

SEPARÁCIA, STANOVENIE A CHARAKTERIZÁCIA ANORGANICKÝCH SYNTETICKÝCH NANOČASTÍČ V KOMPLEXNÝCH ENVIRONMENTÁLNYCH VZORKÁCH

MARTIN ŠEBESTA a PETER MATÚŠ

Ústav laboratórneho výskumu geomateriálov, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava
martin.sebesta@uniba.sk, ugeol@uniba.sk

Došlo 13.12.17, prijato 1.2.18.

Kľúčové slová: prírodné vzorky, nanočastice, charakterizácia, spektrometria

Obsah

1. Úvod
2. Príprava vzorky
3. Separáčn a prekoncentračné metódy
 - 3.1. Centrifugácia a filtrácia
 - 3.2. Frakcionácia tokom v poli
 - 3.3. Chromatografická separácia
 - 3.4. Elektroforetická separácia
 - 3.5. Extrakcia kvapalinou
 - 3.6. Extrakcia tuhou fázou
4. Stanovenie a charakterizácia nanočastíc
 - 4.1. Metódy na báze rozptylu svetla
 - 4.2. Elektrónová mikroskopia
 - 4.3. Spektrometrické metódy
 - 4.4. Elektroanalytické metódy
5. Záver

1. Úvod

V posledných rokoch sa nanomateriály^{1,2} a k nim patriace nanočastice (materiály¹, ktoré majú 3 rozmery medzi 1 a 100 nm) začali používať v rozličných odvetviach ľudskej činnosti³. Podľa pôvodu sa nanočastice (NČ) delia na prírodné, neúmyselne vytvorené – napr. spaľovaním a úmyselne vytvorené – syntetické NČ. Z chemického hľadiska sa delia na dve veľké skupiny: (i) anorganické NČ a (ii) NČ tvorené uhlíkom^{4,5}.

Na svetovom trhu je viac než 1800 produktov využívajúcich syntetické NČ. Najčastejšie sa využívajú špecifické vlastnosti anorganických syntetických NČ vo výživových doplnkoch a farmaceutikách (SiO₂, alumosilikáty), v medicíne (Au, CeO₂, ZnO), v potravinárskom priemysle (Ag, TiO₂, SiO₂, Fe), kozmetike (TiO₂, ZnO), v športovom oblečení (Ag), v prísadách do palív (CeO₂), v čistení odpadových vôd (Fe, TiO₂) a pod⁶.

Široké používanie anorganických syntetických NČ vyvoláva obavy z ich negatívneho vplyvu na človeka, organizmy a životné prostredie. Pôsobenie NČ sa môže potenciálne odlišovať od iných foriem chemických látok rovnakého zloženia. V Európskej únii spadajú nanomateriály ako formy chemických látok pod nariadenia REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) a CLP (Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures). Ďalšie nariadenia vyčleňujú postup a mieru charakterizácie NČ v potravinách, biocídoch a kozmetike⁷.

Súbor analytických techník, ktoré sa používajú pri identifikácii a kvantifikácii NČ, spadá do definície IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) o technikách frakcionácie a/alebo špeciálnej analýzy chemických prvkov⁸. Okrem prvkového chemického zloženia sa pri NČ väčšinou stanovujú veľkostné frakcie, prípadne aj priestorové usporiadanie atómov, a ich oxidačný stav. Techniky pre identifikáciu a kvantifikáciu NČ v jednoduchých, ľahko definovateľných systémoch sú už pomerne dlho známe. Problémom však zostáva identifikácia a kvantifikácia NČ v komplexných prírodných systémoch, kde sa často vyskytujú okrem možnej kontaminácie syntetickými NČ aj prírodné NČ rôzneho zloženia a taktiež rozpustené prvky, ktoré tvoria stanovované syntetické NČ. Z tohto vyplýva problém špecifickej identifikácie syntetických NČ popri prírodných s podobným chemickým zložením a odlišenie NČ od rozpustených prvkov tvoriacich NČ. Komplexnosť problému stanovovania NČ je podmienená tým, že okrem ich chemického zloženia sa musí stanoviť aj ich veľkosť a ich obsah sa môže požadovať vo forme koncentrácie alebo ako počet NČ. Okrem toho sú vyžadované aj kvalitatívne aspekty ich výskytu ako chemické zloženie, členenie na jadro a obal, štruktúra usporiadania atómov, ich tvar a stav ich agregácie. Všetky tieto vlastnosti môžu vplyvať na ich toxicitu, transport a transformáciu v zložkách životného prostredia^{4,5,9–13}.

Cieľom tejto práce je prehľad dostupnej literatúry zaoberajúcej sa modernými metódami pre stanovenie a charakterizáciu syntetických NČ v komplexných systémoch tuhých a kvapalných fáz prírodných systémov, akými sú prírodné vody, pôdy a sedimenty, ale aj biota.

