



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**“ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ  
ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ”**

**ΤΑΤΙΑΝΑ ΧΟΛΕΒΑ  
ΓΕΩΠΟΝΟΣ-ΙΧΘΥΟΛΟΓΟΣ  
M.Sc. Χημείας**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**“ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ  
ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ”**

**ΤΑΤΙΑΝΑ ΧΟΛΕΒΑ  
ΓΕΩΠΟΝΟΣ-ΙΧΘΥΟΛΟΓΟΣ  
M.Sc. Χημείας**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5342/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

- **Ημερομηνία έγκρισης της αίτησης της κ. Τατιάνας Χολέβα:** Συνέλευση Τμήματος Χημείας **927/7-4-2016**
- **Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** από τη Συνέλευση Τμήματος Χημείας **928/ 14-4-2016**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων:

Γκιώκας Δημοσθένης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας

Μέλη:

Βλεσσίδης Αθανάσιος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας

Γαρούφης Αχιλλέας, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας

- **Ημερομηνία ορισμού θέματος:** Συνέλευση Τμήματος Χημείας **930/17-6-2016**

**Θέμα:** “ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ”

- **ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** από τη Συνέλευση του Τμήματος Χημείας **1017/27-05-2020:**

1. Γκιώκας Δημοσθένης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων.
2. Βλεσσίδης Αθανάσιος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής.
3. Γαρούφης Αχιλλέας, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής.
4. Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος.
5. Τσόγκας Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Α.Π.Θ., Μέλος.
6. Τζαναβάρας Παρασκευάς, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Α.Π.Θ., Μέλος.
7. Dionysios Christodouleas, Assistant Professor, University of Massachusetts (Lowell). Department of Chemistry, USA. Μέλος.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό **10** στις 04/12/2020

**Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας**

**Η Γραμματέας του Τμήματος**

Μαρία Λουλούδη, Καθηγήτρια

Ξανθή Τουτουνζόγλου

**Αφιερώνεται  
στην οικογένειά μου**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ..... | vii |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....              | xi  |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....                    | xii |

## Θ Ε Ω Ρ Η Τ Ι Κ Ο Μ Ε Ρ Ο Σ

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. NANOTEΧΝΟΛΟΓΙΑ-NANOΣΩΜΑΤΙΔΙΑ**

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.1 Εισαγωγή.....</b>                                                                                   | <b>2</b>  |
| <b>1.2 Ταξινόμηση των νανοσωματιδίων.....</b>                                                              | <b>6</b>  |
| 1.2.1 Οργανικά νανοσωματίδια.....                                                                          | 6         |
| 1.2.2 Νανοσωματίδια άνθρακα.....                                                                           | 7         |
| 1.2.3 Μεταλλικά νανοσωματίδια.....                                                                         | 7         |
| 1.2.4 Κβαντικές κουκκίδες.....                                                                             | 8         |
| 1.2.5 Νανοσωματίδια μεταλλικών οξειδίων.....                                                               | 9         |
| 1.2.6 Νανοσωματίδια Οργανικών πολυμερών.....                                                               | 10        |
| <b>1.3 Μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων.....</b>                                                            | <b>10</b> |
| <b>1.4 Τεχνικές χαρακτηρισμού νανοϋλικών και νανοσωματιδίων.....</b>                                       | <b>13</b> |
| 1.4.1 Προσδιορισμός μορφολογίας επιφανείας, εμβαδού επιφάνειας, μεγέθους και σχήματος νανοσωματιδίων ..... | 13        |
| 1.4.2 Προσδιορισμός στοιχειακής και ανόργανης σύνθεσης .....                                               | 15        |
| 1.4.3 Προσδιορισμός τύπων δομών και δεσμών σε νανοσωματίδια .....                                          | 15        |
| 1.4.4 Προσδιορισμός μαγνητικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων .....                                          | 16        |

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**

|            |                                                                 |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.1</b> | <b>Εισαγωγή.....</b>                                            | <b>21</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Μετασχηματισμός των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον .....</b>  | <b>21</b> |
| 2.2.1      | Μετασχηματισμός των νανοσωματιδίων στον αέρα .....              | 22        |
| 2.2.2      | Μετασχηματισμός των νανοσωματιδίων στο έδαφος.....              | 23        |
| 2.2.3      | Μετασχηματισμός των νανοσωματιδίων στο υδάτινο περιβάλλον ..... | 25        |
| <b>2.3</b> | <b>Ιδιότητες των νανοσωματιδίων και τοξικότητα .....</b>        | <b>26</b> |
| 2.3.1      | Μέγεθος.....                                                    | 26        |
| 2.3.2      | Σχήμα.....                                                      | 27        |
| 2.3.3      | Φύση των νανοσωματιδίων.....                                    | 27        |
| 2.3.4      | Σταθερότητα .....                                               | 29        |
| 2.3.5      | Χημική επιφανειακή επικάλυψη και φορτίο.....                    | 29        |
| <b>2.4</b> | <b>Επίδραση των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον.....</b>          | <b>29</b> |
| 2.4.1      | Επιπτώσεις των νανοσωματιδίων στο υδάτινο περιβάλλον.....       | 29        |
| 2.4.2      | Επιπτώσεις των νανοσωματιδίων στο έδαφος .....                  | 31        |
| <b>2.5</b> | <b>Νομοθεσία.....</b>                                           | <b>33</b> |

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΧΡΥΣΟΥ ΚΑΙ ΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΑΙΩΡΟΥΜΕΝΑ ΥΠΕΡΜΟΡΙΑΚΑ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΘΕΡΜΙΚΗ ΑΤΟΜΟΠΟΙΗΣΗ**

|                                                                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Περίληψη .....</b>                                                                                                                                             | <b>39</b> |
| <b>1.1 Εισαγωγή.....</b>                                                                                                                                          | <b>40</b> |
| <b>1.2 Υλικά και μέθοδοι</b>                                                                                                                                      |           |
| 1.2.1 Αντιδραστήρια.....                                                                                                                                          | 43        |
| 1.2.2 Εξοπλισμός.....                                                                                                                                             | 44        |
| 1.2.3 Σύνθεση νανοσωματιδίων Χρυσού (AuNPs) .....                                                                                                                 | 45        |
| 1.2.4 Σύνθεση νανοσωματιδίων Αργύρου (AgNPs) .....                                                                                                                | 46        |
| 1.2.5 Παρασκευή διαλυμάτων νανοσωματιδίων τιτανίου ( $\text{nTiO}_2$ ) και υδρόφοβων<br>μαγνητικών νανοσωματιδίων (oleic acid @ $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) ..... | 47        |
| 1.2.6 Πραγματικά δείγματα.....                                                                                                                                    | 47        |
| 1.2.7 Πειραματική πορεία .....                                                                                                                                    | 48        |
| <b>1.3 Αποτελέσματα και συζήτηση</b>                                                                                                                              |           |
| 1.3.1 Σχηματισμός και ιδιότητες της υπερμοριακής φάσης.....                                                                                                       | 49        |
| 1.3.2 Μηχανισμός εκχύλισης.....                                                                                                                                   | 51        |
| 1.3.3 Βελτιστοποίηση των πειραματικών μεταβλητών. ....                                                                                                            | 53        |
| 1.3.4 Επιλογή διηθητικού φίλτρου.....                                                                                                                             | 53        |
| 1.3.5 Επίδραση της ταχύτητας ροής.....                                                                                                                            | 55        |
| 1.3.6 Επίδραση της συγκέντρωσης των αντισταθμιστικών ιόντων .....                                                                                                 | 55        |
| 1.3.7 Επίδραση του pH .....                                                                                                                                       | 57        |
| 1.3.8 Επίδραση της ιοντικής ισχύος .....                                                                                                                          | 58        |
| 1.3.9 Βελτιστοποίηση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης.....                                                                                               | 59        |
| 1.3.10 Βελτιστοποίηση των συνθηκών διαλυτοποίησης .....                                                                                                           | 59        |
| 1.3.11 Αξιολόγηση της επίδρασης της μήτρας του υποστρώματος και της<br>εκλεκτικότητας της μεθόδου .....                                                           | 61        |
| 1.3.12 Εκχύλιση AuNPs με διαφορετική επιφανειακή επικάλυψη και μέγεθος.....                                                                                       | 63        |
| 1.3.13 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου .....                                                                                                                 | 64        |
| 1.3.14 Αξιολόγηση και εφαρμογή της μεθόδου .....                                                                                                                  | 65        |
| 1.3.15 Εφαρμογή στην εκχύλιση και ανάκτηση νανοσωματιδίων αργύρου .....                                                                                           | 67        |
| <b>1.4. Συμπεράσματα .....</b>                                                                                                                                    | <b>72</b> |

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΥΓΡΗ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΑΓΟΝΑΣ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΕΠΑΝΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗ**

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Περίληψη .....</b>                                                                                     | <b>73</b> |
| <b>2.1. Εισαγωγή.....</b>                                                                                 | <b>74</b> |
| <b>2.2 Υλικά και μέθοδοι. ....</b>                                                                        | <b>76</b> |
| 2.2.1 Αντιδραστήρια και υλικά.....                                                                        | 76        |
| 2.2.2 Οργανολογία .....                                                                                   | 77        |
| 2.2.3 Σύνθεση AgNPs.....                                                                                  | 77        |
| <b>2.3 Πειραματική πορεία .....</b>                                                                       | <b>78</b> |
| <b>2.4 Πραγματικά δείγματα.....</b>                                                                       | <b>79</b> |
| <b>2.5 Αποτελέσματα και συζήτηση.....</b>                                                                 | <b>80</b> |
| 2.5.1 Επίδραση pH και ιοντικής ισχύος. ....                                                               | 81        |
| 2.5.2 Επίδραση του χρόνου εκχύλισης και της ταχύτητας ανάδευσης.....                                      | 82        |
| 2.5.3 Επίδραση του όγκου της οκτανόλης.....                                                               | 83        |
| 2.5.4 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση του σταδίου επανεκχύλισης με οξειδωτική<br>διαλυτοποίηση των AgNPs..... | 85        |
| 2.5.5 Όγκος δείγματος. ....                                                                               | 88        |
| 2.5.6 Εκχύλιση AgNPs με διαφορετικά μεγέθη και επικαλύψεις .....                                          | 89        |
| 2.5.7 Εκλεκτικότητα .....                                                                                 | 91        |
| 2.5.8 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου .....                                                          | 93        |
| 2.5.9 Επικύρωση και εφαρμογή μεθόδου .....                                                                | 93        |
| <b>2.6 Συμπεράσματα.....</b>                                                                              | <b>95</b> |

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΧΡΥΣΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΔΙΥΔΡΟΞΕΙΔΙΑ ΔΙΠΛΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ Mg/Al**

|                                                                                                           |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Περίληψη.....</b>                                                                                      | <b>97</b>  |
| <b>3.1 Εισαγωγή .....</b>                                                                                 | <b>98</b>  |
| <b>3.2 Υλικά και μέθοδοι .....</b>                                                                        | <b>100</b> |
| 3.2.1 Αντιδραστήρια.....                                                                                  | 100        |
| 3.2.2 Εξοπλισμός.....                                                                                     | 100        |
| 3.2.3 Σύνθεση νανოსωματιδίων χρυσού.....                                                                  | 101        |
| <b>3.3 Πειραματική πορεία .....</b>                                                                       | <b>101</b> |
| <b>3.4 Πραγματικά δείγματα.....</b>                                                                       | <b>102</b> |
| <b>3.5 Αποτελέσματα και συζήτηση.....</b>                                                                 | <b>102</b> |
| 3.5.1 Χαρακτηρισμός των LDH και μηχανισμός εκχύλισης των AuNPs .....                                      | 102        |
| 3.5.2 Βελτιστοποίηση της πειραματικής πορείας για την εκχύλιση των AuNPs .....                            | 103        |
| 3.5.3 Επίδραση της συγκέντρωσης $Mg^{2+}$ και $Al^{3+}$ και της αναλογίας τους .....                      | 104        |
| 3.5.4 Επίδραση της συγκέντρωσης KOH.....                                                                  | 106        |
| 3.5.5 Επίδραση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης.....                                             | 107        |
| 3.5.6 Επίδραση της ιοντικής ισχύος .....                                                                  | 107        |
| 3.5.7 Εκχύλιση και έκλουση των AuNPs.....                                                                 | 109        |
| 3.5.8 Εκχύλιση AuNPs διαφορετικών μεγεθών και επικαλύψεων .....                                           | 111        |
| 3.5.9 Συνδυασμός της μεθόδου με την ατομική φασματοσκοπία και μελέτη της εκλεκτικότητας της μεθόδου ..... | 114        |
| 3.5.10 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου .....                                                         | 116        |
| 3.5.11 Εφαρμογή της μεθόδου και ανακτήσεις.....                                                           | 117        |
| <b>3.6. Συμπεράσματα.....</b>                                                                             | <b>118</b> |

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΕΔΑΦΗ**

|                                                                                                     |                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>Περίληψη.....</b>                                                                                | <b>119</b>     |
| <b>4.1 Εισαγωγή.....</b>                                                                            | <b>120</b>     |
| <b>4.2 Υλικά και μέθοδοι .....</b>                                                                  | <b>122</b>     |
| 4.2.1 Αντιδραστήρια.....                                                                            | 122            |
| 4.2.2 Εξοπλισμός.....                                                                               | 123            |
| 4.2.3 Σύνθεση AuNPs επικαλυμμένων με κιτρικά και PVP .....                                          | 123            |
| 4.2.4 Πειράματα φυγοκέντρωσης.....                                                                  | 124            |
| 4.2.5 Εμβολιασμός χώματος.....                                                                      | 124            |
| 4.2.6 Μέθοδος διαδοχικής εκχύλισης.....                                                             | 125            |
| 4.2.7 Ειδοταυτοποίηση των AuNPs και ιόντων Au.....                                                  | 126            |
| <b>4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση.....</b>                                                           | <b>127</b>     |
| 4.3.1 Διαχωρισμός νανოსωματιδίων από κolloειδή του χώματος .....                                    | 129            |
| 4.3.2 Ανάπτυξη της μεθόδου κλασματοποίησης .....                                                    | 133            |
| 4.3.3 Αξιολόγηση της κινητικότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των AuNPs .....                        | 138            |
| 4.3.4 Ανάκτηση των AuNPs κατά τη φυγοκέντρωση των εκχυλισμάτων.....                                 | 139            |
| 4.3.5 Ειδοταυτοποίηση μεταλλικών νανοςωματιδίων και μεταλλικών ιόντων στα εκχυλίσματα χώματος ..... | 140            |
| <b>4.4 Συμπεράσματα.....</b>                                                                        | <b>144</b>     |
| <br><b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>                                                                        | <br><b>145</b> |

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ**

### **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Σχήμα 1.1. Οργανικά νανοσωματίδια α. δενδριμερή, β. λιποσώματα, γ. μικύλλια (A. M. Ealias and Saravanakumar M P, 201.....6

Σχήμα 1.2. Επισκόπηση των μεθόδων σύνθεσης νανοσωματιδίων.....12

Σχήμα 2.1. Μετασχηματισμοί νανοσωματιδίων στο περιβάλλον. Τα νανοσωματίδια μπορεί να υποστούν φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς μετασχηματισμούς στον αέρα, στα εδάφη και στο υδάτινο περιβάλλον. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, μαζί με περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθορίζουν τον τύπο των διαδικασιών μετασχηματισμού (Zhang J. et al., 2018).....22

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Σχήμα 1.1. Γραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας για την in-situ μικροεκχύλιση αιωρούμενων συσσωματωμάτων νανοσωματιδίων χρυσού από δείγματα νερού.....48

Εικόνα 1.1. Εικόνες TEM της υπερμοριακής φάσης που σχηματίστηκε με σύζευξη ιόντων 5,0 mM SSA και 0,2 mM CTAB. Η κάτω εικόνα απεικονίζει την συνολική υπερμοριακή φάση που λαμβάνεται με ανάμιξη περιόδων CTAB (5,0 mM SSA, 2,0 mM CTAB).....51

Σχήμα 1.2. Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού εκχύλισης. (α) Τα AuNPs παγιδεύονται εντός του υδατικού πυρήνα κυστιδίων, (β) Τα κυστίδια στοιβάζονται πυκνά κατά τη διάρκεια της διήθησης και τα AuNPs παγιδεύονται φυσικά. Ο αριθμός των μορίων CTAB και SSA και των νανοσωματιδίων είναι ενδεικτικός.....53

Σχήμα 1.3. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων διηθητικών φίλτρων για τη συλλογή της υπερμοριακής φάσης. Στα φίλτρα S-PAK, GN-6 και MF το υμένιο αποκολλήθηκε φυσικά, αφαιρέθηκε από το φίλτρο και διαλύθηκε ξεχωριστά σε ένα όξινο μεθανολικό διάλυμα (1:4 μεθανόλη- $\text{HNO}_3$  6M). Στα φίλτρα AP40, OE66 και 336 η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 2.0 mL διαλύματος μεθανόλης:  $\text{HNO}_3$  6.0 M στην επιφάνεια του φίλτρου για λίγα λεπτά και στη συνέχεια συλλογή υπό κενό. Λεπτομέρειες σχετικά με τις εμπορικές ονομασίες και τις ιδιότητες των φίλτρων παρατίθενται στον Πίνακα 1.1.....54

Σχήμα 1.4. Επίδραση της συγκέντρωσης (α) SSA και (β) CTAB στην απόκριση ατομικού σήματος των  $11.0 \text{ pmol L}^{-1}$  AuNPs που εκχυλίστηκαν από 20 mL υδατικού διαλύματος.....56

Σχήμα 1.5. Επίδραση του pH στην απόκριση ατομικού σήματος των  $11.0 \text{ pmol L}^{-1}$  AuNPs που εκχυλίστηκαν από 20 mL υδατικού διαλύματος.....57

Σχήμα 1.6. Επίδραση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης στην ένταση της απορρόφησης κατά την εκχύλιση  $11.0 \text{ pmol L}^{-1}$  AuNPs από 20 mL υδατικού

διαλύματος.....58

Σχήμα 1.7. Διαγράμματα ατομικού σήματος Au που ελήφθησαν μετά τη διαλυτοποίηση του συσσωματωμένου λεπτού στρώματος σε 2,5 mL (α) μεθανόλης / 2,5 M HNO<sub>3</sub> (1: 3) (β) μεθανόλης / 9,6 M HNO<sub>3</sub> (1: 3) και γ) μεθανόλης / 9,6 M HNO<sub>3</sub> (1: 3) και χώνευση σε μικροκύματα για 15 min στα 900 W.....61

Σχήμα 1.8. Φωτογραφίες (α) υδατικού διαλύματος AgNPs, (β) υπερμοριακής φάσης σε υδατικό διάλυμα AgNPs (γ) διήθημα μετά από εκχύλιση. Φάσματα UV / Vis του (δ) υδατικού διαλύματος AgNPs (κόκκινη γραμμή) και του διηθήματος μετά από εκχύλιση (μαύρη γραμμή) (ε) 0.5 mM υδατικού διαλύματος CTAB (στ) 1.0 mM υδατικού διαλύματος σουλφοσαλικυλικού οξέος (κόκκινη γραμμή) (g) φίλτρα Millipore S-PAK που δείχνουν το υπερμοριακό υμένιο, μετά από συλλογή αυξανόμενων ποσοτήτων CA@AgNPs (από αριστερά προς τα δεξιά: 0, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 και 2,7 mg L<sup>-1</sup> Ag<sup>+</sup>). Οι φωτογραφίες έχουν περικοπώνται και μεγενθυθεί για λόγους ευκρίνειας.....67

Σχήμα 1.9. (α) Φάσματα ATR-IR του αποξηραμένου υμενίου μετά την εκχύλιση AgNPs. Οι δονητικές αποδιεργασίες του CTAB, του SSA και του κιτρικού άλατος είναι όμοιες με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Huang L. et al., 2001, Lakshmanan B.R. et al., 1957, Pozdnyakov I. P. et al., 2006). (b) Εικόνες AFM και ανάλυση τομής για τον προσδιορισμό του μεγέθους των νανοσωματιδίων.....68

Σχήμα 1.10. (α) Λεπτό υμένιο (χωρίς AgNPs) που έχει στεγνώσει στον αέρα και έχει αποκολληθεί από το φίλτρο (β) Διαλυτοποίηση λεπτής μεμβράνης σε μεθανόλη που λαμβάνεται μετά την εκχύλιση ενός υδατικού διαλύματος που περιέχει 2,7 mg L<sup>-1</sup> Ag<sup>+</sup> (γ) Μεθανολικά εναιωρήματα των λεπτών υμενίων που απεικονίζονται στο Σχήμα 4ζ (εκτός από τη μεμβράνη στα 0,2 mg L<sup>-1</sup> Ag<sup>+</sup>) που ελήφθησαν μετά από έκθεση σε ακτινοβολία υπερήχων επί 10 δευτερόλεπτα. (δ) Ένταση απορρόφησης των μεθανολικών εναιωρημάτων του Σχήματος S4γ στα 400 nm. ....69

Σχήμα 1.11. Διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης HNO<sub>3</sub> στην αποτελεσματικότητα διαλυτοποίησης των συλλεχθέντων νανοσωματιδίων αργύρου σε ιονικό άργυρο. ....70

Σχήμα 1.12. Απόλυτες και σχετικές ανάκτησες διαφόρων νανοσωματιδίων (1 mg L<sup>-1</sup> μεταλλικού ιόντος) από υδατικά διαλύματα. Οι απόλυτες ανακτήσεις ορίζονται ως η % αναλογία των νανοσωματιδίων που εκχυλίζονται από το διάλυμα προς την αρχικά προστιθέμενη συγκέντρωση (δηλ. την ποσότητα των NPs που ανακτώνται από την μήτρα έναντι του προτύπου). Οι σχετικές ανακτήσεις ορίζονται ως η % αναλογία της συγκέντρωσης που βρίσκεται στα εμβολιασμένα υδατικά δείγματα με εκείνη που προσδιορίζεται μετά από εκχύλιση πρότυπων υδατικών διαλυμάτων (δηλαδή, ποσότητα NPs που ανακτάται από τη μήτρα έναντι εκχυλισμένου πρότυπου.....71

Σχήμα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής πορείας υγρής μικροεκχύλισης αιωρούμενου σταγονιδίου και επανεκχύλισης με οξειδωτική

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| διαλυτοποίηση των AgNPs (στάδιο A: εκχύλιση, στάδιο B: επανασύσταση, στάδιο Γ: επανεκχύλιση και διαλυτοποίηση).....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 79  |
| Σχήμα 2.2. Βελτιστοποίηση (α) pH (β) NaNO <sub>3</sub> (γ) ταχύτητας ανάδευσης και (δ) χρόνου ανάμιξης κατά την εκτέλεση της μεθόδου. Πειραματικές συνθήκες: οκτανόλη 1 mL, όγκος διαλύματος επανεκχύλισης: 2,5 mL, AgNPs = 0,6 nM (0,36 mg L <sup>-1</sup> Ag +).....                                                                                                                               | 83  |
| Σχήμα 2.3. Επίδραση του όγκου της οκτανόλης στην εκχύλιση των AgNPs. Πειραματικές συνθήκες: pH = 4 (ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος/οξικού νατρίου 90 mM), 70 mM NaNO <sub>3</sub> , ανάδευση στις 1000 rpm για 15 λεπτά, επανεκχύλιση σε 2,5 mL HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                                                                               | 84  |
| Σχήμα 2.4. Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου θέρμανσης στην επανεκχύλιση των AgNPs.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 86  |
| Σχήμα 2.5. Επίδραση της μεθόδου ανάμιξης και του χρόνου επανεκχύλισης των AgNPs. Πειραματικές συνθήκες: όγκος οκτανόλης = 1 mL, pH = 4 (ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος/οξικού νατρίου 90 mM), 70 mM NaNO <sub>3</sub> , ανάδευση στις 1000 rpm για 15 λεπτά, επανεκχύλιση σε 2,5 mL HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                                           | 87  |
| Σχήμα 2.6. Επίδραση του όγκου του διαλύματος επανεκχύλισης στην απόδοση της μεθόδου.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 88  |
| Σχήμα 2.7. Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης με χρήση AgNPs (α) διαφορετικού μεγέθους και (β) διαφορετικών επιφανειακών επικαλύψεων.....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 90  |
| Σχήμα 3.1. (α) Φάσμα ATR-IR των Mg <sup>2+</sup> / Al <sup>3+</sup> LDH. (β) Εικόνες SEM των LDH σε διαφορετική μεγέθυνση (από αριστερά προς τα δεξιά: 65, 100, 300, 2000).....                                                                                                                                                                                                                      | 103 |
| Σχήμα 3.2. Επίδραση (α) της συγκέντρωσης Mg <sup>2+</sup> /Al <sup>3+</sup> και (β) της αναλογίας στην εκχύλιση. Συνθήκες: 15,8 nmol L <sup>-1</sup> κιτρικά AuNPs (4 nm), 100 mmol L <sup>-1</sup> KOH, θερμοκρασία δωματίου, χρόνος ανάμιξης 1 λεπτό, φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 6000 rpm (4200 g), διαλυτοποίηση σε 0,5 mL 0,5 mol L <sup>-1</sup> HCl.....                                   | 105 |
| Σχήμα 3.3. Επίδραση της συγκέντρωσης KOH στην απόδοση της εκχύλισης των AuNPs. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 106 |
| Σχήμα 3.4. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης και της θερμοκρασίας στην απόδοση της εκχύλισης των AuNPs. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 107 |
| Σχήμα 3.5. Επίδραση της ιοντικής ισχύος στην εκχύλιση. Συνθήκες: 15,8 nmol L <sup>-1</sup> AuNPs επικαλυμμένα με κιτρικά (4nm), θερμοκρασία δωματίου, συγκέντρωση Mg <sup>2+</sup> και Al <sup>3+</sup> 6,7 mmol L <sup>-1</sup> (1/3), 50 mmol L <sup>-1</sup> KOH, χρόνος ανάμιξης 1 min, φυγοκέντρηση για 30 min στις 6000 rpm (4200 g), διαλυτοποίηση σε 0,5 mL 0,5 mol L <sup>-1</sup> HCl..... | 108 |
| Σχήμα 3.6. Επίδραση του χρόνου φυγοκέντρησης στις 6000 rpm στην απόδοση της SPE στα AuNPs. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 110 |
| Σχήμα 3.7. Καμπύλες βαθμονόμησης από την εκχύλιση 10 ml νερού βρύσης                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| εμβολιασμένου με AuNPs (4nm) αυξανόμενων συγκεντρώσεων και διαφορετικών επικαλύψεων..                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 114 |
| Σχήμα 4.1. Ανάκτηση των AuNPs (5 nm, 30 nm, επικαλυμμένα με κιτρικά και PVP) στα υπερκείμενα των υδατικών εδαφικών εκχυλισμάτων μετά από φυγοκέντρηση σε διαφορετικές ταχύτητες φυγοκέντρησης και χρόνους. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για n=3.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 131 |
| Σχήμα 4.2. Ανάκτηση των PVP-AuNPs (5 και 30 nm) σε νερό βρύσης μετά από φυγοκέντρηση σε διάφορες επιταχύνσεις και χρόνους. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για n=3. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 132 |
| Σχήμα 4.3. Ανακτήσεις από την διαδοχική εκχύλιση PVP-AuNPs (5 nm) από το χώμα. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για n=3....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 134 |
| Σχήμα 4.4. Αποτελεσματικότητα διάφορων αντιδραστηρίων στην εκχύλιση PVP-AuNPs (5 nm) από την οργανική ύλη του χώματος. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για n=3. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 135 |
| Σχήμα 4.5. Ανάκτηση των PVP-AuNPs (5 nm και 30 nm) μετά από φυγοκέντρηση σε διάλυμα που ελήφθησε μετά από εκχύλιση του χώματος με TSPP. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για n=3.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 140 |
| Σχήμα 4.6. Φάσματα UV-Vis και φωτογραφίες διαλυμάτων ιόντων χρυσού (1.0 mM) (α) πριν και (β) μετά την επώαση με 0.5 M υδροχλωρική υδροξυλαμίνη για 30 min. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 141 |
| Σχήμα 4.7. Αποτελέσματα από την ανάλυση ειδοταυτοποίησης των AuNPs και των ιόντων Au σε εκχυλίσματα χώματος μετά την εκχύλιση του σημείου νεφέλωσης. Τα διαγράμματα χωρίς διαγράμμιση ελήφθησαν από την εκχύλιση του εμβολιασμένου χώματος με AuNPs ή με ιόντα Au, ενώ τα διαγράμματα με εσωτερική διαγράμμιση παρουσιάζουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση του χώματος που έχει εμβολιαστεί με AuNPs και ιόντα Au μετά από διαχωρισμό με εκχύλιση σημείου νεφέλωσης. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για n=3. Επομένως, συνδυάζοντας την εκχύλιση TSPP με CPE είναι εφικτό να λάβουμε πληροφορίες σχετικά με τη σχετική κατανομή και την ειδοταυτοποίηση της συνολικής συγκέντρωσης των ιόντων Au και των AuNPs σε δείγματα χώματος. .... | 143 |

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ**

### **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Πίνακας 1.1. Διαστάσεις νανοϋλικών.....                                                        | 3  |
| Πίνακας 1.2. Είδη νανοϋλικών και εφαρμογές τους .....                                          | 4  |
| Πίνακας 1.3. Κατηγοριοποίηση μεθόδων σύνθεσης νανοσωματιδίων.....                              | 11 |
| Πίνακας 1.4. Τεχνικές χαρακτηρισμού των νανοϋλικών και οι ιδιότητες που προσδιορίζονται.....   | 16 |
| Πίνακας 1.5. Οι προσδιοριζόμενες παράμετροι και οι αντίστοιχες τεχνικές χαρακτηρισμού. ....    | 18 |
| Πίνακας 1.6. Φυσικές και χημικές ιδιότητες διαφόρων νανοσωματιδίων.....                        | 19 |
| Πίνακας 2.1. Ενδεικτικές τοξικές επιδράσεις και επιπτώσεις νανοσωματιδίων.....                 | 28 |
| Πίνακας 2.2. Επιδράσεις μετασχηματισμού στην τοξικότητα που προκαλείται από νανοσωματίδια..... | 32 |

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

|                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Πίνακας 1.1. Τεχνικές προδιαγραφές των διηθητικών φίλτρων που εξετάστηκαν.....                                                                                                 | 43  |
| Πίνακας 1.2. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ET-AAS για τον προσδιορισμό Au μετά από τη μικροεκχύλιση αιωρούμενων υπερμοριακών συσσωματωμάτων.....                                     | 44  |
| Πίνακας 1.3. Ανάκτηση των PVP <sub>10</sub> @AuNPs από εμβολιασμένα δείγματα νερού (n=3).....                                                                                  | 66  |
| Πίνακας 2.1. Ανάκτηση των AgNPs από περιβαλλοντικά δείγματα.....                                                                                                               | 94  |
| Πίνακας 2.2. Συγκριτική επισκόπηση μεταξύ DSME και άλλων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των AgNPs σε περιβαλλοντικά δείγματα με τεχνικές ατομικής φασματοσκοπίας..... | 95  |
| Πίνακας 3.1. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ETAAS για τον προσδιορισμό AuNPs.....                                                                                                     | 102 |
| Πίνακας 3.2. Λογαριθμική συνάρτηση βαθμονόμησης (σε μορφή $y = a \ln x + b$ ) από την εκχύλιση των AuNPs επικαλυμμένων με κιτρικά διαφορετικού μεγέθους.....                   | 112 |
| Πίνακας 3.3. Ανάκτηση AuNPs επικαλυμμένων με κιτρικά από εμβολιασμένα περιβαλλοντικά δείγματα.....                                                                             | 117 |
| Πίνακας 4.1. Πειραματικές συνθήκες της διαδοχικής εκχύλισης των AuNPs από εδάφη.....                                                                                           | 125 |

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Για την υλοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χορηγήθηκε υποτροφία από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Τεχνολογίας (ΕΛΙΔΕΚ) και από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ) στα πλαίσια της «1ης Προκήρυξης ΕΛΙΔΕΚ για υποψήφιους διδάκτορες».

Με την ολοκλήρωση της διατριβής μου θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους στάθηκαν δίπλα μου σε αυτή την προσπάθεια με την πολύτιμη συνεργασία τους και με βοήθησαν να την φέρω εις πέρας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα μου Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημοσθένη Γκιώκα, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και την ποικιλόμορφη στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Όλα αυτά τα χρόνια μου έμαθε πολλά πράγματα, από ερευνητικά θέματα, όπως το πως να προσεγγίζω και να πραγματοποιώ το πείραμά μου, πως να αναλύω τα αποτελέσματά μου, πως να λειτουργώ μέσα στο εργαστήριο κ.α.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Βλεσσίδα Αθανάσιο και τον Καθηγητή Ανόργανης Χημείας κ. Γαρούφη Αχιλλέα για τις σημαντικές συμβουλές, τις εύστοχες υποδείξεις και διορθώσεις και για την εποικοδομητική κριτική τους.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής: τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Σταλικά Κωνσταντίνο, τον Επίκουρο Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Τσόγκα Γεώργιο, τον Επίκουρο Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Τζαναβάρα Παρασκευά, και τον Επίκουρο Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Διονύσιο Χριστοδουλέα (UMASS, Lowell, USA) για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Αναλυτικής χημείας: Τζιάσιου Χαρίκλεια, Γκούμα

Βασιλική, Μωυσιάδη Ηλία και Γκόγκου Δέσποινα για την αμέριστη βοήθεια και άριστη συνεργασία που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την πολύπλευρη συμπαράσταση κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Χολέβα Γ. Τατιάνα

Ιωάννινα, 2020

# **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

## ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

### 1.1 Εισαγωγή

Η νανοτεχνολογία αναφέρεται σε οποιαδήποτε τεχνολογία υλοποιείται στην νανοκλίμακα και μπορεί να οριστεί ως ο έλεγχος ή η ανακατασκευή της ύλης σε ατομικό ή μοριακό επίπεδο στο εύρος των 1-100nm (National Science and Technology, 2000). Η ταχεία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας έθεσε τη βάση για καινοτόμες τεχνολογίες σε ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών που περιλαμβάνει την υγεία, την αγροτική παραγωγή, τα τρόφιμα, τη μεταφορά, την ενέργεια, τις ηλεκτρονικές εφαρμογές και τηλεπικοινωνίες κ.α. (Roco M. et al., 2011). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την προτυποποίηση των υλικών, τα νανοϋλικά ορίζονται ως υλικά όπου οποιαδήποτε εξωτερική τους διάσταση βρίσκεται στη νανοκλίμακα ή τοποθετείται στην νανοκλίμακα ή στις επιφανειακές δομές. Υπάρχουν επίσης περιπτώσεις που τα νανοϋλικά δεν ορίζονται απευθείας σε σχέση με το μέγεθος τους αλλά ως υλικά νανομετρικής κλίμακας των οποίων τα χαρακτηριστικά διαφέρουν από αυτά που θεωρούνται ως κύρια υλικά (Mayard et al., 2011).

Τα νανοσωματίδια είναι κατηγορία νανοϋλικών που έχουν διαστάσεις της τάξης των  $\leq 100\text{nm}$  (Lövestam G. et al., 2010) ενώ η προέλευση τους μπορεί να είναι φυσική ή ανθρωπογενής. Τα φυσικά νανοσωματίδια προέρχονται από φυσικά φαινόμενα όπως σεισμοί, ανεμοθύελλες διαβρώσεις, ηφαιστειακές εκρήξεις και πυρκαγιές δασών (Nowack B. and Bucheli D.B., 2007) ενώ τα ανθρωπογενή είναι συνθετικά υλικά που προκύπτουν από κατευθυνόμενη μηχανική, χημική ή βιολογική δράση με σκοπό την παραγωγή νανοϋλικών με συγκεκριμένες ιδιότητες και χαρακτηριστικά

Η βασική διάκριση των νανοσωματιδίων γίνεται με βάση τις διαστάσεις τους, το σχήμα και το μέγεθος τους καθώς και το υλικό από το οποίο αποτελούνται. (Cho E. et al., 2013). Με βάση τις διαστάσεις τους στη νανοκλίμακα ( $< 100\text{ nm}$ ) τα νανοσωματίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 κατηγορίες (Πίνακας 1.1):

(1) Μηδενικής διάστασης νανοϋλικά (0-D): Σε αυτήν την κατηγορία, και οι τρεις διαστάσεις των νανοϋλικών είναι στην περιοχή νανοκλίμακας. Τα σφαιρικά νανοσωματίδια εντάσσονται σε αυτή την κατηγορία.

(2) Μονοδιάστατα νανοϋλικά (1-D): Σε αυτήν την κατηγορία, οποιαδήποτε μια διάσταση είναι σε περιοχή νανοκλίμακας και οι υπόλοιπες δυο διαστάσεις παραμένουν εκτός της περιοχής. Οι νανοράβδοι, οι νανοσωλήνες και τα νανοςύρματα εντάσσονται σε αυτή την κατηγορία.

(3) Δισδιάστατα νανοϋλικά (2-D): Οποιοσδήποτε από τις δύο διαστάσεις είναι στην περιοχή νανοκλίμακας και η διάσταση που απομένει είναι εκτός αυτής. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει τις νανотαινίες, τις νανοστιβάδες και τις νανοεπικαλύψεις.

