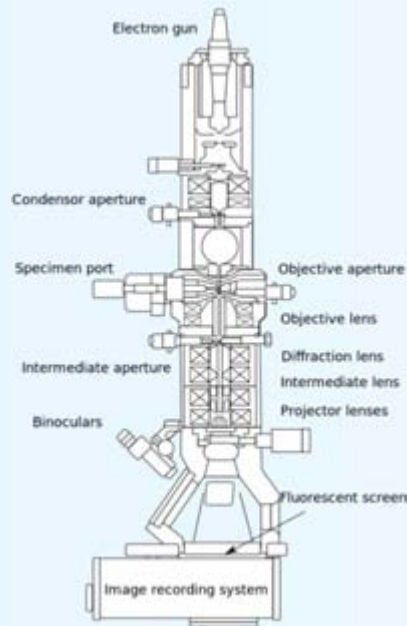
Bildquelle: „Funktionsprinzip REM“ von Salino01 aus der deutschsprachigen Wikipedia. Lizenziert unter CC BY-SA 3.0 über Wikimedia Commons



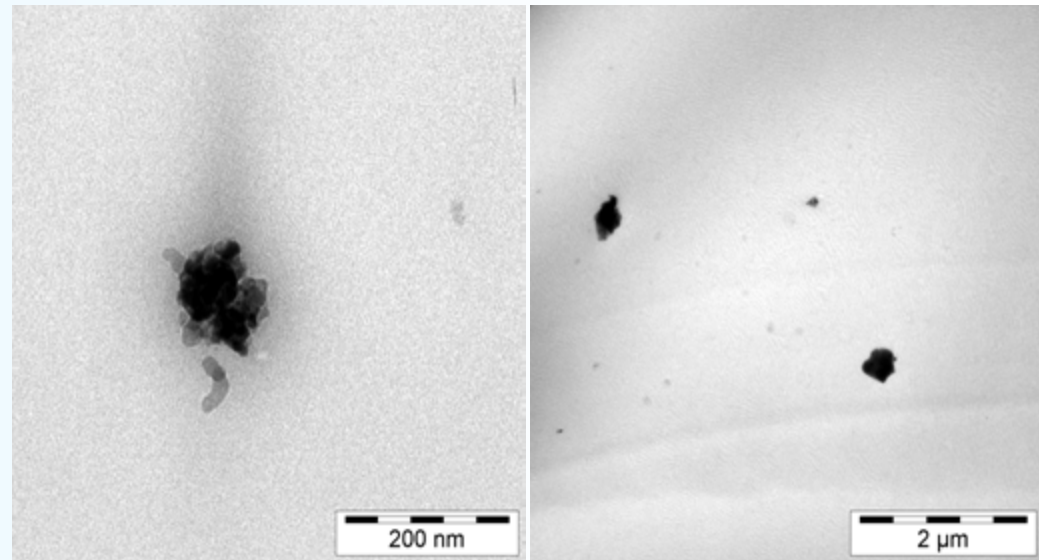
Abbildende Methoden

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

- „geometrischer“ Radius, Chemische Zusammensetzung (EDX), Auflösung < 1 nm
- Unterscheidung Primärpartikel von Aggregaten
- Nachteil: Zeitaufwändig, um genügend große Anzahl Partikel (> 500) zu untersuchen für repräsentative Größenverteilung



Bildquelle: „TEM ray diag2.basic.de“. Lizenziert unter CC BY 2.5 über Wikimedia Commons



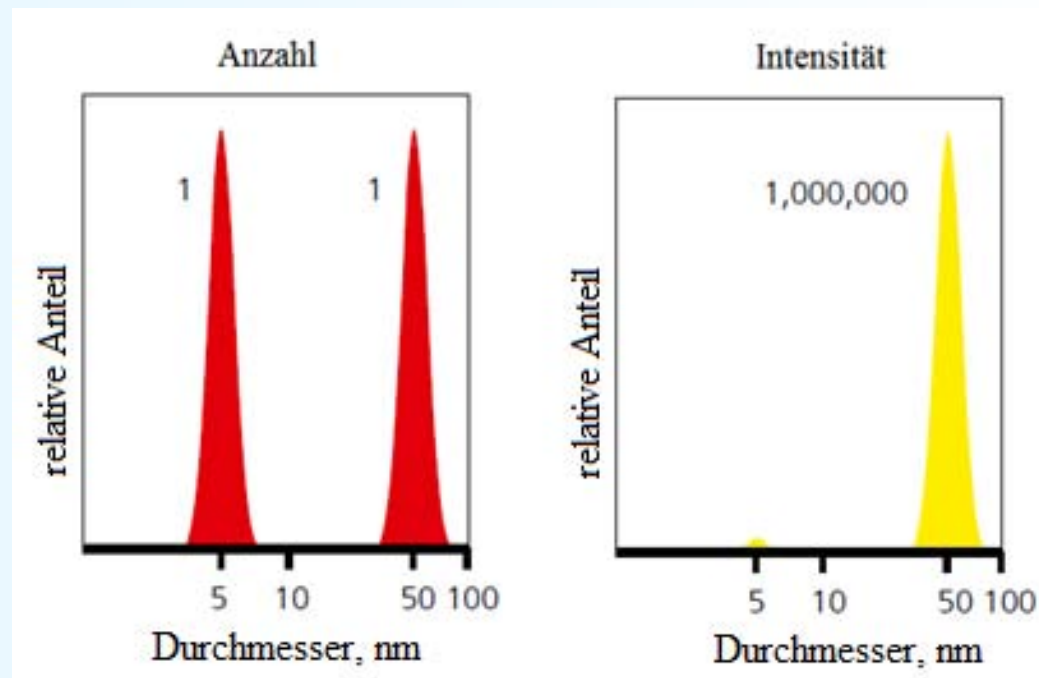
TEM-Aufnahmen von Mikrotomschnitten einer PET-Flasche mit nano-Titannitrid