2. Príprava vzorky

Výskum metód pre odber, uchovanie, skladovanie a prípravu vzoriek obsahujúcich syntetické NČ je v súčasnosti v počiatočných štádiách^{5,14}. Vhodnosť techník sa líši od typu vzorky a taktiež od toho, ktoré vlastnosti NČ sú skúmané a aká analytická metóda je použitá. NČ sú v systémoch citlivé na zmeny faktorov, akými sú pH, ióno-

vá sila roztokov a ich zloženie, svetlo, rast mikroorganizmov, teplota a iné. Skoro nikdy sa nenachádzajú v termodynamickej rovnováhe¹⁴. V mnohých prípadoch nie je možné niektoré vlastnosti vzorky (napr. stav agregácie) zachovať. Taktiež sa bez predošlej stabilizácie vzorky nemusí zachovať oxidačný stav NČ, lebo odberom sa môže narušiť stav chemických rovnováh¹⁵. Pre každý krok prípravy vzorky sa majú zvoliť techniky, ktoré v čo najmenšej miere menia stav agregácie NČ, ich veľkosť, chemické zloženie a iné vlastnosti^{5,11}. Špeciálne sa musí pristupovať k vzorkám, ktoré sú nanášané na podložky a kde je meraná veľkosť a morfológia NČ pomocou elektrónovej mikroskopie. Príprava takejto vzorky pred konvenčným pozorovaním môže zahŕňať kroky, akými sú fixácia, nanášanie kontrastnej látky, chemická dehydratácia, vloženie do polymérovej živice, sušenie a rezanie na tenké, submikrometrové sekcie. Špecifikami prípravy takýchto vzoriek sa zaoberajú práce De la Calle a spol.⁵ a Dudkiewicz a spol.¹⁶.

3. Separačné a prekoncentračné metódy

Metódy separácie a prekoncentrácie sa používajú pre oddelenie NČ od väčších častíc z prostredia vzorky a/alebo pre ich oddelenie od rozpustených prvkov, ktoré tvoria NČ, a prípadne aj na zvýšenie ich obsahu. Jednotlivé techniky sa líšia zložitosťou a schopnosťou od seba oddeliť rôzne veľké NČ. Niektoré sú vhodné len pre oddelenie časticových foriem od rozpustených, ďalšie vedú častice separovať podľa ich rôznej veľkosti.

3.1. Centrifugácia a filtrácia

Centrifugácia dokáže oddeliť NČ od supernatantu pomocou sedimentácie. Čas a aplikovaná odstredivá sila sú faktormi, ktoré ovplyvňujú efektivitu centrifugácie. Centrifugácia sa môže použiť ako prvý krok pri separácii NČ od mikro- a makročastíc vo vzorke. Takto boli separované NČ Ag od Ag mikročastíc v pôde a táto metóda sa zdá byť vhodnejšia ako membránová filtrácia¹⁷. Ultracentrifugácia, pri ktorej sa používajú vyššie odstredivé sily (desiatky až stovky tisíc g), sa často používa na prekoncentráciu, purifikáciu a stanovenie NČ v sedimentovanej fáze a súčasne sa dajú odseparovať od NČ desorbované ligandy, či rozpustené ióny v supernatante¹⁸. Analytická ultracentrifugácia bola použitá ako metóda na rozdelenie NČ podľa veľkosti, hustoty a tvaru¹⁹.

Filtrácia sa môže použiť ako krok pri separovaní veľkých častíc od NČ, podobne ako centrifugácia. Oproti centrifugácii majú membránové filtre s danou veľkosťou pórov jednu veľkú nevýhodu. Sú vyrábané tak, aby neprepúšťali častice väčšie ako určitý priemer, no už sa nedbá na to, nakoľko zachytávajú tie menšie. Preto bolo pozorované, že sa NČ Ag zachytávali v nezanedbateľnom množstve na membránových filtroch a oproti porovnateľnej separácii centrifugáciou bola výsledná koncentrácia NČ Ag o približne 68 % nižšia¹⁷. Ultrafiltrácia rozdeľuje po-

dobne ako filtrácia častice na základe veľkosti. Môže preto predstavovať krok pre prekoncentráciu, separáciu a purifikáciu NČ (cit.¹⁸). Priepustnosť ultrafiltračnej membrány sa udáva v medznej hodnote molekulovej hmotnosti (molecular weight cut-off, MWCO). Membrány s MWCO 10–100 kDa (cit.²⁰) dokážu separovať NČ o veľkosti medzi 1 a 5 nm. Pre separáciu rozpustených iónov od NČ sa často používa ultrafiltrácia pomocou centrifugácie, ktorá je rýchla a jednoduchá a poskytuje pomerne spoľahlivé výsledky²¹. Je teda preferovaná oproti dialýze, ktorá je založená len na difúzii, a preto je oproti ultrafiltrácii pomalšia⁹.

3.2. Frakcionácia tokom v poli

Skupina separačných techník, pri ktorých je vzorka vstrekovaná do dlhého úzkeho separačného kanálika bez stacionárnej fázy, kde je externé silové pole (napr. odstredivé alebo tokové) aplikované kolmo na laminárny tok a vzájomným pôsobením týchto dvoch síl dochádza k frakcionácii analytu, sa volá frakcionácia tokom v poli²². Tieto techniky umožňujú: (i) kontinuálny zber informácií o veľkosti častíc v širokom veľkostnom rozmedzí od 1 nm do 100 μm ; (ii) separáciu zachovávajúcu pôvodné vlastnosti NČ a (iii) on-line zapojenie na širokú škálu detektorov, no taktiež možnosť off-line zberu frakcií²³. Pri analýze vzoriek obsahujúcich NČ sa využili techniky frakcionácie tokom v odstredivom silovom poli (sedimentation field-flow fractionation, SdFFF) a frakcionácie tokom v asymetrickom tokovom poli (asymmetric flow field-flow fractionation, A4F)²⁴. V publikáciách sa veľmi často využíva A4F, ktorá je považovaná za najvšestrannejšiu z techník frakcionácie tokom v poli. A4F je aplikovateľná na polyméry, makromolekuly a aj NČ. Aj keď SdFFF môže mať pre NČ väčšie rozlíšenie veľkostí častíc ako A4F, širší rozsah merateľných veľkostí s použitou ultrafiltračnou membránou na dne separačného kanálika a so separáciou založenou len na hydrodynamickom priemere sú výhodami A4F, ktoré boli využité pri charakterizácii syntetických NČ v komplexných vzorkách⁹.