(4) Τρισδιάστατα ή νανοϋλικά όγκου (3-D): Σε οποιαδήποτε διάσταση αυτά τα νανοϋλικά δεν βρίσκονται σε περιοχή νανοκλίμακας. Αυτό σημαίνει ότι και στις τρεις αυθαίρετες διαστάσεις είναι σε κλίμακα  $>100$  nm. Αυτά τα νανοϋλικά περιλαμβάνουν σύνθετα υλικά ή δομές που αποτελούνται από μεμονωμένα νανωυλικά στοιβαγμένα σε τρισδιάστατες δομές  $>100$  nm όπως τα νανοςύνθετα, τις πολλαπλές νανοστιβάδες, τις δέσμες νανοσυρμάτων και τις δέσμες νανοσωλήνων. (Kolahalalam L.A. et al., 2019)

**Πίνακας 1.1.** Διαστάσεις νανοϋλικών.

| Διαστάσεις                     | Τύποι νανοϋλικού                                       |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Μηδενικής διάστασης            | Νανοσωματίδια, κβαντικές κουκκίδες                     |
| Μονοδιάστατα                   | Νανοράβδοι, νανοσωλήνες, νανοςύρματα                   |
| Δισδιάστατα                    | Νανотαινίες, νανοστιβάδες                              |
| Τρισδιάστατα ή νανοϋλικά όγκου | Φλοιοί πυρήνα, δέσμες νανοσυρμάτων, δέσμες νανοσωλήνων |

Τα κυριότερα είδη νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις και το σχήμα τους και οι σημαντικότερες εφαρμογές τους συνοψίζονται στον Πίνακα 1.2.

**Πίνακας 1.2.** *Είδη νανοϋλικών και εφαρμογές τους.*

| <b>Τύπος νανοϋλικών</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>Εφαρμογές</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Νανोकλωβός:</b> Αρχικά αναφέρθηκαν το 2002, αυτή η κατηγορία νανοϋλικών έχει κοίλα εσωτερικά και πορώδη τοιχώματα που περιέχουν μεταλλικά νανοσωματίδια (MNPs). Το μέγεθος τους κυμαίνεται μεταξύ 10-150 nm (Sun Y.et al., 2002).                                                                                                     | Ως ιχνοθέτες για την ανίχνευση χρησιμοποιώντας φωταύγεια, σκιαγραφικά μέσα για πολυακουστική και πολυτροπική απεικόνιση, φωτοθερμικά μέσα για την επιλεκτική καταστροφή καρκινικού ιστών και οχήματα μεταφοράς φαρμάκου για ελεγχόμενη απελευθέρωση σε απόκριση εξωτερικών ερεθισμάτων όπως η ακτινοβολία NIR ή οι υπέρηχοι υψηλής έντασης (Xia et al., 2011). |
| <b>Νανοκρύσταλλος:</b> Ο νανοκρύσταλλος είναι μόνο- ή πολυφασικά πολυκρυσταλλικά στερεά με μέγεθος μικρότερο από 100 nm (Suryanarayana C. and Koch C.C., 2000).                                                                                                                                                                          | Συσκευές μνήμης, ηλιακές κυψελίδες, οθόνες στερεάς κατάστασης, φωτοανιχνευτές και τρανζίστορ επίδρασης πεδίου (FET) (Panthani M.G. and Korgel B.A., 2012, Zhu T. et al., 2012).                                                                                                                                                                                |
| <b>Νανοταινία:</b> Η νανοταινία είναι λεπτά και επίπεδα φύλλα από δομές τύπου-κορδέλα και το μέγεθός τους είναι 30-300 nm (Pan Z.W. et al., 2001). Οι νανοταινίες με εγκάρσια διατομή και καλά καθορισμένες κρυσταλλικές έδρες, επιτρέπουν την επίτευξη οπτικού περιορισμού, κατάλυση και πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο (Hu C. et al., 2007). | Οι νανοταινίες έχουν αντίκτυπο στον τομέα της αυτοτροφοδότησης νανosuσκευών και νανosuστημάτων. Έχουν εφαρμογές σε συσκευές FET, βιοαισθητήρες, αντηχεία, μικροβραχίονες κλπ (Wang X. et al., 2007).                                                                                                                                                           |
| <b>Νανοϊνα (NF):</b> Πρόκειται για δισδιάστατες δομές ινών με διάμετρο μικρότερη από 100 nm.                                                                                                                                                                                                                                             | Συστήματα φιλτραρίσματος νερού, χειρουργικά εμφυτεύματα, βιοαισθητήρες, συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, ηλεκτρονικές συσκευές, μηχανική ιστών κλπ (Beachley V. and Wen X., 2009, Leung V. and Ko F., 2011, Wei Q., 2012).                                                                                                                                        |
| <b>Νανοσωματίδιο (NP):</b> Σύμφωνα με τη IUPAC, σωματίδιο οποιουδήποτε σχήματος με εύρος διαστάσεων από $1 \times 10^{-9}$ έως $1 \times 10^{-7}$ m είναι γνωστό ως νανοσωματίδιο (NP).                                                                                                                                                  | Τα NPs έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που περιλαμβάνει τον ρόλο τους στις βιοϊατρικές συσκευές (βιοαισθητήρες, μηχανική ιστών, χορήγηση φαρμάκων, βιοενεργοποιητές, συσκευές βιοαπεικόνισης, κλπ.), ηλεκτρονικές και οπτικοηλεκτρονικές συσκευές, βιομηχανία τροφίμων, κατασκευαστικές βιομηχανίες κλπ (Joye I.J. and McClements D.J., 2014).                  |
| <b>Νανωσωλήνας (NT) και νανοράβδος (NR):</b> Ο NT είναι μικροσκοπικός                                                                                                                                                                                                                                                                    | Οι νανωσωλήνες ειδικά οι νανωσωλήνες άνθρακα (CNT) χρησιμοποιούνται                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

σωλήνας η διάμετρος του οποίου μετράται σε νανόμετρα (συνήθως <100 nm) (Baughman R.H. et al., 2002). Ο NT είναι κυρίως κοίλος. Αντίθετα η NR είναι στερεά δομή με αναλογία διαστάσεων ~ 3-5 και καθεμία από τις διαστάσεις είναι 1-100 nm (Zhang C. et al., 2013).

σε τεχνολογίες. Τα νήματα και τα φύλλα CNT είναι ήδη γνωστό ότι έχουν υποσχόμενες εφαρμογές στους υπερπυκνωτές, ενεργοποιητές και ηλεκτρομαγνητικές ασπίδες (Baughman R.H. et al., 2002, De Volder M.F.L. et al., 2013). Συνεχίζονται οι προσπάθειες να προχωρήσει η χρήση αυτών των νανοδομών στα πεδία της βιοϊατρικής και της νανοϊατρικής (He H. et al., 2013).

---

**Νανοσύρμα (NW):** Το νανοσύρμα είναι ένα μονοδιάστατο νανοδομικό υλικό με διαστάσεις της τάξης των  $10^{-9}$  m.

Δεδομένου ότι τα ημιαγωγά νανοσύρματα έχουν ηλεκτρονικές και οπτικοηλεκτρονικές ιδιότητες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή επαφών p-n, τρανζίστορ, ηλιακές κυψελίδες, αισθητήρες κλπ (J. K. Hyun et al., 2013, Li Y. et al., 2006).

---

**Κβαντική κουκίδα (QD):** Οι κβαντικές κουκίδες είναι νανοκρυσταλλικό ημιαγώγιμο υλικό, αρκετά μικρό για να παρουσιάσει κβαντικές μηχανικές ιδιότητες και τα εξιτόνά τους περιορίζονται και στις τρεις διαστάσεις. Η QD μπορεί περιέχει μόλις 100 έως 100.000 άτομα εντός του όγκου της, με διάμετρο 10 έως 50 άτομα (Sheela Modani M.K. and Nijhawan M., 2013).

Λόγω των εξαιρετικών οπτικών και ηλεκτρονικών ιδιοτήτων, εφαρμόζονται εκτενώς στις διόδους εκπομπής φωτός, λέιζερ, βιοδείκτες, συσκευές βιοαισθητήρα και βιοϊατρικής απεικόνισης (Dhyani H. et al., 2011, N.Z. Frederik Hetsch et al., 2013, Jamiesona T. et al., 2007).

---

**Νανοσύνθετα:** Είναι πολυφασικό υλικό όπου τουλάχιστον μια από τις φάσεις των συστατικών έχει μία διάσταση μικρότερη από 100 nm (Fischer H. et al., 2003). Τα νανοσύνθετα με βάση την πολυλειτουργικότητά τους, τη δυνατότητα πραγματοποίησης συνδυασμού ιδιοτήτων με αρχικά υλικά (Dhand C. et al., 2008).

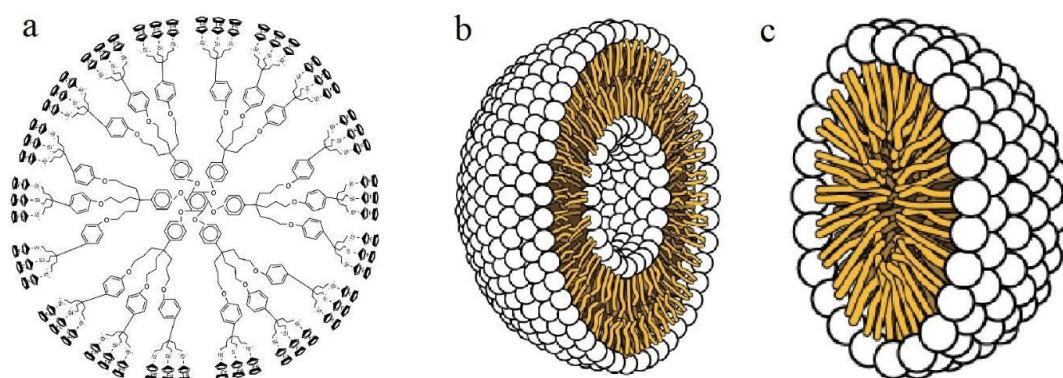
Τα νανοσύνθετα εφαρμόζονται στη μικροηλεκτρονική βιομηχανία, στην αεροδιαστημική, στην ηλεκτρονική συσκευασία και στην κατάλυση (Camargo P.H.C. et al., 2009, Thoniyot P. et al., 2015, Ye E. and Loh X.J., 2013).

## 1.2 Ταξινόμηση των νανοσωματιδίων

Η βασική ταξινόμηση των νανοσωματιδίων γίνεται με βάση σύστασή τους σε οργανικά, ανόργανα και σε νανοσωματίδια άνθρακα.

### 1.2.1 Οργανικά νανοσωματίδια

Τα οργανικά νανοσωματίδια μπορεί να οριστούν ως τα σωματίδια που προέρχονται από οργανικά συστατικά και κυρίως από λιπίδια ή πολυμερή. Τα πιο γνωστά οργανικά νανοσωματίδια ή πολυμερή είναι τα δενδριμερή, τα μικκύλια, τα λιποσώματα, η φερριτίνη κλπ. Αυτά τα νανοσωματίδια είναι βιοαποικοδομήσιμα, μη τοξικά ενώ μερικά εξ'αυτών όπως τα μικκύλια και τα λιποσώματα αναφέρονται και ως νανοκάψουλες λόγω του κόλλου τους πυρήνα (Σχήμα 1.1) (Tiwari D.K., 2008). Τα οργανικά νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται ευρύτερα στον βιοϊατρικό τομέα για παράδειγμα σε συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων καθώς μπορούν να εισαχθούν σε συγκεκριμένα μέρη του σώματος για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων (Ealias A.M. and Saravanakumar M.P., 2017).



**Σχήμα 1.1.** Οργανικά νανοσωματίδια α. δενδριμερή, β. λιποσώματα, γ. μικκύλια (A. M. Ealias and Saravanakumar M P, 2017).

### 1.2.2 Νανοσωματίδια άνθρακα

Οι νανοδομές με βάση τον άνθρακα, αποτελούνται από καθαρό άνθρακα, και ταξινομούνται σε δύο κύριες ομάδες: α) φουλλερένια: ενώσεις που περιέχουν τουλάχιστον 60 άτομα άνθρακα και β) νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs).

Το φουλλερένιο  $C_{60}$ , έχει σφαιροειδή δομή με τα άτομα άνθρακα διατεταγμένα στις κορυφές μιας εικοσάεδρης δομής (López-Serrano A. et al., 2013). Υπάρχουν κι άλλα είδη φουλλερενίων σε λιγότερο σταθερές μορφές όπως το  $C_{70}$ ,  $C_{76}$ ,  $C_{78}$  και  $C_{80}$  που χρησιμοποιούνται σε ένα πλήθος βιολογικών και ιατρικών εφαρμογών. Έχει παρατηρηθεί ότι τα φουλλερένια έχουν αντι-ιική δράση και είναι επίσης ικανά να διεισδύσουν και να δημιουργήσουν δεσμούς σε καταλυτικές θέσεις μερικών ενζύμων. Για παράδειγμα, αποδείχθηκε ο σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ της πρωτεάσης του HIV (απαραίτητη για την επιβίωση του HIV ιού) και των φουλλερενίων, τα οποία αναστέλλουν τη δράση της πρωτεάσης (Friedman S.H. et al., 1993).

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) εμφανίζονται σε μια μεγάλη ποικιλία με διαφορετικές ιδιότητες. Οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν ικανοποιητικές ηλεκτρικές, μηχανικές και χημικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία πολυμερών, στον ηλεκτρονικό και ενεργειακό τομέα και στην ιατρική (Mueller N.C. and Nowack B., 2008). 15 Οι CNTs έχουν βρεί επίσης και πολλές περιβαλλοντικές εφαρμογές όπως στην εξάλειψη παθογόνων μικροοργανισμών, την απομάκρυνση της οργανικής ύλης και των τοξινών των κυανοβακτηρίων κ.α. (Uradhyayula K.K. et al., 2009).

### 1.2.3 Μεταλλικά νανοσωματίδια

Τα αρχικά υλικά των μεταλλικών νανοϋλικών είναι δισθενή και τρισθενή μεταλλικά ιόντα. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια έχουν διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες από τα πρόδρομα μεταλλικά ιόντα τους (π.χ., χαμηλότερα σημεία

τήξης, υψηλότερες ειδικές επιφάνειες, οπτικές ιδιότητες, μηχανικές αντοχές) (Horikoshi S. and Serpone N., 2013). Οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά τους όπως το μέγεθος, η σταθερότητα, οι φυσικές και οι χημικές ιδιότητες επηρεάζονται από τις πειραματικές συνθήκες σύνθεσης, το είδος και τη διαδικασία προσρόφησης του σταθεροποιητικού υποστρώματος στην επιφάνεια τους, την κινητική του σχηματισμού τους, κ.α.

Αυτή η κατηγορία νανοσωματιδίων περιλαμβάνει πολλά ανόργανα NPs που δημιουργούνται από τα αντίστοιχα μεταλλικά ιόντα (ή και μίγματα αυτών και αναφέρονται ως διμεταλλικά, τριμεταλλικά κλπ). Τα πιο συνήθη και διαδεδομένα είναι τα νανοσωματίδια που προέρχονται από ευγενή μέταλλα (Au, Ag), και μέταλλα μετάπτωσης (Fe, Zn). Τα νανοσωματίδια αυτά βρίσκουν πολλές εφαρμογές στην κατάλυση, στην ανάπτυξη οπτικών αισθητήρων, σε φωτοβολταϊκά πάνελ, στην ιχνηθέτηση βιομορίων, κλπ. Επιπλέον, τα AgNPs έχουν αντιμικροβιακή δράση λόγω της επαφής μεταξύ του πυρήνα Ag και των κυτταρικών τοιχωμάτων που προκαλούν τη διάσπασή τους (Ferreira da Silva B. et al., 2011). ενώ τα νανοσωματίδια του σιδήρου, λόγω των μαγνητικών τους ιδιοτήτων, έχουν χρησιμοποιηθεί για την απορρύπανση υδατικών συστημάτων και την εκχύλιση ανόργανων και οργανικών ενώσεων από υδατικά διαλύματα (Grieger K.D., 2010).

#### **1.2.4 Κβαντικές κουκκίδες (Quantum Dots, QDs)**

Οι κβαντικές κουκκίδες είναι αυτοφθορίζοντες ημιαγώγιμοι νανοκρύσταλλοι με μοναδικές οπτικές ιδιότητες, όπως οξεία και συμμετρικά φάσματα εκπομπής, υψηλή κβαντική απόδοση, ειδικές χημικές ιδιότητες και υψηλή φωτο-σταθερότητα. Τα πιο απλά χημικά συστατικά των QDs είναι δυαδικά μεταλλικά σύμπλοκα, όπως τα CdSe, CdS, CdZn, κλπ, ενώ μπορούν να σχηματιστούν και με συνδυασμό όπως νανοκρύσταλλοι CdSe-ZnS. Οι κβαντικές κουκκίδες χρησιμοποιούνται ευρέως για *in vivo* βιοϊατρική απεικόνιση (Larson D.R. et al., 2003, Bruchez M., et al., 1998, Chan W.C.W. and Nie S. , 1998, Mattoussi H., et al., 2000) ως φθορίζοντες ανιχνευτές σε

οπτικούς (βιο)αισθητήρες, ως υποστρώματα σε ανοσολογικά τεστ, καθώς και άλλες διαγνωστικές εφαρμογές (Lopez-Serrano A. et al., 2013).

#### **1.2.5 Νανοσωματίδια μεταλλικών οξειδίων**

Τα νανοσωματίδια μεταλλικών οξειδίων περιλαμβάνουν μια πληθώρα από νανοδομημένα οξείδια μετάλλων με μεγάλη ποικιλία δομικών γεωμετριών που παρουσιάζουν αγωγή, ημιαγωγή ή μονωτική ηλεκτρονική δομή. Τα νανοσωματίδια των μεταλλικών οξειδίων παρουσιάζουν μοναδικές φυσικές και χημικές ιδιότητες εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους και της μέγιστης πυκνότητας των πλευρικών επιφανειών τους. Έχουν συνήθως συμπαγή και σταθερή δομή με καλά ορισμένη κρυσταλλογραφική επιφάνεια. Όσο μικρότερη είναι η ελεύθερη επιφανειακή ενέργεια των νανοσωματιδίων τόσο μεγαλύτερη σταθερότητα παρουσιάζουν γεγονός που εμφανίζεται και στα νανοσωματίδια μικτών οξειδίων όπως το  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{VO}_x$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  και  $\text{MoO}_x$  (Song et al., 2003).

Τα πιο ευρέως μελετημένα νανοσωματίδια μεταλλικών οξειδίων που αναφέρονται στην βιβλιογραφία είναι τα νανοσωματίδια  $\text{CuO}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{CeO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Τα νανοσωματίδια  $\text{TiO}_2$  και το  $\text{ZnO}$  χρησιμοποιούνται σε μια μεγάλη ποικιλία καταναλωτικών προϊόντων όπως τα καλλυντικά και τα αντηλιακά (Jang H. and Kim S., 2007, Auffan M. et al., 2009, Zhou K. et al., 2006) καθώς και σε εφαρμογές οπτικοηλεκτρονικής, φωτοκατάλυσης καθώς και ως καταλύτες σε διάφορους τύπους οργανικών αντιδράσεων (Song et al., 2003). Τα νανοσωματίδια  $\text{CuO}$  χρησιμοποιούνται ως καταλύτες σε διάφορες διαδικασίες οξείδωσης καθώς και σε φωτοαγωγή και φωτοθερμικά υλικά (Rout C.S. et al., 2007). Τα νανοσωματίδια  $\text{Al}_2\text{O}_3$  έχουν βρεί εμπορικές εφαρμογές στην κατάλυση και σε υγρά μεταφοράς θερμότητας (Cho J. et al., 2006, Ding Y. et al., 2010). Οι ειδικές υπερπαραμαγνητικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου τα έχουν καταστήσει ως ιδανικά υλικά για *in vivo* εφαρμογές όπως είναι η ενίσχυση της αντίθεσης της απεικόνισης στην μαγνητική τομογραφία, η επιδιόρθωση ιστών, η

αποτοξίνωση βιολογικών υγρών, η μεταφορά φαρμάκων κλπ. (Gupta A.K. and Gupta M., 2005).

Τα νανοσωματίδια οξειδίων του μαγνησίου (MgO) χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορους τύπους της χημικής βιομηχανίας ως φίλτρα για τους αέριους ρύπους αλλά και ως καταλύτες σε αντιδράσεις οργανικής σύνθεσης. Τα νανοσωματίδια  $ZrO_2$  χρησιμοποιούνται ως δομικά στοιχεία, ως στερεοί ηλεκτρολύτες, αέριοι αισθητήρες και ως καταλύτες (Song et al., 2003).

### **1.2.6 Νανοσωματίδια Οργανικών πολυμερών**

Τα νανοσωματίδια οργανικών πολυμερών είναι μια ειδική κατηγορία νανοσωματιδίων με εξαιρετική σταθερότητα σε βιολογικά υγρά. Έχει αποδειχθεί ότι τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερικά νανοσωματίδια, με κατάλληλες επιφανειακές τροποποιήσεις, μπορούν να μεταφέρουν φάρμακα από το αίμα στον εγκέφαλο για διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές (Roney C. et al., 2005). Η χρήση τους ως μοριακά εντυπωμένα πολυμερή που έχουν μεγάλη εξειδίκευση για αναγνώριση και χημική προσρόφηση συγκεκριμένων χημικών ενώσεων έχει αποτελέσει την βάση για την ανάπτυξη εφαρμογών στην εκχύλιση στερεάς φάσης, την κατάλυση, την ιατρική, την κλινική ανάλυση και τους αισθητήρες. Με βάση την ιδιότητα τους αυτή έχουν αναπτυχθεί και εξειδικευμένες εφαρμογές όπως για παράδειγμα η δημιουργία τεχνητών αντισωμάτων με βελτιωμένη εκλεκτικότητα και ευαισθησία (Schirhagl R. et al., 2012).

### **1.3 Μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων**

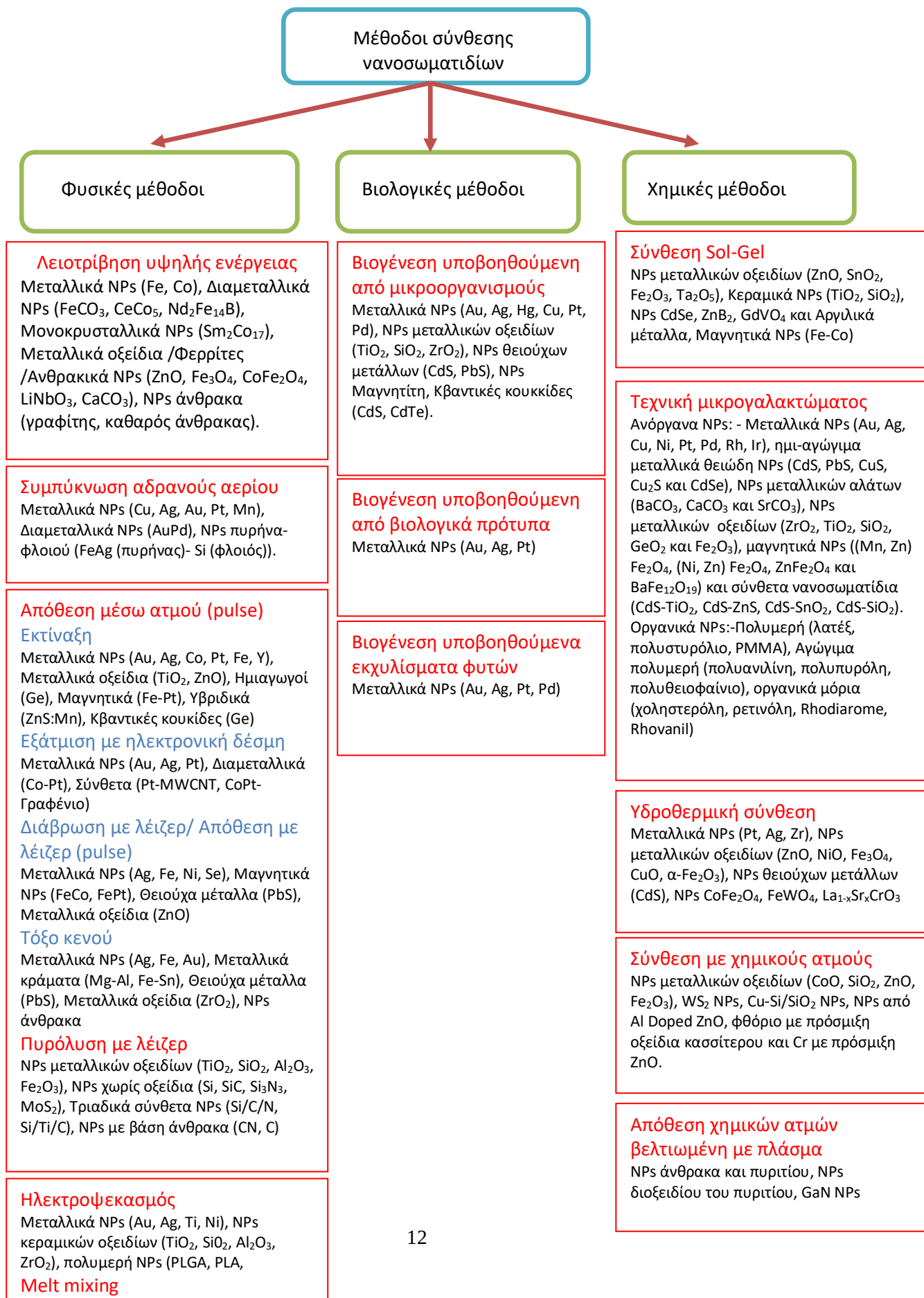
Τα νανοσωματίδια συντίθενται με διάφορες φυσικές, χημικές ή βιολογικές μεθόδους (Σχήμα 1.2) που κατηγοριοποιούνται σε δυο κατηγορίες: εκ των κάτω προς τα άνω (bottom-up) και εκ των άνω προς τα κάτω (top-down) (Πίνακας 1.3). Οι μέθοδοι Bottom-up πραγματοποιούνται με σταδιακή συσσώρευση ατόμων σε

συστάδες και στη συνέχεια στην συγκέντρωση των συστάδων μέχρι του σχηματισμού νανοσωματίδιων (για παράδειγμα οι μέθοδοι sol-gel, περιστροφής, χημικής εναπόθεσης από ατμό, πυρόλυσης, αναγωγής, κ.α.) ενώ οι μέθοδοι top-down πραγματοποιείται με μείωση του μεγέθους ενός αρχικού ογκώδες υλικού σε σωματίδια μεγέθους μερικών νανομέτρων (για παράδειγμα μηχανική άλεση, νανολιθογραφία, διάβρωση με λέιζερ, ο ψεκασμός και η θερμική αποσύνθεση, κ.α.).

**Πίνακας 1.3.** Κατηγοριοποίηση μεθόδων σύνθεσης νανοσωματιδίων.

| Κατηγορία | Μέθοδος                    | Νανοσωματίδια                             |
|-----------|----------------------------|-------------------------------------------|
| Bottom-up | Sol-gel                    | Άνθρακα, μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων |
|           | Περιστροφή                 | Οργανικά πολυμερή                         |
| Bottom-up | Απόθεση μέσω χημικού ατμού | Άνθρακα και μετάλλων                      |
|           | Πυρόλυση                   | Άνθρακα και μεταλλικών οξειδίων           |
|           | Βιοσύνθεση                 | Οργανικά πολυμερή και μετάλλων            |
|           |                            |                                           |
| Top-down  | Μηχανική λειοτρίβηση       | Μετάλλων, οξειδίων και πολυμερή           |
|           | Νανολιθογραφία             | Μετάλλων                                  |
|           | Διάβρωση με λέιζερ         | Άνθρακα και μεταλλικών οξειδίων           |
|           | Εκτίναξη                   | Μετάλλων                                  |
|           | Θερμική διάσπαση           | Άνθρακα και μεταλλικών οξειδίων           |

**Σχήμα 1.2.** Επισκόπηση των μεθόδων σύνθεσης νανοσωματιδίων.



## **1.4 Τεχνικές χαρακτηρισμού νανοϋλικών και νανოსωματιδίων**

Ο χαρακτηρισμός των νανοϋλικών μπορεί να αφορά το μέγεθος, το σχήμα, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (π.χ. επιφανειακό φορτίο, ειδική επιφάνεια, κρυσταλλικότητα, μηχανική αντοχή, ελαστικότητα, υδροφοβικότητα/υδροφιλικότητα, κλπ) καθώς και τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα υλικά. Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται για την μελέτη των χαρακτηριστικών των νανοϋλικών που περιλαμβάνουν φασματοφωτομετρία UV (UV Spectrophotometer), φασματομετρία υπερύθρου μέσω μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy), μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (Atomic Force Microscopy, AFM), ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης (Transmission Electron Microscopy, TEM), σαρωτική ηλεκτρονική μικροσκοπία (Scanning Electron Microscopy, SEM), μαγνητομετρία δονούμενου δείγματος (Vibrating Sample Magnetometer, VSM), υπεραγώγιμη συσκευή κβαντικής παρεμβολής (Superconducting Quantum Interference Device, SQUID), φασματοσκοπία διασποράς ενέργειας με ακτίνες X (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, EDS), φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία με ακτίνες X (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS), μικροσκοπία μαγνητικών δυνάμεων (Magnetic Force Microscopy, MFM), φασματοσκοπία Mossbauer (Mossbauer Spectroscopy, MS), παραμαγνητικός ηλεκτρονικός συντονισμός (Electron Paramagnetic Resonance, EPR) και θερμοσταθμική ανάλυση (Thermo Gravimetric Analysis, TGA) (Galloway J.M. et al., 2015).

### **1.4.1 Προσδιορισμός μορφολογίας επιφανείας, εμβαδού επιφάνειας, μεγέθους και σχήματος νανოსωματιδίων**

Η μορφολογία της επιφάνειας μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας AFM, TEM και FESEM. Οι εικόνες που λαμβάνονται με τη χρήση αυτών των τεχνικών προσδιορίζουν το σχήμα των νανοςωματιδίων το οποίο είναι σφαιρικό, ραβδοειδές

ή πορώδεις. Επίσης, μπορεί να υπολογιστεί και η διάμετρος των νανοσωματιδίων. Σε σύγκριση με το SEM, από το TEM λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση, τη μορφολογία και κρυσταλλικότητα των νανοσωματιδίων. Στο SEM μια δέσμη ηλεκτρονίων αλληλεπιδρά με άτομα του δείγματος και παράγουν διάφορα σήματα. Αυτά τα σήματα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την τοπογραφία της επιφάνειας και τη σύνθεση του δείγματος. Έτσι τουλάχιστον η επιφάνεια των δειγμάτων πρέπει να είναι ηλεκτρικά αγωγίμη. Στα μη αγωγίμα δείγματα, η επιφανειακή επικάλυψη πρέπει να γίνει με εξαιρετικά λεπτό ηλεκτρικά αγωγίμο υλικό. Το AFM έχει τα ίδια αποτελέσματα με SEM και TEM αλλά λειτουργεί μόνο για ξηρά δείγματα. Τα HRTEM, FESEM, XRD χρησιμοποιούνται κυρίως για τον υπολογισμό του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Σε σύγκριση με άλλα μικροσκόπια, το TEM μπορεί να συλλάβει την εικόνα σε υψηλή ανάλυση, επομένως να ληφθούν λεπτομερείς και σαφείς πληροφορίες για τα νανοσωματίδια. Με τη χρήση του οργάνου TEM μπορεί επίσης να επιτευχθεί ο προσανατολισμός του κρυστάλλου, η κατάσταση της συσσωμάτωσης, η δομή των ηλεκτρονίων, η απόσταση του πλέγματος, η μετατόπιση φάσης ηλεκτρονίων, όπως επίσης και ο προσδιορισμός του μεγέθους του νανοσωματιδίου (Chekli L. et al., 2016, Gabbasov R. et al., 2015). Χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία XRD μπορεί να γίνει προσδιορισμός του μεγέθους χρησιμοποιώντας εξίσωση Scherrer. Οι οξείες κορυφές του XRD είναι κατάλληλες για τον καθορισμό του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Αλλά στην περίπτωση των μη κρυσταλλικών νανοσωματιδίων, οι κορυφές XRD είναι ευρείες και δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί το μέγεθος όπως στο TEM. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας το XRD το πολύ μικρό μέγεθος νανοσωματιδίων δεν μπορεί να προσδιοριστεί. Η φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων, η φασματοσκοπία Mossbauer και η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) είναι χρήσιμες για τον υπολογισμό του μέσου μεγέθους σωματιδίων και της κατανομής μεγέθους. Η μέθοδος Brunauer Emmet Teller (BET) είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό του εμβαδού της επιφάνειας των νανοσωματιδίων.

#### **1.4.2 Προσδιορισμός στοιχειακής και ανόργανης σύνθεσης**

Όταν το EDS ενώνεται με τεχνικές SEM και TEM μπορεί να γίνει προσδιορισμός στοιχειακής σύνθεσης μαζί με επιφανειακή μορφολογία. Η φασματοσκοπία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) και η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης (AAA) είναι χρήσιμα για τον στοιχειακό υπολογισμό. Αλλά για τη χρήση φασματοσκοπίας AAA τα στερεά νανοσωματίδια δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα. Πριν από τη χρήση, πρέπει να διαλυτοποιηθούν στα κατάλληλα οξέα ή βάσεις. Ο προσδιορισμός της σύνθεσης του συσσωματωμένου κρυσταλλικού νανοσωματιδίου, καθώς και ο υπολογισμός του ποσοστού της κρυσταλλικότητας και των διαστάσεων του στοιχείου, μπορούν να γίνουν χρησιμοποιώντας XRD (Kubickova S. et al., 2013). Επίσης, το XPS παρέχει πληροφορίες στοιχειακής σύνθεσης.

#### **1.4.3 Προσδιορισμός τύπων δομών και δεσμών σε νανοσωματίδια**

Η δομή και τα δεσμικά χαρακτηριστικά μπορούν να επιτευχθούν χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους. Οι κοινές τεχνικές όπως FT-IR, XPS, TGA, φασματοσκοπία Raman (RS) και φασματοσκοπία απορρόφησης X-ray (XAS) είναι χρήσιμες. Οι δεσμοί μετάλλου-οξυγόνου επιβεβαιώνονται από το FT-IR και XPS. Το XPS είναι επίσης χρήσιμο για την επιφανειακή διαμόρφωση των νανοσωματιδίων. Τα δεδομένα σχετικά με την κατάσταση οξείδωσης, η ενέργεια δέσμευσης των υλικών με τη στοιχειακή σύνθεση μπορεί να καταγραφούν. Η φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δομής και του πλέγματος σπινελίων της ένωσης. Το XAS προσφέρει ευρύ φάσμα πληροφοριών για τις καταστάσεις οξείδωσης, τα γειτονικά άτομα, τον αριθμό συντονισμού, το μήκος δεσμού, τα απαιτούμενα στοιχεία και η ηλεκτρονική διαμόρφωση (Gräfe M. et al., 2014, Harivardhan R.L. et al., 2012).

#### 1.4.4 Προσδιορισμός μαγνητικών ιδιοτήτων των νανოსωματιδίων

Οι τεχνικές EPR, VSM και SQUID είναι χρήσιμες στη διερεύνηση των μαγνητικών ιδιοτήτων των νανოსωματιδίων. Τα παραμαγνητικά κέντρα και οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να ανιχνευθούν με την τεχνική EPR. Τα διαφορετικά δείγματα όπως κρύσταλλα, λεπτές μεμβράνες, σκόνες, υγρά, αέρια μπορούν να διερευνηθούν χρησιμοποιώντας το όργανο SQUID, το οποίο είναι ένα πολύ ευαίσθητο όργανο. Στο σταθερό εφαρμοζόμενο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο μπορεί να προσδιοριστεί το  $H_s$ , ο μαγνητικός κορεσμός, ο υπολειπόμενος μαγνητισμός, χρησιμοποιώντας SQUID και VSM (Graham C.D. et al., 2000, Krzyminiewski R. et al., 2018). Χρησιμοποιώντας, επίσης τη φασματοσκοπία Mossbauer μπορεί να ληφθεί μια σειρά πληροφοριών. Τέλος, μπορούν να ληφθούν πληροφορίες που σχετίζονται με τους δεσμούς, τους δομικούς, τους μαγνητικούς χαρακτήρες, την οξειδωση και τις περιστροφικές καταστάσεις και ηλεκτροαραννητικότητα ομοιοπολικών δεσμών.

Στους Πίνακες 1.4 και 1.5 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τεχνικές χαρακτηρισμού των νανοϋλικών καθώς και οι ιδιότητες που μπορούν να προσδιοριστούν με κάθε τεχνική.