Quelle: R. Franz, Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV) Freising (Projekt LENA)

Lichtstremethoden

Statische und dynamische Lichtstreuung

- Nachteil aller Lichtstremethoden
Lichtstreu-Intensität \sim Radius⁶ , Gegenwart großer Partikel stört die Messung sehr kleiner Partikel

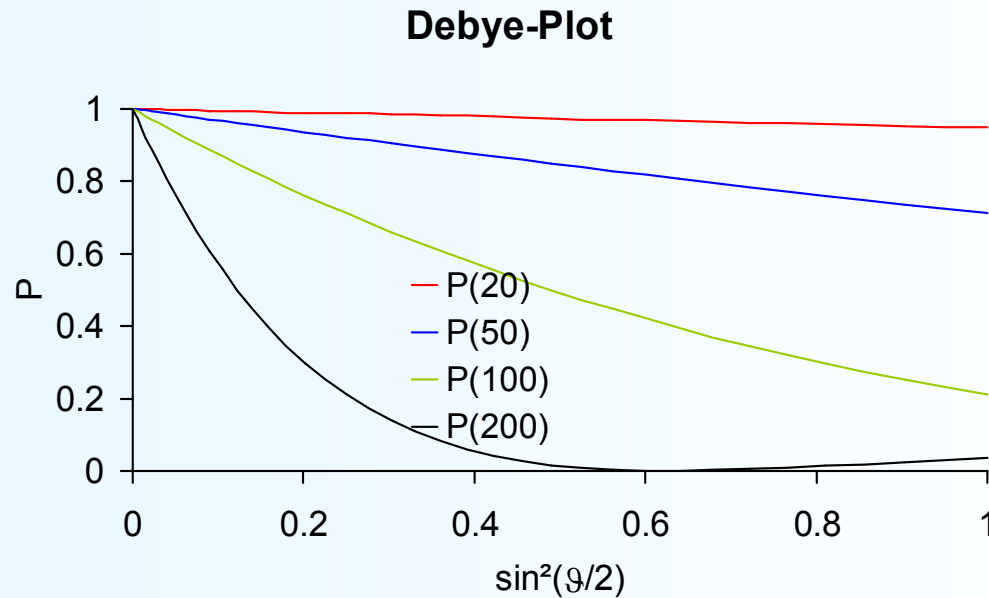


Bildquelle: Malvern Instruments Limited

Lichtstremethoden

Statische Lichtstreuung (MALS, multi angle light scattering)