3.3. Chromatografická separácia

Pre separáciu NČ sa často používajú techniky chromatografickej separácie¹⁸. Najčastejšie používanou metódou je hydrodynamická chromatografia (hydrodynamic chromatography, HDC) a menej častými sú kvapalinová chromatografia v reverznej fáze (reversed-phase liquid chromatography, RP-LC)²⁵ a kvapalinová chromatografia s katexovými živcami (cation-exchange resins)²⁶.

Princíp hydrodynamickej chromatografie spočíva v rozdielnom zotrvaní rôzne veľkých NČ v kolóne. Tá je naplnená chemicky inertnými guľôčkami, ktoré nemajú póry. Separácia je spôsobená rýchlostným gradientom vytvoreným na kapilárach medzi guľôčkami. Väčšie častice sú transportované rýchlejšie ako menšie, keďže strávia menej času v blízkosti hrán kapilár²⁷. Hydrodynamická chromatografia bola použitá pri stanovení prírodných

a syntetických NČ (cit.^{27,28}) TiO₂, SiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, Ag a Au vo vzorkách čistiarenskeho kalu^{27,29}, v riečnej vode²⁹ a v syntetickej povrchovej vode³⁰. Použitie HDC môže byť problematické v komplexnejších vzorkách, kde povrchová úprava NČ vplyva na elučný čas³¹.

3.4. Elektroforetická separácia

Techniky elektroforézy sú založené na migrácii nabitých molekúl alebo častíc vplyvom elektrického poľa³². Medzi techniky elektroforetickej separácie NČ patrí gélová elektroforéza³³, kapilárna zónová elektroforéza³⁴, izotachoforéza³⁵, izoelektrická fokusácia (isoelectric focusing, IEF)³⁶ a micelárna elektrokinetická chromatografia (micellar electrokinetic chromatography, MEKC)³⁷. Gélová elektroforéza je založená na rôznej migrácii analytov cez nanopórový gél, ktorý pod vplyvom elektrického poľa pôsobí ako nanočasticové sito. Polyakrylamidový gél bol použitý pri charakterizácii 2 nm CdTe NČ (cit.³⁸), ale jeho malá pórová veľkosť (menej ako 10 nm) limituje jeho aplikáciu pre separáciu NČ (cit.⁹). Agarový gél má veľkosť pórov medzi 10 a 100 nm, vďaka čomu našiel pri separácii NČ širšie uplatnenie. Takto boli napr. separované NČ Ag a Au rôznych veľkostí a tvarov³⁹. Kapilárna zónová elektroforéza (CZE) je založená na rozdielnych mobilitách nabitých iónov alebo častíc, ktoré sú injektované do tenkej kapiláry napustenej požadovým elektrolytom, zatiaľ čo na konce kapilár je aplikované vysoké napätie³⁴. CZE bola najčastejšie použitá na pozorovanie veľmi malých NČ – kvantových bodov⁴⁰ a interakciu medzi proteínmi a NČ (cit.⁴¹). Pri NČ tvorených kovmi alebo oxidmi kovov boli aplikované tenzidy na zlepšenie separácie NČ (cit.³²). Ako veľmi perspektívna sa zdá byť MEKC. Pri jej spojení s hmotnostnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS) má dobrú rozlíšovacíu a separačnú schopnosť a nízku medzu dôkazu³⁷.

3.5. Extrakcia kvapalinou

Syntetické NČ v tuhých alebo v kvapalných vzorkách boli extrahované pomocou vodných alebo organických roztokov. Extrakcia NČ Au pomocou tiosíranu sodného bola použitá pre vzorky prírodných vôd⁴². Ag a TiO₂ NČ boli modifikované hydrofóbnou kyselinou 11-merkaptoundekanovou a nasledovala iónovo-párová extrakcia s oktadecylamínom v cyklohexáne⁴³. Často používanou metódou na extrakciu a prekoncentráciu NČ z prírodných vôd je extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (cloud point extraction, CPE). CPE zahŕňa prídanie neiónových tenzidov (predovšetkým Triton X 114) do vzorky v koncentráciách vyšších ako kritická micelárna koncentrácia, inkorporáciu NČ do micelárnych agregátov a ich separáciu zahriatím^{9,44-47}. Prídanie komplexačného činidla (napr. tiosíran⁴⁸, EDTA⁴⁹, tiokyanatan⁵⁰) sa takto môžu selektívne extrahovať NČ Ag, Au, CuO, ZnO v prítomnosti im korešpondujúcich rozpustených iónov. Táto stratégia v spojení so stanovením totálnej koncentrácie prvkov pomocou elektrotermickej atómovej absorpcijnej

spektrometrie (ET-AAS) alebo ICP-MS poskytuje informáciu o koncentráciách prvkov v ich rozpustenej aj nanočasticovej forme⁹.

3.6. Extrakcia tuhou fázou

Techniky extrakcie tuhou fázou sú pri NČ menej využívané. NČ Au a Ag boli extrahované pomocou anexových živíc. Povrch týchto NČ sa modifikuje molekulami s vysokou afinitou k danej živici. Extrakčná metóda vie zachovať veľkosť a tvar NČ a bola aplikovaná na rôzne povrchovo modifikované NČ (cit.⁵¹). Z ďalších techník boli použité funkcionalizované magnetické NČ pre selektívnu extrakciu NČ (cit.⁵²) Au a Ag a prietoková injekčná analýza s použitím uzlového reaktora (knotted reactor) pre selektívnu separáciu NČ Ag od Ag⁺ iónov⁵³.