**Πίνακας 1.4** Τεχνικές χαρακτηρισμού των νανοϋλικών και οι ιδιότητες που προσδιορίζονται.

| Τεχνική                                    | Ιδιότητες                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| XRD (τεχνικές X-ray)<br>XAS (EXAFS, XANES) | Κρυσταλλική δομή, σύνθεση, κρυσταλλικό μέγεθος κόκκων<br>Συντελεστής απορρόφησης ακτίνων X (για κάθε στοιχείο) - χημική κατάσταση ειδών, διατομικές αποστάσεις, παράγοντες Debye – Waller, και για μη κρυσταλλικά NPs<br>Μέγεθος σωματιδίων, κατανομή μεγέθους, ανάπτυξη κινητικών |
| SAXS                                       | Ηλεκτρονική δομή, στοιχειακή σύνθεση, καταστάσεις οξειδωσης, δέσμευση υποκαταστάτη (ευαίσθητο στην επιφάνεια)                                                                                                                                                                      |
| XPS                                        | Σύνθεση επιφάνειας, δέσμευση υποκαταστάτη                                                                                                                                                                                                                                          |
| FTIR                                       | Πυκνότητα και διάταξη προσδέτη, ηλεκτρονική δομή πυρήνα, ατομική σύνθεση, επίδραση των υποκαταστάτων στο σχήμα και το μέγεθος NPs                                                                                                                                                  |
| NMR (όλοι οι τύποι)                        | Εμβαδό επιφάνειας                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| BET                                        | Μάζα και σύνθεση σταθεροποιητών                                                                                                                                                                                                                                                    |
| TGA                                        | Πάχος και χημική σύνθεση αυτοσυγκροτούμενων μονοστιβάδων των NPs                                                                                                                                                                                                                   |
| LEIS                                       | Οπτικές ιδιότητες, μέγεθος, συγκέντρωση, κατάσταση συσσωμάτωσης, υποδείξεις για το σχήμα των NPs                                                                                                                                                                                   |
| UV-Vis                                     | Οπτικές ιδιότητες - σχέση με δομικά χαρακτηριστικά όπως ελλείμματα, μέγεθος, σύνθεση                                                                                                                                                                                               |
| Φασματοσκοπία PL                           | Υδροδυναμικό μέγεθος, ανίχνευση συσσωματωμάτων                                                                                                                                                                                                                                     |

|                               |                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DLS                           | Μέγεθος NPs και κατανομή μεγέθους                                                                                                                                                                                                            |
| NTA                           | Μέγεθος NPs και κατανομή μεγέθους                                                                                                                                                                                                            |
| DCS                           | Στοιχειακή σύνθεση, μέγεθος, κατανομή μεγέθους, συγκέντρωση NPs                                                                                                                                                                              |
| ICP-MS                        | Χημικές πληροφορίες σε λειτουργική ομάδα, μοριακός προσανατολισμός και διαμόρφωση, τοπογραφία επιφάνειας, MALDI για μέγεθος NPs                                                                                                              |
| SIMS, ToF-SIMS, MALDI         | Κορεσμός μαγνητισμού, απόσταση μαγνητισμού, θερμοκρασία αποκλεισμού                                                                                                                                                                          |
| SQUID-nanoSQUID               | Παρόμοια με τη SQUID μέσω γραφημάτων M – H και καμπύλες ZFC-FC                                                                                                                                                                               |
| VSM                           | Κατάσταση οξειδωσης, συμμετρία, περιστροφές επιφάνειας, μαγνητική σειρά ατόμων Fe, μαγνητική ανισοτροπία, θερμική απεμπλοκή, διάκριση μεταξύ οξειδίων σιδήρου                                                                                |
| Mössbauer                     | Μέγεθος NPs, κατανομή μεγέθους, σχήμα, κρυσταλλογραφική ατέλεια, σύνθεση επιφάνειας, τιμές M, μαγνητική ανισοτροπική σταθερά, πεδίο απομαγνητισμού                                                                                           |
| FMR                           | Συμμετρία θέσης και μαγνητικές ροπές μεταβατικών ιόντων σε σιδηρο- και σιδηρομαγνητικά υλικά, ειδικά στοιχεία                                                                                                                                |
| XMCD                          | Ιδιότητες πυρήνα, υδροδυναμική κατανομή μεγέθους, ανίχνευση και εντοπισμός υπερπαραμαγνητικών NPs                                                                                                                                            |
| TEM (τεχνικές μικροσκοπίας)   | Μέγεθος NPs, μέγεθος μονοδιασποράς, σχήμα, κατάσταση συσσωμάτωσης, ανίχνευση και εντοπισμός ποσοτικοποίηση των NPs στις μήτρες, μελέτη ανάπτυξης κινητικών                                                                                   |
| HRTEM                         | Όλες οι πληροφορίες από συμβατική TEM αλλά και για την κρυσταλλική δομή απλών σωματιδίων. Διακρίνει μονοκρυσταλλικά, πολυκρυσταλλικά και άμορφα NPs. Μελέτη ελαττωμάτων                                                                      |
| Liquid TEM                    | Απεικόνιση της ανάπτυξης NPs σε πραγματικό χρόνο, μελέτη του μηχανισμού ανάπτυξης, κίνηση απλού μορίου, σχηματισμός υπερπλέγματος                                                                                                            |
| Cryo-TEM                      | Μελέτη σύνθετων μηχανισμών ανάπτυξης, πορείες συσσωμάτωσης, χρήσιμη στη μοριακή βιολογία και την κολλοειδή χημεία για να αποφευχθούν παραπλανητικά αποτελέσματα ή κατεστραμμένα δείγματα                                                     |
| Περίθλαση ηλεκτρονίων         | Κρυσταλλική δομή, παράμετροι δικτυωτού πλέγματος, μελέτη μετασχηματισμού τάξης-διαταραχής, παράμετροι τάξης μεγάλης εμβέλειας                                                                                                                |
| STEM                          | Σε συνδυασμό με τη HAADF, EDX για μελέτη μορφολογίας, κρυσταλλικής δομής, στοιχειακής σύνθεσης. Μελέτη της ατομικής δομής των ετερο-διεπαφών                                                                                                 |
| Διόρθωση εκτροπής (STEM, TEM) | Ατομική δομή των συστάδων NPs, ειδικά των διμεταλλικών, ως συνάρτηση της σύνθεσης, της ομοιογένειας κράματος και του διαχωρισμού φάσης                                                                                                       |
| EELS (EELS-STEM)              | Τύπος και ποσότητα των ατόμων που υπάρχουν, χημική κατάσταση ατόμων, συλλογικές αλληλεπιδράσεις ατόμων με γειτονικά, κύριος όγκος συντονισμού πλασμονίων                                                                                     |
| Ηλεκτρονική τομογραφία        | Ρεαλιστική απεικόνιση τρισδιάστατων σωματιδίων, στιγμιότυπα, βίντεο, ποσοτικές πληροφορίες σε ατομική κλίμακα                                                                                                                                |
| SEM-HRSEM, T-SEM-EDX          | Μορφολογία, διασπορά NPs σε κύτταρα και άλλες μήτρες/υποστρώματα, ακρίβεια σε πλευρικές διαστάσεις των NPs, γρήγορη εξέταση-στοιχειακή σύνθεση                                                                                               |
| EBSD                          | Δομή, προσανατολισμός κρυστάλλων και φάση υλικών σε SEM. Εξέταση μικροδομών, εμφάνιση υφής, ελαττωμάτων, μορφολογία κόκκων, παραμόρφωση                                                                                                      |
| AFM                           | Μέγεθος και σχήμα NPs σε λειτουργία 3D, αξιολόγηση του βαθμού κάλυψης μιας επιφάνειας με μορφολογία NP, διασπορά NPs σε κύτταρα και άλλες μήτρες/υποστρώματα, ακρίβεια στις πλευρικές διαστάσεις των NPs, γρήγορη εξέταση-στοιχειακή σύνθεση |
| MFМ                           | Τυπική απεικόνιση AFM μαζί με τις πληροφορίες των μαγνητικών ροπών των μεμονωμένων NPs. Μελέτη μαγνητικών NPs στο εσωτερικό των κυττάρων. Διάκριση από μη μαγνητικά NPs                                                                      |

**Πίνακας 1.5.** Οι προσδιοριζόμενες παράμετροι και οι αντίστοιχες τεχνικές χαρακτηρισμού.

| Παράμετροι                                                      | Τεχνικές χαρακτηρισμού                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Μέγεθος (δομικές ιδιότητες)                                     | TEM, XRD, DLS, NTA, SAXS, HRTEM, SEM, AFM, EXAFS, FMR, DCS, ICP-MS, UV-Vis, MALDI, NMR, TRPS, EPLS, magnetic susceptibility |
| Σχήμα                                                           | TEM, HRTEM, AFM, EPLS, FMR, 3D-tomography                                                                                   |
| Στοιχειακή-χημική σύνθεση                                       | XRD, XPS, ICP-MS, ICP-OES, SEM-EDX, NMR, MFM, LEIS                                                                          |
| Κρυσταλλική δομή                                                | XRD, EXAFS, HRTEM, electron diffraction, STEM                                                                               |
| Κατανομή μεγέθους                                               | DCS, DLS, SAXS, NTA, ICP-MS, FMR, superparamagnetic relaxometry, DTA, TRPS, SEM                                             |
| Χημική κατάσταση - κατάσταση οξείδωσης                          | XAS, EELS, XPS, Mössbauer                                                                                                   |
| Κινητική ανάπτυξης                                              | SAXS, NMR, TEM, cryo-TEM, liquid-TEM                                                                                        |
| Σύνδεση                                                         |                                                                                                                             |
| υποκαταστάτη/σύνθεση/πυκνότητα/διάταξη/μάζα, σύνθεση επιφάνειας | XPS, FTIR, NMR, SIMS, FMR, TGA, SANS                                                                                        |
| Εμβαδό επιφάνειας, ειδικό εμβαδό επιφάνειας                     | BET, liquid NMR                                                                                                             |
| Επιφανειακή φόρτιση                                             | Zeta potential, EPM                                                                                                         |
| Συγκέντρωση                                                     | ICP-MS, UV-Vis, RMM-MEMS, PTA, DCS, TRPS                                                                                    |
| Κατάσταση συσσωμάτωσης                                          | Zeta potential, DLS, DCS, UV-Vis, SEM, Cryo-TEM, TEM                                                                        |
| Πυκνότητα                                                       | DCS, RMM-MEMS                                                                                                               |
| Ιδιότητες μεμονωμένων σωματιδίων                                | Sp-ICP-MS, MFM, HRTEM, liquid TEM                                                                                           |
| 3D απεικόνιση                                                   | 3D-tomography, AFM, SEM                                                                                                     |
| Διασπορά NPs σε μήτρες/υποστρώματα                              | SEM, AFM, TEM                                                                                                               |
| Δομικές ατέλειες                                                | HRTEM, EBSD                                                                                                                 |
| Ανίχνευση NPs                                                   | TEM, SEM, STEM, EBSD, magnetic susceptibility                                                                               |
| Οπτικές ιδιότητες                                               | UV-Vis-NIR, PL, EELS-STEM                                                                                                   |
| Μαγνητικές ιδιότητες                                            | SQUID, VSM, Mössbauer, MFM, FMR, XMCD, magnetic susceptibility                                                              |

Οι σημαντικότερες ιδιότητες διαφόρων νανοϋλικών συνοψίζονται στον Πίνακα 1.6.

**Πίνακας 1.6.** Φυσικές και χημικές ιδιότητες διαφόρων νανοσωματιδίων.

| Νανοσωματίδια                            | Ιδιότητες                                                                                                 | Αναφορά                             |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Νανοσωματίδια άνθρακα</b>             |                                                                                                           |                                     |
| Φουλλερένια                              | Ασφαλής και αδρανής, ημιαγωγός, αγωγός και υπεραγωγός, μεταδίδει φως με βάση την ένταση                   | Tenne R., 2002                      |
| Γραφένιο                                 | Υψηλή αντοχή, θερμική, ηλεκτρική αγωγιμότητα, απορρόφηση φωτός                                            | Huang X. et al., 2010               |
| Νανοσωλήνες άνθρακα (CNT)                | Υψηλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, αντοχή σε εφελκυσμό, εύκαμπτο και ελαστικό                       | Volder M.F. L. et al., 2013         |
| Νανοϊνες άνθρακα                         | Υψηλές θερμικές, ηλεκτρικές, θωράκιση συχνότητας και μηχανικές ιδιότητες                                  |                                     |
| Μαύρος άνθρακας                          | Υψηλή αντοχή και ηλεκτρική αγωγιμότητα, εμβασμό επιφάνειας ανθεκτικός σε αποσύνθεση από UV                | Fawole O. G. et al., 2016           |
| <b>Μεταλλικά νανοσωματίδια</b>           |                                                                                                           |                                     |
| Αργίλιο                                  | Υψηλή αντιδραστικότητα, ευαίσθητο στην υγρασία, τη θερμότητα και το ηλιακό φως, μεγάλο εμβασμό επιφάνειας | Geetha P. Et al., 2016              |
| Σίδηρος                                  | Δραστικό και ασταθές, ευαίσθητο στον αέρα (οξυγόνο) και στο νερό                                          | Harshiny M. et al., 2015            |
| Άργυρος                                  | Απορροφά και διασκορπίζει φως, σταθερό, αντιβακτηριδιακό, απολυμαντικό                                    | Hulteen J.C. et al., 1999           |
| Χρυσός                                   | Διαδραστικό με ορατό φως                                                                                  | Syed B. et al., 2016                |
| Κοβάλτιο                                 | Ασταθές, μαγνητικό, τοξικό, απορροφά μικροκύματα                                                          | Bau V.M. et al., 2016               |
| Κάδμιο                                   | Ημιαγωγός ηλεκτρικής ενέργειας, αδιάλυτο                                                                  | Osuntokun J. and Ajibade P.A., 2016 |
| Μόλυβδος                                 | Υψηλή τοξικότητα, δραστικό, πολύ σταθερό                                                                  | Tysczuk-rotko K. et al., 2016       |
| Χαλκός                                   | Πολύ υψηλή θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα, πολύ εύφλεκτα στερεά                                        | Ryu C. et al., 2016                 |
| Ψευδάργυρος                              | Αντιβακτηριδιακό, αντιδιαβρωτικό, αντιμυκητιακό, φίλτρο UV                                                | Bogutska K.I. et al., 2013          |
| <b>Νανοσωματίδια μεταλλικών οξειδίων</b> |                                                                                                           |                                     |
| Οξείδιο τιτανίου                         | Μεγάλο εμβασμό επιφάνειας, μαγνητικό, αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων                                   | Laad M. and Jatti V.K.S., 2016      |

|                     |                                                                                                         |                               |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Οξείδιο σιδήρου     | Δραστικό και ασταθές                                                                                    | Ruales-Ionfat C. et al., 2015 |
| Μαγνητίτης          | Μαγνητικό, εξαιρετικά δραστικό                                                                          | Carlos L. et al., 2013        |
| Διοξείδιο πυριτίου  | Σταθερό, λιγότερο τοξικό, ικανό να λειτουργήσει πολλά μόρια                                             | Kaynar Ü.H. et al., 2016      |
| Οξείδιο ψευδάργυρου | Αντιβακτηριδιακό, αντιδιαβρωτικό, αντιμυκητιακό και φίλτρο UV                                           | Bajpai S.K. et al., 2016      |
| Οξείδιο δημητρίου   | Αντιοξειδωτικό, χαμηλό δυναμικό αναγωγής                                                                | Kim S. and Chung B.H., 2016   |
| Οξείδιο αργιλίου    | Αυξημένη δραστικότητα, ευαίσθητο στην υγρασία, τη θερμότητα και το ηλιακό φως, μεγάλο εμβαδό επιφάνειας | Munuswamy D.B. et al., 2015   |

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>**

### **ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**

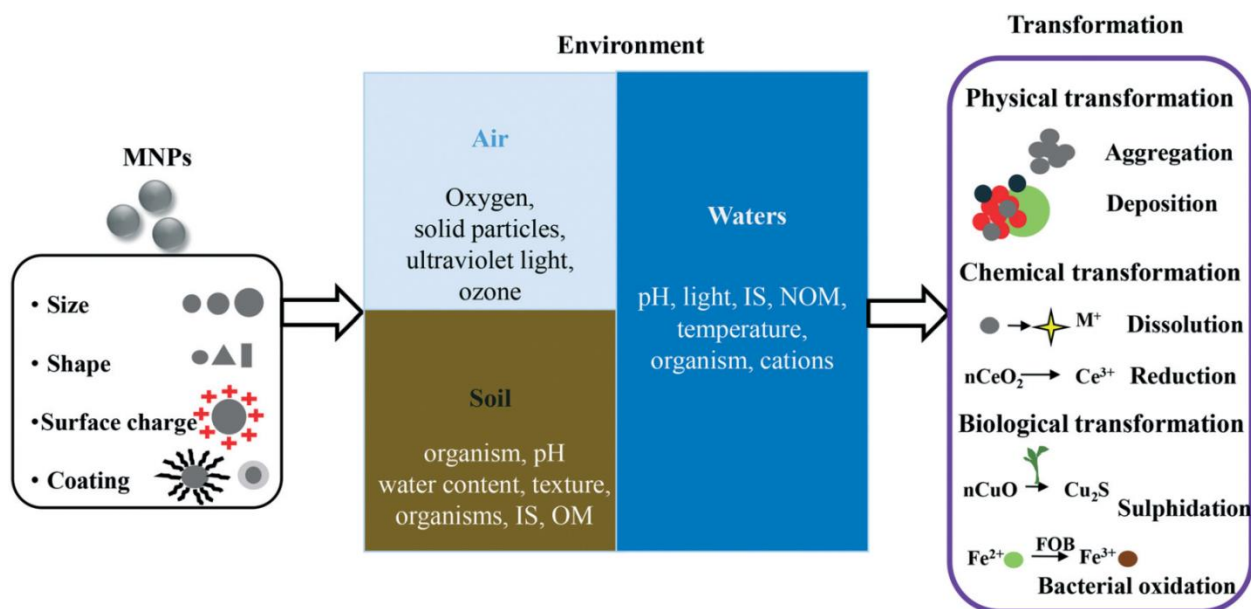
#### **2.1. Εισαγωγή**

Η έκθεση του φυσικού περιβάλλοντος στα νανοσωματίδια ενδέχεται να συμβεί σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής τους: παραγωγή πρώτων υλών, μεταφορά και αποθήκευση, βιομηχανική χρήση (συμπεριλαμβανομένης της επεξεργασίας ή/και του εμπορίου), κατανάλωση, διάθεση αποβλήτων (συμπεριλαμβανομένης της επεξεργασίας αποβλήτων, της υγειονομικής ταφής και της ανάκτησης) (European Commission TGD on Risk Assessment).

Η τύχη και η συμπεριφορά των νανοσωματιδίων, που απελευθερώνονται στο περιβάλλον από ανθρωπογενείς δραστηριότητες καθορίζεται από την κινητικότητά τους στα διάφορα μέσα (δηλ. το έδαφος, το νερό, τον αέρα), καθώς και από τη δυνατότητά τους να βιοαποικοδομούνται ή να υποβάλλονται σε χημικό μετασχηματισμό.

#### **2.2. Μετασχηματισμός των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον**

Έχει αποδειχθεί ότι μόλις τα νανοσωματίδια απελευθερωθούν στο περιβάλλον, υποβάλλονται σε μια σειρά φυσικών, χημικών και βιολογικών μετασχηματισμών. Στο Σχήμα 2.1 παρουσιάζονται οι βασικοί περιβαλλοντικοί μετασχηματισμοί των νανοσωματιδίων, οι οποίοι και αναλύονται ακολούθως για τα τρία κύρια περιβαλλοντικά υποστρώματα: αέρας, έδαφος και νερό.



**Σχήμα 2.1.** Μετασχηματισμοί νανοσωματιδίων στο περιβάλλον. Τα νανοσωματίδια μπορεί να υποστούν φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς μετασχηματισμούς στον αέρα, στα εδάφη και στο υδάτινο περιβάλλον. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, μαζί με περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθορίζουν τον τύπο των διαδικασιών μετασχηματισμού (Zhang J. et al., 2018).

### 2.2.1 Μετασχηματισμοί νανοσωματιδίων στον αέρα

Παρόλο που η έκθεση σε νανοσωματίδια μέσω εισπνοής μπορεί να οδηγήσει σε αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία (Erbis S. et al., 2016, Xia T. et al., 2009), τα αερομεταφερόμενα νανοσωματίδια δεν θεωρούνται ακόμη ανησυχητικά για τη δημόσια υγεία. Ωστόσο, η υψηλή κινητικότητα τους και η προσβασιμότητα στους ανθρώπους συνεπάγουν την επείγουσα διερεύνηση της συμπεριφοράς των αερομεταφερόμενων νανοσωματιδίων στο περιβάλλον και τις επακόλουθες βιολογικές τους επιπτώσεις.

Τα νανοσωματίδια στην ατμόσφαιρα προέρχονται κυρίως από ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως η σύνθεση-παραγωγή, η μεταφορά και η απόρριψη των σχετικών εμπορικών προϊόντων τους (Debia M. et al., 2016). Μετά την απελευθέρωση στην ατμόσφαιρα, τα αερολυματοποιημένα νανοσωματίδια τείνουν να συσσωματώνονται (Ding Y. et al., 2017, Yamada M. et al., 2015) ή να υποβάλλονται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, εξαρτώμενες σε μεγάλο βαθμό από τις ιδιότητες των πρωτογενών (μητρικών) υλικών. Για παράδειγμα, η

αερομεταφερόμενη νανοαλουμίνα ( $\text{nAl}_2\text{O}_3$ ) με μέγεθος σωματιδίων από 27 έως 56 nm, αφού εξατμιστεί επί ξηρού, θα μπορούσε να σχηματίσει συσσωματώματα με ονομαστικό μέγεθος 200 nm (Tsai S.J. et al., 2010). Ο σίδηρος μηδενικού σθένους (NZVI) έχει την τάση να μετατρέπεται σε σωματίδια οξειδίου του σιδήρου λόγω της υψηλής του δραστηριότητας. Επιπλέον, αερομεταφερόμενα βακτήρια που οξειδώνουν το σίδηρο θα μπορούσαν να επιταχύνουν τη διάβρωση του σιδήρου μηδενικού σθένους, μετατρέποντας το  $\text{Fe}^{2+}$  σε  $\text{Fe}^{3+}$  (Lei C. et al., 2018).

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες στον αέρα, τα αιωρούμενα σωματίδια, το υπεριώδες (UV) φως, το οξυγόνο, το όζον και άλλα οξειδωτικά (π.χ. υδροξύλια, νιτρικές ρίζες και όξινα αέρια), επηρεάζουν τις ατμοσφαιρικές διαδικασίες μετασχηματισμού (Tiwari A.J. and Marr L.C., 2010). Για παράδειγμα, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι λειτουργικές χημικές ομάδες σε σωματίδια διαμέτρου  $\leq 2,5 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ) θα μπορούσαν να προσροφήσουν νανοσωματίδια  $\text{nTiO}_2$  και  $\text{nZnO}$ , προκαλώντας αλλαγές στο μέγεθος των νανοσωματιδίων, στο επιφανειακό τους φορτίο και στη λειτουργικότητά τους. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι τα νανοσωματίδια μπορούν να υποβληθούν σε φωτόλυση στην ατμόσφαιρα. Για παράδειγμα, όταν λεπτές μεμβράνες χιτοζάνης που περιείχαν άλατα του χρυσού ακτινοβολήθηκαν στιγμιαία με υπεριώδες φως σε υγρό αέρα και σε θερμοκρασία δωματίου, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός AuNPs διαμέτρου 10nm στην επιφάνεια της μεμβράνης (Miyama T. and Yonezawa Y., 2004).

### **2.2.2 Μετασχηματισμοί νανοσωματιδίων στο έδαφος**

Τα νανοσωματίδια μπορούν να απελευθερωθούν στο έδαφος άμεσα ή έμμεσα (Gladkova M. and Terekhova V., 2013). Εκτός από τις εγγενείς ιδιότητες των νανοσωματιδίων (Heckmann L.H. et al., 2011), οι μετασχηματισμοί σε εδάφη ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη χημεία του εδαφικού περιβάλλοντος (δηλ. τα συστατικά και τα χαρακτηριστικά του εδάφους), όπως η περιεκτικότητα σε νερό, η υφή, οι οργανισμοί, η ιοντική ισχύς, η οργανική ύλη, η θερμοκρασία και το pH (Kabata-Pendias A., 2004, Navarro E. et al., 2008, Santiago-Martín A.D. et al., 2016).

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες στα εδάφη μπορούν να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα τις διαδικασίες της ρόφησης, συσσωμάτωσης και διαλυτοποίησης των νανοσωματιδίων (Cornelis G. et al., 2011, Milani N. et al., 2012, Milani N. et al., 2015). Η τροποποίηση του επιφανειακού φορτίου και της επιφάνειας των νανοσωματιδίων είναι συχνό φαινόμενο στο έδαφος που επηρεάζει έμμεσα τον μετασχηματισμό τους (Tourinho P.S. et al., 2012). Για παράδειγμα, ο σχηματισμός συμπλοκών μεταξύ νανοσωματιδίων Au και διαλυμένης οργανικής ύλης μετά την επώαση διαλυμένης οργανικής ύλης σε εναιώρημα νανοσωματιδίων Au 4 και 18 nm ελαχιστοποιεί τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων Au (Glenn J.B. and Klaine S.J., 2013). Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και για νανο-ξείδια μετάλλων όπως ο nZnO (Jiang X. et al., 2012). Έχει επίσης αναφερθεί ότι το κλάσμα αργίλου (φυσικό κολλοειδές), διευκολύνει την κατακράτηση των νανοσωματιδίων CeO<sub>2</sub> στα εδάφη, σχηματίζοντας συσσωματώματα μεγαλύτερου μεγέθους, ενώ η φυσική οργανική ύλη προάγει τη φυτοδιαθεσιμότητα των νανοσωματιδίων CeO<sub>2</sub> (Layet C. et al., 2017).

Το pH, η περιεκτικότητα σε νερό, τα αργιλοπηριτικά ορυκτά και οι μικροοργανισμοί, επηρεάζουν τη διαλυτοποίηση των νανοσωματιδίων προάγοντας την απελευθέρωση των ελεύθερων πρόδρομων ιόντων τους (Benoit R. et al., 2013, Cornelis G. et al., 2012, Li L.-Z. et al., 2011, Navarro E. et al., 2008). Για παράδειγμα, η αύξηση του ρυθμού διαλυτοποίησης θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα τα νανοσωματίδια ZnO να είναι περισσότερο επικίνδυνα σε όξινα εδάφη λόγω της απελευθέρωσης ιοντικού Zn<sup>2+</sup> (Waalewijn-Kool P.L. et al., 2013). Επιπλέον, οι βιολογικοί μετασχηματισμοί των νανοσωματιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της τύχης τους σε χερσαία περιβάλλοντα. Έχει αναφερθεί, για παράδειγμα, ότι τα *Geobacter sulfurucens* μπορούν να ανάγουν τον Ag(I) και να καταβυθίζουν εξωκυτταρικά τον Ag(0) (Law N. et al., 2008).

### 2.2.3 Μετασχηματισμοί νανοσωματιδίων στο υδάτινο περιβάλλον

Τα υδάτινα συστήματα είναι ο κύριος αποδέκτης των νανοσωματιδίων. Οι μετασχηματισμοί στο υδάτινο περιβάλλον περιλαμβάνουν διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές διαδικασίες, όπως η συσσωμάτωση, η προσρόφηση, η διαλυτοποίηση, η σουλφωνίωση και οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Εκτός από τις πρωταρχικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων (He Y.T. et al., 2008), αυτές οι διαδικασίες βασίζονται επίσης σε μεγάλο βαθμό στη χημεία του νερού (Amde M. et al., 2017). Επιπλέον, το φως, η ιοντική ισχύς, η διαλυμένη οργανική ύλη, η θερμοκρασία και το pH επηρεάζουν τις διαδικασίες μετασχηματισμού στο νερό (Odzak N. et al., 2017, Yin Y. et al., 2015, Zou X. et al., 2017).

Η συσσωμάτωση αυξάνει το μέγεθος των νανοσωματιδίων και μειώνει τη συγκέντρωσή τους στο διάλυμα, το οποίο θα μπορούσε να επιταχύνει την εναπόθεση τους στα ιζήματα (Quik J.T.K. et al., 2012). Πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία συσσωμάτωσης και τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων σε υδάτινα συστήματα. Για παράδειγμα, η αλλαγή της ιοντικής ισχύος και της τιμής του pH του υδατικού διαλύματος επηρεάζει το επιφανειακό τους φορτίο και κατά συνέπεια την συσσωμάτωση τους ενώ η ύπαρξη φυσικής οργανικής ύλης που προσκολλάται στην επιφάνεια των σωματιδίων μειώνει την συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων στην υδατική φάση (Chen G. et al., 2012, Peng Y.H. et al., 2017).

Οι μοναδικές ιδιότητες, η μεγάλη επιφάνεια και η δραστηριότητα των νανοσωματιδίων, μαζί με τις περίπλοκες συνθήκες στο υδάτινο περιβάλλον, προκαλούν στα νανοσωματίδια διάφορους χημικούς μετασχηματισμούς. Οι αντιδράσεις διαλυτοποίησης και οξειδοαναγωγής είναι οι πιο κοινές χημικές διεργασίες. Η διαλυτοποίηση των νανοσωματιδίων εξαρτάται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (π.χ. μέγεθος, σχήμα και επιφανειακή χημεία) (Soenen S.J. et al., 2015) και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. pH, φυσική οργανική ύλη, ιοντική

ισχύς, θερμοκρασία και φως) (Odzak N. et al., 2017, Wang Z. et al., 2016). Η έκταση της διαλυτοποίησης έχει μεγάλη επίδραση στη μεταφορά, τη διανομή και τη βιοδιαθεσιμότητα τους. Από την άλλη πλευρά, οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μπορούν, να επηρεάσουν τη διαλυτοποίηση και τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων. Έχει αναφερθεί ότι σε υδάτινα περιβάλλοντα, μπορούν να προκληθούν φωτοκαταλυθείσες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στα νανοσωματίδια  $MnO_2$ , προκαλώντας τη διαλυτοποίηση τους ή τη δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species) (Marafatto F.F. et al., 2015). Επιπλέον, βιολογικοί μετασχηματισμοί επηρεάζουν την μορφή και τη βιοδιαθεσιμότητα τους. Για παράδειγμα, ανιχνεύθηκαν  $Cu_2S$  και άλλα είδη  $Cu$  σε φυτικούς ιστούς όπου υπήρχαν προηγουμένως νανοσωματίδια οξειδίου του χαλκού ( $nCuO$ ), παρέχοντας ενδείξεις για τον βιολογικό μετασχηματισμό τους σε  $nCuO$  (Zhao J. et al., 2017).

## **2.3 Ιδιότητες των νανοσωματιδίων και τοξικότητα**

Οι πιο σημαντικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων που σχετίζονται με την τοξική τους δράση σε ζωντανούς οργανισμούς αναφέρονται ακολούθως.

### **2.3.1 Μέγεθος**

Καθώς το μέγεθος των νανοσωματιδίων μειώνεται, η αναλογία της επιφάνειας προς τον όγκο αυξάνεται εκθετικά, το οποίο καθιστά τα NPs πιο δραστικά και τοξικά. Επιπλέον, με μείωση του μεγέθους, αυξάνεται η ικανότητά τους να εισχωρούν σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς. Νανοσωματίδια με μέγεθος μικρότερο από 100 nm μπορούν να εισέρχονται στα κύτταρα διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη ενώ νανοσωματίδια με μέγεθος μικρότερο από 35 nm μπορούν να εισχωρούν στον αιμοτοεγκεφαλικό φραγμό και σε πυρήνες κυττάρων (Oberdörster G. et al., 2004, Dawson K.A. et al., 2009).

### **2.3.2 Σχήμα**

Το σχήμα των νανοσωματιδίων συμβάλλει επίσης στις τοξικές τους επιδράσεις. Υπολογισμοί έδειξαν ότι το σχήμα και το φορτίο των νανοσωματιδίων μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία μετακίνησης μέσω των κυτταρικών μεμβρανών έως 60 τάξεις μεγέθους (Nangia S. and Sureshkumar R., 2012). Για νανοσωματίδια ιδίου μεγέθους και επιφάνειας το σχήμα αποτελεί τη σημαντικότερη ιδιότητα για την αξιολόγηση της τοξικότητας τους. Οι νανοράβδοι ZnO προκαλούν περισσότερη τοξικότητα στο επιθήλιο του πνεύμονα στα ανθρώπινα κύτταρα (A549) από τα σφαιρικά νανοσωματίδια ZnO (Hsiao I.-L. and Huang Y.-J., 2011). Ομοίως, τα σφαιρικά AuNPs έδειξαν ότι έχουν πιο τοξική δράση από τα ραβδοειδή κάτι το οποίο αποδόθηκε στην ταχεία απελευθέρωση περισσότερων λειτουργικών μορίων από τη σφαιρική επιφάνεια κατά την κυτταρική αλληλεπίδραση σε σχέση με την ραβδοειδή επιφάνεια (Tarantola M. et al., 2011).

### **2.3.3 Φύση των νανοσωματιδίων**

Η φύση των νανοσωματιδίων είναι επίσης ένας από τους βασικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην τοξικότητα τους. Για παράδειγμα σε μια σειρά δοκιμών μέτρησης τοξικότητας βρέθηκε ότι τα AgNPs είναι πιο τοξικά από τα νανοσωματίδια CeO<sub>2</sub> (Gaiser B.K. et al., 2012). Οι τοξικές επιδράσεις διαφόρων νανοσωματιδίων αναφέρονται στον Πίνακα 2.1.

**Πίνακας 2.1.** Ενδεικτικές τοξικές επιδράσεις και επιπτώσεις νανοσωματιδίων.

| Νανοσωματίδια                                                         | Σημαντικοί βιολογικοί προσδιορισμοί                                                                                      | Μέσο                                            | Σημαντικά ευρήματα                                                                                                                                                                                                                                              | Αναφορά                         |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| AgNPs και AgNO <sub>3</sub>                                           | 1. LC50<br>2. Αξιολόγηση φαρμακευτικής δράσης<br>3. Αξιολόγηση σχηματισμού ROS<br>4. Εκτίμηση ζημιάς του οξειδωτικού DNA | Νηματώδη, <i>Caenorhabditis elegans</i>         | 1. Τα AgNPs και ο AgNO <sub>3</sub> έχουν ίδια τοξικότητα.<br>2. Τα επικαλυμμένα με PVP AgNPs έχουν χαμηλότερη τοξικότητα αλλά εξαρτάται από το μέγεθος. Τα μικρότερα είναι πιο τοξικά.<br>3. AgNPs και ο AgNO <sub>3</sub> προκαλούν οξειδωτική ζημιά στο DNA. | (Ahn J.-M. et al., 2014)        |
| CuO, ZnO και Ag-TiO <sub>2</sub> NPs                                  | Εκκόλαψη                                                                                                                 | <i>Labeo rohita</i>                             | Υψηλότερη εκκόλαψη στα νανοσωματίδια CuO και ZnO ενώ χαμηλότερη στα Ag-TiO <sub>2</sub>                                                                                                                                                                         | (Swain P. et al., 2014)         |
| Κατιονικά και ανιονικά NPs πολυστυρένιου                              | Παραγωγή ROS από DCFH-DA                                                                                                 | Μακροφάγα κύτταρα NR8383                        | 1. Υψηλότερη κυτταροτοξικότητα των κατιονικών PSNPs λόγω σχηματισμού ROS.<br>2. Πιο εμφανής επίδραση με σωματίδια μικρού μεγέθους.<br>3. Τόσο αρνητικά όσο και θετικά φορτισμένα PSNPs αύξησαν την τραχύτητα της κυτταρικής μεμβράνης.                          | (Bhattacharjee S. et al., 2014) |
| Ασθενή συσσωματωμένα CuO NPs                                          | Αντιβακτηριδιακή αξιολόγηση                                                                                              | <i>E. coli</i>                                  | Η τοξικότητα επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το pH, τη συγκέντρωση NPs και τη συγκέντρωση βακτηριδίων.                                                                                                                                                          | (Rispoli F. et al., 2010)       |
| NPs φερρίτη κοβαλτίου                                                 | Μικροφυσιομετρία                                                                                                         | Καλλιέργειες ινοβλαστών                         | 1. Παρατηρήθηκαν κυτταροτοξικές επιδράσεις.<br>2. Η μικροφυσιομετρία είναι μια καλή μέθοδος για τον προσδιορισμό της τοξικότητας των νανοσωματιδίων.                                                                                                            | (Mariani V. et al., 2012)       |
| COOH, απλά και τροποποιημένα με NH <sub>2</sub> υπερπαραμαγνητικά NPs | 1. Αξιολόγηση MTT<br>2. Ανάλυση μικροσυστοιχιών DNA                                                                      | Ανθρώπινη καρδιά, εγκέφαλος και νεφρικά κύτταρα | 1. Η τοξικότητα εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων.<br>2. Τα απλά σωματίδια προκάλεσαν μεγαλύτερη τοξικότητα από τα επικαλυμμένα.                                                                                                                              | (Mahmoudi et al., 2011)         |

### **2.3.4 Σταθερότητα**

Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων στα βιολογικά συστήματα εξαρτάται από τη φύση, το μέγεθος και τη συγκέντρωσή τους. Στο pH των βιολογικών συστημάτων, το μεγαλύτερο μέρος των ανόργανων και οργανικών νανοσωματιδίων καθίστανται διαλυτά. Στην περίπτωση των νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων, η συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων αυξάνεται εντός των κυττάρων προκαλώντας σημαντική καταπόνηση της κυτταρικής λειτουργίας.

### **2.3.5 Χημική επιφανειακή επικάλυψη και φορτίο**

Οι χημικές τροποποιήσεις των νανοσωματιδίων αλλάζουν σημαντικά τον τρόπο δράσης τους σε βιολογικά συστήματα. Τροποποιημένα νανοσωματίδια Au με κατιονικές αλυσίδες εμφάνισαν μέτρια τοξικότητα ενώ νανοσωματίδια Au τροποποιημένα με ανιονικές ομάδες δεν εμφάνισαν τοξική δράση (Goodman C.M. et al., 2004). Μη επικαλυμμένα νανοσωματίδια Ag και νανοσωματίδια Ag επικαλυμμένα με τρεις διαφορετικές τροποποιήσεις, εκτέθηκαν σε διάφορα είδη βακίλλων και τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση στην τοξικότητα ως συνάρτηση της επιφανειακής επικάλυψης (El Badawy A.M. et al., 2011).