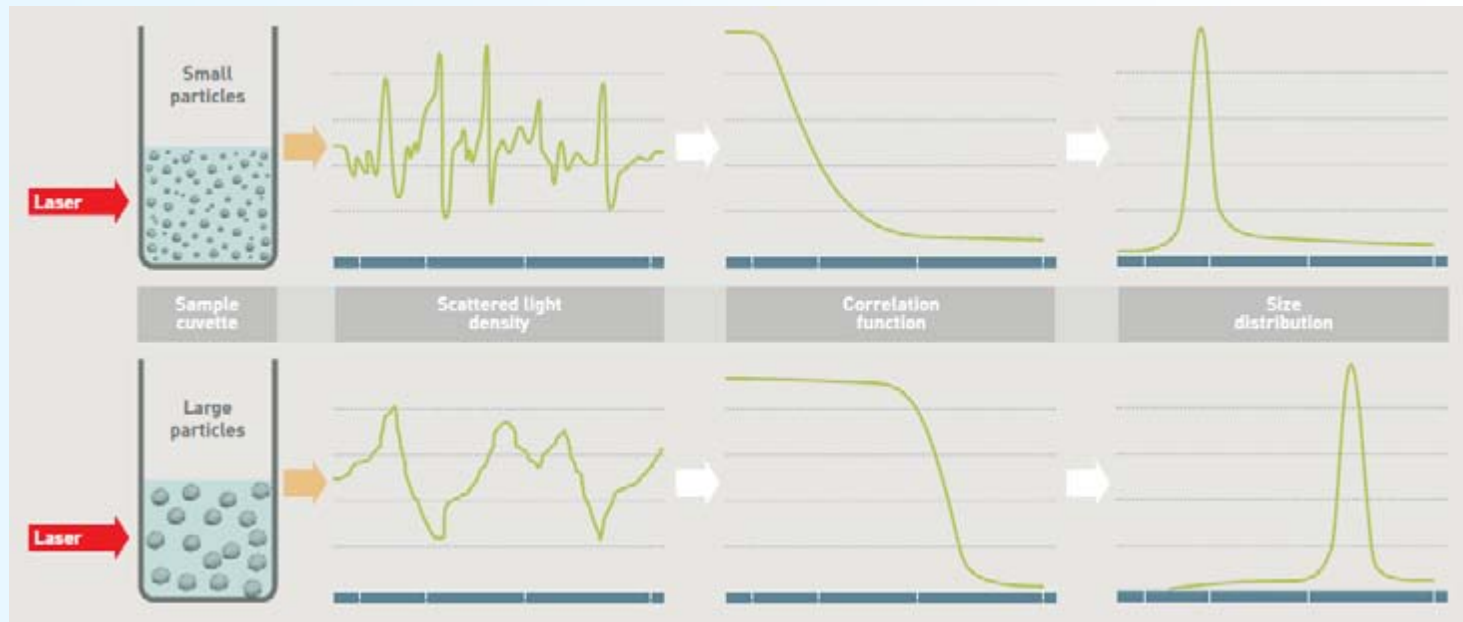
- Prinzip: Messung des Streulichts in mehreren Raumwinkeln (7 bzw. 21)
- Kleine Partikel streuen in alle Richtungen gleich, große hauptsächlich nach vorne
- Streumassenradius, Trägheitsradius, Gyrationradius R_g (auch $\langle r \rangle_g$)



Lichtstremethoden

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

- Hydrodynamischer Durchmesser
- Messung der zeitlichen Veränderungen des von Partikeln gestreuten Lichts. Anhand der Geschwindigkeit der Fluktuation der Helligkeitspunkte kann die Partikelgröße abgeleitet werden.
- Messbereich: Partikelgrößen im Bereich von 5 nm bis μm -Bereich
- Funktioniert nur verlässlich bei monodispersen Größenverteilungen

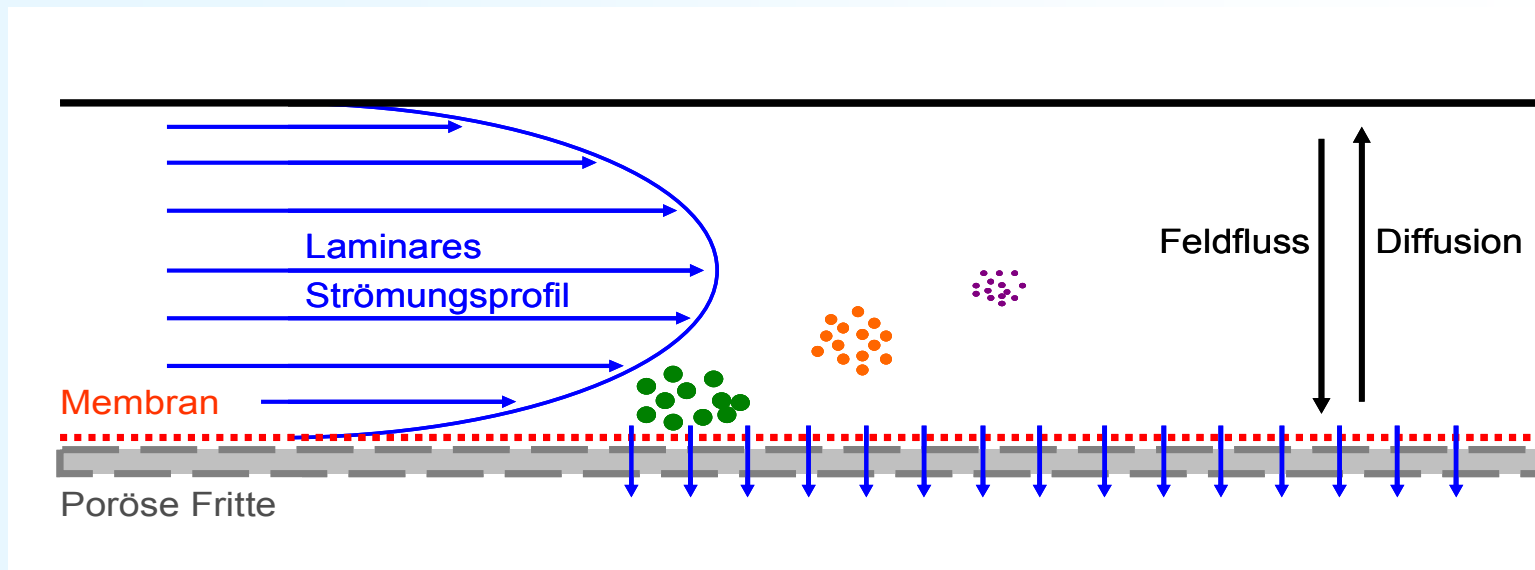


Bildquelle: Malvern Instruments Limited

Trennmethoden

Feldflussfraktionierung (FFF), z.B. asymmetrischer Fluss-FFF (AF4)