4. Stanovenie a charakterizácia nanočastíc

Podľa komplexnosti vzorky, koncentrácie syntetických NČ vo vzorke, či požadovaných parametrov, ktoré sú dôležité pre daný výskum, je možné použiť rôzne metódy analýzy, ktoré poskytujú rozličné množstvo informácií o veľkosti, tvare, štruktúre a chemickom zložení syntetických NČ. Zatiaľ čo metódy na báze rozptylu svetla poskytujú len údaje o veľkostnej distribúcii NČ, metódy spektrometrie môžu v kombinácii so separačnými metódami poskytnúť informácie o prvkovom zložení NČ, veľkostnej distribúcii, prípadne aj informácie o obale NČ. Elektroónová mikroskopia sa používa na ďalšiu fyzikálno-chemickú charakterizáciu vzoriek, zatiaľ čo elektroanalytické metódy môžu poskytnúť informácie o veľkosti NČ a oxidačnom stupni prvkov, ktorými sú tvorené.

4.1. Metódy využívajúce rozptyl svetla na časticiach

Metódami využívajúcimi rozptyl svetla na časticiach sa dá stanoviť veľkosť NČ, ale v komplexnej environmentálnej vzorke nedokážu stanoviť koncentráciu, zloženie a ani štruktúru NČ. Na meranie veľkosti častíc vo vodných suspenziách sa bežne používajú tri metódy využívajúce rozptyl svetla: (i) dynamický rozptyl svetla (dynamic light scattering, DLS), (ii) viacuhlový rozptyl svetla (multi-angle light-scattering, MALS) a (iii) analýza sledovania pohybu NČ (nanoparticle tracking analysis, NTA).

DLS je najpoužívanejšou technikou na rýchle stanovenie veľkosti NČ vo vodných suspenziách. Vie stanoviť ekvivalentný hydrodynamický priemer častíc pomocou merania Brownovho pohybu častíc a časovo-závislej fluktuácie intenzity rozptýleného svetla spôsobeného konštruktívnymi alebo deštruktívnymi interferenciami⁵⁴. Interpretácia výsledkov DLS analýzy komplexných environmentálnych vzoriek, ktoré obsahujú interferujúce častice, je zložitá, a preto sa často používa s technikami ako HDC a A4F, ktoré vedú niektoré tieto problémy vyriešiť⁵⁵. DLS sa využíva pri monitorovaní agregácie NČ v prírodných vodách³⁰ a ekotoxikologických testovacích médiách⁵⁶.

Metóda MALS je založená na meraní fyzikálnych vlastností, ktoré sú odvodené od uhlovej závislosti svetla rozptýleného časticami. Je citlivá na čistotu vzoriek a relatívne hlboké poznanie optických vlastností sledovaných častíc. Pre komplexné vzorky⁹ je používaná v spojení s A4F.

Rozvíjajúcou sa metódou je NTA, ktorá využíva Brownov pohyb NČ, ktorý je zachytený pomocou video mikroskopie a hydrodynamický priemer NČ je vypočítaný pomocou upravenej Stokes-Einsteinovej rovnice. Jednotlivá NČ je detegovaná, následne sa meria ňou prejdená vzdialenosť za jednotku času a tá je vzťahnutá na hydrodynamický priemer NČ. Zozbieraním dostatočného množstva meraní jednotlivých NČ je vypočítaná koncentrácia vzťahnutá na počet NČ v danom objeme a distribúcia veľkostí hydrodynamického priemeru⁵⁷. Nevýhodou je, že sa týmto spôsobom nedajú merať NČ menšie ako cca 20 nm, výhodou sú nižšie merateľné koncentrácie ako pri DLS, do 10^6 častíc ml^{-1} alebo cca $1 \mu\text{g l}^{-1}$. NTA bola použitá v toxikologických štúdiách pri meraní veľkosti syntetických NČ v biologických médiách⁵⁸ a v syntetických a reálnych vzorkách povrchových sladkých vôd⁵⁹.

4.2. Elektrónová mikroskopia

Elektrónová mikroskopia v spojení s ďalšími technikami dokáže semikvantitatívne určiť chemické zloženie, taktiež aj vnútorné usporiadania atómov či molekúl v NČ a prináša vizuálny dôkaz ich výskytu a najpresvedčivejšie výsledky o ich veľkosti a tvare^{59,16,60}. Vo väčšine prípadov tento účel plní konvenčná transmisná elektrónová mikroskopia (transmission electron microscopy, TEM). TEM s vysokým rozlíšením (od cca 0,1 nm) je možné použiť pre sledovanie malých nanoštruktúr a lepšie rozlíšenie viacvrstvých NČ (cit.⁶¹). Rastrovacía elektrónová mikroskopia (scanning electron microscopy, SEM) dokáže zobrazovať štruktúry od 1 nm. Okrem schopnosti zobrazovať tvar a veľkosť štruktúr a v prípade TEM aj štruktúrnú mriežku je možné vďaka pomocným metódam, ktoré sú pridružené k SEM alebo TEM, energiovo-disperznej röntgenovej spektroskopie (energy dispersive X-ray spectroscopy, EDX) a spektroskopie strát energie elektrónov (electron energy-loss spectroscopy, EELS) stanoviť a semikvantitatívne určiť prvky ťažšie ako bór (EDX) alebo atómové zloženie, chemické väzby, valencie atómov a povrchové vlastnosti skúmaných látok (EELS). Nevýhodou elektrónovej mikroskopie je, že vzorky sa musia naniest' na podložku a často aj dehydrovať kvôli použitiu vákuu. Tieto kroky môžu spôsobiť zmeny stavu NČ a pri sušení sa môžu vytvoriť novotvary, ktoré sa v pôvodnej vzorke nenachádzali⁵. Tieto nedostatky sa snaží zmeniť environmentálna SEM (environmental scanning electron microscopy, ESEM), ktorá môže pracovať za zníženého tlaku (1,3 až 6,7 kPa) a nepotrebuje vákuum. Napriek tomu sa dajú merať len NČ, ktoré sú blízko povrchu a musia sa teda aplikovať vzorky s malou hrúbkou. Takto boli *in situ* stanovené NČ Au v pôde až do minimálnej veľkosti cca 25 nm v koncentráciách najmenej cca $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ pôdy⁶².