## **2.4 Επίδραση των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον**

### **2.4.1 Επιπτώσεις των νανοσωματιδίων στο υδάτινο περιβάλλον**

Το υδάτινο περιβάλλον είναι πιο επιρρεπές σε ρύπανση με νανοσωματίδια κυρίως λόγω της χρήσης των καταναλωτικών προϊόντων όπως αντηλιακά και καλλυντικά που περιέχουν νανοσωματίδια όπως  $\text{TiO}_2$  (Poron A.P. et al., 2005). Τα νανοσωματίδια είναι τοξικά για τα υδρόβια ζώα όπως τα ψάρια ή τα φυτιά *Daphnia Magna* καθώς και για μονοκύτταρους οργανισμούς (Nowack B. and Bucheli T.D., 2007). Η ευαισθησία στην τοξικότητα για υδρόβια ζώα ποικίλλει από είδος σε είδος (Griffitt R.J. et al., 2008) με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η

ακριβής τοξική επίδραση των νανοσωματιδίων στο υδάτινο περιβάλλον. Εκτός από το μέγεθος των νανοσωματιδίων, η βιοσυμβατότητα των νανοσωματιδίων με τον οργανισμό εξαρτάται από το επιφανειακό φορτίο και τη χημική τους δραστηριότητα (Oberdörster E., 2004). Τα μικρά σωματίδια λόγω του μεγάλου εμβαδού της επιφάνειας μπορεί να δημιουργήσουν δραστικές μορφές οξυγόνου που είναι πολύ βλαβερές και καταστρέφουν τις πρωτεΐνες, το DNA και τις μεμβράνες (Reijnders L. 2006, Brown D.M. et al., 2001).

Η έκθεση φυκών, δελφινιών και ψαριών-ζέβρα (zebrafish) σε νανοσωματίδια νικελίου, χαλκού, αργύρου και αργιλίου είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικής επίδρασης σε αυτούς τους οργανισμούς (Griffitt R.J. et al., 2008). Δεν παρατηρήθηκε όμως τοξικότητα όταν έμβρυα zebrafish εκτέθηκαν σε πυριτικά νανοσωματίδια (Fent K. et al., 2010) ενώ αντίθετα τα νανοσωματίδια Ag βρέθηκαν εξαιρετικά θανατηφόρα (Bar-Ilan O. et al., 2009). Η ανάλυση του ηπατικού ιστού του zebrafish μετά από έκθεση σε νανοσωματίδια Ag έδειξε κυτταρικές αλλαγές συμπεριλαμβανομένων αποπτωτικών αλλαγών. Επιπροσθέτως, αυξήθηκε το συνολικό επίπεδο γλουταθειόνης και η μηλονική διαλδεΰδη που είναι υποπροϊόν της υπεροξειδωσής των κυτταρικών λιπιδίων. Τα νανοσωματίδια Ag προκάλεσαν επίσης καταστροφή του DNA (Choi J.E. et al., 2010). Η βραχυπρόθεσμη έκθεση του zebrafish σε νανοσωματίδια  $\text{TiO}_2$  έχει πολύ μικρή τοξική επίδραση ενώ η μακροχρόνια έκθεση οδηγεί σε σοβαρή βλάβη διαφορετικών οργάνων. Τα βράγχια, το συκώτι, ο εγκέφαλος και η ανάπτυξη επηρεάζονται λόγω της μακροχρόνιας έκθεσης (Chen J. et al., 2011). Οξεία και χρόνια τοξικότητα παρατηρήθηκε στο *D. magna* όταν εκτέθηκε για μικρό και μεγάλο χρονικό διάστημα αντίστοιχα σε νανοσωματίδια  $\text{TiO}_2$ . Επιπλέον, παρατηρήθηκε υψηλή θνησιμότητα και χαμηλοί ρυθμοί ανάπτυξης λόγω αναπαραγωγικών προβλημάτων (Wiench K. et al., 2009, Zhu X. et al., 2010). Τα *D. magna*, παρουσίασαν σημαντική καθυστέρηση στην παραγωγή γόνων όταν εκτέθηκαν σε υδατοδιαλυτό φουλλερένιο για 21 ημέρες (Oberdörster E. et al., 2006). Τα νανοσωματίδια  $\text{CuO}$  και  $\text{TiO}_2$  έχει βρεθεί ότι είναι πολύ τοξικά για τα φύκια ενώ λιγότερο τοξικό είναι το  $\text{ZnO}$  (Aruoja V. et al., 2009).

#### 2.4.2 Επιπτώσεις των νανοσωματιδίων στο έδαφος

Τα νανοσωματίδια Ag σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις είχαν πολύ χαμηλές τοξικές επιδράσεις στην ενζυματική δραστηριότητα του εδάφους (Peyrot C. et al., 2014). Στα σκουλήκια *Lumbricus rubellus* η επίδραση των νανοσωματιδίων Ag στον ρυθμό ανάπτυξης και τον πληθυσμό τους εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους. Όταν εκτεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις νανοσωματίδια Ag για μεγάλο χρονικό διάστημα, μηδενίζεται η αύξηση του πληθυσμού τους. Τα νανοσωματίδια Ag επηρεάζουν επίσης τα ανοσοκύτταρα σε γαιοσκώληκες (Van der Ploeg M.J.C. et al., 2014) ενώ προκάλεσαν τοξικότητα στα βακτήρια του εδάφους *Bacillus cereus* και *Pseudomonas stutzeri*. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν επιδράσεις σε συγκέντρωση  $5 \text{ mg L}^{-1}$  σε περίοδο έκθεσης 48 ωρών (Fajardo C. et al., 2014). Ομοίως, τα νανοσωματίδια ZnO παρουσίασαν δυσμενείς επιπτώσεις στη γονιμότητα των σκουληκιών (García-Gómez C. et al., 2014). Τα άλατα ZnO και  $\text{ZnCl}_2$  παρουσίασαν τις ίδιες χρόνιες τοξικές επιδράσεις στην ανάπτυξη, τη γονιμότητα και τη συσσώρευση σε *D. magna* (Adam N. et al., 2014). Τα νανοσωματίδια Cs βρέθηκαν να επηρεάζουν την κινητική απονιτροποίησης σε δείγματα εδάφους και αυτή η διαδικασία απονιτροποίησης έδειξε να εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων, τη συγκέντρωση και το εξεταζόμενο είδος (Dahle J.T. and Arai Y., 2014). Σε μια άλλη μελέτη εκτιμήθηκε η τοξικότητα τριών διαφορετικών μεγεθών νανοσωματιδίων  $\text{CeO}_2$  στους τομείς της αναπαραγωγής, της συσσώρευσης, της επιβίωσης και στην ιστοπαθολογία του γαιοσκώληκα *Eisenia fetida*. Η μελέτη αποκάλυψε ότι η μακροχρόνια έκθεση μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ιστοπαθολογικές διαταραχές (Lahive E. et al., 2014).

Στο Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται ενδεικτικά μελέτες τοξικότητας των νανοσωματιδίων σε διάφορους ζωντανούς οργανισμούς (συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου) (Zhang J. et al., 2018).

**Πίνακας 2.2.** Επιδράσεις μετασχηματισμού στην τοξικότητα που προκαλείται από νανοσωματίδια.

| MNPs                                                         | Οργανισμοί                                  | Επίδραση τοξικότητας                                                                                                                      | Αναφορά                                              |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Τοξικότητα στους οργανισμούς του αέρα και του εδάφους</b> |                                             |                                                                                                                                           |                                                      |
| nZnO και nTiO <sub>2</sub>                                   | Αρνητικά και θετικά κατά Gram βακτήρια      | Ενισχυμένη τοξικότητα                                                                                                                     | Baysal A. et al., 2018                               |
| nTiO <sub>2</sub>                                            | <i>Lumbricus terrestris</i>                 | Ενισχυμένη απόπτωση                                                                                                                       | Lapied E. et al., 2011                               |
| nZnO                                                         | Corn ( <i>Zea mays</i> )                    | Μείωση της αναγωγής της βιομάζας και φθορά του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος                                                       | Zhao L.J. et al., 2013                               |
| AgNPs                                                        | Alfalfa                                     | Τροποποιημένη διανομή                                                                                                                     | Stegemeier J.P. et al., 2015                         |
| <b>Τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς</b>                |                                             |                                                                                                                                           |                                                      |
| AgNPs                                                        | Βακτήρια                                    | Μειωμένη τοξικότητα (μειωμένη ζώνη αναστολής)                                                                                             | Korshed P. et al., 2018                              |
| MNPs                                                         | Βακτήρια                                    | Μειωμένη αντιβακτηριακή δραστηριότητα                                                                                                     | Wang Z.Y. et al., 2016                               |
| AgNPs                                                        | Βακτήρια                                    | Αυξημένη βακτηριακή θνησιμότητα                                                                                                           | Sheng Z.Y. and Liu Y., 2017, Zhang C.Q. et al., 2016 |
| NZVI                                                         | Φύκη ( <i>Chlorella vulgaris</i> )          | Μειωμένα αποτελέσματα αναστολής της ανάπτυξης                                                                                             | Lei C. et al., 2016                                  |
| nZnO                                                         | Φύκη ( <i>Scenedesmus obliquus</i> )        | Αλλαγές στη βιωσιμότητα των κυττάρων                                                                                                      | Bhuvaneshwari M. et al., 2015                        |
| nZnO                                                         | Φύκη ( <i>Chlorella vulgaris</i> )          | Υψηλότερη τοξικότητα σε φύκη που κατεργαστήκαν με nZnO για 30 ημέρες                                                                      | Zhang H. et al., 2016                                |
| AgNPs                                                        | <i>Tetrahymena pyriformis</i>               | Αλλαγές στη βιωσιμότητα των κυττάρων                                                                                                      | Zou X.Y. et al., 2014                                |
| nTiO <sub>2</sub> and AgNPs                                  | Έμβρυα zebrafish                            | Αύξηση του ποσοστού θνησιμότητας, ελαττώματα στη μορφολογία και αναπτυξιακές διαταραχές και μείωση της εκκόλαψης και του καρδιακού ρυθμού | Chia S.L. et al., 2015                               |
| AgNPs                                                        | <i>Daphnia magna</i>                        | Μείωση μέσης συγκέντρωσης θνησιμότητας 8 ωρών                                                                                             | Zhang Z. et al., 2015                                |
| AgNPs                                                        | <i>Danio rerio</i> και <i>Daphnia magna</i> | Μειωμένη θνησιμότητα                                                                                                                      | Bone A.J. et al., 2012                               |
| <b>Αναπτυξιακή και γενετική τοξικότητα</b>                   |                                             |                                                                                                                                           |                                                      |
| AgNPs                                                        | Κύτταρα A549                                | Μείωση κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας                                                                                             | Ma Y. et al., 2014                                   |
| AgNPs                                                        | <i>Caenorhabditis elegans</i>               | Υψηλότερος μέσος αριθμός                                                                                                                  | Starnes D.L. et al., 2015                            |

|                                   |                                                               |                                                                                  |                                                    |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| απογόνων ανά ενήλικα              |                                                               |                                                                                  |                                                    |
| nTiO <sub>2</sub>                 | Ανάπτυξη ανηλίκων <i>Daphnia magna</i>                        | Χαμηλότερη σε EC50                                                               | Rosenfeldt R.R. et al., 2014                       |
| CuNPs                             | Νεογνά <i>Daphnia magna</i>                                   | Αυξημένη θνησιμότητα                                                             | Xiao Y. et al., 2016                               |
| <b>Κυτταροτοξικότητα in vitro</b> |                                                               |                                                                                  |                                                    |
| ZnO νανοσκόνη                     | Ανθρώπινα αδενοκαρκινικά κύτταρα επιθηλιακού πνεύμονα (H1650) | Απενεργοποίηση ενζύμων επιδιόρθωσης DNA και μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων | Jones P. et al., 2013                              |
| AuNPs                             | Μακροφάγα ποντικού RAW 264.7                                  | Διαφορική κυτταρική αναγνώριση και πρόσληψη                                      | Saha K. et al., 2016                               |
| AuNPs                             | Ανθρώπινα κύτταρα νεφρού και ενδοθηλιακά κύτταρα              | Αλλαγές στις κυτταρικές διαδρομές                                                | Chandran P. et al., 2017, Ortega M.T. et al., 2017 |
| AgNPs                             | Κύτταρα CaCo-2                                                | Αλλαγές στη βιωσιμότητα των κυττάρων, τη μορφολογία και απελευθέρωση κυτοκίνης   | Kaiser J.P. et al., 2017                           |
| nZnO                              | Κύτταρα λευχαιμίας Jurkat                                     | Αλλαγές στη βιωσιμότητα των κυττάρων                                             | Eixenberger J.E. et al., 2017                      |

## 2.5 Νομοθεσία

Διάφοροι κυβερνητικοί οργανισμοί έχουν θεσπίσει κανονισμούς με στόχο την ελαχιστοποίηση ή την αποφυγή των κινδύνων που σχετίζονται με τα νανοϋλικά (Nano-particles in baby formula, 2016). Ωστόσο, δεν υπάρχει συγκεκριμένος διεθνής κανονισμός, ούτε συμφωνήθηκαν διεθνή πρωτόκολλα ή νομικοί ορισμοί για την παραγωγή, τον χειρισμό ή την επισήμανση, την δοκιμή τοξικότητας και την αξιολόγηση του περιβαλλοντικού αντίκτυπου των νανοσωματιδίων.

Επί του παρόντος, οι ΗΠΑ και η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) έχουν ισχυρούς κανονιστικούς φορείς και κατευθυντήρια νομοθεσία για τον έλεγχο των πιθανών κινδύνων των νανουλικών. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή ο όρος νανοϋλικό σημαίνει "ένα φυσικό, τυχαίο ή κατασκευασμένο υλικό που περιέχει σωματίδια, σε ελεύθερη κατάσταση ή ως συσσωμάτωμα, και όπου το 50% ή περισσότερα σωματίδια στην κατανομή μεγέθους αριθμού, σε μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις κυμαίνονται από 1 nm έως 100 nm". Επιπλέον, η ΕΕ έχει συστήσει την Επιστημονική Επιτροπή σχετικά με τους αναδυόμενους και τους πρόσφατα αναγνωρισμένους κινδύνους για την υγεία (SCENIHR), για την εκτίμηση των

κινδύνων που σχετίζονται με νανοϋλικά (SCENIHR, 2009). Το 2013, ο κανονισμός 1223/2009 της ΕΕ για τα καλλυντικά αντικαταστάθηκε από την οδηγία 76/768 /ΕΟΚ. Ο κανονισμός ορίζει τον όρο νανοϋλικό ως «Ένα αδιάλυτο ή βιο-ανθεκτικό και σκόπιμα κατασκευασμένο υλικό με μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις ή εσωτερική δομή στην περιοχή από 1 έως 100 nm που περιλαμβάνει τεχνητά φουλερένια, νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος και φύλλα γραφενίου». Τα καλλυντικά εφαρμόζουν κανονισμούς και εποπτεία από την Ομοσπονδία Τροφίμων, Φαρμάκων και Καλλυντικών της USFDA (FFDCA), το Συμβούλιο Προϊόντων Προσωπικής Φροντίδας (PCPC), το Εθελοντικό Πρόγραμμα Εγγραφής Καλλυντικών (VCRP), την Ευρωπαϊκή Πύλη Κοινοποίησης Καλλυντικών Προϊόντων (CPNP), την REACH, την Επιστημονική Επιτροπή Ασφάλειας των Καταναλωτών (SCCS) και τη Διεθνούς Συνεργασίας Κανονισμών για τα Καλλυντικά (ICCR). Αυτοί οι κανονισμοί από τις ΗΠΑ και την ΕΕ, καθώς και από άλλες χώρες όπως η Ιαπωνία και ο Καναδάς, αποκαλύπτουν ότι η νανοτοξικότητα μέσω καλλυντικών αποτελεί σημαντική ανησυχία τόσο για τους επιστημονικούς υπεύθυνους όσο και για τη βιομηχανία που παράγει καταναλωτικά προϊόντα (Ajazzuddin M. et al., 2015, Johnson V.R., 2016). Στις ΗΠΑ, ρυθμιστικοί φορείς όπως η Διοίκηση Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), ο Οργανισμός της Προστασίας Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (USEPA) και το Ινστιτούτο Προτύπων Τροφίμων και Γεωργίας (IFAS) έχουν ξεκινήσει πρωτόκολλα για την αντιμετώπιση των πιθανών κινδύνων των νανοϋλικών και των νανοπροϊόντων. Από το 2006, η FDA έχει εργαστεί για τον εντοπισμό πηγών νανοϋλικών, εκτιμώντας τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις των νανοϋλικών και τους κινδύνους τους σε ανθρώπους, ζώα και φυτά, και πώς αυτοί οι κίνδυνοι θα μπορούσαν να αποφευχθούν ή να μετριαστούν (Thomas T. et al., 2006).

Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) και η Διοίκηση Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (USFDA) βοηθά στη ρύθμιση της ιατρικής χρήσης νανοϋλικών. Η διεθνής έκδοση με τίτλο «Αρχές για την επίβλεψη των νανοτεχνολογιών και των νανοϋλικών» απαιτεί μια ισχυρή και ολοκληρωμένη εποπτεία των προϊόντων που παράγονται με ή από νανοϋλικά. Ομοίως, η αναφορά Προτάσεων Πολιτικής Νανοϋλικών καλύπτει τρόπους αποφυγής ή μείωσης του κινδύνου των νανοϋλικών σε βιομηχανίες που σχετίζονται με τρόφιμα. Αυτή η αναφορά επίσης συμβουλεύει τις εταιρείες να υιοθετήσουν μια λεπτομερή δημόσια

πολιτική για τη χρήση των νανοϋλικών, τη δημοσίευση αναλύσεων ασφαλείας των νανοϋλικών, την ανακοίνωση των προμηθευτών, την επισήμανση των νανοσωματιδίων κάτω από 50 nm ενώ υιοθέτησε και μια προσέγγιση ελέγχου κινδύνου για την αποτροπή της έκθεσης σε νανοσωματίδια (Nanomaterial fact sheet, 2015). Οι προμηθευτές βιολογικών προϊόντων συμπεριλαμβανομένου του UK Soil Association (Soil Association, 2008), των αγροτών βιολογικών προϊόντων της Αυστραλίας (Nanotechnology prohibited, 2012) και του Συμβουλίου Γενικών Προτύπων του Καναδά (Roseboro K., 2010) έχουν ήδη απαγορεύσει τη χρήση νανοσωματιδίων στα τρόφιμα.



## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη νέων μεθόδων ανάλυσης νανοσωματιδίων σε περιβαλλοντικά δείγματα καθώς οι υπάρχουσες μέθοδοι απαιτούν εξειδικευμένο και ακριβό εξοπλισμό (π.χ. single-element ICP-MS) καθώς και πολύπλοκες και χρονοβόρες διαδικασίες εκχύλισης, χωρίς παρόλα αυτά να επιτυγχάνουν, σε πολλές περιπτώσεις επαρκή ευαισθησία για την ανάλυση ιχνοποσοτήτων μεταλλικών νανοσωματιδίων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Παράλληλα σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη μιας μεθόδου διαδοχικής (βαθμωτής) εκχύλισης των νανοσωματιδίων από στερεά δείγματα, επιτρέποντας την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών και των φαινομένων που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον.

### ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΧΡΥΣΟΥ ΚΑΙ ΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΑΙΩΡΟΥΜΕΝΑ ΥΠΕΡΜΟΡΙΑΚΑ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΘΕΡΜΙΚΗ ΑΤΟΜΟΠΟΙΗΣΗ

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται μια νέα μέθοδος για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό των νανοσωματιδίων του χρυσού (AuNPs) και αργύρου (AgNPs) σε περιβαλλοντικά δείγματα μέσω μικροεκχύλισης σε υπερμοριακά συσσωματώματα και φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση. Η μέθοδος βασίζεται στη εκχύλιση των νανοσωματιδίων σε ένα υπερμοριακό συσσωμάτωμα που σχηματίζεται μέσω σύζευξης ιόντων μεταξύ ενός κατιονικού επιφανειοδραστικού και ενός παραγώγου του βενζολοσουλφονικού οξέος. Τα νανοσωματίδια εγκλωβίζονται στο υπερμοριακό συσσωμάτωμα το οποίο διαχωρίζεται από το υδατικό διάλυμα με διήθηση υπό κενό στην επιφάνεια ενός φίλτρου κυτταρίνης υπό τη μορφή λεπτού υμενίου (μεμβράνης). Η μεμβράνη αφαιρείται από την επιφάνεια του φίλτρου και διαλυτοποιείται σε οξιניσμένο μεθανολικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται για ανάλυση. Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, τα AuNPs μπορούν να εκχυλιστούν αποτελεσματικά από δείγματα νερού με ανακτήσεις που κυμαίνονται από 81,0 έως 93,3%, ακρίβεια 5,4-12,0% και όρια ανίχνευσης χαμηλότερα από 75 femtomol L<sup>-1</sup> χρησιμοποιώντας μόνο 20 mL όγκου δείγματος. Σε ότι αφορά τα AgNPs επετεύχθησαν ανακτήσεις μεταξύ 70-96% (ως σχετικές ανακτήσεις), ακρίβεια (επαναληψιμότητα) από 3,1 έως 6,8% και όριο ανίχνευσης ίσο με 280 femtomol L<sup>-1</sup>.

## 1.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, οι μοναδικές ιδιότητες των μεταλλικών νανοσωματιδίων οδήγησαν στην εκθετική αύξηση της παραγωγής και της χρήσης τους σε μια ποικιλία προϊόντων και εφαρμογών στη βιομηχανία, την ιατρική, την τεχνολογία των τροφίμων, την επεξεργασία νερού και λυμάτων κ.λπ. (Lim J. and Majetich S.A., 2013, Ren S. and Wang Y., 2012, Singh S. et al., 2011, Sozer N. and Kokini J.L., 2009). Ως εκ τούτου, η απελευθέρωση των μεταλλικών νανοσωματιδίων στο περιβάλλον και οι οικοτοξικολογικοί κίνδυνοι που συνδέονται με την εμφάνισή τους σε περιβαλλοντικά δείγματα, τυγχάνουν όλο και περισσότερο αυξημένης προσοχής (Maurer-Jones A.M. et al., 2013, Schaumann G.E. et al., 2015).

Προκειμένου να καταστεί δυνατή η ρεαλιστική εκτίμηση της επικινδυνότητας των μεταλλικών νανοσωματιδίων στο περιβάλλον, απαιτούνται διεξοδικές επιστημονικές μελέτες σχετικά με την ύπαρξη και την τύχη τους σε περιβαλλοντικά συστήματα. Για να πραγματοποιηθούν τέτοιες μελέτες, απαιτούνται και οι κατάλληλες αναλυτικές μέθοδοι. Οι κλασικές τεχνικές χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία, η κλασματοποίηση πεδίου ροής, η χρωματογραφία διαχωρισμού μεγεθών (υδροδυναμική, αποκλεισμός μεγέθους, κατ' αντιρροής) (Liu J.-F. et al., 2012, Silva B.F. et al., 2011) δεν είναι κατάλληλες για ποσοτικούς προσδιορισμούς, λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητας και της πολυμορφίας των περιβαλλοντικών υποστρωμάτων και των ανεπαρκών ορίων ανίχνευσης. Ο συνδυασμός αυτών των τεχνικών με πιο ευαίσθητους ανιχνευτές (π.χ. ICP-MS) ξεπερνά αυτά τα προβλήματα, αλλά η χρήση των συνδυασμένων μεθόδων απαιτεί εξειδικευμένους χειριστές και εξελιγμένο εξοπλισμό, καθιστώντας τη ανάλυση χρονοβόρα και δαπανηρή.

Για να αντιμετωπιστούν αυτοί οι περιορισμοί, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού και εκχύλισης των νανοσωματιδίων που μπορούν να μετριάσουν τις επιδράσεις της μήτρας και να προσυγκεντρώσουν τα νανοσωματίδια εντός της δυναμικής περιοχής μέτρησης των συμβατικών αναλυτικών τεχνικών. Οι πρώτες μέθοδοι που αναπτύχθηκαν για την εκχύλιση και τον εμπλουτισμό των νανοσωματιδίων βασίστηκαν στις αρχές της

υγρής-υγρής εκχύλισης (Majedi S.M. et al., 2013, Myakonkaya O., Guibert C., et al., 2010, Myakonkaya O., Hu Z., et al., 2010, Wilson O.M. et al., 2004) και της εκχύλισης στερεής φάσης (Li L. et al., 2012, Li L. and Leopold K., 2012). Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι απαιτούσαν σχετικά επίπονες και χρονοβόρες πειραματικές διαδικασίες όπως η παραγωγοποίηση νανοσωματιδίων μέσω ανταλλαγής υποκαταστάτη, η δέσμευση σε ρητίνες ανταλλαγής ιόντων μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών, ο σχηματισμός ζεύγους ιόντων, η ανταλλαγή διαλύτη ή υγρή-υγρή επανεκχύλιση από στερεούς ροφητές. Από την άλλη πλευρά, έχει αποδειχθεί ότι οι μέθοδοι που βασίζονται σε μη ιοντικά επιφανειοδραστικά αιωρήματα συσσωματωμάτων όπως τα μικρογαλακτώματα (Nazar M.F. et al., 2011) και η εκχύλιση του σημείου νεφέλωσης (Hartmann G. et al., 2013, Liu J.-F., Chao J.-B., et al., 2009, Liu J.-F., Liu R., et al., 2009, Tsogas G.Z. et al., 2014) επιτρέπουν την ευκολότερη εκχύλιση και την ανάκτηση νανοσωματιδίων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για την προσυγκέντρωση ποικιλίας νανοσωματιδίων και με διαφορετικές επιφανειακές επικαλύψεις (Hartmann G. et al., 2013, Hartmann G. et al., 2014, Tsogas G.Z. et al., 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεγαλύτερη προσοχή έχει επικεντρωθεί στην εκχύλιση των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs), λόγω της τοξικότητας τόσο των νανοσωματιδίων αργύρου όσο και του ιοντικού  $\text{Ag}^+$ , σε ζωντανούς (μικρο)οργανισμούς. Ωστόσο, η χρήση των AuNPs συνεχώς διευρύνεται και λόγω της υψηλής χημικής τους σταθερότητας τα επίπεδα συγκεντρώσεων τους σε φυσικά ύδατα αναμένεται για να φτάσουν τα επίπεδα των  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Myakonkaya O. et al., 2010). Ως εκ τούτου, τα AuNPs μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως ένας δείκτης για την αξιολόγηση της ύπαρξης νανοσωματιδίων καθώς και της μεταφοράς και της απελευθέρωσης νανοϋλικών στο περιβάλλον.

Μεταξύ των μεθόδων εκχύλισης, οι διαδικασίες μικροεκχύλισης έχουν προελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω των μοναδικών τους πλεονεκτημάτων όπως υψηλή ευελιξία, ευκολία, λειτουργικότητα και ταχύτητα. Μέχρι σήμερα, μια πληθώρα μεθόδων μικροεκχύλισης (υγρής και στερεής φάσης) έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε ένα ευρύ φάσμα αναλυτικών εφαρμογών που περιλαμβάνουν τον διαχωρισμό και την προσυγκέντρωση μεταλλικών ιόντων, και οργανικών ενώσεων (Pawliszyn J., 2012). Παρ' όλα αυτά, η χρήση τους στον εμπλουτισμό και την εκχύλιση νανοσωματιδίων εξακολουθεί να είναι σχετικά

σπάνια. Μέχρι την στιγμή που διεξάγονταν αυτή η έρευνα, είχε δημοσιευθεί μόνο μια μέθοδος μικροεκχύλισης για τον προσδιορισμό νανοσωματιδίων σε περιβαλλοντικά δείγματα, χρησιμοποιώντας χημικά τροποποιημένα μαγνητικά νανοσωματίδια για την μικρο-εκχύλιση στερεής φάσης και τον διαχωρισμό των Au και AuNPs (Su S. et al., 2014).

Στο κεφάλαιο αυτό αναπτύξαμε μια νέα μέθοδο που βασίζεται στην εκχύλιση των νανοσωματιδίων σε αιωρούμενα συσσωμάτωματα (In-situ suspended aggregate microextraction, iSAME) και η οποία έχει εφαρμοστεί από το εργαστήριο μας στον εμπλουτισμό οργανικών ενώσεων από υδατικά δείγματα (Benedé J.L. et al., 2015). Η νέα αυτή μέθοδος, iSAME, βασίζεται στην παγίδευση (εγκλωβισμό) των νανοσωματιδίων σε ένα υπερμοριακό συσσωμάτωμα, που αποτελείται από πολυστρωματικά κυστίδια, τα οποία αυτο-συγκροτούνται επί τόπου στο υδατικό διάλυμα μέσω σχηματισμού ενός ζεύγους ιόντων μεταξύ δύο οργανικών αντισταθμιστικών ιόντων. Το συσσωμάτωμα στη συνέχεια συλλέγεται με διήθηση και διαλύεται σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη για την απελευθέρωση των νανοσωματιδίων. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι ανακτήσεις μεγιστοποιούνται, λόγω της συλλογής της συνολικής ποσότητας της φάσης εκχύλισης όπως και στην περίπτωση της χρήση μικκυλίων (Hartmann G. et al., 2013, Hartmann G. and Schuster M., 2013, Liu J.-F., Chao J.-B., et al., 2009, Liu J.-F., Liu R., et al., 2009, Tsogas G.Z. et al., 2014) ενώ δεν απαιτούνται επιπλέον πειραματικά στάδια όπως αντιδράσεις παραγωγοποίησης ή χημικώς τροποποιημένοι ροφητές.

Βάση αυτής της αρχής, η iSAME εφαρμόστηκε και αξιολογήθηκε για την αποδοτικότητα της στην εκχύλιση νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων (με έμφαση στα AuNPs) από υδατικά διαλύματα. Πολυμερώς σταθεροποιημένα AuNPs χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι που σχετίζονται με αυτή τη νέα προσέγγιση εκχύλισης η οποία εφαρμόζεται απευθείας στα δείγματα νερού χωρίς εξειδικευμένες συσκευές ή νέα υλικά. Η μέθοδος αξιολογήθηκε περαιτέρω με AuNPs διαφορετικών επιφανειακών επικαλύψεων, (δηλ., με πολυβινυλοπυρρολιδόνη, με κυστεΐνη και κιτρικά) και κατανομή μεγέθους (5-40 nm) καθώς και με AgNPs. Χρησιμοποιώντας αυτά τα αποτελέσματα, αποδείξαμε την επιτυχή εφαρμογή της iSAME στην ανάλυση των νανοσωματιδίων

ευγενών μετάλλων σε δείγματα νερού με ικανοποιητικές ανακτήσεις, επαναληψιμότητα και ακρίβεια.

## 1.2. Υλικά και μέθοδοι

### 1.2.1 Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά). Τριένυδρος τετραχλωριούχος χρυσός ( $\geq 99,9\%$ ), βοροϋδρίδιο του νατρίου, κιτρικό νάτριο, πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP<sub>10</sub>, μέσο MW 10.000), σουλφοσαλικυλικό οξύ (SSA), σουλφανλικό οξύ, δινάτριο άλας του 4,5-διυδροξυ-1,3-βενζολοδισουλφονικού οξέος (Tirons), βρωμιούχο τριμεθυλαμμώνιο (CTAB) και νιτρικό οξύ υψηλής καθαρότητας για ανάλυση ανόργανων ιχνών (TraceSELECT Ultra) αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Μεθανόλη HPLC αγοράστηκε από την Fisher Scientific (Loughborough, UK). Νανοσωματίδια TiO<sub>2</sub> (21 nm) σε μορφή πούδρας αποκτήθηκαν από την Degussa (Hanau, Germany) και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία. Υδρόφιλα διηθητικά φίλτρα με διάφορα τεχνικά χαρακτηριστικά αγοράστηκαν από διάφορους προμηθευτές ανάλογα τη διαθεσιμότητα. Λεπτομέρειες σχετικά με τους τύπους των διηθητικών φίλτρων, (προμηθευτής, εμπορική ονομασία και τεχνικά χαρακτηριστικά) παρατίθενται στον Πίνακα 1.1.

**Πίνακας 1.1.** Τεχνικές προδιαγραφές των διηθητικών φίλτρων που εξετάστηκαν.

| Φίλτρο         | Τύπος                             | βάρος (g m <sup>-2</sup> ) | Μέγεθος πόρων (μm) | Πάχος (μm) | Ταχύτητα ροής (sec 100 mL <sup>-1</sup> ) |
|----------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------|------------|-------------------------------------------|
| Millipore AP40 | Γυάλινες ίνες                     | 65                         | 0.7                | 475        | 14.4                                      |
| Whatman No. 1  | Ποιοτικό                          | 87                         | 11                 | 180        | 150                                       |
| Whatman No. 40 | Ποιοτικό, άτεφρο                  | 95                         | 8                  | 210        | 240                                       |
| Whatman No. 41 | Ποιοτικό, άτεφρο                  | 85                         | 20-25              | 220        | 54                                        |
| Whatman No. 43 | Ποιοτικό, άτεφρο                  | 95                         | 16                 | 220        | 155                                       |
| Whatman No. 50 | Ποιοτικό, σκληρό,<br>Χαμηλή τέφρα | 97                         | 2.7                | 115        | 2685                                      |

### 1.2.2 Εξοπλισμός

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων χρυσού χρησιμοποιήθηκε διάταξη φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση Shimadzu AA-6800 (ETAAS) εξοπλισμένη με σύστημα αυτόματης δειγματοληψίας ASC-6100. Χρησιμοποιήθηκε λυχνία κοίλης καθόδου με διόρθωση υποβάθρου με αυτό-αναστροφή της πηγής (Heraeus, Hanau, Γερμανία) που λειτουργεί στα 10,0 mA. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση του θερμοκρασιακού προγράμματος που παρουσιάζεται στον πίνακα 1.2, εισάγοντας 20  $\mu\text{L}$  δείγματος στο γραφικό σωλήνα με τη βοήθεια του αυτόματου δειγματολήπτη. Η ένταση του σήματος μετρήθηκε στα 242,8 nm και επεξεργάστηκε με βάση το ύψος κορυφής. Η βαθμονόμηση της διάταξης εκτελέστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή χρησιμοποιώντας υδατικά πρότυπα διαλύματα ιόντων χρυσού. Η μέθοδος βαθμονόμησης για την ανάλυση των πραγματικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση προτύπων διαλυμάτων AuNP έτσι ώστε η αποτελεσματικότητα εκχύλισης (ανακτήσεις) να συνυπολογίζεται στη εξίσωση βαθμονόμησης ((Hartmann G. and Schuster M., 2013).

**Πίνακας 1.2.** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ET-AAS για τον προσδιορισμό Au μετά από τη μικροεκχύλιση αιωρούμενων υπερμοριακών συσσωματωμάτων.

| Στάδιο      | Θερμοκρασία<br>(°C) | Ramp time (sec) | Hold time (sec) | Ταχύτητα ροής<br>αργού ( L min <sup>-1</sup> ) |
|-------------|---------------------|-----------------|-----------------|------------------------------------------------|
| Ξήρανση 1   | 150                 | 10              | 0               | 1,0                                            |
| Ξήρανση 2   | 250                 | 10              | 0               | 1,0                                            |
| Πυρόλυση    | 500                 | 10              | 13              | 1,0                                            |
| Ατομοποίηση | 1700                | 0               | 4               | 0                                              |
| Καθαρισμός  | 2500                | 1               | 2               | 1,0                                            |

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων αργύρου, τιτανίου και σιδήρου χρησιμοποιήθηκε διάταξη φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης με ατομοποίηση φλόγας Shimadzu AA-6800 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) με

λυχνίες κοίλης καθόδου που λειτουργούσαν στα 10 mA για τον  $\text{Ag}^+$ , 10 mA για το  $\text{Ti}^{4+}$  and 12 mA για τον  $\text{Fe}^{3+}$ . Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα 328.1 nm ( $\text{Ag}^+$ ), 364.3 nm ( $\text{Ti}^{4+}$ ) και 248.3 nm ( $\text{Fe}^{3+}$ ) αντίστοιχα. Η εισαγωγή του υγρού δείγματος γινόταν μέσω τροχοειδούς εκνεφωτή με παροχή ακετυλενίου/αέρα σε ροή 2.2 L/min για τον  $\text{Ag}^+$  και τον  $\text{Fe}^{3+}$ , ενώ για τον προσδιορισμό του  $\text{Ti}^{4+}$  χρησιμοποιήθηκε ακετυλένιο / $\text{N}_2\text{O}$  σε ροή 7.8 L/min.

Σύστημα διήθησης Millipore αποτελούμενο από μια γυάλινη εσφυρισμένη ύαλο διαμέτρου 47 mm χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση του υπερμοριακού συσσωματώματος. Τα φάσματα απορρόφησης UV-vis των διαλυμάτων των AuNPs ελήφθησαν με κυψελίδα χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής 1 cm σε φασματοφωτόμετρο Jenway 6405 UV/VIS. Ένας φούρνος μικροκυμάτων, εξοπλισμένος με δίσκο 6 δειγμάτων και με ισχύ ανατροφοδότησης/ελέγχου στην περιοχή των 200-900W χρησιμοποιήθηκε για την πέψη των εκχυλισμάτων η οποία πραγματοποιήθηκε σε βόμβες τεφλόν Savillex (Eden Prairie, USA) με βιδωτό πώμα.