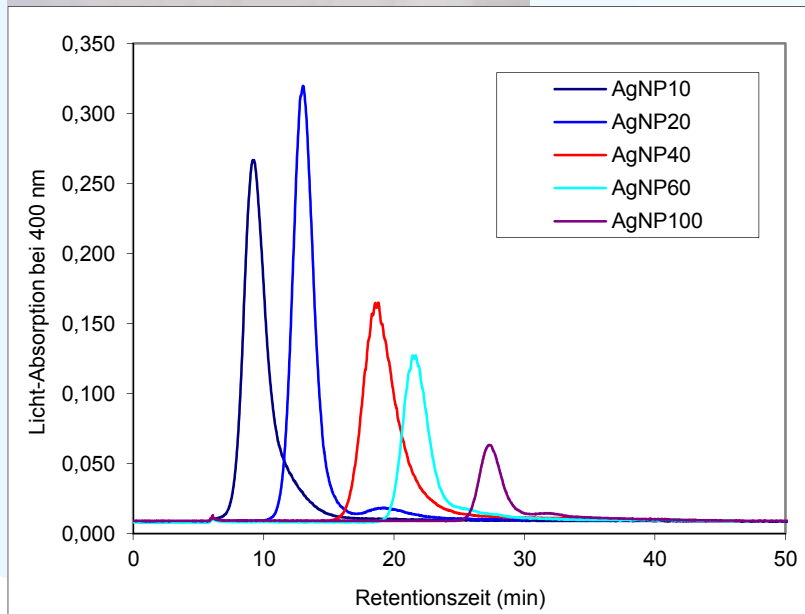
- Kontaktlose Trennmethode, FFF-Theorie
- Hydrodynamischer Durchmesser



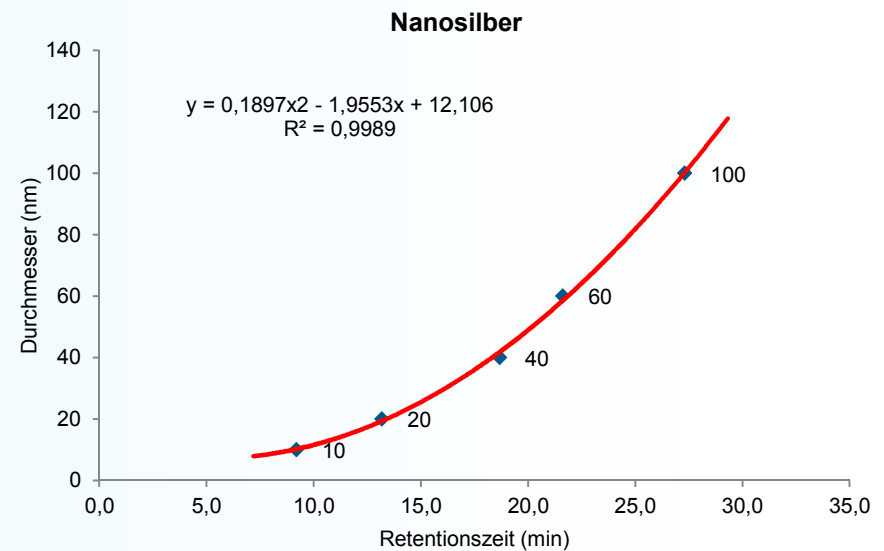
- Mit unterschiedlichsten Detektoren koppelbar: UV-VIS, MALS, DLS, ICP-MS
- Fraktionen können gesammelt werden für off-line-Analyse
- Grenzen/Nachteile: rel. zeitaufwändig, Wechselwirkung von Partikeln mit Membran möglich

Trennmethoden

asymmetrischer Fluss-FFF (AF4)
Beispiel Nanosilber (10, 20, 40, 60, 100 nm)
Bestimmung der Größe über Retentionszeit