4.3. Spektrometrické metódy

Pre detekciu NČ je veľmi dôležité a hodnotné získať informáciu o koncentrácii prvkov, z ktorých sú zložené. Túto informáciu pri meraniach syntetických NČ v komplexných environmentálnych vzorkách poskytujú metódy ET-AAS, optickej emisnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou (ICP-OES) a ICP-MS, ale aj metódy röntgenovej absorpčnej spektroskopie (XAS), ktorá často využíva synchrotrónové žiarenie. Tieto metódy nie sú, okrem ICP-MS v móde merania jednotlivých častíc (single particle ICP-MS, spICP-MS), nanočasticovo špecifické a bez separačného kroku sa používajú na stanovenie totálneho obsahu prvkov vo vzorke bez možnosti zistenia, či sa sledovaný prvok nachádza v nanočasticovej alebo rozpustenej forme. Metódou najvhodnejšou pre nízke koncentrácie, ktoré sa môžu potenciálne nachádzať v environmentálnych vzorkách, je ICP-MS s medzami dôkazu až do 1 ng l^{-1} , ICP-OES a ET-AAS majú vyššie medze dôkazu okolo $1 \mu\text{g l}^{-1}$. Výhodou ET-AAS je možnosť použitia ako kvapalných, tak aj tuhých vzoriek, kým metódy ICP-MS a ICP-OES sú aplikované len na kvapalné vzorky. Aplikácia týchto metód bez použitia separačných techník sa používa v prácach o biodistribúcii syntetických NČ v organizmoch^{63,64}.

Najperspektívnejšou metódou je ICP-MS, ktorá dokáže stanoviť rôzne formy výskytu prvkov – rozpustené ióny vs. NČ (spICP-MS)⁶⁵, prípadne, ak je ICP-MS spojená so separačnými technikami ako A4F, SdFFF, HDC a i., je možné zistiť rozdiel medzi syntetickými a prírodnými NČ pomocou viacprvkovej a izotopovej analýzy zloženia jednotlivých častíc^{12,66,67}. Pomocou ICP-MS a iných metód hmotnostnej spektrometrie je možné získať mnohé informácie o charaktere syntetických NČ vrátane ich veľkostnej distribúcie, chemického zloženia, stechiometrie, koncentrácie vzťahnutej na hmotnosť alebo aj počet častíc, či hustoty pokrytia povrchu NČ ligandami (aj organickými) a charakterizácie obalu syntetických NČ (cit.⁶⁶).

Metóda spICP-MS je založená na diskretnom toku suspendovaných NČ, ktoré sú zriedené (cca 10^5 častíc ml^{-1}) a zhmlením sa dostávajú jednotlivo do plazmového horáka tak, aby mohol byť zachytený signál vždy len jednej NČ. Tento signál je zachytený ako pulz v trvaní cca 0,5 ms. Takto sa dá zistiť prvkové zloženie NČ, hmotnosť daného prvku v NČ a ak sú informácie o fyzikálno-chemickom charaktere NČ, tak aj ich približnú veľkosť a veľkostnú distribúciu⁶⁸. Touriniami a spol.⁶⁹ takto merali NČ Ag od najmenej veľkosti 5 nm v zložitej matici odpadových vôd. Použitím veľmi krátkych časov na zber dát alebo preletového analyzátora (time of flight) je možné stanoviť viacero prvkov naraz a odlíšiť NČ podobného zloženia¹².

Metóda XAS ponúka kvalitatívne informácie o distribúcii špecií kovov a polokovov v komplexných kvapalných alebo tuhých vzorkách (pôdy, sedimenty, biota). Poskytuje informácie o oxidačnom stave, koordinácii prvku a geometrii usporiadania bez možnosti určiť, či sa tieto špecie vo vzorke nachádzajú ako častice alebo

v rozpustenej, či inej forme. Výhodou je minimálna alebo žiadna príprava vzorky a to, že vzorka sa nedeštruuje. Hlavným problémom metód XAS je ich vysoká medza dôkazu (1 mg kg^{-1}) a problém s interpretáciou dát v komplexných vzorkách⁷⁰. XAS bola použitá pri štúdiu nanočastíc v čistiarňach odpadových vôd⁷¹, distribúcii nanočastíc v rastlinných pletivách⁷², a v ekotoxikologických experimentoch v pôdach a vodách^{73,74}.

4.4. Elektroanalytické metódy

Tieto metódy môžu byť vhodné na finančne nenáročnú a účinnú detekciu NČ a zistenie ich veľkosti a koncentrácie. Ide buď o coulometriu zrážiek častíc (particle collision coulometry, PCC) alebo voltmetriu imobilizovaných častíc (voltammetry of immobilized particles, VIP). PCC je schopná rozlíšenia medzi časticovými a rozpustenými formami, dokáže určiť prvkové zloženie, veľkosť častíc a ich koncentráciu. VIP je citlivá na oxidačný stav prvkov, ale nedokáže rozlíšiť medzi rozpustenými a časticovými formami⁹.