### 1.2.3 Σύνθεση νανοσωματιδίων Χρυσού (AuNPs)

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων χρυσού βασίστηκε σε καθιερωμένες συνθετικές πορείες που ανακτήθηκαν από τη βιβλιογραφία. AuNPs επικαλυμμένα με κιτρικά ( $\text{CA} @ \text{AuNPs}$ ) συντέθηκαν με αναγωγή του  $\text{AuCl}_4^-$  από  $\text{NaBH}_4$  παρουσία κιτρικού οξέος ως σταθεροποιητή (Karakoglou N.I. et al., 2009). Για τη σύνθεση 20mL αιωρήματος AuNPs, 0,5mL 10,0 mM κιτρικού οξέος και 0,5mL πρότυπου διαλύματος τριένυδρου τετραχλωριούχου χρυσού (10,0 mM) αναμείχθηκαν σε 18,5 mL δισ-απεσταγμένου νερού. Στο μείγμα προστέθηκε άμεσα, και υπό συνεχή ανάδευση, 0,5 ml ενός φρέσκου διαλύματος 0.1 M  $\text{NaBH}_4$ . Το μείγμα αναδεύτηκε για 10 λεπτά και αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι για 24 ώρες πριν τη χρήση του (Hartmann G. and Schuster M., 2013).

AuNPs επικαλυμμένα με  $\text{PVP}_{10}$  ( $\text{PVP}_{10} @ \text{AuNPs}$ ) και AuNPs επικαλυμμένα με κυστεΐνη ( $\text{Cys} @ \text{AuNPs}$ ) παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις πειραματικές πορείες που περιγράφονται στους Hartmann et al., (2014) (Hartmann G. et al., 2014 και αντίστοιχες παραπομπές). Τα  $\text{PVP}_{10} @ \text{AuNPs}$  συντέθηκαν με ανάμιξη 10 mL ενός υδατικού εναιωρήματος  $\text{CA} @ \text{AuNPs}$  με 1,1 mL  $\text{PVP}_{10}$  (0,02 mM σε αποσταγμένο

νερό) και ανάδευση για 20 ώρες. Τα Cys@AuNPs παρασκευάστηκαν με ανάμιξη 10 mL ενός εναιωρήματος CA@AuNPs με 200  $\mu$ L διαλύματος κυστεΐνης (1,0 mM), ανάδευση για 10 λεπτά και ωρίμανση για 24 ώρες στο σκοτάδι. Όλα τα AuNPs αποθηκεύονταν στους 4 °C για μία εβδομάδα.

Το μέσο μέγεθος και η γραμμομοριακή συγκέντρωση των νανοσωματιδίων εκτιμήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που ανέπτυξαν οι Haiss et al., (Haiss W. Et al., 2007) και η οποία βασίζεται στον προσδιορισμό της αναλογίας της έντασης της απορρόφησης των AuNPs στη μέγιστη κορυφή συντονισμού επιφανειακών πλάσμονίων προς την απορρόφηση στα 450 nm, και διαιρώντας την απορρόφηση στα 450 nm με το μοριακό δεκαδικό συντελεστή απόσβεσης σε  $\lambda=450$  nm, αντίστοιχα. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, οι τιμές του μέσου μεγέθους των AuNPs και η γραμμομοριακή τους συγκέντρωση ήταν σύμφωνες με εκείνες που αναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία και εκτιμάται ότι είναι 4nm ( $360 \pm 8$  nmolL<sup>-1</sup>) για CA@AuNPs, 5nm ( $150 \pm 3$  nmolL<sup>-1</sup>) για PVP<sub>10</sub>@AuNPs και 4nm ( $371 \pm 11$  nmolL<sup>-1</sup>) για Cys@AuNPs. Πριν από τη χρήση, τα AuNPs αραιώθηκαν περαιτέρω κατά 100 φορές χρησιμοποιώντας διπλά απεσταγμένο νερό.

#### 1.2.4 Σύνθεση νανοσωματιδίων Αργύρου (AgNPs)

AgNPs επικαλυμμένα με κιτρικά ιόντα (CA@AgNPs, 5 nm) παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην βιβλιογραφία (Karri F.A. et al., 2014) προσθέτοντας διαδοχικά 0,5 mL από διαλύματα AgNO<sub>3</sub>, κιτρικού νατρίου και NaBH<sub>4</sub> (τελικές συγκεντρώσεις 0,25 mM) σε 18,5 mL απεσταγμένου νερού σε σκούροχρωμα φιαλίδια και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. AgNPs τροποποιημένα με PVP10, κυστεΐνη, θειούχα και φωσφορικά ιόντα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται από τους Hartmann et. al. (2014) (Hartmann G. et al., 2014). AgNPs επικαλυμμένα με PVP10 (PVP10 @ AgNPs) παρασκευάστηκαν με ανάμιξη 10 mL ενός υδατικού εναιωρήματος CA@AgNPs με 1,1 mL PVP10 (0,02 mM σε απεσταγμένο νερό) και ανάδευση για 20 ώρες. Τα AgNPs επικαλυμμένα με κυστεΐνη παρασκευάστηκαν με ανάμιξη 10 mL ενός εναιωρήματος CA@ AgNPs με 200  $\mu$ L διαλύματος κυστεΐνης (1.0 mM), ανάδευση για 10 λεπτά και παραμονή στο σκοτάδι για 24 ώρες. Για τη σύνθεση των AgNPs επικαλυμμένων με σουλφίδια

(Ag<sub>2</sub>S @ AgNPs), 10 mL ενός υδατικού εναιωρήματος CA@AgNPs αναμίχθηκαν με 200  $\mu$ L Na<sub>2</sub>S (0.01 M) για 3 ώρες. Προκειμένου να παρασκευαστούν νανοσωματίδια φωσφορικού αργύρου (Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>@AgNPs), αναμίχθηκαν 15 mL AgNO<sub>3</sub> (0,02 M) με 15 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,02 M) και αναδεύθηκαν για 10 λεπτά. Όλα τα εναιωρήματα νανοσωματιδίων αργύρου αποθηκεύτηκαν στους 4 °C σε σκουρόχρωμα φιαλίδια.

#### **1.2.5 Παρασκευή διαλυμάτων νανοσωματιδίων τιτανίου (nTiO<sub>2</sub>) και υδρόφοβων μαγνητικών νανοσωματιδίων (oleic acid @CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).**

Τα νανο-TiO<sub>2</sub> διασκορπίστηκαν σε νερό υπό έντονη ανάμειξη. Αμέσως πριν τη δειγματοληψία, το μείγμα επαναιωρήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 5 λεπτά. Μαγνητικά νανοσωματίδια κοβαλτίου-σιδήρου με επικάλυψη ελαϊκού οξέος (ελαϊκό οξύ @ CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) παρασκευάστηκαν με αλκαλική υδρόλυση αλάτων τρισθενούς σιδήρου και κοβαλτίου και ανάμειξη με ελαϊκό οξύ σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην βιβλιογραφία (Benede J.L. et al., 2014). Το υλικό αλέστηκε σε λεπτή σκόνη σε ένα σφαιρόμυλο και η επιθυμητή ποσότητα αιωρήθηκε σε απεσταγμένο νερό με έντονη ανάμειξη. Πριν από τη δειγματοληψία, τα νανοσωματίδια του ελαϊκού οξέος @CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> επαναιωρήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 5 λεπτά.

Για όλα τα νανοσωματίδια, η συγκέντρωση του προδρόμου μεταλλικού ιόντος (Ag<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup> και Ti<sup>4+</sup>) στο τελικό εναιώρημα προσδιορίστηκε με AAS μετά από διαλυτοποίηση ενός δεδομένου όγκου του αιωρήματος νανοσωματιδίων ( $\eta = 5$ ) με βασιλικό ύδωρ υψηλής καθαρότητας (TraceSelect® Ultra HCl και HNO<sub>3</sub>).

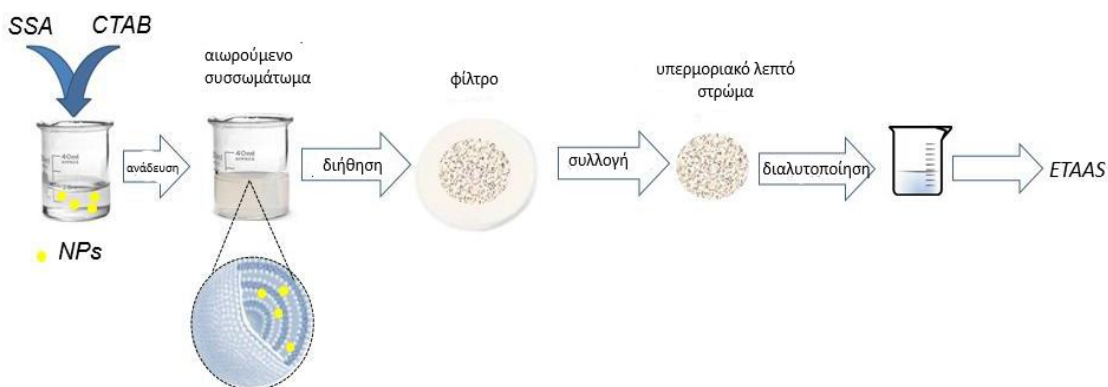
#### **1.2.6 Πραγματικά δείγματα**

Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν πραγματικά δείγματα νερού που ελήφθησαν από το τοπικό δίκτυο διανομής νερού της πόλης των Ιωαννίνων (νερό βρύσης), τον ποταμό Λούρο (ΒΔ Ελλάδα), τη λίμνη Παμβώτιδα (Ιωάννινα, Ελλάδα) και τα επεξεργασμένα υγρά αστικά απόβλητα από την μονάδα επεξεργασίας υγρών αστικών λυμάτων των

Ιωαννίνων (Ελλάδα). Τα δείγματα διηθήθηκαν μέσω 0,45  $\mu\text{m}$  για την απομάκρυνση της σωματιδιακής ύλης και φυλάχθηκαν στους 4 °C μέχρι την χρήση τους.

### 1.2.7 Πειραματική πορεία

Η πειραματική πορεία για την εκχύλιση των δειγμάτων νερού παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.1. Σε 20 mL υδατικού δείγματος, προστέθηκαν 5.0 mL  $\text{NaNO}_3$  για τη ρύθμιση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Στη συνέχεια προστέθηκαν διαδοχικά τα αντιδραστήρια ζεύγους ιόντων (SSA και CTAB) σε τελική συγκέντρωση 5,0 mM SSA (7,5 mM στα πραγματικά δείγματα) και 0,5 mM CTAB. Το μίγμα κατόπιν αναδεύτηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της ανάδευσης, η διαπερατότητα του διαλύματος αυξάνονταν σταδιακά δηλώνοντας έτσι το σχηματισμό της υπερμοριακής φάσης. Έπειτα, το μίγμα εναποτέθηκε στη διάταξη εκχύλισης και διηθήθηκε υπό κενό (400 mbar) μέσω φίλτρου εστέρα κυτταρίνης (Millipore, S-PAK 0,45  $\mu\text{m}$ ). Το συσσωμάτωμα συλλέχθηκε στην επιφάνεια του φίλτρου με τη μορφή λεπτού υμενίου (πάχος  $\leq 0.1\text{mm}$ ) και αφέθηκε να ξηρανθεί σε συνθήκες περιβάλλοντος. Μετά την ξήρανση, το υμένιο (μεμβράνη) αφαιρέθηκε από την επιφάνεια του φίλτρου και διαλύθηκε σε όξινο μεθανολικό διάλυμα αποτελούμενο από μεθανόλη:  $\text{HNO}_3$  (9,6 M). Όγκος 20  $\mu\text{L}$  από το εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση.



**Σχήμα 1.1.** Γραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας για την *in-situ* μικροεκχύλιση αιωρούμενων συσσωματωμάτων νανοσωματιδίων χρυσού από δείγματα νερού.

### 1.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

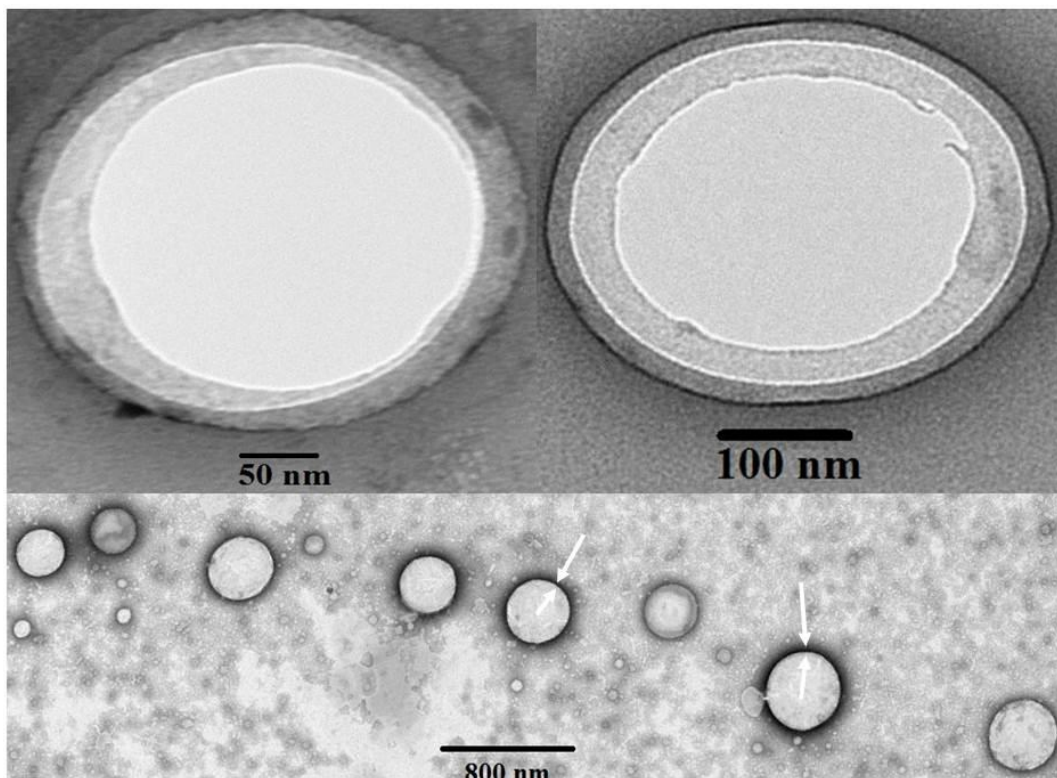
Η βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών επικεντρώθηκε στην επιλογή των καταλληλότερων αντισταθμιστικών ιόντων για τον σχηματισμό του αιωρούμενου υπερμοριακού συσσωματώματος. Με βάση προηγούμενες παρατηρήσεις (Endo M. et al., 1998, Grabner D. et al., 2008, Zhai L. et al., 2006), το κατιονικό επιφανειοδραστικό CTAB χρησιμοποιήθηκε ως αντισταθμιστικό κατιόν (σε συγκέντρωση 0,25 mM), προκειμένου να αξιολογηθούν τρία διαφορετικά αντισταθμιστικά ανιόντα (σουλφανλικό οξύ, σουλφοσαλικυλικό οξύ και Tiron) σε επίπεδο συγκέντρωσης 10,0 mM για την αποτελεσματικότητά τους στο σχηματισμό ενός υπερμοριακού συσσωματώματος ικανού να εκχυλίζει  $11.0 \text{ pmolL}^{-1}$  PVP<sub>10</sub>@AuNPs από 20 mL πρότυπα υδατικά διαλύματα. Αυτά τα αντισταθμιστικά ανιόντα επιλέχθηκαν επειδή διαθέτουν σουλφονικές ομάδες οι οποίες συνδέονται αποτελεσματικά με την τεταρτοταγή αμίνη του CTAB οδηγώντας στο σχηματισμό συσσωματωμάτων (Endo M. et al., 1998, Grabner D. et al., 2008, Zhai L. et al., 2006). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το σουλφοσαλικυλικό οξύ και το Tiron ήταν τα πιο αποτελεσματικά στην ανάκτηση των AuNPs ενώ παρουσία σουλφανλικού οξέος δεν παρατηρήθηκε συσσωμάτωση. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες, (Endo M. et al., 1998) και δείχνουν ότι τα παράγωγα του βενζολίου που έχουν τουλάχιστον τρεις αρνητικά φορτισμένες λειτουργικές ομάδες, δύο από τις οποίες βρίσκονται παραπλεύρως, είναι πιο αποτελεσματικά στο σχηματισμό συμπλόκων με αμίνες (Endo M. et al., 1998). Τελικά, επιλέχθηκε το σουλφοσαλικυλικό οξύ (SSA) ως αντισταθμιστικό ιόν επειδή τα τελικά εκχυλίσματα του Tiron ήταν λιγότερο διαφανή γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπερμοριακή φάση δεν είχε διαλυτοποιηθεί πλήρως κατά το στάδιο της επαναδιαλυτοποίησης.

#### 1.3.1 Σχηματισμός και ιδιότητες της υπερμοριακής φάσης

Αν και τα SSA και CTAB σχηματίζουν διαφανή και οπτικά ισότροπα διαλύματα χαμηλού ιξώδους σε νερό στους 25 °C, τα μίγματα αυτών δημιουργούν ένα οπτικώς ισότροπο θολό διάλυμα μέσω σχηματισμού ζεύγους ιόντων. Δεδομένου ότι η τιμή  $pK_a$  της βενζολοσουλφονικής ομάδας του SSA είναι πολύ

χαμηλή(-SO<sub>3</sub>H: pK<sub>a</sub>=0-1.52) συνεπάγεται ότι το pH του διαλύματος είναι επίσης όξινο και ότι τα άλλα δύο πρωτόνια του SSA (-COOH: pK<sub>a</sub>=2.32-2.90 και -OH pK<sub>a</sub>=11.30-11.80) είναι πρωτονιομένα (Pozdnyakov I.P. et al., 2006). Επομένως, σχηματίζεται ζεύγος ιόντων μεταξύ της σουλφονικής ομάδας SSA και της τεταρτοταγούς αμίνης του CTAB.

Αυτό το ζεύγος ιόντων ανήκει στη γενική κατηγορία των κατιονικών υπερμοριακών συστημάτων τα οποία είναι γνωστό ότι αυτοσυγκροτούνται σε διάφορα συσσωματώματα με τη μορφή διπλοστιβάδων ως συνάρτηση και της γραμμομοριακής αναλογίας των συστατικών και της μοριακής δομής τους (Grabner D. et al., 2008, Kaler E.W. et al., 1989). Στην συγκεκριμένη περίπτωση των SSA και CTAB, τα συσσωματώματα που παράχθηκαν ήταν πολυστρωματικά κυστίδια (MLVs) και όχι ραβδοειδούς τύπου μικκύλια. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τα διαλύματα ραβδοειδών μικκυλίων είναι συνήθως διαφανή, (Zhai L. et al., 2006). Συγκεκριμένα, η υπερμοριακή φάση όντας πλούσια σε SSA είχε χαμηλό ιξώδες και αυξημένη θολερότητα. Η θολερότητα αυξήθηκε περαιτέρω με την αύξηση της γραμμομοριακής αναλογίας CTAB κάτι που είναι σύμφωνο με προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικά με το σχηματισμό των MLVs από την αλληλεπίδραση μορίων με βενζολοσουλφονικές ομάδες με κατιονικό τριμεθυλαμμώνιο (Grabner D. et al., 2008, Zhai L. et al., 2006). Επιπλέον, η συσσωματωμένη φάση υπέστη θερμικά αναστρέψιμες μεταβάσεις κατά τη θέρμανση (η θολερότητα εξαφανίστηκε κατά τη θέρμανση και αποκαταστάθηκε μετά από ψύξη), το οποίο είναι μια ένδειξη του θερμοαντιστρεπτού μετασχηματισμού των κυστιδίων σε μικκύλια ραβδοειδούς τύπου (Davies T.S. et al., 2006). Η παρατήρηση των δομικών χαρακτηριστικών της υπερμοριακής φάσης, με TEM, επαλήθευσε την παρουσία των πολυστρωματικών κυστιδίων (Εικόνα 1.1) με 2 έως 3 ομόκεντρους δακτυλίους και μέση διάμετρο 0,4 έως 0,5 μm.



**Εικόνα 1.1.** Εικόνες TEM της υπερμοριακής φάσης που σχηματίστηκε με σύζευξη ιόντων 5,0 mM SSA και 0,2 mM CTAB. Η κάτω εικόνα απεικονίζει την συνολική υπερμοριακή φάση που λαμβάνεται με ανάμιξη περιόσεως CTAB (5,0 mM SSA, 2,0 mM CTAB).

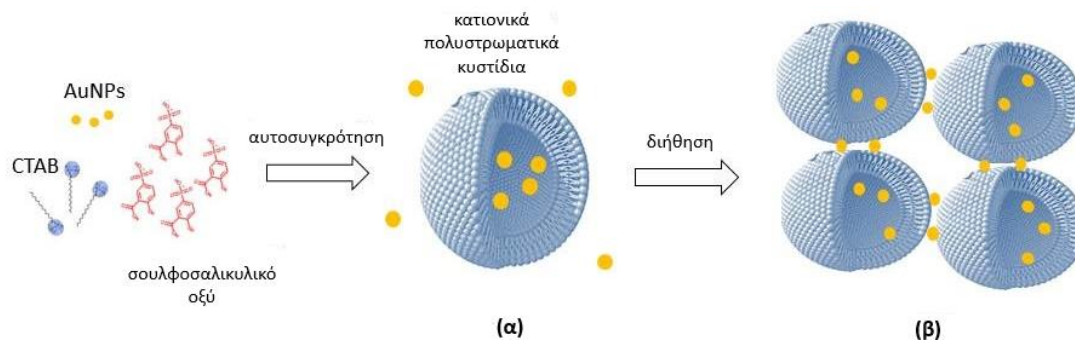
### 1.3.2 Μηχανισμός εκχύλισης

Δεδομένου ότι α) το SSA είναι ένα ισχυρό αντισταθμιστικό ανιόν για το CTAB (Grabner D. et al., 2008, Zhai L. et al., 2006) και β) χρησιμοποιείται σε δεκαπλάσια περίσσεια σε σύγκριση με το CTAB (αναλογία SSA/CTAB=10), η αλληλεπίδραση των AuNPs με τη θετικά φορτισμένη τεταρτοταγή αμίνη του CTAB είναι σχεδόν αδύνατη. Αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από το ότι (α) οι έντονα όξινες συνθήκες του διαλύματος μετά την προσθήκη SSA αντισταθμίζουν κάθε αρνητικό φορτίο στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, (β) νανοσωματίδια με διαφορετικό επιφανειακό φορτίο (όπως τα κιτρικά ή η κυστεΐνης) εκχυλίστηκαν εξίσου αποτελεσματικά τα και (γ) το διήθημα ήταν απαλλαγμένο από υπολείμματα CTAB (όπως αυτό προσδιορίστηκε με φασματομετρία UV-vis). Ως εκ τούτου, ένας εύλογος

μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει την εκχύλιση των AuNPs, είναι η φυσική παγίδευση των AuNPs εντός του υδατικού πυρήνα των κυστιδίων κατά τη διάρκεια της αυτοσυγκρότησής τους που λαμβάνει χώρα επί τόπου στο υδατικό διάλυμα. Ωστόσο, το μέγεθος των κυστιδίων ( $\sim 0.4\text{-}0.5\ \mu\text{m}$ ) υποδηλώνει ότι μόνο ένα μέρος των AuNPs θα μπορούσε να έχει εγκλωβιστεί μέσα στον πυρήνα τους λόγω του περιορισμένου χώρου. Αυτό υποδηλώνει ότι και ένας δεύτερος μηχανισμός εκχύλισης λαμβάνει χώρα.

Η πιθανότητα να έχουν παγιδευτεί τα AuNPs μέσα στη μη πολική περιοχή της διπλοστιβάδας των κυστιδωδών συσσωματωμάτων αποκλείστηκε επειδή το μήκος του δεσμού C-C, που αντιστοιχεί σε περίπου  $0.15\ \text{nm}$ , είναι μικρότερο από το μέσο μέγεθος των AuNPs (δηλαδή  $\geq 5\ \text{nm}$ ). Επομένως, ο δευτερεύων μηχανισμός εκχύλισης αποδόθηκε στο γεγονός ότι, καθώς τα κυστίδια συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του φίλτρου, δημιουργούν μια λεπτή στρώση η οποία είναι πρακτικά μια τρισδιάστατη στρώση υπερμοριακών συγκροτημάτων (Paris N.A. et al., 2005). Κατά τη διήθηση του δείγματος, τα AuNPs που υπάρχουν στην υδατική φάση μπορούν να παγιδευτούν φυσικά μεταξύ αυτών των στρωμάτων και αφαιρούνται έτσι αποτελεσματικά από την υδατική φάση του διαλύματος μέσω φυσικής παγίδευσης (εγκλωβισμού).

Για να αξιολογηθεί η εγκυρότητα αυτών των μηχανισμών καθώς και η συνεισφορά τους στην εκχύλιση των AuNPs, το εναιώρημα της υπερμοριακής φάσης σχηματίστηκε σε ένα υδατικό διάλυμα που δεν περιείχε AuNPs (τυφλό διάλυμα) και διηθήθηκε. Το υπερμοριακό στρώμα που κατακρατήθηκε στην επιφάνεια του διηθητικού φίλτρου χρησιμοποιήθηκε ώστε να διηθηθεί ένα πρότυπο διάλυμα νανοσωματιδίων. Οι ανακτήσεις των AuNPs μειώθηκαν σε σχεδόν 30-35%, σε σύγκριση με εκείνες που προέκυψαν όταν τα AuNPs προυπήρχαν ήδη στο διάλυμα, υποδηλώνοντας ότι η παγίδευση στον υδατικό πυρήνα των κυστιδίων είναι ο επικρατέστερος μηχανισμός εκχύλισης (60-65% της παρατηρούμενης εκχύλισης). Μια σχηματική παρουσίαση του μηχανισμού εκχύλισης απεικονίζεται στο σχήμα 1.2.



**Σχήμα 1.2.** Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού εκχύλισης. (α) Τα AuNPs παγιδεύονται εντός του υδατικού πυρήνα κυστιδίων, (β) Τα κυστίδια στοιβάζονται πυκνά κατά τη διάρκεια της διήθησης και τα AuNPs παγιδεύονται φυσικά. Ο αριθμός των μορίων CTAB και SSA και των νανοσωματιδίων είναι ενδεικτικός.

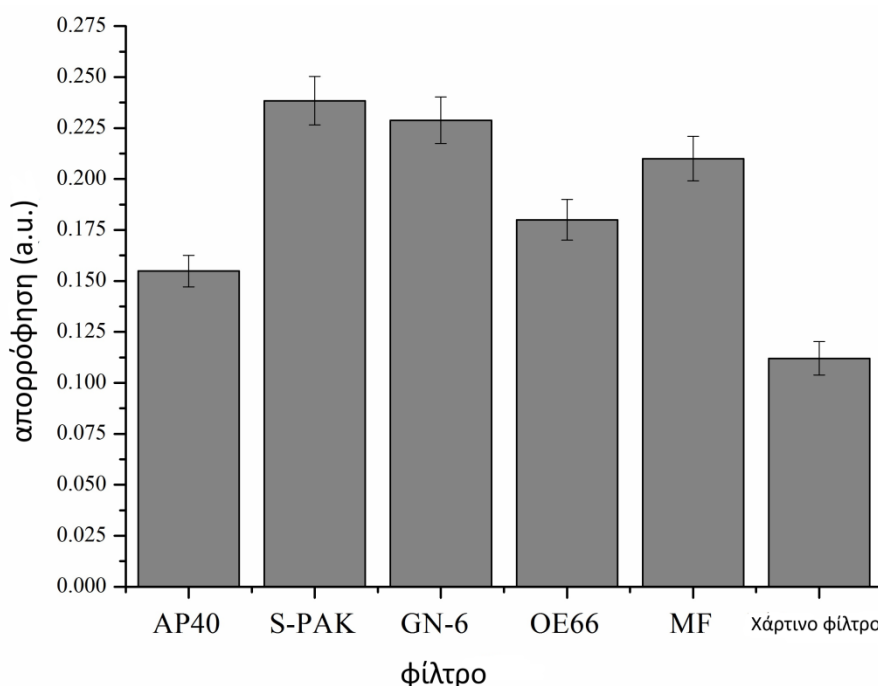
### 1.3.3 Βελτιστοποίηση των πειραματικών μεταβλητών

Οι πειραματικές παράμετροι που επηρεάζουν τον διαχωρισμό των νανοσωματιδίων διερευνήθηκαν με τη διεξαγωγή δοκιμασιών που περιλάμβαναν την εκχύλιση  $11.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  PVP<sub>10</sub>@AuNPs από 20 mL προτύπων υδατικών διαλυμάτων υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (n=3). Το λεπτό υμένιο διαλυτοποιήθηκε σε όξινο μεθανολικό διάλυμα (2,5 mL) αποτελούμενο από μεθανόλη: HNO<sub>3</sub> (9,6 M) και χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση.

### 1.3.4 Επιλογή διηθητικού φίλτρου

Αρχικά, εξετάστηκαν διάφορα διηθητικά φίλτρα ως προς την αποτελεσματικότητά τους να συλλέξουν ποσοτικά τη συσσωρευμένη φάση. Αυτά τα φίλτρα επιλέχθηκαν επειδή είναι εμπορικά διαθέσιμα, φθηνά και επιτρέπουν υψηλές ταχύτητες ροής. Τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στο Σχήμα 1.3 δείχνουν ότι όλα τα διηθητικά φίλτρα μπορούσαν να κατακρατήσουν τη υπερμοριακή συσσωρευμένη αλλά πιο αποτελεσματικά ήταν τα φίλτρα με διάμετρο μεγέθους πόρων μικρότερο ή ίσο με 0,45  $\mu\text{m}$ . Το βέλτιστο μέγεθος πόρου των

φίλτρων συμφωνεί με το μέσο μέγεθος των MLVs που παρατηρήθηκε από το TEM (0,4-0,5  $\mu\text{m}$ ) (Εικόνα 1) (Benedé J.L. et al., 2015). Η παρατήρηση αυτή παρέχει πρόσθετες ενδείξεις σχετικά με την εγκυρότητα του δευτερεύοντος μηχανισμού εκχύλισης που περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός τρισδιάστατου δικτύου υπερμοριακών συγκροτημάτων στην επιφάνεια του φίλτρου κατά τη διάρκεια της διήθησης. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι το λεπτό υμένιο μπορεί να αποκολληθεί πλήρως από τα φίλτρα που αποτελούνται από μικτά παράγωγα εστέρα κυτταρίνης ενώ σε άλλα υλικά (γυάλινες ίνες και άλλα παράγωγα κυτταρίνης) το υμένιο προσκολλόταν ισχυρά και δεν μπορούσε να αποκολληθεί πλήρως, με αποτέλεσμα την μείωση των ανακτήσεων. Με βάση τα παραπάνω, επιλέχθηκαν τα μικτά φίλτρα εστέρα κυτταρίνης (S-PAK, Millipore, 0,45  $\mu\text{m}$ ) για τη συλλογή της υπερμοριακής φάσης.



**Σχήμα 1.3.** Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων διηθητικών φίλτρων για τη συλλογή της υπερμοριακής φάσης. Στα φίλτρα S-PAK, GN-6 και MF το υμένιο αποκολλήθηκε φυσικά, αφαιρέθηκε από το φίλτρο και διαλύθηκε ξεχωριστά σε ένα όξινο μεθανολικό διάλυμα (1:4 μεθανόλη- $\text{HNO}_3$  6M). Στα φίλτρα AP40, OE66 και 336 η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 2.0 mL διαλύματος μεθανόλης:  $\text{HNO}_3$  6.0 M στην επιφάνεια του φίλτρου για λίγα λεπτά και στη συνέχεια συλλογή υπό κενό. Λεπτομέρειες σχετικά με τις εμπορικές ονομασίες και τις ιδιότητες των φίλτρων παρατίθενται στον Πίνακα 1.1.

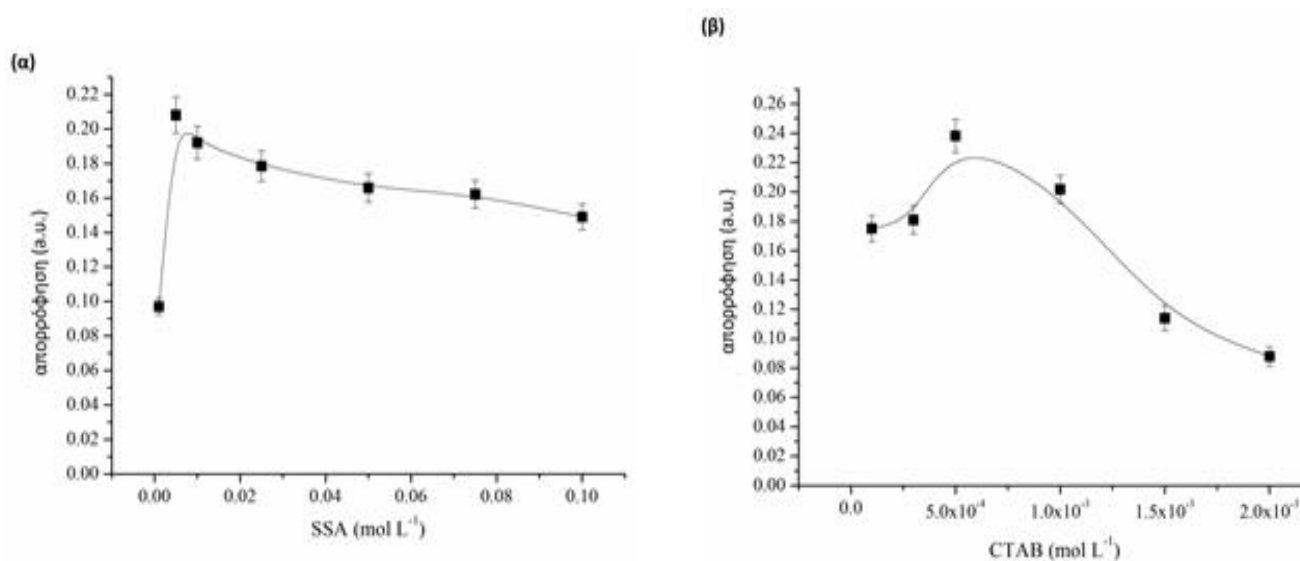
### 1.3.5 Επίδραση της ταχύτητας ροής

Η ταχύτητα ροής του αιωρήματος μέσω του διηθητικού φίλτρου προσαρμόστηκε με τη ρύθμιση της πίεσης του κενού. Για τις συνθήκες εργασίας και το επιλεγμένο διηθητικό φίλτρο παρατηρήθηκαν επαναλήψιμες ταχύτητες ροής μεταξύ 200 και 800 mbar. Ωστόσο, όταν η πίεση κενού αυξήθηκε περισσότερο από 400 mbar το λεπτό στρώμα προσκολλήθηκε ισχυρά στην επιφάνεια του φίλτρου και δεν μπορούσε να αποκολληθεί ποσοτικά. Όταν η πίεση κενού διατηρήθηκε στα ~400 mbar το λεπτό στρώμα μπορούσε, σχεδόν αυτόνομα, να αποκολληθεί από το διηθητικό φίλτρο μετά την ξήρανση. Η ταχύτητα ροής στα 400 mbar υπολογίστηκε σε  $\sim 2,2 \text{ mL min}^{-1}$  που αντιστοιχεί σε διαπερατότητα υγρού  $\sim 280 \text{ L h}^{-1} \times \text{m}^{-2}$ , που είναι καλύτερη από εκείνη που επιτυγχάνεται με υπερμοριακές μεμβράνες ή μεμβράνες (μικρο-) (υπερ-) διήθησης (Krieg E. et al., 2011, Ramakrishna S. et al., 2010). Μικρότερες ταχύτητες διήθησης δεν ήταν ευνοϊκές, όχι μόνο λόγω αύξησης του χρόνου εκχύλισης αλλά και λόγω της διάσπασης των κυστιδίων σε μικρότερα κυστίδια σε χαμηλότερες πιέσεις (π.χ. 200-300 mbar) (Nicolini C. et al., 2006) προκαλώντας διαρροή των συστατικών του υμενίου ή διάσπαση των κυστιδίων με αποτέλεσμα των απώλεια AuNPs κατά τη διήθηση. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, η πίεση του κενού ρυθμίστηκε στα 400 mbar.