Kalibrierkurve Partikelgröße vs. Retentionszeit



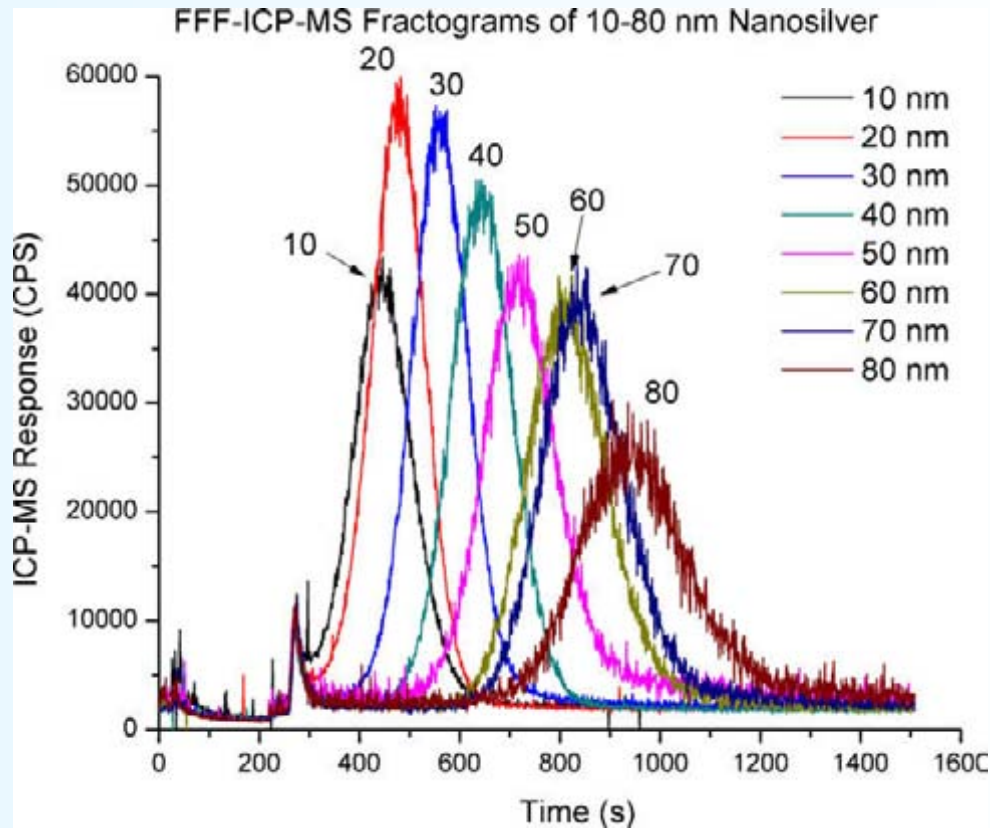
Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Eigenschaften der ICP-MS

- Ionisierung der Elemente durch Argon-Plasma
- Bestimmung der Masse der Ionen
- Besonders gut geeignet für metallische NP wie Ag, Au, (TiO₂, SiO₂)
- Gleichzeitige Bestimmung mehrerer Elemente möglich
- Niedrige Nachweisgrenze (µg/L bis ng/L) (ppb bis ppt)
- Grenzen/Nachteile: isobare Störungen (z.B. ⁴⁸Ca und ⁴⁸Ti) (kann mit hochauflösenden Geräten (Sektorfeld-ICP-MS) kompensiert werden)

ICP-MS Methoden

Als Online-Detektor für Feldflussfraktionierung (FFF-ICP-MS)