Princíp PCC spočíva v náhodných zrážkach NČ s povrchom elektródy, na ktorej je udržiavaný stály potenciál. Zrážka je zaznamenaná ako silný dočasný signál, ktorý reprezentuje zmenu oxidačného stavu NČ alebo iný elektrokatalytický proces spôsobený zrážkou s elektródou. Náboj spojený týmto procesom je vzťahovaný na veľkosť aktívnej špécie a teda na veľkosť NČ (cit.⁷⁵). Takto boli študované NČ Ag, Au, Cu, Fe₃O₄, Ni, SiO₂, Pt. V rámci meraní boli sledované rôzne parametre ako agregácia, koncentrácia a veľkosť NČ, oxidačná aktivita a kinetika elektrónového prenosu⁷⁵. Touto metódou boli stanovené NČ Pt (cit.⁷⁶) do najmenšej veľkosti 4 nm. Medze dôkazu PCC sa pohybujú⁷⁷ okolo 1 mg l^{-1} .

VIP je založená na imobilizácii NČ na elektróde pomocou aplikovania malého množstva vzorky na elektródu a jej následným vysušením alebo je povrch elektródy modifikovaný tak, aby elektrostaticky alebo chemicky imobilizoval NČ. Potom je elektróda premiestnená do roztoku elektrolytu, kde prebieha meranie. Výšky alebo plochy píkov na voltamograme môžu byť vzťahované na zloženie NČ, ich veľkosť a pokrytie povrchu⁷⁸.

5. Záver

Stanovenie NČ a charakterizácia ich vlastností v komplexných environmentálnych vzorkách (prírodné vody, pôdy, sedimenty a biota) ponúka rozdielne množstvo informácií, vďaka čomu nemusí byť ani jedna metóda dostatočujúca na poskytnutie všetkých požadovaných dát. V takomto prípade je nutná kombinácia viacerých metód, ktoré spoločne dokážu poskytnúť všetky potrebné informácie. Vzhľadom na analyzované vzorky môžu nastať dva prípady, ktoré si vyžadujú rozdielny prístup: (i) systémy, kde sú syntetické, dostatočne charakterizované NČ umelo aplikované vo vysokých, stredných až nízkych koncentráciách pri testoch uvoľňovania, mobility a toxicity a (ii)

vzorky odobrané v životnom prostredí v rámci monitoringu a sledovania syntetických NČ, často prítomných vo veľmi nízkych koncentráciách, pri ktorých je potrebná prekoncentrácia alebo dostatočne citlivá metóda stanovenia. Druhý z prípadov môže byť náročnejší na stanovenie NČ a dôležitá môže byť aj ich dôsledná charakterizácia. V súčasnosti sú pre tieto požiadavky perspektívne metódy spICP-MS alebo A4F s ICP-MS, ktoré dokážu stanoviť NČ vo veľmi nízkych koncentráciách (v jednotkách až v stovkách ng l^{-1}), a v spojení s technikami TEM môžu byť tieto NČ aj dostatočne charakterizované^{9,68}.

Metódy stanovovania a charakterizácie syntetických NČ v komplexných environmentálnych systémoch sú vo svojich počiatkoch. V súčasnosti prebiehajú experimenty na overenie správnosti jednotlivých analytických techník a v blízkej budúcnosti možno očakávať prvé protokoly štandardizujúce niektoré aspekty stanovenia NČ v zložitých systémoch prírodných vzoriek, ktoré sú potrebné pre ďalší rozvoj monitorovania syntetických NČ a ich vplyvu na zložky životného prostredia. V budúcnosti sa taktiež očakáva vytvorenie prvých matricových certifikovaných referenčných materiálov obsahujúcich syntetické NČ na overenie správnosti výsledkov analýz. Najväčšou výzvou do budúcnosti ostáva rozlíšenie syntetických NČ od prírodných NČ v reálnych vzorkách so zložitou maticou.

Práca vznikla v rámci riešenia projektu, ktorý bol finančne podporený grantom Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaŠ SR a SAV VEGA 1/0153/17.

LITERATÚRA

1. Rumble J.: *Uniform Description System for Materials on the Nanoscale*. CODATA-VAMAS Working Group On the Description of Nanomaterials, Version 2.0. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.56720>. Staženo 3.3.2018.
2. Boholm M., Arvidsson R.: *Nanoethics* 10, 25 (2016).
3. Dohnalová L., Dohnal V.: *Chem. Listy* 109, 444 (2015).
4. Šebesta M., Kolenčík M., Matúš P., Kořenková L.: *Chem. Listy* 111, 322 (2017).
5. De la Calle I., Menta M., Séby F.: *Spectrochim. Acta, Part B* 125, 66 (2016).
6. Vance M. E., Kuiken T., Vejerano E. P., McGinnis S. P., Hochella M. F., Rejeski D., Hull M. S.: *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769 (2015).
7. Rauscher H., Rasmussen K., Sokull-Klüttgen B.: *Chem. Ing. Tech.* 89, 224 (2017).
8. Templeton D. M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.-G., Muntau H., van Leeuwen H. P., Lobinski R.: *Pure Appl. Chem.* 72, 1453 (2000).
9. Laborda F., Bolea E., Cepriá G., Gómez M. T., Jiménez M. S., Pérez-Arantegui J., Castillo J. R.: *Anal. Chim. Acta* 904, 10 (2016).
10. Hrivnáková E., Fargašová A.: *Chem. Listy* 110, 440 (2016).