### 1.3.6 Επίδραση της συγκέντρωσης των αντισταθμιστικών ιόντων

Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των AuNPs εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ιδιότητες και τον όγκο του υπερμοριακού συσσωματώματος που καθορίζονται από τη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων ζεύγους ιόντων. Οι μέγιστες ανακτήσεις πραγματοποιήθηκαν με ανάμιξη 5,0 mM SSA και 0,5 mM CTAB, ενώ οι αποκλίσεις από αυτές τις τιμές προκάλεσαν μείωση της εκχύλισης των AuNPs (Σχήμα 1.4), οι οποίες ήταν πιο σημαντικές σε υψηλότερες συγκεντρώσεις CTAB. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων ζεύγους ιόντων το συσσωμάτωμα δεν σχηματίστηκε επαρκώς, όπως φάνηκε από τη χαμηλή θολερότητα του διαλύματος, μειώνοντας την απόδοση εκχύλισης των AuNPs. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η θολερότητα του διαλύματος αυξήθηκε και ο ρυθμός διήθησης μειώθηκε, πιθανώς

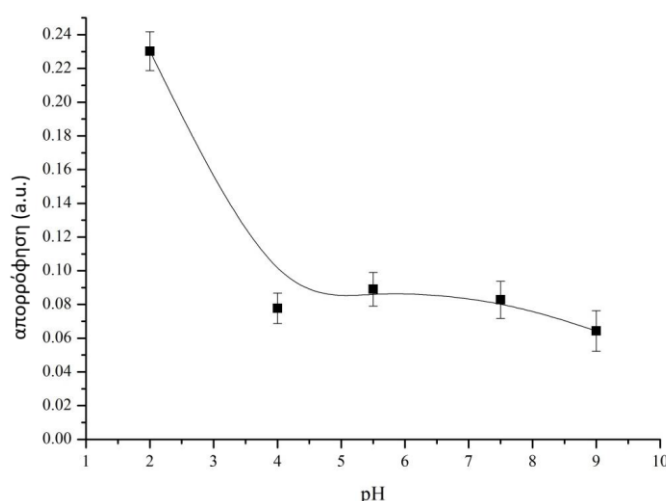
λόγω του πυκνού στοιβάγματος των συγκροτημάτων κυστιδίων (Grabner D. et al., 2008). Οι φωτογραφίες TEM της Εικόνας 1.1β αποκάλυψαν ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις αντισταθμιστικών ιόντων, τα κυστίδια είχαν πολύ μικρή διαστρωματική απόσταση μεταξύ των μεμονωμένων στιβάδων (που σχεδόν εφάπτονται) ή ήταν μονά κυστίδια με διπλοστοιβάδες (Σχήμα 1-κάτω εικόνα). Αυτά τα κυστίδια είναι πιο εύκαμπτα και μπορούν να συσσωρευτούν περισσότερο κατά τη διάρκεια της διήθησης, με αποτέλεσμα την ισχυρή προσκόλληση του υπερομοριακού στρώματος στην επιφάνεια του φίλτρου. Ως αποτέλεσμα, ένα μέρος του λεπτού στρώματος παρέμεινε στην επιφάνεια του φίλτρου ακόμη και μετά από παρατεταμένη ξήρανση (24 ώρες σε συνθήκες περιβάλλοντος), μειώνοντας ταυτόχρονα την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των AuNPs.



**Σχήμα 1.4.** Επίδραση της συγκέντρωσης (α) SSA και (β) CTAB στην απόκριση ατομικού σήματος των 11.0 pmol L<sup>-1</sup> AuNPs που εκχυλίστηκαν από 20 mL υδατικού διαλύματος.

### 1.3.7 Επίδραση του pH

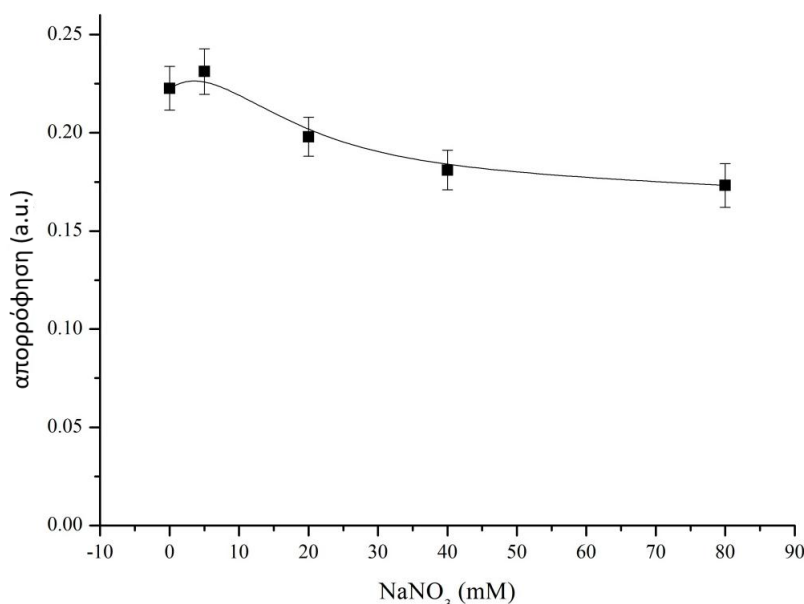
Το pH του διαλύματος παίζει σημαντικό ρόλο στη μοριακή δομή του υπερμοριακού συσσωματώματος και συνεπώς στην σταθερότητα του υμενίου που συλλέγεται μετά από τη διήθηση. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η  $pK_a$  της βενζολοσουλφονικής ομάδας του SSA είναι ισχυρά όξινη ( $-SO_3H$ :  $pK_a=0-1.52$ ) (Pozdnyakov I.P. et al., 2006) και ως αποτέλεσμα το pH του διαλύματος SSA-CTAB είναι επίσης όξινο ( $pH \leq 2$ ). Οι όξινες τιμές pH έχουν αποδειχθεί ότι είναι ευνοϊκές για την εκχύλιση των AuNPs με διαφορετικές επιφανειακές τροποποιήσεις, ανάλογα με το ζήτα δυναμικό και το σημείο μηδενικού φορτίου (Hartmann G. and Schuster M., 2013, Li L. et al., 2012, Li L. and Leopold K., 2012, Su S. et al., 2014, Tsogas G.Z. et al., 2014). Όταν το pH αυξήθηκε πάνω από 3 (χρησιμοποιώντας NaOH), το καρβοξυλικό ιόν του SSA αποπρωτονιώθηκε (Grabner D. et al., 2008, Pozdnyakov I.P. et al., 2006). Αυτό επηρέασε τη δομή των κυστιδίων εισάγοντας αρνητικό φορτίο στο εσωτερικό της υδρόφοβης περιοχής της διπλοστοιβάδας προκαλώντας τη διόγκωση των κυστιδίων, αυξάνοντας την θολερότητα του διαλύματος και επιβραδύνοντας τη διήθηση. Κατά συνέπεια, το λεπτό υμένιο που συλλέχθηκε στην επιφάνεια του φίλτρου δεν μπορούσε να αποκολληθεί πλήρως, μειώνοντας έτσι την ανάκτηση των AuNPs (Σχήμα 1.5). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσσεις χωρίς ρύθμιση του pH (δηλαδή σε  $pH < 2$ ).



**Σχήμα 1.5.** Επίδραση του pH στην απόκριση ατομικού σήματος των  $11.0 \text{ pmol L}^{-1}$  AuNPs που εκχυλίστηκαν από 20 mL υδατικού διαλύματος.

### 1.3.8 Επίδραση της ιοντικής ισχύος

Η ιοντική ισχύς του διαλύματος μπορεί να επηρεάσει τη δομή και τις ιδιότητες της υπερμοριακής φάσης αντισταθμίζοντας το φορτίο του CTAB και του SSA. Σύμφωνα με τις προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας με άλλα φορτισμένα κυστίδια, η χαμηλή ιοντική ισχύς ευνοεί τη συγκρότηση των ανιονικά φορτισμένων κυστιδίων (Giokas D.L. et al., 2004) ενώ η υψηλή ιοντική ισχύς οδηγεί σε σημαντικές δομικές παραμορφώσεις (Karakoglou N.I. et al., 2008, Tsogas G.Z. et al., 2004). Τα αποτελέσματα με  $\text{NaNO}_3$  ως ρυθμιστή ιοντικής ισχύος σε επίπεδα συγκέντρωσης μεταξύ 0-80 mM, δείχνουν ότι η ένταση της απορρόφησης αυξάνεται για χαμηλή ιοντική ισχύ ( $\leq 5$  mM) αλλά μειώνεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλάτων (Σχήμα 1.6). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα ανόργανα ιόντα αντισταθμίζουν το αρνητικό φορτίο των κυστιδίων ή δημιουργήσουν ένα ανταγωνιστικό περιβάλλον γύρω από την αμινομάδα του CTAB που οδηγεί σε δομικές παραμορφώσεις που δεν ευνοούν την εκχύλιση. Συνεπώς, οι εκχυλίσες πραγματοποιήθηκαν παρουσία 5,0 mM  $\text{NaNO}_3$ .



**Σχήμα 1.6.** Επίδραση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης στην ένταση της απορρόφησης κατά την εκχύλιση  $11.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  AuNPs από 20 mL υδατικού διαλύματος.

### 1.3.9 Βελτιστοποίηση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης

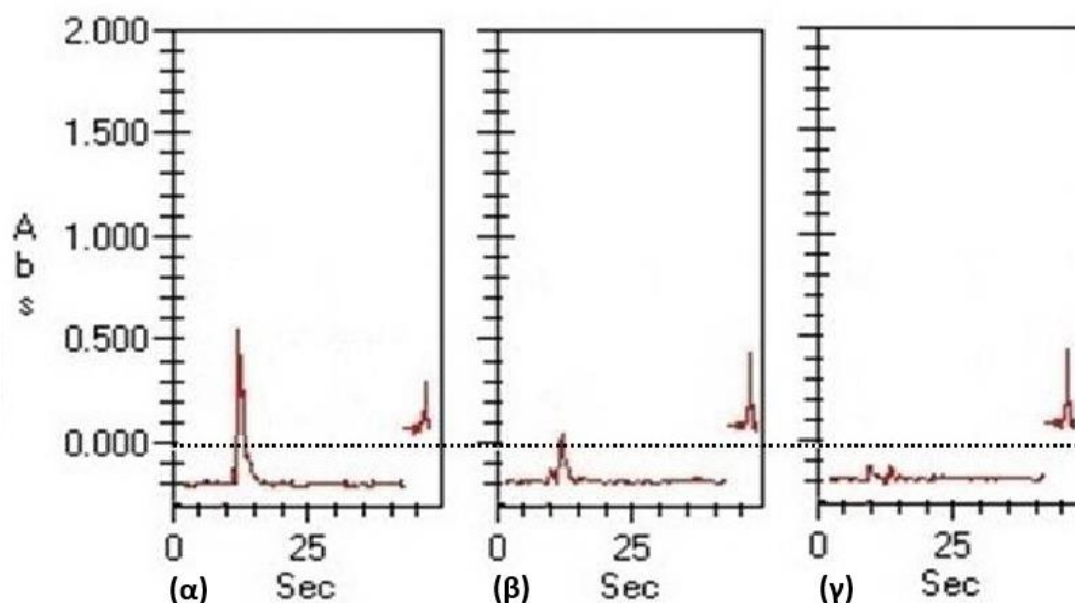
Ο χρόνος και η θερμοκρασία εκχύλισης διερευνήθηκαν σε ένα εύρος από 0.5-30 λεπτά και 20-60 °C, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, οι ανακτήσεις των AuNPs έφθασαν τη μέγιστη τιμή μετά από 10 λεπτά ανάμιξης σε θερμοκρασία δωματίου. Σε χρόνους επώασης μεγαλύτερους από 15 λεπτά, η θολερότητα αυξήθηκε και ο ρυθμός διήθησης επιβραδύνθηκε επειδή αυξήθηκε το ιξώδες του αιωρήματος. Ως αποτέλεσμα, η υπερμοριακή φάση κατέστη δύσκαμπτη και προσκολλήθηκε ισχυρά στην επιφάνεια του διηθητικού φίλτρου με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ποσοτική ανάκτηση της από την επιφάνεια του φίλτρου, μειώνοντας την ανάκτηση των AuNPs. Όσον αφορά τη θερμοκρασία, καθώς αυξήθηκε η θερμοκρασία, η απόδοση της εκχύλισης μειώθηκε ενώ σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 45 ° C το διάλυμα έγινε διαφανές εξαιτίας των θερμικών μεταβολών στη δομή της υπερμοριακής φάσης, πιθανότατα με τη μετάβαση από κυστίδια σε ραβδοειδή μικκύλια (Davies T.S. et al., 2006). Συνεπώς, όλες οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν μετά από 10 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου.

### 1.3.10 Βελτιστοποίηση των συνθηκών διαλυτοποίησης

Η διαλυτοποίηση του υμενίου βελτιστοποιήθηκε μελετώντας μίγματα μεθανόλης /  $\text{HNO}_3$  σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης νιτρικού οξέος. Προστέθηκε μεθανόλη για να διευκολυνθεί η διαλυτοποίηση της υπερμοριακής δομής του υμενίου ενώ χρησιμοποιήθηκε  $\text{HNO}_3$  για την εμπόδιση της υδρόλυσης των μεταλλικών κατιόντων και τη μείωση της πτητικότητας των αναλυτών εντός του γραφιτικού σωλήνα κατά την ηλεκτροθερμική ατομοποίηση (Cassella R.J. et al., 2011). Επιπλέον, το  $\text{HNO}_3$  μπορεί να ελαχιστοποιήσει τη μη ειδική προσρόφηση των μετάλλων των νανοσωματιδίων στα τοιχώματα των φιαλιδίων (Su S. et al., 2014). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτό το πείραμα επιβεβαίωσαν ότι ήταν απαραίτητος ένας μικρός όγκος μεθανόλης για να βοηθηθεί η διάσπαση της υπερμοριακής φάσης ενώ απουσία μεθανόλης το τελικό εκχύλισμα ήταν ελαφρώς θολό.

Η παρουσία  $\text{HNO}_3$  βρέθηκε ότι έχει σημαντική επίδραση στην ευαισθησία των μετρήσεων των AuNPs καθώς καταγράφηκε αξιοσημείωτη αύξηση του αναλυτικού σήματος όταν η συγκέντρωση του  $\text{HNO}_3$  αυξήθηκε από 0 M σε 9,6 M. Στην πραγματικότητα, στις συγκεντρώσεις  $\text{HNO}_3$  κάτω από 3,5 M οι ανακτήσεις ήταν πολύ χαμηλές. Η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο του ατομικού σήματος κατατομής του Au αποκάλυψε ότι ένα τμήμα του Au χάνεται πριν από την ατομοποίηση (Σχήμα 1.7α). Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τον λόγο της απώλειας του Au, αναλύσαμε μια σειρά από πρότυπα διαλύματα AuNPs που παρασκευάστηκαν σε νερό και 9.6M  $\text{HNO}_3$  στην ίδια τελική συγκέντρωση. Προφανώς, δεν παρατηρήθηκε καμία απώλεια Au κατά τη διάρκεια του βήματος ξήρανσης υποδηλώνοντας ότι ο λόγος της απώλειας Au αφορά τη σύνθεση του τελικού εκχυλίσματος. Παρόλο που δεν υπήρχαν επαρκή πειραματικά και θεωρητικά στοιχεία που να υποστηρίζουν μια τεκμηριωμένη εξήγηση, θεωρήθηκε ότι ο Au εξατμίστηκε μαζί με το SSA και το PVP. Η παραδοχή αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι οι θερμοκρασίες εξάτμισης των PVP και SSA είναι  $>120\text{ }^\circ\text{C}$  και  $>150\text{ }^\circ\text{C}$ , αντίστοιχα (σύμφωνα με τα δελτία δεδομένων ασφαλείας τους). Η υπόθεση αυτή υποστηρίχθηκε επίσης εν μέρει από το ότι (α) η αύξηση της συγκέντρωσης του  $\text{HNO}_3$  σε 9.6M παρείχε σημαντική βελτίωση (Σχήμα 1.7β) ενδεχομένως μειώνοντας την πτητικότητα των μεταλλικών ιόντων (Cassella R.J. et al., 2011) και (β) το πρόβλημα μπορούσε να εξαλειφθεί πλήρως με την χώνευση του εκχυλίσματος σε μικροκύματα για 15 min στα 900 W (Σχήμα 1.7γ) προφανώς λόγω της αποδόμησης των οργανικών υπολειμμάτων των εκχυλισμάτων σε απλούστερα μόρια τα οποία εξατμίστηκαν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, για να αποφασιστεί η καλύτερη μέθοδος κατεργασίας, αξιολογήθηκε η σχετική διαφορά του σήματος Au με και χωρίς το στάδιο χώνευσης σε μικροκύματα. Η σχετική διαφορά στα αναλυτικά σήματα ήταν  $<4\%$  υποδηλώνοντας ότι οι δύο μέθοδοι μπορούν να μετριάσουν επαρκώς την πρόωγη εξάτμιση του Au. Αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν με τις διαπιστώσεις των Fabricius et al. (Fabricius A.L. et al., 2014) που παρατήρησαν ότι τόσο η οξίνιση όσο και η χώνευση με μικροκύματα είναι κατάλληλα εργαλεία προετοιμασίας δειγμάτων για ανάλυση νανοσωματιδίων με ατομικούς ανιχνευτές. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις και για λόγους

απλότητας και ταχύτητας ανάλυσης το υμένιο διαλυτοποιήθηκε σε μίγμα 1:3 μεθανόλης/9,6M HNO<sub>3</sub> χωρίς χώνευση.



**Σχήμα 1.7.** Διαγράμματα ατομικού σήματος Au που ελήφθησαν μετά τη διαλυτοποίηση του συσσωματωμένου λεπτού στρώματος σε 2,5 mL (α) μεθανόλης / 2,5 M HNO<sub>3</sub> (1: 3) (β) μεθανόλης / 9,6 M HNO<sub>3</sub> (1: 3) και γ) μεθανόλης / 9,6 M HNO<sub>3</sub> (1: 3) και χώνευση σε μικροκύματα για 15 min στα 900 W.

### 1.3.11 Αξιολόγηση της επίδρασης της μήτρας του υποστρώματος και της εκλεκτικότητας της μεθόδου

Λόγω της χρήσης ενός ισχυρού μέσου συμπλοκοποίησης όπως το SSA, διερευνήθηκε η παρεμπόδιση των ανόργανων κατιόντων και ιδιαίτερα των Ca<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup>, τα οποία είναι τα πλέον άφθονα μεταλλικά ιόντα στα φυσικά ύδατα. Συνεπώς εκχυλίσθηκαν υδατικά πρότυπα διαλύματα PVP<sub>10</sub>@AuNPs (11,0 μmol L<sup>-1</sup>) που περιείχαν 100 mg L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά που ελήφθησαν σε απεσταγμένο νερό. Διαπιστώθηκε ότι τα ιόντα Ca<sup>2+</sup> παρεμποδίζουν στον σχηματισμό της υπερμοριακής φάσης με δέσμευση της σουλφονικής ομάδας του SSA προκαλώντας αισθητή μείωση της θολερότητας των διαλυμάτων και ταυτόχρονα στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των AuNPs.

Για να αρθεί αυτή η παρεμπόδιση, αυξήθηκε η συγκέντρωση του SSA προκειμένου να αντισταθμιστεί ο ανταγωνισμός από τα ανόργανα ιόντα και να

αποκατασταθεί ο σχηματισμός της υπερμοριακής φάσης. Επειδή τα φυσικά ύδατα περιέχουν μεταβλητές ποσότητες μετάλλων αλκαλικών γαιών, εκχυλίστηκε μια σειρά πραγματικών δειγμάτων όπως νερό βρύσης, νερό από ποτάμι και λίμνη, εμβολιασμένα με  $11.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  PVP<sub>10</sub>@AuNPs, για να διερευνηθεί η συγκέντρωση του SSA που απαιτείται για να αποκατασταθεί η ποσοτική εκχύλιση των AuNPs. Θεωρώντας ότι η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης αποκαθίσταται όταν φθάσει τουλάχιστον 95% σε σχέση εκείνη που παρατηρείται σε απεσταγμένο νερό, βρέθηκε ότι συγκέντρωση SSA 7,5 mM, που αντιστοιχεί σε 50% υψηλότερη συγκέντρωση SSA σε σχέση με το απεσταγμένο νερό, ήταν επαρκής για να αποκατασταθεί η αποτελεσματικότητα εκχύλισης των AuNPs σε όλα τα πραγματικά δείγματα. Υπό αυτές τις συνθήκες, η παρεμπόδιση διαφόρων μεταλλικών ιόντων ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  και  $\text{Al}^{3+}$ ) αξιολογήθηκε ξεχωριστά σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα συνήθη περιβαλλοντικά επίπεδα ( $150 \text{ mg L}^{-1}$  για  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  και  $25 \text{ mg L}^{-1}$  για τα άλλα μεταλλικά ιόντα) χωρίς να παρατηρηθεί καμία επίδραση στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των AuNPs. Επίσης, η παρουσία των κοινών ανόργανων ανιόντων ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ) σε συγκεντρώσεις πάνω από τις περιβαλλοντικές τους συγκεντρώσεις ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) δεν είχαν καμία επίδραση στο αναλυτικό σήμα υποδηλώνοντας ότι δεν παρεμποδίζουν την ανάλυση.

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου έναντι των ιόντων χρυσού, που θα μπορούσαν να συνεκχυλιστούν και να παρερμηνευτούν ως AuNPs, διερευνήθηκε με εκχύλιση 20 mL νερού βρύσης εμβολιασμένου με  $10 \text{ ng L}^{-1}$   $\text{Au}^{3+}$ , λαμβάνοντας υπόψη ότι η συνηθισμένη συγκέντρωση διαλυμένου χρυσού σε δείγματα νερού βρίσκεται μεταξύ 1 και  $5 \text{ ng L}^{-1}$  (Cidu R. Et al., 1994, McHugh J.B., 1988). Η απόδοση της εκχύλισης των ιόντων χρυσού ήταν μικρότερη από 8%, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μέθοδος προσφέρει επαρκή εκλεκτικότητα έναντι των AuNPs. Η εκλεκτικότητα της μεθόδου μπορεί να αποδοθεί στη μεγάλη σχετική περίσσεια CTAB,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  και άλλων μεταλλικών ιόντων που υπάρχουν σε δείγματα νερού και τα οποία μπορούν να αντισταθμίσουν αποτελεσματικά τις δραστικές σουλφονικές ομάδες του SSA. Λόγω αυτού, δεν χρησιμοποιήθηκαν καλυπτικά αντιδραστήρια για τα ιόντα Au (όπως το EDTA, το  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , το  $\text{CN}^-$  κλπ.), αν και θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μετριασμό της επίδρασης του διαλυμένου χρυσού

σε περιπτώσεις που οι συγκεντρώσεις του είναι ιδιαίτερα αυξημένες (Hartmann G. and Schuster M., 2013, Tsogas G.Z. et al., 2014).

Τέλος, η επίδραση της διαλυμένης οργανικής ύλης ερευνήθηκε με εκχύλιση 20 mL νερού βρύσης που εμβολιάστηκε με  $11.0 \text{ pmol L}^{-1}$  PVP<sub>10</sub>@AuNPs,  $10 \text{ ng L}^{-1}$  Au και  $10 \text{ mg L}^{-1}$  χουμικού οξέος. Η παρουσία του χουμικού οξέος δεν είχε προφανή επίδραση στην ανάκτηση των AuNPs (ή στην συνεκχύλιση των ιόντων Au) πιθανώς επειδή οι ισχυρώς όξινες συνθήκες ευνοούν την πρωτονίωσή του μειώνοντας έτσι την ικανότητα του να δεσμεύσει μεταλλικά ιόντα. Για τα δείγματα πλούσια σε διαλυμένη οργανική ύλη, η προκατεργασία με του υδατικού δείγματος με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> θα μπορούσε να εφαρμοστεί για τον μετρίασμό πιθανών παρεμποδίσεων καθώς έχει αποδειχτεί ότι διασπά αποτελεσματικά τη διαλυμένη οργανική ύλη (Li L. et al., 2012, Majedi S.M. et al., 2013) χωρίς να επηρεάζονται τα AuNPs (Li L. et al., 2012, Tsogas G.Z. et al., 2014).

#### **1.3.12 Εκχύλιση AuNPs με διαφορετική επιφανειακή επικάλυψη και μέγεθος**

Για να επικυρωθεί η γενικευμένη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου, προσδιορίστηκε η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των AuNPs με διαφορετική επιφανειακή επικάλυψη και μέγεθος. Τα AuNPs που έχουν σταθεροποιηθεί με κιτρικά, PVP<sub>10</sub> και κυστεΐνη ανακτήθηκαν κατά μέσο όρο κατά  $93 \pm 3\%$  ( $91 \pm 4\%$  για Cys@AuNPs,  $92 \pm 5\%$  για CA@AuNPs και  $95 \pm 4\%$  για PVP<sub>10</sub>@AuNPs) υποδηλώνοντας ότι η μέθοδος μπορεί να εκχυλίσει αποτελεσματικά τα AuNPs ανεξάρτητα από την επιφανειακή τους επικάλυψη. Αυτό εξηγείται με βάση τον μηχανισμό εκχύλισης που περιλαμβάνει την φυσική παγίδευση και διαχωρισμό των AuNPs που καθιστά λιγότερο σημαντικούς τις χημικές αλληλεπιδράσεις με τα μόρια που χρησιμοποιούνται για την επιφανειακή κάλυψη και σταθεροποίηση των AuNPs.

Όσον αφορά τις διαστάσεις των νανοσωματιδίων, είναι γνωστό ότι το μέγεθος είναι αντιστρόφως ανάλογο της μοριακής συγκέντρωσής τους (Haiss W. et al., 2007). Επομένως, για να συγκριθούν AuNPs διαφορετικών μεγεθών, μετρήθηκε η ένταση του αναλυτικού σήματος από τα AuNPs με πρότυπα διαλύματα νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν από την ίδια αρχική συγκέντρωση του Au (ελέγχοντας τη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων κατά το στάδιο της σύνθεσης),

σύμφωνα με τις διαδικασίες που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Ghosh D. et al., 2011). Τα διαλύματα στη συνέχεια εκχυλίστηκαν υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, και αραιώθηκαν ώστε να διατηρηθεί η ίδια τελική συγκέντρωση χρυσού. Τα ατομικά σήματα για AuNPs των 15-40 nm ήταν παρόμοια με μια μέση απόλυτη απόκλιση  $\pm 10\%$  η οποία είναι ικανοποιητική λαμβάνοντας υπόψη την πολυδιασπορά των διαλυμάτων νανοσωματιδίων. Επιπλέον, ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ των εντάσεων σήματος και της συγκέντρωσης μεταλλικών ιόντων ήταν ίσος με 0,8655 ( $p=0,05$ ), το οποίο δείχνει ότι η αναλυτική απόκριση είναι άμεσα ανάλογη με τη συγκέντρωση των ιόντων ανεξάρτητα από το μέγεθος των AuNPs.

### **1.3.13 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου**

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου αξιολογήθηκαν ως προς την γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης, της αναπαραγωγικότητα και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων και τις ανακτήσεις από πραγματικά δείγματα. Η βαθμονόμηση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση 20 mL πρότυπων υδατικών διαλυμάτων που περιείχαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $PVP_{10}@AuNPs$  και επαναδιαλυτοποίηση του λεπτού υμενίου σε 2,5 mL μεθανόλης: $HNO_3$  (9,6 M). Τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι οι καμπύλες βαθμονόμησης περιγράφονται από εξίσωση πρώτης τάξης στην περιοχή συγκεντρώσεων από 1,0 έως 20,0  $\mu mol L^{-1}$  ( $y=0,0212x+0,0423$ ,  $R^2=0,997$ ) αποδίδοντας όριο ανίχνευσης, που ορίζεται ως η μέση απορρόφηση του τυφλού συν 3 φορές την τυπική απόκλιση του τυφλού, ίσο με 0,7  $\mu mol L^{-1}$ . Η γραμμικότητα της περιοχής βαθμονόμησης είναι σχετικά χαμηλή, αλλά βρίσκεται εντός του περιοχής των αναμενόμενων περιβαλλοντικών συγκεντρώσεων των AuNPs που προβλέπεται από αλγόριθμους πιθανοτήτων και ροής (Silva B.F. et al., 2011). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν 20 mL όγκου δείγματος, η ευαισθησία της μεθόδου υπερτερεί από τεχνικές όπως η κλασμάτωση πεδίου ροής, η UV/Vis, η φασματομετρία Raman και ο φθορισμός (Cayuela A. et al., 2014, Li L. and Leopold K., 2012, López-Lorente A.I. et al., 2012) ενώ είναι συγκρίσιμη με την ευαισθησία άλλων μεθόδων ατομικής φασματοσκοπίας καθώς και χημειοφωταύγειας

(Hartmann G. and Schuster M., 2013, Tsogas G.Z. et al., 2014). Είναι επίσης σημαντικό ότι τα LODs μπορούν να βελτιωθούν περαιτέρω με (α) προσυγκέντρωση μεγαλύτερου όγκου δειγμάτων. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να εκχυλιστούν όγκοι δειγμάτων μέχρι 40 mL ενώ η χρήση ισχυρότερων αντλιών καθιστά δυνατή την εκχύλιση όγκων δειγμάτων μέχρι 150 mL χρησιμοποιώντας διηθητικά φίλτρα της ίδιας διαμέτρου (δηλ. 45 mm) (Benedé J.L. et al., 2015). Επιπροσθέτως, οι φίλτρα μεγαλύτερης διαμέτρου μπορούν να διευκολύνουν τη συλλογή μεγαλύτερης μάζας του συσσωματώματος, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα εκχύλισης ακόμη μεγαλύτερων όγκων δειγμάτων, (β) χρησιμοποιώντας πιο ευαίσθητους ανιχνευτές όπως το ICP-MS ή (γ) μειώνοντας τον όγκο του τελικού εκχυλίσματος. Η βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου μειώνοντας τον όγκο του τελικού εκχυλίσματος αξιολογήθηκε περαιτέρω με βαθμονόμηση της μεθόδου υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες και διαλυτοποίηση του λεπτού στρώματος σε 0,5 mL μεθανόλης:  $\text{HNO}_3$  (1: 3). Σε αυτή την περίπτωση, δημιουργήθηκε μια νέα καμπύλη βαθμονόμησης στην περιοχή συγκεντρώσεων από 0,25-4,0  $\text{pmol L}^{-1}$  ( $y=0,117x+0,0353$ ,  $R^2=0,9982$ ) αποδίδοντας  $\text{LOD}_{(3\sigma/N)}=75 \text{ femto-mol L}^{-1}$ . Επομένως, η μέθοδος μπορεί να επιτύχει εξαιρετικά χαμηλά LOD που μπορούν να ικανοποιήσουν την ανάλυση των AuNPs ακόμη και σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων.

Για την αξιολόγηση της ακρίβειας της μεθόδου υπολογίσαμε την επαναληψιμότητα (ακρίβεια των μετρήσεων κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας) και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (ακρίβεια των μετρήσεων σε διαδοχικές ημέρες) ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %) πέντε μετρήσεων σε συγκέντρωση 11,0  $\text{pmol L}^{-1}$  PVP<sub>10</sub>@AuNPs (5 nm). Η επαναληψιμότητα κυμάνθηκε μεταξύ 5,4-9,6% ενώ η αναπαραγωγιμότητα, υπολογιζόμενη από την ανάλυση ενός πρότυπου διαλύματος AuNPs για πέντε συνεχόμενες ημέρες, ήταν μικρότερη από 12,0%, γεγονός που απεικονίζει την καλή ακρίβεια της συνολικής διαδικασίας.

#### **1.3.14 Αξιολόγηση και εφαρμογή της μεθόδου**

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκε στον προσδιορισμό AuNPs σε πραγματικά δείγματα νερού με διαφορετική σύνθεση μήτρας (δηλαδή νερό βρύσης, νερό από ποτάμι, λίμνη και απόβλητα) εμβολιασμένα με τρεις διαφορετικές

συγκεντρώσεις PVP<sub>10</sub>@AuNPs. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3 δείχνουν ότι τα ποσοστά ανάκτησης κυμάνθηκαν μεταξύ 81,0% και 93,3% τα οποία μπορούν να θεωρηθούν ικανοποιητικά και εντός του εύρους τιμών που αναφέρθηκαν και από προηγούμενες μεθόδους (Hartmann G. and Schuster M., 2013, Li L. et al., 2012, Liu J.-F., Liu R., et al., 2009, Su S. et al., 2014, Tsogas G.Z. et al., 2014). Αυτό υποδεικνύει την καταλληλότητα της διαδικασίας για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό των AuNPs σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού.

Για τα δείγματα λυμάτων, διερευνήθηκε περαιτέρω εάν τα αποτελέσματα επηρεάζονται από συστηματικά σφάλματα που προκαλούνται από τις χημικές ή/και φυσικές ιδιότητες της μήτρας του δείγματος. Συνεπώς, εφαρμόστηκε εκχύλιση σημείου θόλωσης (CPE) ενός εμβολιασμένου δείγματος αποβλήτων (0,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $n=3$ ) σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε σε προηγούμενες μελέτες, (Hartmann G. and Schuster M., 2013, Tsogas G.Z. et al., 2014) και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της αναλυτικής μεθόδου που αναπτύχθηκε. Η απόκλιση μεταξύ των μέσων τιμών από τις δύο μεθόδους ήταν περίπου 13% που είναι αποδεκτή για ποσοτικοποίηση στα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης των AuNPs, λαμβάνοντας επίσης υπόψη την πολυδιασπορά των πρότυπων διαλυμάτων AuNPs που χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό και τη βαθμονόμηση της μεθόδου.

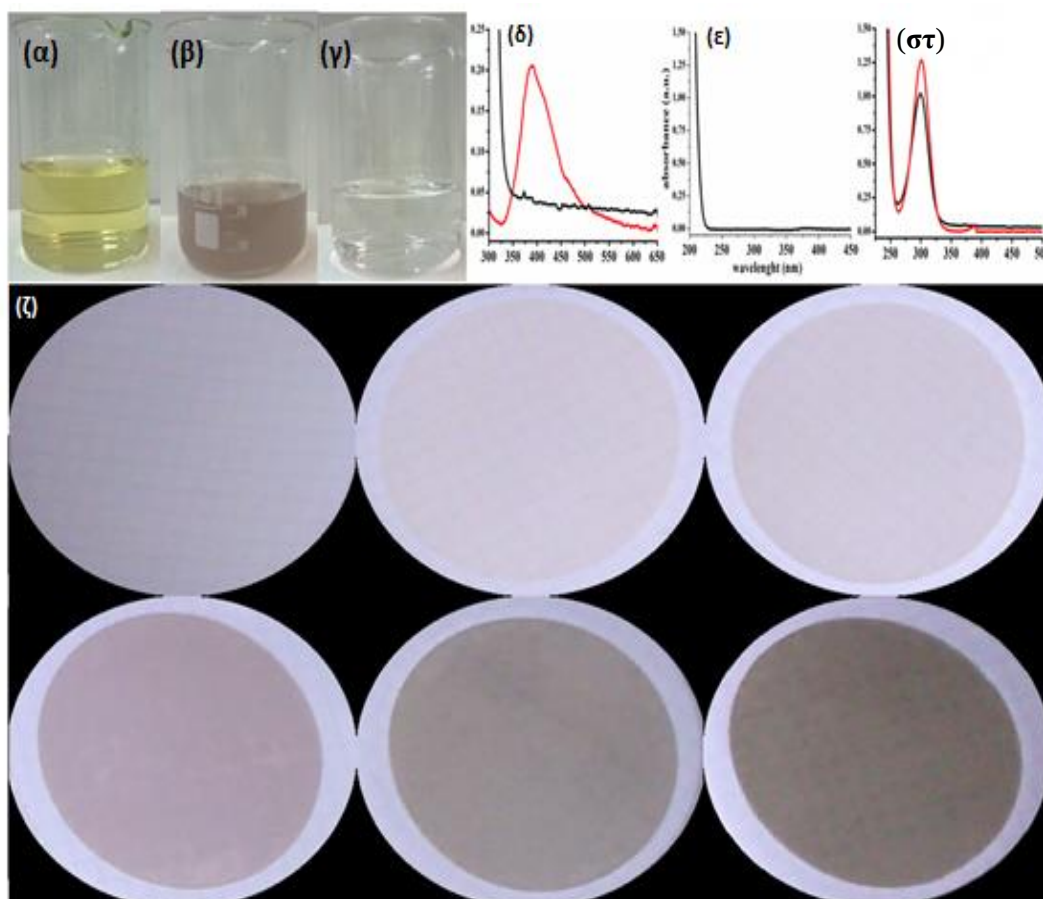
**Πίνακας 1.3.** Ανάκτηση των PVP<sub>10</sub>@AuNPs από εμβολιασμένα δείγματα νερού ( $n=3$ ).

| Δείγμα       | Μετρήθηκε<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | Προστέθηκε<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | Βρέθηκε ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | Σχετική<br>ανάκτηση (%) |
|--------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| Νερό βρύσης  | <L.O.D                                  | 1.0                                      | 0.91±0.11                          | 91.0                    |
|              |                                         | 3.7                                      | 3.2±0.2                            | 86.5                    |
|              |                                         | 7.5                                      | 7.0±0.4                            | 93.3                    |
| Νερό ποταμού | <L.O.D                                  | 1.0                                      | 0.90±0.08                          | 90.0                    |
|              |                                         | 3.7                                      | 3.3±0.4                            | 89.2                    |
|              |                                         | 7.5                                      | 7.0±0.5                            | 93.3                    |
| Νερό λίμνης  | <L.O.D                                  | 1.0                                      | 0.87±0.08                          | 87.0                    |
|              |                                         | 3.7                                      | 3.1±0.3                            | 83.0                    |
|              |                                         | 7.5                                      | 6.7±0.5                            | 88.0                    |
| Απόβλητα     | <L.O.D                                  | 1.0                                      | 0.81±0.10                          | 81.0                    |
|              |                                         | 3.7                                      | 3.0±0.3                            | 81.0                    |
|              |                                         | 7.5                                      | 6.3±0.6                            | 84.0                    |

\* Για τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με 1.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  AuNPs, εκχυλίστηκαν πρότυπα υδατικά διαλύματα AuNPs για τη βαθμονόμηση της μεθόδου (0.25-4.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) και διαλυτοποιήθηκαν σε 0.5 mL μεθανόλης: HNO<sub>3</sub>. Για μεγαλύτερα επίπεδα εμβολιασμού (3.7 και 7.5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), εκχυλίστηκαν πρότυπα υδατικά διαλύματα AuNPs (1.0-20.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) σε 2.5 mL μεθανόλης: HNO<sub>3</sub>. Οι υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες περιγράφονται στο κείμενο.