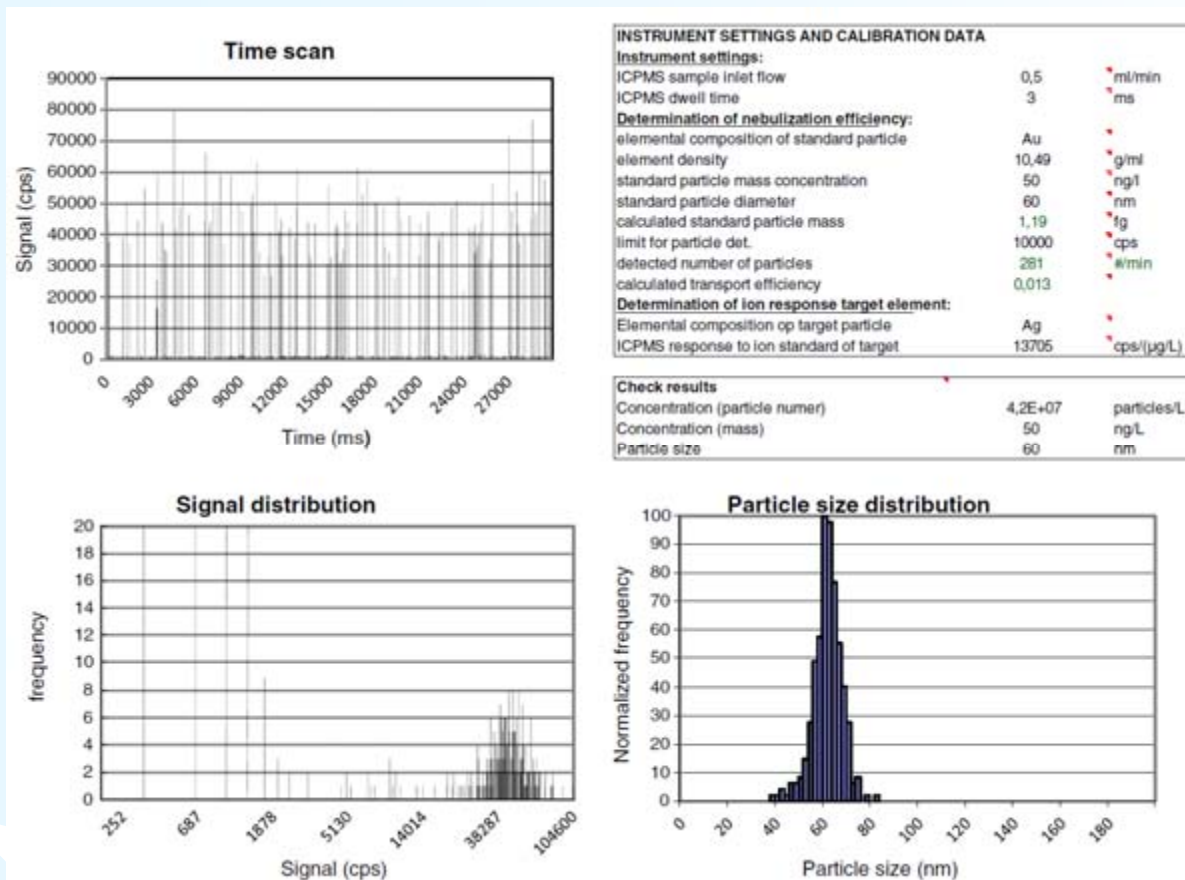


Poda et al. 2011, Characterization of silver nanoparticles using flow-field flow fractionation interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J Chromatography A*, 1218, 4219– 4225

ICP-MS Methoden

Einzelpartikelanalyse (SP-ICP-MS)

- Hochverdünnte Lösungen, jedes NP erzeugt ein Signal, Intensität ~ NP-Masse (Durchmesser)
- Nachweisgrenze, kleinste Partikelgröße abhängig vom Hintergrundsignal des Elements (Ag, TiO₂ >20 nm, SiO₂ > 30 nm)

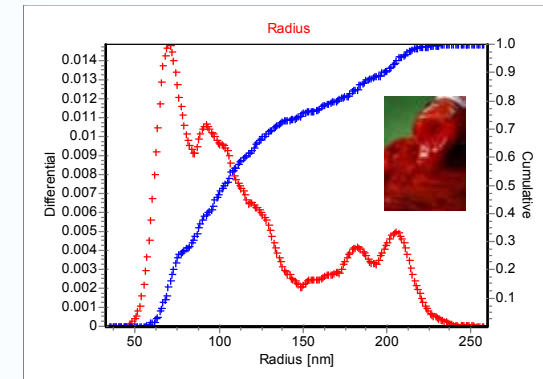
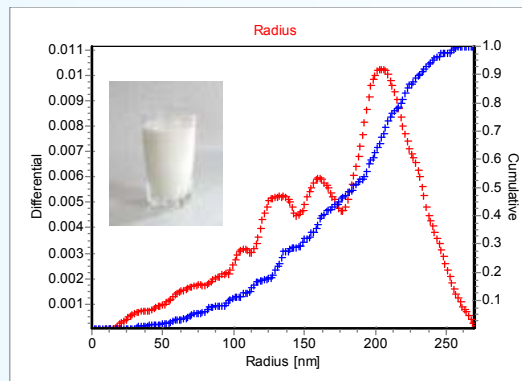
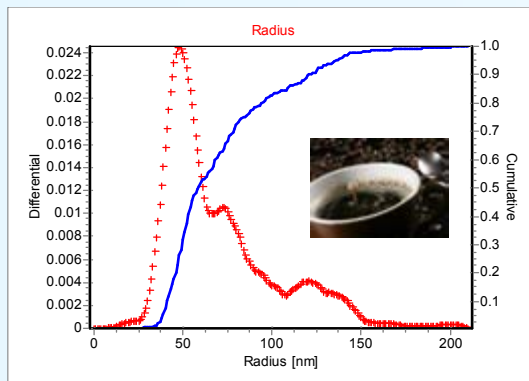


Peters et al., 2014: Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 3875-3885

Probeprobereitung

Problem: Vielzahl natürlicher Nanopartikel in Lebensmitteln

- Wie kann man natürliche von synthetischen Nanopartikeln unterscheiden?
- Probeprobereitung: Trennung von Matrix



Probenvorbereitung

Nur die Matrix soll aufgelöst werden, die NP dürfen sich nicht verändern!