11. Leopold K., Philippe A., Wörle K., Schaumann G. E.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **84**, 107 (2016).
12. Nowack B., Baalousha M., Bornhoft N., Chaudhry Q., Cornelis G., Cotterill J., Gondikas A., Hasselov M., Lead J., Mitrano D. M., von der Kammer F., Wontner-Smith T.: *Environ. Sci. Nano* **2**, 421 (2015).
13. Šebesta M., Kolenčík M., Urík M., Bujdoš M., Vávra I., Dobročka E., Smílek J., Kalina M., Diviš P., Pavúk M., Miglierini M., Kratošová G., Matůš P.: *J. Nanosci. Nanotechnol.* v tisku.
14. von der Kammer F., Ferguson P. L., Holden P. A., Masion A., Rogers K. R., Klaine S. J., Koelmans A. A., Horne N., Unrine J. M.: *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 32 (2012).
15. Liu J., Hurt R. H.: *Environ. Sci. Technol.* **44**, 2169 (2010).
16. Dudkiewicz A., Tiede K., Loeschner K., Jensen L. H. S., Jensen E., Wierzbicki R., Boxall A. B. A., Molhave K.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **30**, 28 (2011).
17. Schwertfeger D. M., Velicogna J. R., Jesmer A. H., Saatcioglu S., McShane H., Scroggins R. P., Prinz J. I.: *Anal. Chem.* **89**, 2505 (2017).
18. Majedi S. M., Lee H. K.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **75**, 183 (2016).
19. Walter J., Löhr K., Karabudak E., Reis W., Mikhael J., Peukert W., Wohlleben W., Cölfen H.: *ACS Nano* **8**, 8871 (2014).
20. Sweeney S. F., Woehrl G. H., Hutchison J. E.: *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3190 (2006).
21. Fabricius A.-L., Duester L., Meermann B., Ternes T. A.: *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 467 (2014).
22. Janča J.: *Chem. Listy* **92**, 449 (1998).
23. Meermann B.: *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 2665 (2015).
24. von der Kammer F., Legros S., Hofmann T., Larsen E. H., Loeschner K.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **30**, 425 (2011).
25. Soto-Alvaredo J., Montes-Bayón M., Bettmer J.: *Anal. Chem.* **85**, 1316 (2013).
26. Hadioui M., Leclerc S., Wilkinson K. J.: *Talanta* **105**, 15 (2013).
27. Tiede K., Boxall A. B. A., Tiede D., Tear S. P., David H., Lewis J.: *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 964 (2009).
28. Philippe A., Schaumann G. E.: *PLoS One* **9**, e90559 (2014).
29. Proulx K., Hadioui M., Wilkinson K. J.: *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 5147 (2016).
30. Metreveli G., Philippe A., Schaumann G. E.: *Sci. Total Environ.* **535**, 35 (2015).
31. Gray E. P., Bruton T. A., Higgins C. P., Halden R. U., Westerhoff P., Ranville J. F.: *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 1532 (2012).
32. López-Lorente A. I., Simonet B. M., Valcárcel M.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **30**, 58 (2011).
33. Xu X., Caswell K. K., Tucker E., Kabisatpathy S., Brodhacker K. L., Scrivens W. A.: *J. Chromatogr. A* **1167**, 35 (2007).
34. Stewart D. T. R., Celiz M. D., Vicente G., Colón L. A., Aga D. S.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **30**, 113 (2011).
35. Praus P., Turicová M., Suchomel P., Kvítek L.: *RSC Adv.* **5**, 59131 (2015).
36. Gole A. M., Sathivel C., Lachke A., Sastry M.: *J. Chromatogr. A* **848**, 485 (1999).
37. Franze B., Engelhard C.: *Anal. Chem.* **86**, 5713 (2014).
38. Wang S., Mamedova N., Kotov N. A., Chen W., Studer J.: *Nano Lett.* **2**, 817 (2002).
39. Hanauer M., Pierrat S., Zins I., Lotz A., Sönnichsen C.: *Nano Lett.* **7**, 2881 (2007).
40. Stanisavljevic M., Vaculovicova M., Kizek R., Adam V.: *Electrophoresis* **35**, 1929 (2014).
41. Aleksenko S. S., Shmykov A. Y., Oszwałdowski S., Timerbaev A. R.: *Metallomics* **4**, 1141 (2012).
42. Liu Y., He M., Chen B., Hu B.: *Spectrochim. Acta, Part B* **122**, 94 (2016).
43. Majedi S. M., Kelly B. C., Lee H. K.: *Anal. Chim. Acta* **789**, 47 (2013).
44. Hagarová I.: *Chem. Listy* **103**, 712 (2009).
45. Hagarová I.: *Anal. Methods* **9**, 3594 (2017).
46. Hagarová I.: *Chem. Listy* **109**, 269 (2015).
47. Hagarová I.: *Chem. Listy* **108**, 949 (2014).
48. Hartmann G., Schuster M.: *Anal. Chim. Acta* **761**, 27 (2013).
49. Majedi S. M., Kelly B. C., Lee H. K.: *Anal. Chim. Acta* **814**, 39 (2014).
50. López-García I., Vicente-Martínez Y., Hernández-Córdoba M.: *Spectrochim. Acta, Part B* **101**, 93 (2014).
51. Li L., Hartmann G., Schuster M.: *Environ. Sci. Technol.* **47**, 7317 (2013).
52. Su S., Chen B., He M., Xiao Z., Hu B.: *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, 444 (2014).
53. Su C. K., Hsieh M. H., Sun Y. C.: *Anal. Chim. Acta* **914**, 110 (2016).
54. Brar S. K., Verma M.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **30**, 4 (2011).
55. Montañó M. D., Lowry G. V., von der Kammer F., Blue J., Ranville J. F.: *Environ. Chem.* **11**, 351 (2014).
56. Metreveli G., Frombold B., Seitz F., Grün A., Philippe A., Rosenfeldt R. R., Bundschuh M., Schulz R., Manz W., Schaumann G. E.: *Environ. Sci. Nano* **3**, 418 (2016).
57. Gallego-Urrea J. A., Tuoriniemi J., Hasselöv M.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **30**, 473 (2011).
58. Kaiser J. P., Roesslein M., Diener L., Wick P.: *PLoS One* **8**, e83215 (2013).
59. Piccapietra F., Sigg L., Behra R.: *Environ. Sci. Technol.* **46**, 818 (2012).
60. Prasad A., Lead J. R., Baalousha M.: *Sci. Total Environ.* **537**, 479 (2015).
61. Zhu R., Lu S., v knize: *Mol. Environ. Soil Sci. Interfaces Earth's Crit. Zo.* (Xu J., Huang P. M., ed.), Springer, Berlin 2010.
62. Tuoriniemi J., Gustafsson S., Olsson E., Hasselöv