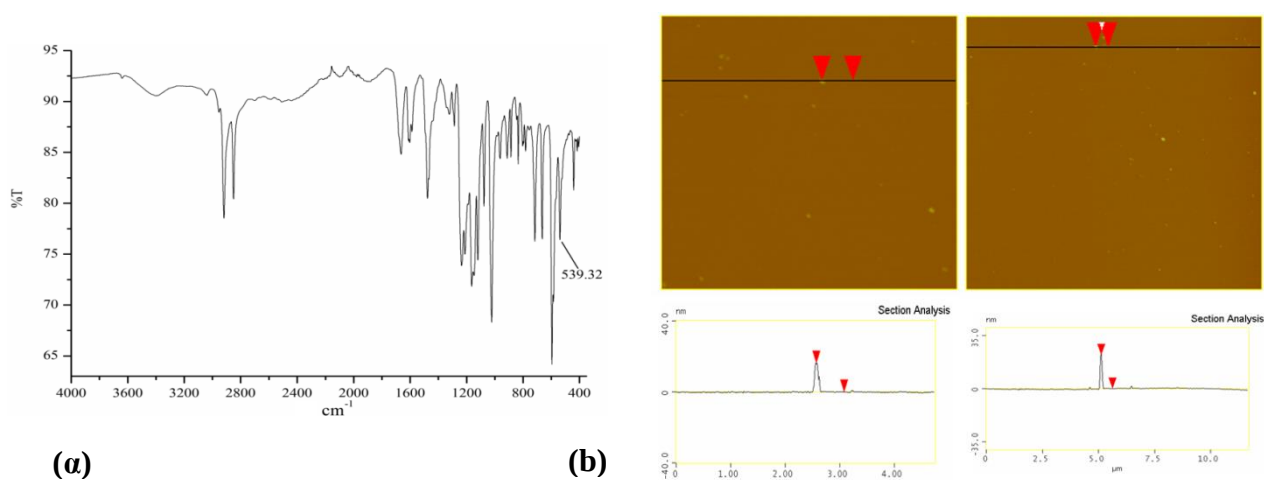
### 1.3.15 Εφαρμογή στην εκχύλιση και ανάκτηση νανοσωματιδίων αργύρου

Η μέθοδος εφαρμόστηκε επίσης για την εκχύλιση νανοσωματιδίων αργύρου. Η χαρακτηριστική εμφάνιση των φίλτρων μετά τη διήθηση υδατικών διαλυμάτων AgNPs αυξανόμενης συγκέντρωσης απεικονίζεται στο Σχήμα 1.8α-γ,η.



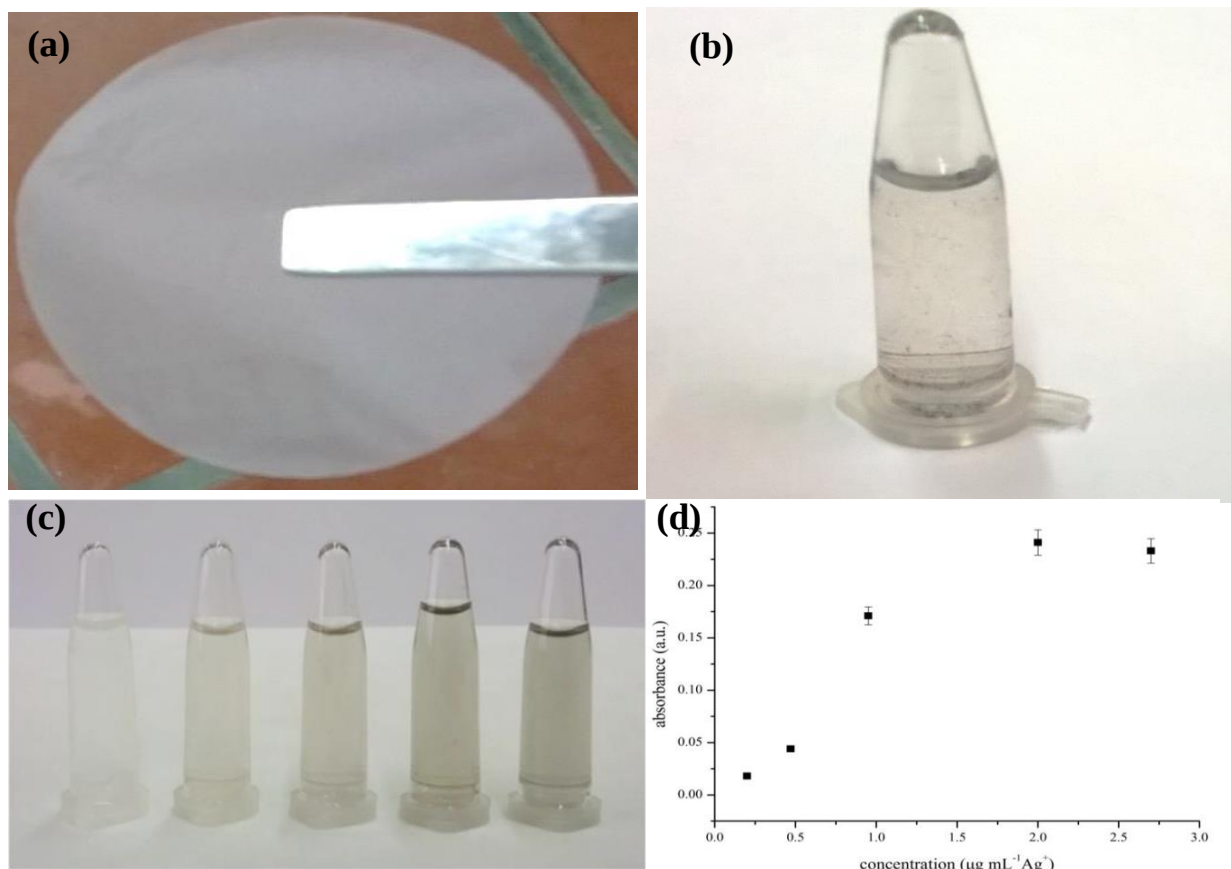
**Σχήμα 1.8.** Φωτογραφίες (α) υδατικού διαλύματος AgNPs, (β) υπερμοριακής φάσης σε υδατικό διάλυμα AgNPs (γ) διήθημα μετά από εκχύλιση. Φάσματα UV / Vis του (δ) υδατικού διαλύματος AgNPs (κόκκινη γραμμή) και του διηθήματος μετά από εκχύλιση (μαύρη γραμμή) (ε) 0.5 mM υδατικού διαλύματος CTAB (στ) 1.0 mM υδατικού διαλύματος σουλφοσαλικυλικού οξέος (κόκκινη γραμμή) (ζ) φίλτρα Millipore S-PAK που δείχνουν το υπερμοριακό υμένιο, μετά από συλλογή αυξανόμενων ποσοτήτων CA@AgNPs (από αριστερά προς τα δεξιά: 0, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 και 2,7 mg L<sup>-1</sup> Ag +). Οι φωτογραφίες έχουν περικοπώνται και μεγενθυθεί για λόγους ευκρίνειας.

Όπως φαίνεται, το υπερμοριακό αιώρημα και συνεπώς το εναποτιθέμενο υμένιο που περιέχει τα AgNPs αποκτά ένα καστανό-γκρίζο χρωματισμό ο οποίος αποδίδεται στην συσσωμάτωση των CA@AgNPs καθώς και στην αποσύνθεση τους σε νανοδομημένα οξείδια του αργύρου ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ). Αυτό επαληθεύθηκε περαιτέρω από τα φάσματα ATR-IR του εναποτιθέμενου υμένιου (μεμβράνης) που εμφανίζουν την ασυμπτωτική ζώνη του  $\text{Ag}_2\text{O}$  στα 539 nm [34,35] ενώ η απεικόνιση με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) απέδειξε την παρουσία συσσωματωμάτων νανο-αργύρου με κατανομή μέσου μεγέθους μεταξύ 16-22 nm (Σχήμα 1.9).



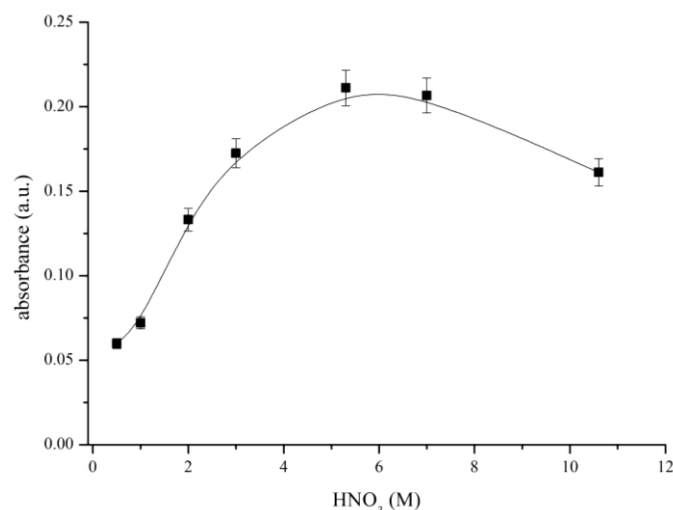
**Σχήμα 1.9.** (α) Φάσματα ATR-IR του αποξηραμένου υμενίου μετά την εκχύλιση AgNPs. Οι δονητικές αποδιεργασίες του CTAB, του SSA και του κιτρικού άλατος είναι όμοιες με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Huang L. et al., 2001, Lakshmanan B.R. et al., 1957, Pozdnyakov I. P. et al., 2006). (b) Εικόνες AFM και ανάλυση τομής για τον προσδιορισμό του μεγέθους των νανοσωματιδίων.

Με την προσθήκη ολικών οργανικών διαλυτών το υμένιο επανδιαλυτοποιείται και επαναιωρεί τα νανοσωματίδια του Ag που έχουν συλλεχθεί (Σχήμα 10b) τα οποία μπορούν να διασκορπιστούν πλήρως στο μεθανολικό στο διάλυμα υπό την επίδραση υπερήχων (Σχήμα 1.10c). Η απορρόφηση του μεθανολικού αιωρήματος στα 400 nm παρουσιάζεται στο Σχήμα 10δ και αυξάνει με την αρχική συγκέντρωση των AgNPs.



**Σχήμα 1.10.** (α) Λεπτό υμένιο (χωρίς AgNPs) που έχει στεγνώσει στον αέρα και έχει αποκολληθεί από το φίλτρο (β) Διαλυτοποίηση λεπτής μεμβράνης σε μεθανόλη που λαμβάνεται μετά την εκχύλιση ενός υδατικού διαλύματος που περιέχει  $2,7 \text{ mg L}^{-1} \text{Ag}^+$  (γ) Μεθανολικά εναιωρήματα των λεπτών υμενίων που απεικονίζονται στο Σχήμα 4ζ (εκτός από τη μεμβράνη στα  $0,2 \text{ mg L}^{-1} \text{Ag}^+$ ) που ελήφθησαν μετά από έκθεση σε ακτινοβολία υπέρυχων επί 10 δευτερόλεπτα. (δ) Ένταση απορρόφησης των μεθανολικών εναιωρημάτων του Σχήματος S4γ στα 400 nm.

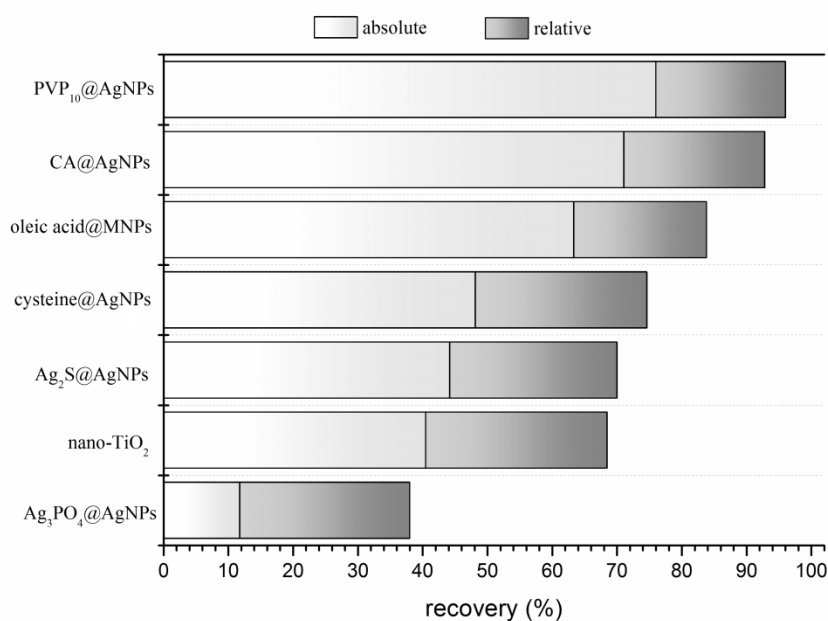
Για τον αναλυτικό προσδιορισμό των ιόντων  $\text{Ag}^+$ , η διαλυτοποίηση των AgNPs έγινε με κατεργασία του υμενίου με μεθανόλη- $\text{HNO}_3$ . Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, η διαλυτοποίηση του υμενίου με μικρούς όγκους έκλουσης (δηλ. 2,5 mL) αποτελούμενοι από μίγμα 1: 4 μεθανόλης - 5,5 M  $\text{HNO}_3$  (Σχήμα 1.11) για τουλάχιστον 30 λεπτά επιτρέπει την πλήρη διαλυτοποίηση των AgNPs.



**Σχήμα 1.11.** Διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης  $\text{HNO}_3$  στην αποτελεσματικότητα διαλυτοποίησης των συλλεχθέντων νανοσωματιδίων αργύρου σε ιονικό άργυρο.

Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκε εκχύλιση AgNPs από πρότυπα υδατικά διαλύματα. Η ένταση της απορρόφησης ήταν γραμμική σε περιοχή συγκεντρώσεων από 20 έως  $700 \mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ , σύμφωνα και την εξίσωση  $y = 7,5 \times 10^{-4} (\pm 1,5 \times 10^{-5}) \times C$  (ως  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}^+$ ) +  $6,3 \times 10^{-3} (\pm 2,8 \times 10^{-3})$ ,  $R^2 = 0.9980$  αποδίδοντας ένα όριο ανίχνευσης  $11,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (που ορίζεται ως ο τριπλάσιος λόγος σήματος προς θόρυβο) και αντιστοιχεί σε  $280 \text{ femtomol L}^{-1}$  (υπολογιζόμενη για AgNPs με μέση διάμετρο 20 nm). Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγικότητα στην ανάκτηση AgNPs, εκφραζόμενη ως η σχετική τυπική απόκλιση πέντε επαναλήψεων, κυμαινόταν μεταξύ 3,1 και 6,8% (επαναληψιμότητα) και 2,3-4,4% (αναπαραγωγικότητα), υποδεικνύοντας ότι η διαδικασία παρέχει πολύ καλή ακρίβεια στην ανάλυση AgNPs. Οι απόλυτες και σχετικές ανακτήσεις της μεθόδου χρησιμοποιώντας δείγματα νερού εμπλουτισμένα με διάφορους τύπους AgNPs, νανο- $\text{TiO}_2$  και μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου με υδρόφοβη επικάλυψη απεικονίζονται στο Σχήμα 1.12. Αυτές οι γραφικές παραστάσεις δείχνουν ότι η μέθοδος δεν είναι εκλεκτική για ένα είδος νανοσωματιδίων αλλά η απόδοση εκχύλισης κάθε νανοσωματιδίου ποικίλει ανάλογα με τη φύση και την επιφανειακή επικάλυψη νανοσωματιδίων. Με εξαίρεση τα νανοσωματίδια  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  οι απόλυτες ανακτήσεις κυμαίνονται μεταξύ 40-76% (ανοιχτόχρωμες μπάρες) ενώ οι σχετικές ανακτήσεις (σκουρόχρωμες μπάρες) κυμαίνονται μεταξύ 70-96%, οι οποίες

βρίσκονται εντός του πεδίου των τιμών που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες (Liu F. et al., 2009, Majedi M. et al., 2012, Nazar M.F., Shah S.S et al., 2011, Tsogas G.Z. et al., 2014).



**Σχήμα 1.12.** Απόλυτες και σχετικές ανάκτησες διαφόρων νανοσωματιδίων ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  μεταλλικού ιόντος) από υδατικά διαλύματα. Οι απόλυτες ανακτήσεις ορίζονται ως η % αναλογία των νανοσωματιδίων που εκχυλίζονται από το διάλυμα προς την αρχικά προστιθέμενη συγκέντρωση (δηλ. την ποσότητα των NPs που ανακτώνται από την μήτρα έναντι του προτύπου). Οι σχετικές ανακτήσεις ορίζονται ως η % αναλογία της συγκέντρωσης που βρίσκεται στα εμβολιασμένα υδατικά δείγματα με εκείνη που προσδιορίζεται μετά από εκχύλιση πρότυπων υδατικών διαλυμάτων (δηλαδή, ποσότητα NPs που ανακτάται από τη μήτρα έναντι εκχυλισμένου πρότυπου).

#### 1.4 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάστηκε μια νέα και απλή μέθοδος για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό νανοσωματιδίων (με έμφαση στα νανοσωματίδια ευγενών μετάλλων) από περιβαλλοντικά υδατικά δείγματα. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε βασίζεται στον σχηματισμό μίας υπερμοριακής φάσης (συσσωματώματος), που αποτελείται από πολυστρωματικά κυστίδια, η οποία χρησιμοποιείται ως κolloειδής φάση μικροεκχύλισης. Το υπερμοριακό συσσωμάτωμα συλλέγεται με τη μορφή ενός λεπτού υμενίου σε φίλτρο κυτταρίνης με απλή διήθηση και διαλυτοποιείται για να απελευθερώσει τα παγιδευμένα νανοσωματίδια. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μέθοδος μπορεί να προσυγκεντρώνει αποτελεσματικά τα τόσο νανοσωματίδια ευγενών μετάλλων (όπως AuNPs και AgNPs) όσο και άλλα νανοσωματίδια με διαφορετική επιφανειακή επικάλυψη και μέγεθος και με καλή εκλεκτικότητα έναντι των ιοντικών τους μορφών. Η μέση ανάκτηση των AuNPs που είχαν εμβολιαστεί σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού ήταν υψηλότερη από 87% με ικανοποιητική ακρίβεια (<12.0%) ενώ η ανάκτηση των AgNPs έφτανε το 75%. Βελτιωμένες ανακτήσεις επιτυγχάνονται αν υπολογιστούν ως σχετικές ανακτήσεις κάτι που ισχύει για τις περισσότερες μεθόδους μικροεκχύλισης και επιτυγχάνεται με την βαθμονόμηση της μεθόδου με πρότυπα διαλύματα που παρασκευάζονται με εκχύλιση προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΥΓΡΗ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΑΓΟΝΑΣ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΕΠΑΝΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σ' αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται μια μέθοδος μικροεκχύλισης υγρής φάσης για τον προσδιορισμό νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) σε περιβαλλοντικά δείγματα μέσω μικροεκχύλισης αιωρούμενου σταγονιδίου και φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης. Η μέθοδος βασίζεται στη διασπορά οκτανόλης σε σταγονίδια όπου τα AgNPs εκχυλίζονται από την κύρια υδατική φάση. Στη συνέχεια η οκτανόλη διασπείρεται και πάλι σε ισχυρά όξινο και οξειδωτικό υδατικό μέσο για την διάσπαση των AgNPs σε ιόντα αργύρου. Το υδατικό εκχύλισμα στη συνέχεια αναλύεται με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης. Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, η μέθοδος προσφέρει υψηλή εκλεκτικότητα για τα AgNPs, καθώς τα περισσότερα νανοσωματίδια δεν μπορούν να εκχυλιστούν στη φάση της οκτανόλης, ενώ η εκλεκτική διαδικασία επανεκχύλισης εξασφαλίζει ότι μόνο τα AgNPs διαλύονται στο τελικό μέσο εκχύλισης. Η μέθοδος λειτουργεί εξίσου καλά για AgNPs διαφορετικού μεγέθους και επικαλύψεων, επιτρέποντας έτσι τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης των AgNPs. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε διαφορετικά δείγματα νερού διαφορετικής πολυπλοκότητας με ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά το όριο ανίχνευσης (λιγότερο από 100 femto-mole AgNPs), ανακτήσεις (90-104%) και αναπαραγωγικότητα (μικρότερη από 7%).

## 2.1 Εισαγωγή

Κατά την τελευταία δεκαετία, οι τεχνολογίες που βασίζονται στα νανοϋλικά έχουν αναπτυχθεί σημαντικά και έχουν βρεί πληθώρα χρήσεων σε βιομηχανικές, ιατρικές, περιβαλλοντικές και ερευνητικές εφαρμογές. Η αυξανόμενη χρήση των νανοϋλικών όμως έχει εγείρει ανησυχίες σχετικά με τους κινδύνους που εγκυμονεί η απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον (Wagner S. et al., 2014). Ήδη, πολλές αρχές (π.χ. Ηνωμένα Έθνη) έχουν ταξινομήσει τα νανοσωματίδια ως αναδυόμενους ρύπους (United Nations Environment Programme: UNEP, 2007) με βάση τα οικοτοξικολογικά αποτελέσματα σε κύτταρα, μικροοργανισμούς ή ακόμη και σε ολόκληρους οργανισμούς (Hristozov D. and Malsch I., 2009, Oberdörster G. et al., 2005).

Το πρώτο βήμα για την εκτίμηση των επιπτώσεων των (μη φυσικών) νανοσωματιδίων (NPs) στο περιβάλλον είναι η παρακολούθηση των επιπέδων συγκέντρωσής τους σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα και ο προσδιορισμός των πηγών τους στο περιβάλλον (Wagner S. et al., 2014). Από αναλυτικής άποψης ο προσδιορισμός των NPs στα φυσικά ύδατα είναι εφικτός με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα συζευγμένο με φασματοσκοπία ατομικών μαζών (ICP-MS), η οποία είναι πολύ ευαίσθητη και ισχυρή τεχνική στην στοιχειακή ανάλυση. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις των μεταλλικών νανοσωματιδίων βρίσκονται ακόμη σε πολύ χαμηλά επίπεδα και η μήτρα του δείγματος είναι συχνά υπερβολικά πολύπλοκη για άμεση ανάλυση (Hartmann G. et al., 2014, Su S. et al., 2014). Επιπλέον, η τεχνική ICP-MS καθώς και άλλες τεχνικές ατομικής φασματοσκοπίας δεν μπορούν να διακρίνουν τα μεταλλικά νανοσωματίδια και τα αντίστοιχα ιόντα τους. Έτσι, τα διαλυμένα ιόντα κατά την εκχύλιση, συν-προσδιορίζονται μαζί με τα αντίστοιχα νανοσωματίδια προκαλώντας θετικό σφάλμα στην μέτρηση (Hartmann G. et al., 2014, Su S. et al., 2014). Για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί, αναπτύχθηκαν ειδικές ενόργανες διατάξεις όπως μονοσωματιδιακό (single particle) ICP-MS (Laborda F. et al., 2011), συζευγμένες μέθοδοι που χρησιμοποιούν φυσικό διαχωρισμό των νανοσωματιδίων από το δείγμα όπως η κλασματική ροή πεδίου (ασύμμετρης και κανονικής ροής) (Mitrano D.M. et al., 2012) ή η υδροδυναμική χρωματογραφία (Tiede K. et al., 2010) συζευγμένη με ICP-MS (Touriniemi J. et al., 2012). Επιπροσθέτως, λόγω των πολύ

χαμηλών επιπέδων συγκέντρωσης και της πολύπλοκης μήτρας των περιβαλλοντικών δειγμάτων, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων βασισμένες στην εκχύλιση στερεής ή υγρής φάσης. Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν όχι μόνο τον διαχωρισμό των ιόντων από τα μεταλλικά NPs, αλλά μπορούν επίσης να απαλλάξουν το δείγμα από σύνθετα στοιχεία της μήτρας του δείγματος και να πραγματοποιήσουν προσυγκέντρωση των νανοσωματιδίων. Η εκχύλιση σημείου νεφέλωσης (CPE) είναι αυτή τη στιγμή η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος εκχύλισης νανοσωματιδίων λόγω της απλότητας της, της ικανότητας να εκχυλίζει και να προσυγκεντρώνει διάφορα είδη νανοσωματιδίων (οργανικής και ανόργανης φύσης) και της συμβατότητάς της με πολλούς ανιχνευτές ατομικής και μοριακής φασματοσκοπίας) (Hartmann G. et al., 2013, Liu J.-F. et al., 2009, Majedi S.M. et al., 2012, Mandyla S.P. et al., 2017, Tsogas G.Z. et al., 2014). Μέθοδοι που χρησιμοποιούν στερεούς ροφητές έχουν επίσης αναπτυχθεί με βάση την εκχύλιση στερεής φάσης σε ροφητές C18 (Li L. and Leopold K., 2012), προσρόφηση σε ιοντοανταλλακτικές ρητίνες (Li L. et al., 2012), εκχύλιση σε τροποποιημένα μαγνητικά νανοσωματίδια (Su S. et al., 2014) καθώς και σε μονολιθικές στήλες επικαλυμμένες με πολυμερή (Zhang L. et al., 2015).

Μια άλλη κατηγορία μεθόδων προκατεργασίας δειγμάτων που δοκιμάστηκαν για την εκχύλιση και την προσυγκέντρωση των νανοσωματιδίων από υδατικά δείγματα είναι αυτές που βασίζονται στις αρχές της μικροεκχύλισης υγρής φάσης.

Ωστόσο, η εφαρμογή τους είναι ακόμη πολύ περιορισμένη (Majedi S.M. and Lee H.K., 2016), ειδικά σε σύγκριση με τις τεράστιες εφαρμογές τους στην ανάλυση οργανικών και ανόργανων ρύπων. Ένα σημαντικό εμπόδιο στη χρήση τους είναι ότι τα νανοσωματίδια δεν μπορούν να φτάσουν σε θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων (δηλ. νερό και μη πολικό διαλύτη), όπως συμβαίνει με οργανικά μόρια ή χηλικές ενώσεις και επομένως δεν μπορούν να εκχυλιστούν ποσοτικά σε μη πολικούς διαλύτες (Praetorius A. et al., 2014). Η χημική τροποποίηση της επιφάνειας των NPs με υδρόφοβους υποκαταστάτες (Majedi S.M. et al., 2013) ή η γαλακτωματοποίηση με τη βοήθεια επιφανειοδραστικών (Liu Y. et al., 2016), έχουν χρησιμοποιηθεί για να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο και να επιτραπεί η μεταφορά των NPs σε ένα μη πολικό οργανικό διαλύτη ο οποίος στη

συνέχεια συλλέγεται και χρησιμοποιείται για ανάλυση. Τα ιοντικά ζεύγη επιφανειοδραστικών συσσωματωμάτων (Choleva T.G. et al., 2016) ή τα ιοντικά υγρά (Chen S. et al., 2016, López-Lorente A.I. et al., 2012) είναι επίσης μια αποτελεσματική εναλλακτική λύση έναντι των γαλακτωμάτων ή των συμβατικών μη πολικών διαλυτών. Στις περισσότερες από αυτές τις μεθόδους όμως απαιτείται χώνευση του τελικού εκχυλίσματος πριν την μέτρηση, διαδικασία που μειώνει τον συντελεστή προσυγκέντρωσης (δηλ. το εκχύλισμα αραιώνεται από λίγα mL εκχυλίσματος σε αρκετά mL τελικού όγκου), είναι σχετικά χρονοβόρο και απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό (οβίδες και διατάξεις εκχύλισης με μικροκύματα).

Στο κεφάλαιο αυτό, περιγράφουμε για πρώτη φορά μια μέθοδο άμεσης μικροεκχύλισης υγρής φάσης για την εκχύλιση και τον εμπλουτισμό μεταλλικών νανοσωματιδίων από υδατικά δείγματα. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη μικροεκχύλιση διασποράς σταγόνas (Dispersive Suspended Microextraction - DSME) (Yang Z.-H. et al., 2011) νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) από την κύρια υδατική φάση και την επανεκχύλιση σε ένα ισχυρά οξειδωτικό μέσο όπου τα AgNPs διαλυτοποιούνται στα πρόδρομα μεταλλικά ιόντα (δηλαδή, ιόντα  $\text{Ag}^+$ ). Η μέθοδος βελτιστοποιήθηκε για τον εκλεκτικό εμπλουτισμό των AgNPs από μεγάλους όγκους δειγμάτων (σε σύγκριση με εκείνους που τυπικά χρησιμοποιούνται σε μικροεκχύλιση υγρής φάσης διασπειρόμενης σταγόνas) και εφαρμόστηκε, στην ανάλυση των AgNPs σε εμβολιασμένα υδατικά δείγματα με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης (AAS) με ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τη γραμμικότητα, την αναπαραγωγικότητα και τα ποσοστά ανάκτησης.

## **2.2. Υλικά και μέθοδοι**

### **2.2.1. Αντιδραστήρια και υλικά**

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας. Προμηθευτήκαμε το νιτρικό άργυρο από την Acros Organics (Geel, Βέλγιο). Το βοροϋδρίδιο του νατρίου, το κιτρικό τρινάτριο, το χουμικό οξύ (HA), την πυρρολιδόνη ( $\text{PVP}_{10}$ , μέσο μοριακό βάρος MW 10.000), το εννεαένυδρο θειούχο νάτριο, το νιτρικό νάτριο, η L-κυστεΐνη και το νιτρικό οξύ υψηλής καθαρότητας για ανάλυση ανόργανων ιχνών (TraceSELECT® Ultra) ελήφθησαν από την Sigma-Aldrich

(Steinheim, Germany). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (30%, Perhydrol) αγοράστηκε από την Merck (Darmstadt, Γερμανία). Τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου (35-100 nm) και τα νανοσωματίδια οξειδίου του χαλκού (μέγεθους σωματιδίων <50 nm) αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich. Αιωρήματα συγκέντρωσης 10 mg L<sup>-1</sup> παρασκευάστηκαν σε νερό. Αμέσως πριν από την ογκοληψία, το κάθε αιώρημα αναδεύτηκε έντονα για 2 λεπτά και ακολούθησε έκθεση σε λουτρό υπερήχων για άλλα 2 λεπτά για την πλήρη αιώρηση των νανοσωματιδίων και την ομογενοποίηση του αιωρήματος.

### **2.2.2. Οργανολογία**

Ένα φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης Shimadzu AA-6800 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) με λυχνία κοίλης καθόδου που λειτουργούσε στα 10 mA χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μετρήσεις που έγιναν στα 328,1 nm με διόρθωση υποβάθρου D2. Για τους υπερήχους χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων Elmasonic S 30 (Elma, Singen, Germany).

### **2.2.3. Σύνθεση AgNPs**

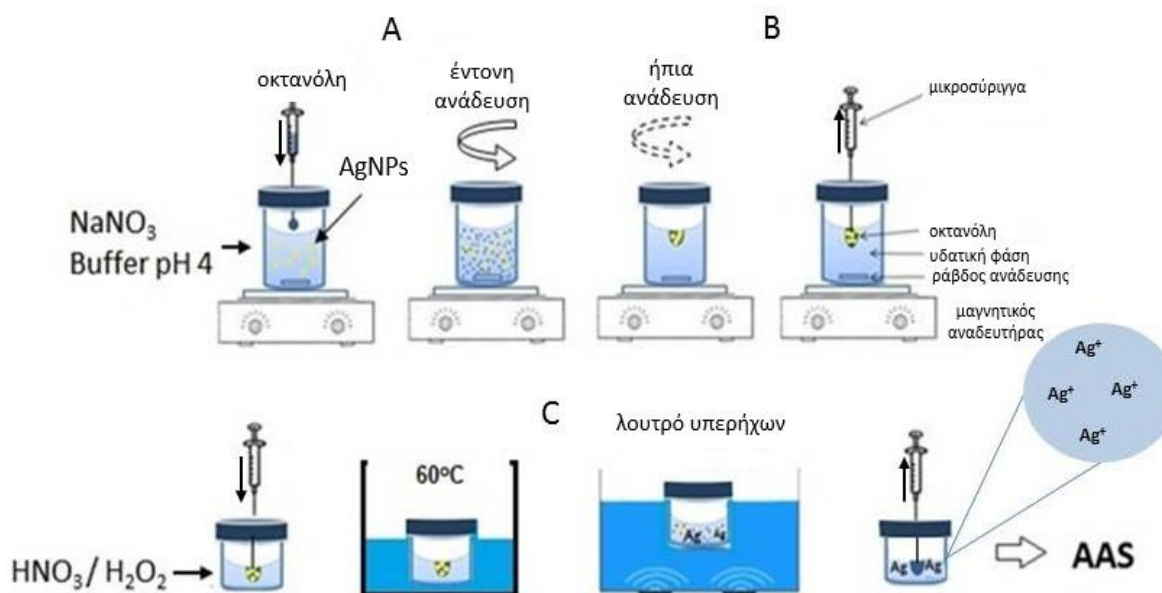
Η σύνθεση των AgNPs (5 nm) πραγματοποιήθηκε με αναγωγή AgNO<sub>3</sub> 0.25 mM με NaBH<sub>4</sub> 1 mM παρουσία 0,25 mM κιτρικού νατρίου ως σταθεροποιητή, σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία (Pinto V.V. et al., 2010). Η συγκέντρωση των AgNPs στο αιώρημα ήταν 41,5 nM και υπολογίστηκε σύμφωνα με τις εξισώσεις που περιγράφονται από τον Liu et. al. (Liu X. et al., 2007) και Xu et.al (Xu X.-H.N. et al., 2004). Χρησιμοποιώντας τα AgNPs ως αρχικό υλικό, παρασκευάστηκαν PVP-AgNPs, Cysteine-AgNPs, Ag<sub>2</sub>S-NPs και Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-NPs σύμφωνα με πειραματικές διαδικασίες βιβλιογραφικών αναφορών (Hartmann G. et al., 2014). Όλα τα εναιωρούμενα AgNPs χρησιμοποιήθηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους για να ελαχιστοποιηθεί η επαναδιαλυτοποίηση του Ag, κάτι που θα μπορούσε να ερμηνευτεί εσφαλμένα ως μειωμένη ανάκτηση. Όταν αυτό δεν ήταν εφικτό τα εναιωρήματα αποθηκεύονταν στους 4 °C προστατευμένα από την έκθεση σε φως για λιγότερο από 24 ώρες. Η συγκέντρωση του Ag<sup>+</sup> σε κάθε αιώρημα AgNP

προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με ατομοποίηση φλόγας (Flame AAS) μετά από διαλυτοποίηση των AgNPs με  $\text{HNO}_3$ .

### 2.3 Πειραματική πορεία

Στο σχήμα 2.1 απεικονίζεται γραφικά η διαδικασία DSME για τον προσδιορισμό των AgNPs. Λεπτομερέστερα, υδατικό δείγμα που περιείχε AgNPs μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως. Η ιοντική ισχύς του διαλύματος ρυθμίστηκε με  $\text{NaNO}_3$  70mM με και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 4,0 με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος /οξικού νατρίου 90 mM. Στη συνέχεια προστέθηκε 1,0 ml οκτανόλης ως διαλύτης εκχύλισης. Για το στάδιο της εκχύλισης, το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα και ακολούθησε ανάδευση στις 1000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά. Κατά την ανάδευση, έγινε διασπορά της οκτανόλης σε μικρά σταγονίδια σχηματίζοντας ένα θολό διάλυμα και τα AgNPs εκχυλίστηκαν στη διεπιφάνεια οκτανόλης / νερού των σταγονιδίων. Μετά το στάδιο εκχύλισης, ο ρυθμός της ανάδευσης μειώθηκε στις 200 στροφές/λεπτό έτσι ώστε να σχηματιστεί μια σταθερή και ήπια δίνη. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, τα διασκορπισμένα σταγονίδια ανασυστάθηκαν στην κορυφή της δίνης μετά από 10 λεπτά. Σταματώντας την ανάδευση, η οργανική φάση επέπλεε στην επιφάνεια του δείγματος. Στο στάδιο της επανεκχύλισης, ο διαλύτης που επέπλεε στην επιφάνεια του υδατικού διαλύματος, απομακρύνθηκε με σύριγγα. Υπολείμματα του νερού που συλλέχθηκαν μαζί με την οκτανόλη, απορρίφθηκαν από την σύριγγα και στη συνέχεια η οκτανόλη μεταφέρθηκε σε άλλο φιαλίδιο που περιείχε 0,5 mL διαλύματος  $\text{HNO}_3$  /  $\text{H}_2\text{O}_2$  (που παρασκευάστηκε με ανάμιξη 4 mL  $\text{HNO}_3$  8M και 1 mL 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Το διάλυμα καλύφθηκε και θερμάνθηκε για 30 λεπτά στους 60 °C (με ανάμιξη και εξαέρωση για την απελευθέρωση αερίων που παράγονται από τη διάσπαση του  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε λουτρό υπερήχων για 25 λεπτά. Κατά τη διάρκεια του σταδίου επανεκχύλισης, ο διαλύτης επαναδιασκορπίζεται σε μικρά σταγονίδια εντός του ισχυρά όξινου και οξειδωτικού μέσου με αποτέλεσμα τα AgNPs να διασπώνται στα πρόδρομα ιόντα  $\text{Ag}^+$  και να μεταφέρονται στην υδατική φάση. Στη συνέχεια το διάλυμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ανασυσταθεί η φάση οκτανόλης και να

σχηματιστούν ξανά οι δύο φάσεις. Ο διαλύτης αφαιρέθηκε με σύριγγα και η υδατική φάση χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με ατομοποίηση φλόγας (FAAS).