Säureaufschluss (z.B. konz. HNO_3 , H_2O_2)

- Geeignet für TiO_2 , SiO_2
- Analyse mit AF4-ICP-MS, SP-ICP-MS

Peters et al. 2014, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 6285-6293
Wagner et al 2015, *J. Anal. At. Spectrom.* 30, 1286-1296

Enzymatische Verdauung bei Nanosilber

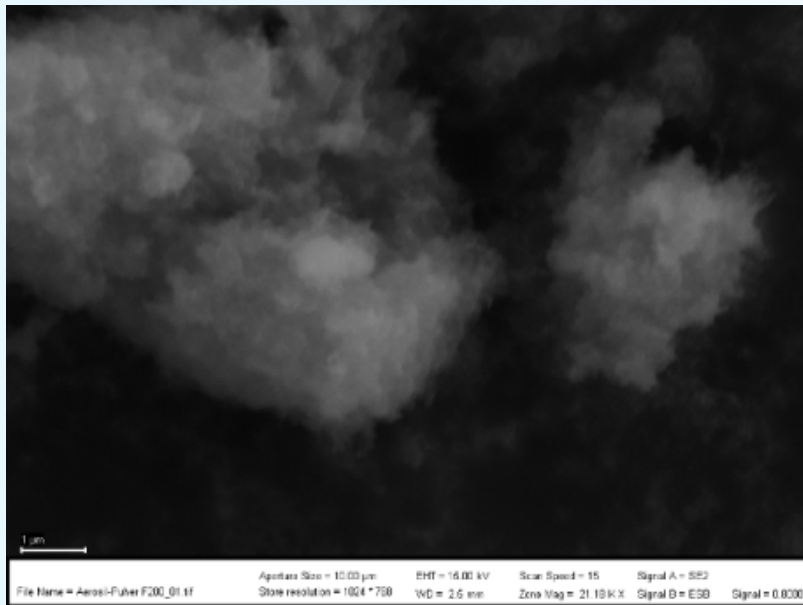
- Nanosilber in Hühnerfleisch
- Verdauung mit Enzym Proteinase K
- Analyse mit SP-ICP-MS

Peters et al., 2014: Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 3875-3885

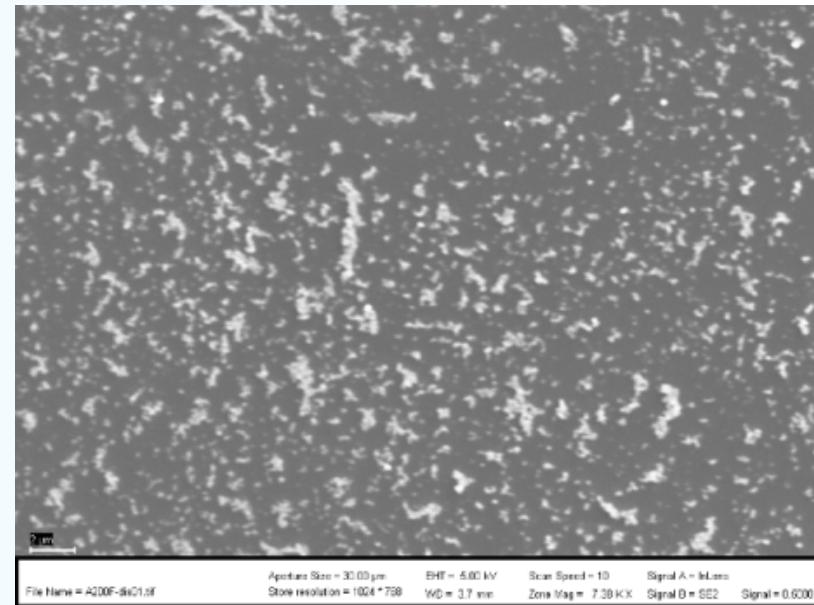
Probepvorbereitung

- Unterscheidung von Aggregaten und Agglomeraten
- Dispersion (Homogenisierung) der Nanopartikel