- M.: *Environ. Chem.* **11**, 367 (2014).
63. Krystek P.: *Microchem. J.* **105**, 39 (2012).
 64. Kořenková L., Šebesta M., Urík M., Kolenčík M., Kratošová G., Bujdoš M., Vávra I., Dobročka E.: *Acta Agric. Scand., Sect. B* **67**, 285 (2017).
 65. Telgmann L., Nguyen M. T. K., Shen L., Yargeau V., Hintelmann H., Metcalfe C. D.: *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 5169 (2016).
 66. Costa-Fernández J. M., Menéndez-Miranda M., Bouzas-Ramos D., Encinar J. R., Sanz-Medel A.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **84**, 139 (2016).
 67. Montano M., Ranville J., Lowry G., Blue J., Hiremath N., Koenig S., Tuccillo M.: *Detection and Characterization of Engineered Nanomaterials in the Environment: Current State-of-the-art and Future Directions Report, Annotated Bibliography, and Image Library*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-14/244, 2014. https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=286070. Staženo 3.2.2018.
 68. Laborda F., Bolea E., Jiménez-Lamana J.: *Trends Environ. Anal. Chem.* **9**, 15 (2016).
 69. Tuoriniemi J., Jürgens M. D., Hassellöv M., Cornelis G.: *Environ. Sci. Nano* **4**, 1189 (2017).
 70. Gräfe M., Donner E., Collins R. N., Lombi E.: *Anal. Chim. Acta* **822**, 1 (2014).
 71. Wang P., Menzies N. W., Dennis P. G., Guo J., Forstner C., Sekine R., Lombi E., Kappen P., Bertsch P. M., Kopittke P. M.: *Environ. Sci. Technol.* **50**, 8274 (2016).
 72. Larue C., Castillo-Michel H., Stein R. J., Fayard B., Pouyet E., Villanova J., Magnin V., Del Real A. E. P., Trcera N., Legros S., Sorieul S., Sarret G.: *Spectrochim. Acta, Part B* **119**, 17 (2016).
 73. Bone A. J., Colman B. P., Gondikas A. P., Newton K. M., Harrold K. H., Cory R. M., Unrine J. M., Klaine S. J., Matson C. W., Di Giulio R. T.: *Environ. Sci. Technol.* **46**, 6925 (2012).
 74. Lowry G. V., Espinasse B. P., Badireddy A. R., Richardson C. J., Reinsch B. C., Bryant L. D., Bone A. J., Deonaraine A., Chae S., Therezien M., Colman B. P., Hsu-Kim H., Bernhardt E. S., Matson C. W., Wiesner M. R.: *Environ. Sci. Technol.* **46**, 7027 (2012).
 75. Cheng W., Compton R. G.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **58**, 79 (2014).
 76. Xiao Y., Fan F. R. F., Zhou J., Bard A. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16669 (2008).
 77. Ellison J., Batchelor-Mcauley C., Tschulik K., Compton R. G.: *Sens. Actuators, B* **200**, 47 (2014).
 78. Tschulik K., Batchelor-McAuley C., Toh H.-S., Stuart E. J. E., Compton R. G.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 616 (2014).
- M. Šebesta and P. Matúš** (*Institute of Laboratory Research on Geomaterials, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava*): **Separation, Determination, and Characterization of Inorganic Engineered Nanoparticles in Complex Environmental Samples**
- As the use of inorganic engineered nanoparticles in commercial products is increasing, the probability of their intentional or unintentional release to the environment does also increase. Therefore, it is of the utmost importance to develop methods enabling to identify, quantify and characterize these nanoparticles in the environment. Analysis of the environmental samples containing nanoparticles is a difficult process with many contributing factors. Even to distinguish between the naturally occurring and engineered nanoparticles is a problem by itself. This leads to the use of nanospecific methods for sample preparation. Methods to identify and quantify nanoparticles, many of them spectroscopic, were developed for the complex matrices of environmental samples. Methods that were used to analyze these complex samples including natural waters, soils, sediments and biota are described in the review together with their advantages and disadvantages and the near future prospects and needs of the field.
- Keywords: environmental samples, nanoparticles, characterization, spectrometry