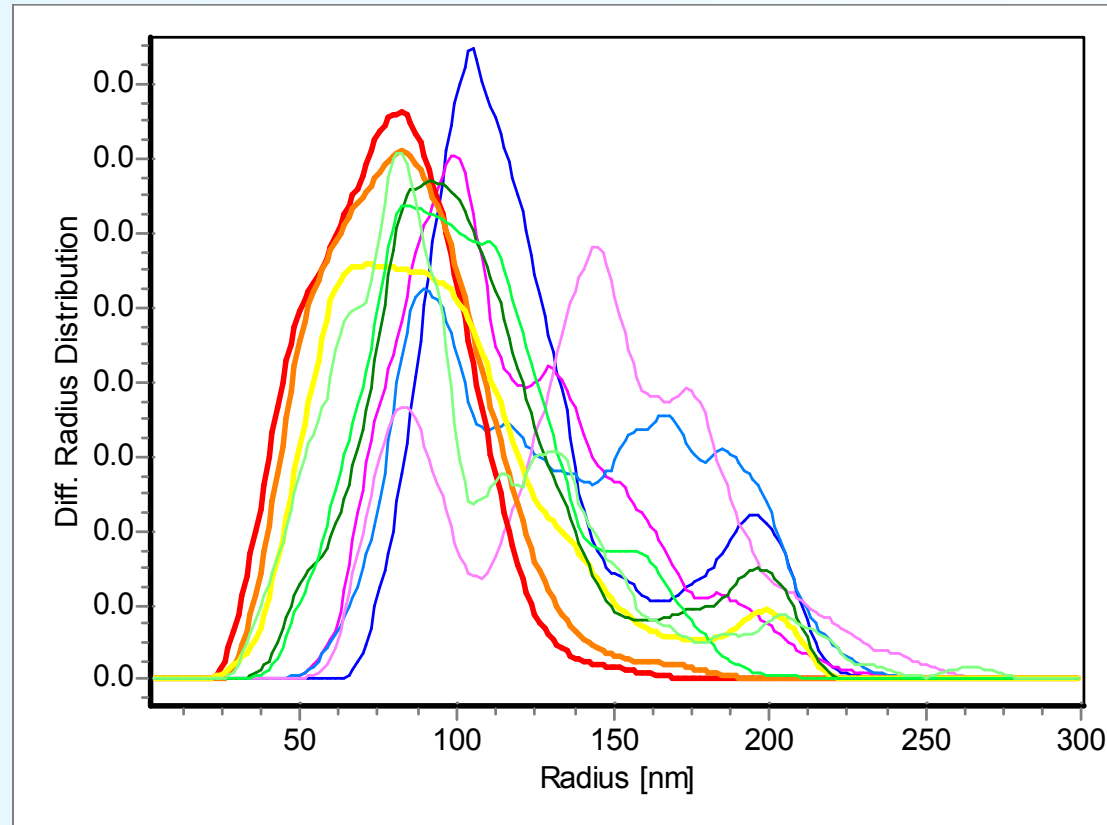
Aerosil 200 unbehandeltes Pulver



Aerosil 200 in Wasser nach Ultraschallbehandlung



Probenvorbereitung: Dispersion (Homogenisierung)



3 Methoden getestet:

Ultra-Turrax

Ultraschallbad

Ultraschallsonotrode



Einfluss der Dispergiermethode auf Größenverteilung

Sonotrode: Fett: gelb (1 min), orange (5 min), rot (10 min)

Ultraschallbad: Hellgrün (1 min), mittelgrün (5 min) dunkelgrün (10 min)

Ultraturrax: rosa (1 min) violett (5 min) hellblau (1 min) dunkelblau (5 min)

Herstellung von Referenzmaterial für Lebensmittel und Methodenvvalidierung

Nanosilber (60 nm) in Hühnerfleisch

- Zugabe von 5 bis 25 mg/kg Nanosilber zu homogenisierter Hühnerbrust
- Verdauung mit Enzym Proteinase K
- Analyse mit SP-ICP-MS, Detektionslimit 0,05 mg/kg

Validierung	Partikelgröße	Konzentration
Richtigkeit	98-99%	91-101%
Standardabweichung	0,8-1,8%	6,7-11%

Peters et al., 2014: Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 3875-3885

SiO₂ in Tomatensuppe

- Zugabe von 5 g/kg pyrogener Kieselsäure (Aerosdisp, Evonik) zu frisch gekochter Tomatensuppe
- Analyse mit AF4-ICP-MS, AF4-MALS

Grombe et al. 2014: Production of refence materials for the detection and size determination of silica nanoparticles in tomato soup, *Anal. Bioanal. Chem.*, 406, 3895-3907

Wagner et al 2015: First steps towards a generic sample preparation scheme for inorganic engineered nanoparticles in a complex matrix for detection characterization, and quantification by AF4-MALS and ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 30, 1286-1296

Zusammenfassung

- Zahlreiche analytische Verfahren zur Charakterisierung von NP vorhanden, die allerdings methodenabhängige Größen liefern: Elektronenmikroskopie, Lichtstreuung, Trennmethode, ICP-MS
- Kombination mehrerer Methoden für vollständige Charakterisierung nötig
- Im unteren Bereich der Partikelgrößen sind die meisten Methoden limitiert
- Herausforderung der Probenaufbereitung, ohne die NP zu verändern: Abtrennung von Lebensmittelmatrix, Einfluss der Homogenisierung auf Größenverteilung
- **Perspektiven:**
 - erste vielversprechende Ergebnisse des Projekts „Nanolyse“ bzgl. Methodenentwicklung, Referenzmaterialien und Validierung
 - weitere Referenzmaterialien für andere Lebensmittel müssen entwickelt und entsprechende Methoden der Probeaufbereitung gefunden werden
 - ein breiteres Spektrum zertifizierter NP-Referenzmaterialien, insbesondere unterschiedliche Partikelgrößen zur Kalibrierung, wäre hilfreich

Informationsquellen

EU-Projekt NanoLyse (2010-2012)

Ziel: Entwicklung analytischer Methoden zur Detektion und Charakterisierung synthetischer Nanopartikel in Lebensmitteln. <http://www.nanolyse.eu/>

Literatur:

JRC Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) 2012: Requirements on measurement for the implementation of the EC definition of the term “nanomaterial”

<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC73260>

Linsinger et al. 2013: Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food. *Food Chemistry* 138, S. 1959-1966