**Σχήμα 2.1.** Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής πορείας υγρής μικροεκχύλισης αιωρούμενου σταγονιδίου και επανεκχύλισης με οξειδωτική διαλυτοποίηση των AgNPs (στάδιο A: εκχύλιση, στάδιο B: επανασύσταση, στάδιο C: επανεκχύλιση και διαλυτοποίηση).

## 2.4 Πραγματικά δείγματα

Δείγματα νερού (νερό βρύσης και ποταμού) και δείγματα αποβλήτων, συλλέχθηκαν σε καθαρές φιάλες πολυπροπυλενίου και διηθήθηκαν μέσω φίλτρων  $0,45\ \mu\text{m}$  για να απομακρυνθούν τα αιωρούμενα στερεά. Τα δείγματα εμβολιάστηκαν με γνωστές συγκεντρώσεις PVP-AgNPs και αναλύθηκαν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε.

## 2.5 Αποτελέσματα και συζήτηση

Ένας σημαντικός παράγοντας για την επιτυχημένη εφαρμογή της μικροεκχύλισης αιωρούμενου σωματιδίου, είναι η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης. Ο οργανικός διαλύτης πρέπει να είναι μη αναμίξιμος με νερό, να έχει χαμηλότερη πυκνότητα από το νερό προκειμένου να επιπλέει στην επιφάνεια του υδατικού δείγματος και να έχει χαμηλή πτητικότητα για την αποφυγή εξάτμισης του διαλύτη κατά την εκχύλιση. Εξετάστηκαν τρεις διαλύτες που ικανοποιούν αυτά τα κριτήρια: η οκτανόλη, το τολουόλιο και το εξάνιο. Αυτοί οι διαλύτες έχουν σχετικά παρόμοια πυκνότητα αλλά οι δείκτες ιξώδους και πολικότητας διαφέρουν σχεδόν κατά μία τάξη μεγέθους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα AgNPs μπορούν να εκχυλιστούν τόσο σε τολουόλιο όσο και σε οκτανόλη, αλλά όχι σε εξάνιο. Αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε οκτανόλη επειδή τα σήματα ήταν ελαφρώς υψηλότερα από αυτά που ελήφθησαν με το τολουόλιο και λόγω της μικρότερης τοξικότητάς της.

Η κατανομή των νανοσωματιδίων στην οκτανόλη έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία προκειμένου να υπολογιστούν οι συντελεστές κατανομής οκτανόλης-νερού ( $K_{ow}$ ) οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη μελέτη της μεταφοράς και κατανομής των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον (Hristovski K.D. et al., 2011, Praetorius A. et al., 2014). Από αυτές τις μελέτες κατέστη σαφές ότι τα νανοσωματίδια δεν μπορούν να φτάσουν σε θερμοδυναμική ισορροπία δια της κατανομής μεταξύ δύο φάσεων (δηλ. μιας μη πολικής φάσης οργανικού διαλύτη και νερού), όπως συμβαίνει με τα μη ιονισμένα οργανικά μόρια. Οι οργανικές ενώσεις μπορούν να φτάσουν σε θερμοδυναμική ισορροπία επειδή μπορούν να διασπαρθούν μεταξύ των δύο φάσεων, κάτι που ευνοείται από την ελεύθερη ενέργεια Gibbs. Τα νανοσωματίδια, από την άλλη, μπορούν να προσκολληθούν σε μια διεπιφάνεια υγρού-υγρού, επειδή αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ελεύθερης ενέργειας τους (σε σύγκριση με τα νανοσωματίδια που έχουν παραμείνει στην κύρια ρευστή μάζα), αλλά δεν μπορούν να διασχίσουν τη διεπιφάνεια υγρού-υγρού γιατί αυτό απαιτεί την υπέρσχυση σημαντικών τριχοειδών και ιξωδών δυνάμεων (Praetorius A. et al., 2014, Sinha A. et al., 2013). Ως αποτέλεσμα, τα μεταλλικά νανοσωματίδια, όπως τα AgNPs, σχηματίζουν μια τρίτη φάση στη διεπιφάνεια μεταξύ οκτανόλης και νερού

(Balmes O. et al., 2006, Clarkson J. et al., 1991, Kralchevsky P. and Nagayama K., 2001, Yogev D. and Efrima S. 1991α, Yogev D. and Efrima S. 1991β). Οι συνθήκες έντονης ανάδευσης που εφαρμόζονται στη DSME παρέχουν αρκετή εξωτερική ενέργεια που μειώνει την ελεύθερη ενέργεια των νανοσωματιδίων (Hristovski K.D. et al., 2011, Praetorius A. et al., 2014) επιτρέποντας στα AgNPs να διαπεράσουν τη διεπιφάνεια υγρού-υγρού. Ωστόσο, δεν μπορούν να κατανεμηθούν ομοιογενώς στη φάση οκτανόλης. Αντ' αυτού, σχηματίζουν συσσωματώματα που βρίσκονται κοντά στην διεπιφάνεια οκτανόλης-νερού. Αυτό παρατηρήθηκε πειραματικά σε υψηλές συγκεντρώσεις AgNPs όπου τα συσσωματώματα των AgNPs ήταν ορατά στη φάση της οκτανόλης δια γυμνού οφθαλμού.

Η μείωση της ελεύθερης ενέργειας των νανοσωματιδίων, που διευκολύνει τον διαχωρισμό τους στη διεπιφάνεια διαλυτών μη-αναμίξιμων με νερό επηρεάζεται από τις ιδιότητες των νανοσωματιδίων και του περιβάλλοντος μέσου (π.χ. μέγεθος σωματιδίων, ζήτα δυναμικό, σύσταση ηλεκτρολύτη κλπ) και στην παροχή εξωτερικής ενέργειας (Hristovski K.D. et al., 2011, Praetorius A. et al., 2014). Επομένως, παράγοντες όπως το μέγεθος και το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων, η ιοντική ισχύς, ο όγκος της οκτανόλης, ο χρόνος αντίδρασης και ο ρυθμός ανάδευσης επηρεάζουν την κατανομή των AgNPs. Λαμβάνοντας αυτούς τους παράγοντες υπόψιν, η εκχύλιση των AgNPs μέσω της DSME βελτιστοποιήθηκε μελετώντας την επίδραση του pH και της ιοντικής ισχύος του δείγματος, του χρόνου ανάδευσης, του όγκου της οκτανόλης και της ταχύτητας ανάδευσης. Λόγω των χαμηλών επιπέδων συγκέντρωσης των AgNPs στα περιβαλλοντικά δείγματα, η βελτιστοποίηση της DSME πραγματοποιείται στα 35 mL υδατικού δείγματος προκειμένου να επιτευχθεί επαρκής εμπλουτισμός με AgNPs.

### **2.5.1 Επίδραση pH και ιοντικής ισχύος**

Τόσο το pH όσο και η ιοντική ισχύς παίζουν σημαντικό ρόλο στο διαχωρισμό των AgNPs στη διεπιφάνεια οκτανόλης/νερού καθώς συνδράμουν στην εξουδετέρωση του επιφανειακού φόρτου των NPs και την συμπύκνωση της ηλεκτρικής τους διπλοστιβάδας (Hristovski K.D. et al., 2011). Προκαταρκτικές έρευνες με αραιό οξικό οξύ και NaOH έδειξαν ότι οι όξινες τιμές του pH ευνοούν τη διασπορά των AgNPs

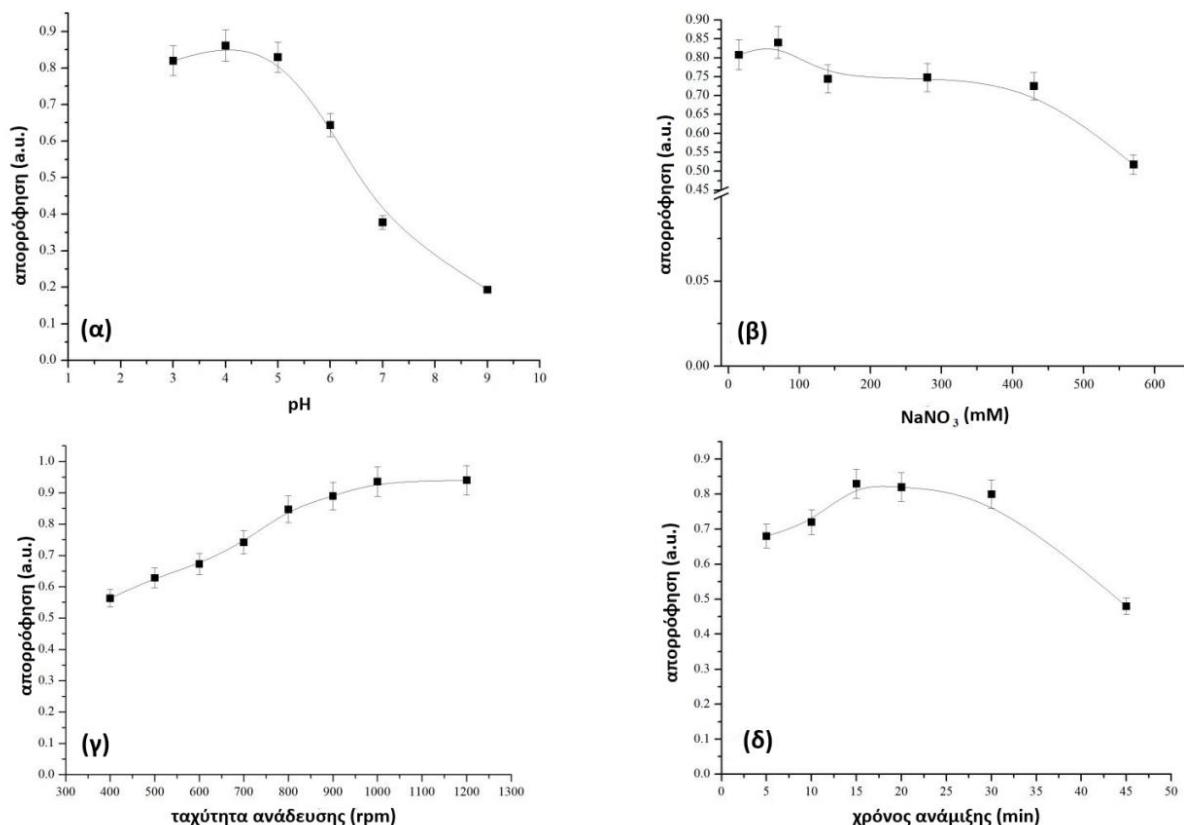
επικαλυμμένων με κιτρικά, στα σταγονίδια οκτανόλης επειδή οι χαμηλές τιμές pH μπορούν να εξουδετερώσουν το αρνητικό φορτίο των καρβοξυλικών ομάδων των κιτρικών ιόντων που υπάρχουν στην επιφάνεια των AgNPs. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης όταν η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος / οξικού νατρίου, λόγω της αύξησης της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος από 15 mM έως 90 mM το σήμα της απορρόφησης σχεδόν διπλασιάστηκε, ενώ δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω βελτίωση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος. Συνεπώς, το pH του διαλύματος εκτιμήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος / οξικού νατρίου (90 mM) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 2α. Τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν σε pH 4.

Η επίδραση της ιοντικής ισχύος μελετήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας  $\text{NaNO}_3$  σε συγκεντρώσεις μεταξύ 15 και 600 mM (επιπροσθέτως του ρυθμιστικού διαλύματος). Στο Σχήμα 2β φαίνεται ότι το  $\text{NaNO}_3$  επιφέρει μικρή βελτίωση σε συγκέντρωση 70 mM αλλά δεν έχει σημαντική επίδραση στην απόδοση της εκχύλισης σε συγκεντρώσεις μέχρι 450 mM. Ως εκ τούτου, προστέθηκαν επιπλέον 70 mM  $\text{NaNO}_3$  για να αυξηθεί στο μέγιστο η απόδοση της εκχύλισης.

### **2.5.2 Επίδραση του χρόνου εκχύλισης και της ταχύτητας ανάδευσης**

Η εκχύλιση με DSME ολοκληρώνεται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η εκχύλιση των αναλυτών στα σταγονίδια του διαλύτη και το δεύτερο στάδιο είναι η επανασύσταση του διαλύτη (που περιέχει τους αναλύτες στόχους) για περαιτέρω ανάλυση. Το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται με εφαρμογή υψηλής ταχύτητας ανάδευσης έτσι ώστε η οκτανόλη να διασπείρεται σε σταγονίδια υπό συνεχιζόμενη και έντονη ανάδευση. Από τα αποτελέσματα του Σχήματος 2.2γ συμπεραίνουμε ότι απαιτείται ταχύτητα ανάδευσης 1000 στροφές/λεπτό, ενώ οι χαμηλότερες ταχύτητες ανάδευσης δεν ευνοούν την εκχύλιση των AgNPs στη διεπιφάνεια οκτανόλης/νερού. Σύμφωνα με το γράφημα που παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.2δ, η ανάδευση σε 1000 στροφές/λεπτό θα πρέπει να εφαρμόζεται για τουλάχιστον 15 λεπτά ενώ σε μεγάλους χρόνους εκχύλισης το σήμα τελικά μειώνεται. Αυτό μπορεί

να αποδοθεί στην αστάθεια των σταγονιδίων οκτανόλης και στο γεγονός ότι κατά την παρατεταμένη ανάδευση σε υψηλή ταχύτητα, τα AgNPs αποσπώνται από τη διεπιφάνεια οκτανόλης/ νερού και απελευθερώνονται στην υδατική φάση.

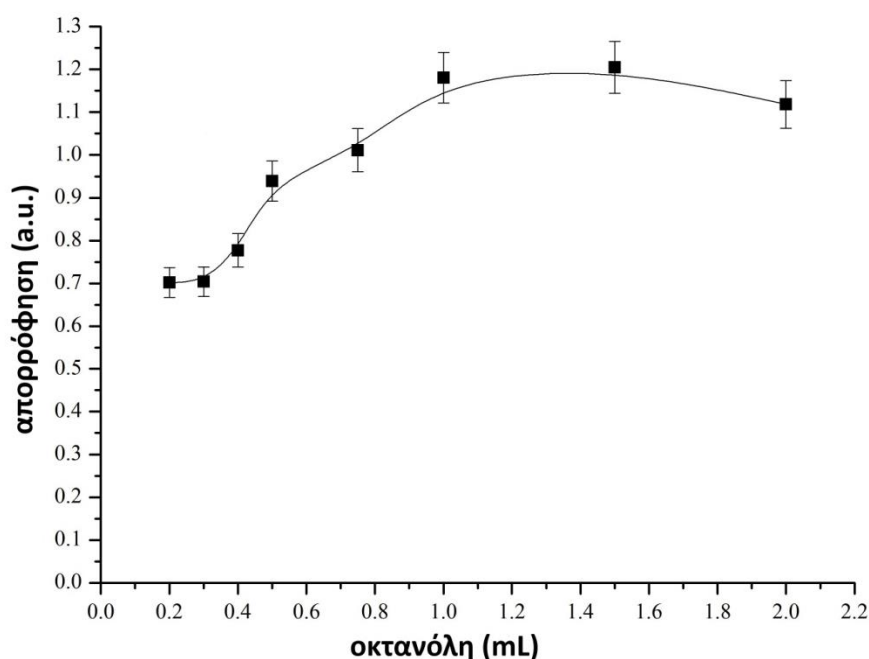


**Σχήμα 2.2.** Βελτιστοποίηση (α) pH (β) NaNO<sub>3</sub> (γ) ταχύτητας ανάδευσης και (δ) χρόνου ανάμιξης κατά την εκτέλεση της μεθόδου. Πειραματικές συνθήκες: οκτανόλη 1 mL, όγκος διαλύματος επανεκχύλισης: 2,5 mL, AgNPs = 0,6 nM (0,36 mg L<sup>-1</sup> Ag<sup>+</sup>).

### 2.5.3 Επίδραση του όγκου της οκτανόλης

Προκειμένου να αυξηθεί στο μέγιστο η κατανομή των AgNPs στη διεπιφάνεια, μελετήθηκαν διάφοροι όγκοι οκτανόλης (0,2-2 mL). Οι όγκοι αυτοί είναι σημαντικά μεγαλύτεροι από αυτούς που χρησιμοποιούνται σε άλλες μεθόδους DSME, αλλά ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιήσαμε ήταν επίσης μεγαλύτερος (δηλαδή 35 mL) προκειμένου να επιτευχθεί υψηλότερος συντελεστής προσυγκέντρωσης λαμβάνοντας υπόψη τα χαμηλά επίπεδα AgNPs στα

περιβαλλοντικά δείγματα. Με την αύξηση του όγκου της οκτανόλης, τα σήματα απορρόφησης αυξήθηκαν και πρακτικά έφτασε σε ανώτατο όριο σε 1 mL (Σχήμα 2.3). Αυτό δεν παρατηρείται σε άλλες μεθόδους DMSE, όπου μεγαλύτεροι όγκοι διαλύτη, μειώνουν τα αναλυτικά σήματα των αναλυτών λόγω της μεγαλύτερης αραίωσης. Σε αυτήν την μέθοδο όμως, ο διαλύτης δεν χρησιμοποιήθηκε απευθείας για ανάλυση αλλά, επανεκχυλίστηκε σε ορισμένο όγκο ενός υδατικού οξειδωτικού διαλύματος. Συνεπώς, ανεξάρτητα από τον όγκο της οκτανόλης, οι αναλύτες επανεκχυλίστηκαν στον ίδιο τελικό όγκο του διαλύματος εκχύλισης πριν από την ανάλυση.



**Σχήμα 2.3.** Επίδραση του όγκου της οκτανόλης στην εκχύλιση των AgNPs. Πειραματικές συνθήκες: pH = 4 (ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος/οξικού νατρίου 90 mM), 70 mM NaNO<sub>3</sub>, ανάδευση στις 1000 rpm για 15 λεπτά, επανεκχύλιση σε 2,5 mL HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

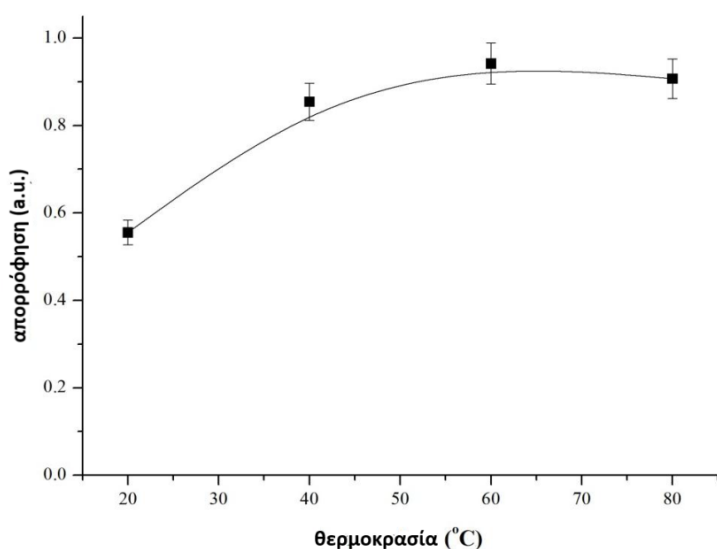
#### 2.5.4 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση του σταδίου επανεκχύλισης με οξειδωτική διαλυτοποίηση των AgNPs.

Μετά την διασπορά των AgNPs στη διεπιφάνεια οκτανόλης/νερού, σχηματίστηκαν μεγάλα συσσωματώματα τα οποία, σε υψηλές συγκεντρώσεις AgNPs, ήταν ορατά δια γυμνού οφθαλμού. Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με το υψηλό ιξώδες της οκτανόλης, μας εμπόδισε από το να αναρροφήσουμε τη φάση οκτανόλης απευθείας στον εκνεφωτή της FAAS. Αντ' αυτού, προσπαθήσαμε να εξατμίσουμε την οκτανόλη και να επαναδιαλυτοποιήσουμε το υπόλειμμα σε πολικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, μεθανόλη/ $\text{HNO}_3$  1M και  $\text{HNO}_3$  1M ώστε να επαναδιαλυτοποιηθούν τα AgNPs και να πραγματοποιηθεί η ανάλυση. Ωστόσο, παρατηρήσαμε ότι η εξάτμιση προκαλεί σημαντικές απώλειες AgNPs για λόγους που δεν μπόρεσαν να αποσαφηνιστούν.

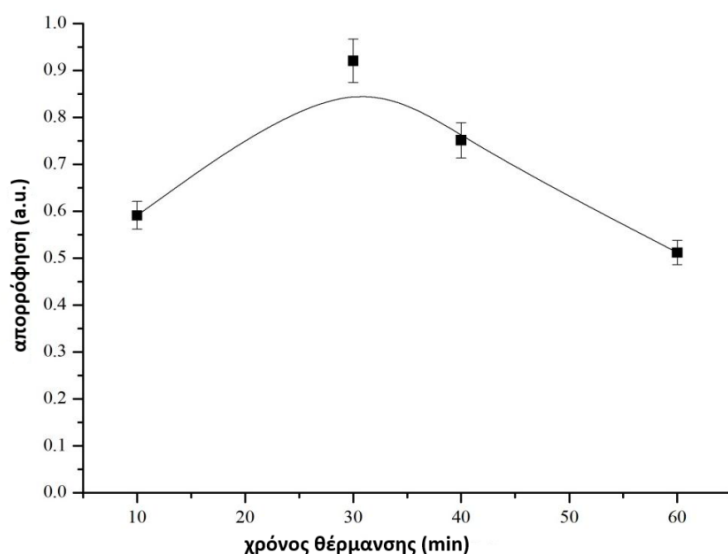
Για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί, αναπτύξαμε μια νέα διαδικασία που βασίζεται στη διαλυτοποίηση και την επανεκχύλιση των AgNPs σε ένα υδατικό διάλυμα το οποίο περιέχει ένα ισχυρώς όξινο και οξειδωτικό μίγμα  $\text{HNO}_3$  και  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Σε αυτή τη διαδικασία, τα AgNPs διαλυτοποιούνται στα πρόδρομα μεταλλικά τους ιόντα ( $\text{Ag}^+$ ) τα οποία δεν εκχυλίζονται στην οκτανόλη και μεταφέρονται στην υδατική φάση η οποία στη συνέχεια αναλύεται απευθείας με FAAS. Η διαλυτοποίηση των AgNPs επιτυγχάνεται με μία διαδικασία παρόμοια με εκείνη που χρησιμοποιείται για εκχύλιση και κατά την οποία τα AgNPs ξεπερνούν τους ενεργειακούς φραγμούς και αποσπώνται από τη διεπιφάνεια οκτανόλης / νερού με χρήση θερμότητας και εξωτερικής ενέργειας (Praetorius A. et al., 2014). Μόλις απελευθερωθούν στην υδατική φάση, τα AgNPs διαλυτοποιούνται σε ιόντα  $\text{Ag}^+$  λόγω των ισχυρών οξειδωτικών συνθηκών.

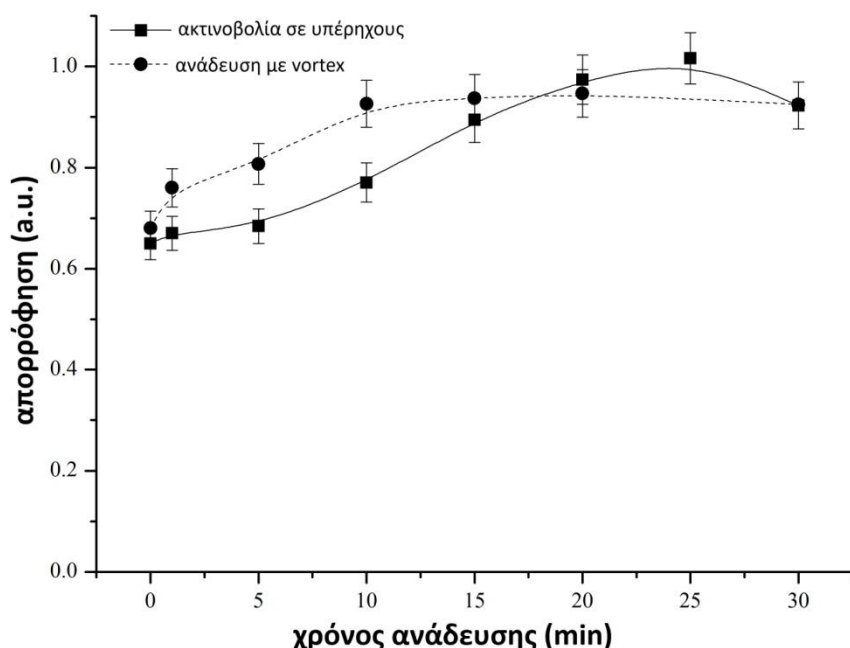
Η επαναδιασπορά του διαλύτη σε μικρά σταγονίδια για την επανεκχύλιση των AgNPs δοκιμάστηκε μέσω περιδίνησης και ακτινοβολίας υπερήχων. Η διαλυτοποίηση των AgNPs ήταν εφικτή και με τις δύο μεθόδους αλλά ήταν αναγκαία η θέρμανση του διαλύματος για να επιτευχθεί υψηλή απόδοση εκχύλισης, καθώς μέσω της θέρμανσης επιτυγχάνεται η αύξηση της διαλυτότητας της οκτανόλης και η μείωση του ενεργειακού φραγμού που συγκρατεί τα AgNPs στη διεπιφάνεια οκτανόλης/νερού (Praetorius A. et al., 2014). Τα καλύτερα

αποτελέσματα ελήφθησαν όταν τα δείγματα αρχικά θερμάνθηκαν και έπειτα αναδεύτηκαν υπό δίνη ή εκτέθηκαν σε υπέρηχους, σε σύγκριση με την ταυτόχρονη εφαρμογή θέρμανσης και ανάμιξης ή με την εφαρμογή ανάμιξης χωρίς θερμότητα. Από τα αποτελέσματα των σχήματων 4 και 5 καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το σήμα φτάνει στη μέγιστη τιμή του μετά από 30 λεπτά θέρμανσης στους 60 °C, ακολουθούμενη από 10 λεπτά ανάδευσης με στροβιλισμό (Σχήμα 2.4) ή μετά από 25 λεπτά έκθεση σε ακτινοβολία υπερήχων (Σχήμα 2.5). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η επανεκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε δύο βήματα: αρχικά τα διαλύματα θερμάνθηκαν στους 60 °C για 30 λεπτά με χειροκίνητη ανάμιξη στο ενδιάμεσο και στη συνέχεια έκθεση σε λουτρό υπερήχων για 25 λεπτά.



**Σχήμα 2.4.** Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου θέρμανσης στην επανεκχύλιση των AgNPs.

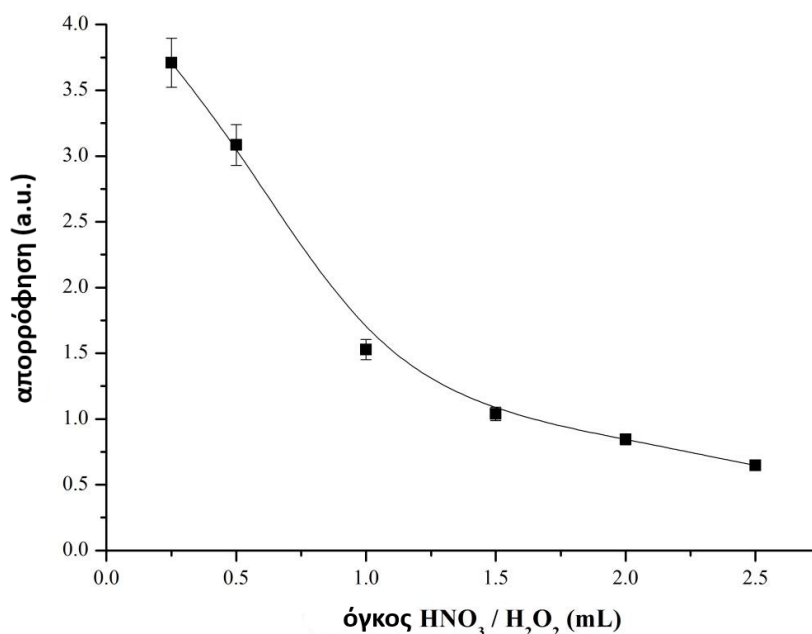




**Σχήμα 2.5.** Επίδραση της μεθόδου ανάμιξης και του χρόνου επανεκχύλισης των AgNPs. Πειραματικές συνθήκες: όγκος οκτανόλης = 1 mL, pH = 4 (ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος/οξικού νατρίου 90 mM), 70 mM NaNO<sub>3</sub>, ανάδευση στις 1000 rpm για 15 λεπτά, επανεκχύλιση σε 2,5 mL HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Μετά την ολοκλήρωση του σταδίου της επανεκχύλισης, τα δείγματα παρέμειναν εν ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για να επανασυσταθεί η φάση της οκτανόλης. Η οκτανόλη απομακρύνθηκε ενώ η υδάτινη φάση μεταφέρθηκε απευθείας στον εκνεφωτή της FAAS για ανάλυση χωρίς άλλα στάδια κατεργασίας (όπως πέψη, αραιώση, κλπ). Για να επιτευχθεί το μέγιστο σήμα, οι όγκοι του μίγματος διαλυτοποίησης (δηλ. HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4:1) που διερευνήθηκαν ήταν από 0,25 έως 2,5 mL (Σχήμα 2.6). Ο όγκος του μίγματος διαλυτοποίησης δεν μπορούσε να είναι μικρότερος από 0,25 mL διότι δεν ήταν εφικτή η επανασύσταση της φάσης της οκτανόλης. Τα αποτελέσματα του Σχήματος 2.6 δείχνουν ότι τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονταν σε όγκο σε 0,25 mL ενώ η απορρόφηση μειώνονταν με την αύξηση του όγκου του μίγματος διαλυτοποίησης, προφανώς λόγω της αυξανόμενης αραιώσης. Η χρήση 0,25 mL όμως δεν επαρκεί για την ανάλυση με

FAAS εκτός αν υπάρχει σύστημα έκχυσης μικρο-δειγμάτων. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε 1,0 mL του διαλύματος διαλυτοποίησης.



**Σχήμα 2.6.** Επίδραση του όγκου του διαλύματος επανεκχύλισης στην απόδοση της μεθόδου.

### 2.5.5 Όγκος δείγματος

Ο μέγιστος όγκος δείγματος που μπορεί να εκχυλιστεί με την μέθοδο, διερευνήθηκε με εκχύλιση 35-100 mL υδατικών προτύπων διαλυμάτων AgNPs. Κάθε διάλυμα παρασκευάστηκε με εμβολιασμό κατάλληλων ποσοτήτων AgNPs έτσι ώστε η συγκέντρωση των AgNPs (εκφρασμένα ως ιόντα Ag) μετά την εκχύλιση να είναι ίδια σε όλα τα εκχυλίσματα. Θεωρήσαμε ότι η εκχύλιση γίνεται ανεπαρκής όταν η συγκέντρωση των AgNPs που εκχυλίζεται μειώνεται κάτω από 90%. Αυτή η προϋπόθεση παρατηρήθηκε για όγκους δείγματος μεγαλύτερους από 75 mL, συνεπώς τα 75 mL είναι ο μέγιστος όγκος δείγματος που μπορεί να εκχυλιστεί υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες χωρίς να επηρεάζεται η απόδοση της μεθόδου. Η εκχύλιση μεγαλύτερων όγκων δειγμάτων, ωστόσο, εξακολουθεί να είναι εφικτή αυξάνοντας τον χρόνο εκχύλισης. Αυτό αποδείχθηκε με την εκχύλιση ενός πρότυπου υδατικού διαλύματος AgNPs 100 mL σε τρεις χρόνους εκχύλισης (30, 45

και 60 λεπτά). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι αύξηση του χρόνου εκχύλισης σε 30 λεπτά, δίνει τη δυνατότητα να ληφθούν ποσοτικές ανακτήσεις από όγκο δείγματος 100 mL, υποδηλώνοντας ότι μπορούν να εκχυλιστούν μεγάλοι όγκοι δειγμάτων για να βελτιωθεί η ευαισθησία της μεθόδου.

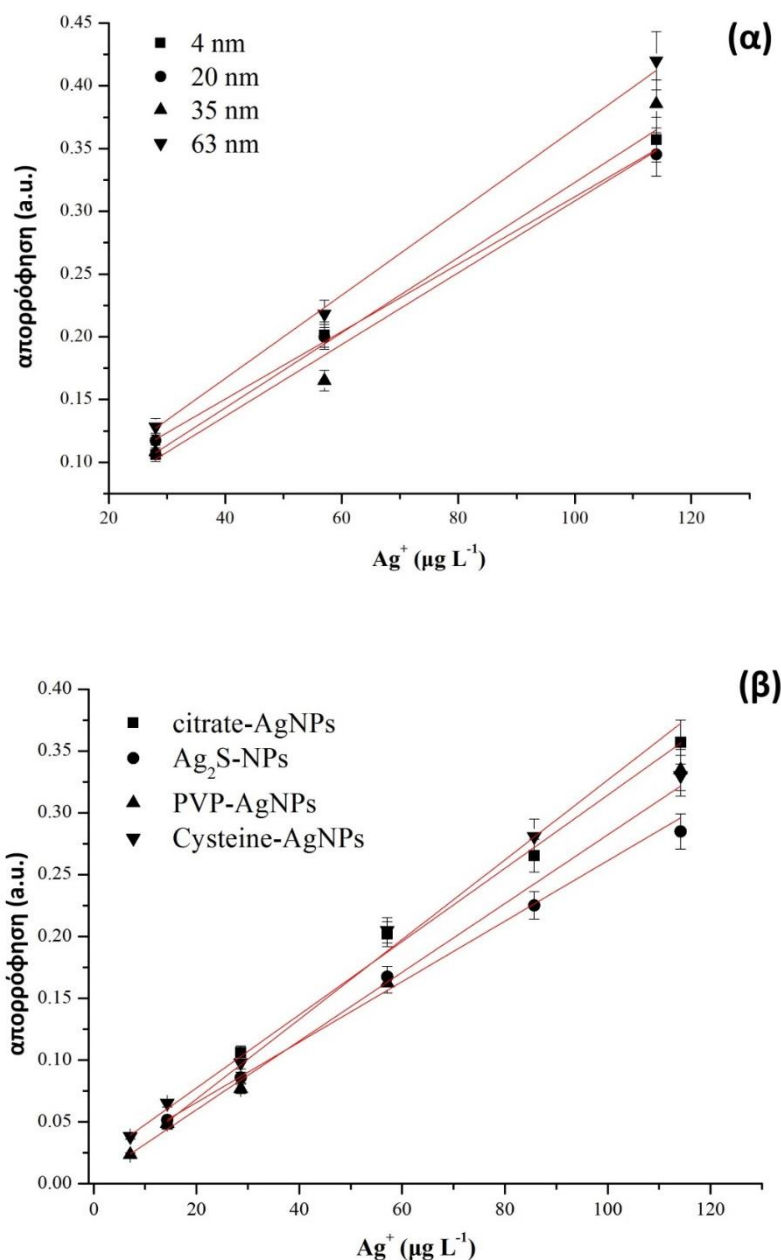
#### **2.5.6 Εκχύλιση AgNPs με διαφορετικά μεγέθη και επικαλύψεις**

Στα πραγματικά δείγματα, όπως τα φυσικά νερά και τα λύματα, τα AgNPs υπάρχουν σε μεγάλη ποικιλία διαφορετικών μεγεθών, μορφολογιών και επιφανειακών επικαλύψεων (Hartmann G et al., 2014, Hassellön M. et al., 2008, Huang K. et al., 2015, Pettibone J.M. et al., 2013). Επομένως, μια αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό των AgNPs πρέπει να εκχυλίζει όλα τα είδη των AgNPs ώστε να αποδίδει τη συνολική συγκέντρωση των AgNPs στο δείγμα ανεξαρτήτως των επικαλύψεων της επιφάνειάς τους και του μεγέθους τους.

Η ικανότητα εκχύλισης των AgNPs με διαφορετικά μεγέθη σωματιδίων (4, 20, 35 και 63 nm) δοκιμάστηκε υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες. Για να συγκριθούν τα AgNPs διαφορετικών μεγεθών, παρασκευάστηκαν (πρότυπα) υδατικά διαλύματα AgNPs της ίδιας τελικής συγκέντρωσης σε ιόντα  $\text{Ag}^+$ . Η μέθοδος στη συνέχεια εφαρμόστηκε σε υδατικά διαλύματα AgNPs που αντιστοιχούν σε 28, 57 και 114  $\mu\text{g L}^{-1}$  Ag (για όλα τα μεγέθη AgNPs). Το σχήμα 2.7α δείχνει ότι τα AgNPs διαφορετικών μεγεθών παρήγαγαν ισοδύναμα σήματα ως εκ τούτου, η μέθοδος είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό των AgNPs ως μια αθροιστική παράμετρο, δηλ. η συνολική συγκέντρωση AgNPs στο δείγμα.

Επίσης αξιολογήθηκε η απόδοση εκχύλισης των AgNPs με διαφορετικές επικαλύψεις χρησιμοποιώντας AgNPs επικαλυμμένα με κιτρικά ιόντα, πολυμερή ( $\text{PVP}_{10}$ ), βιομόρια (κυστεΐνη) και ανόργανα ιόντα (θείο και φωσφορικά). Όπως και προηγουμένως, όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν ως διαλύματα AgNPs της ίδιας τελικής συγκέντρωσης σε ιόντα  $\text{Ag}^+$ , που αντιστοιχεί σε 7.1, 14.3, 28.6, 57.2, 114.2  $\mu\text{g L}^{-1}$  ιόντων  $\text{Ag}^+$ . Το σχήμα 2.7β δείχνει ότι η ένταση της απορρόφησης έχει παρόμοιο μοτίβο για AgNPs διαφορετικών επικαλύψεων. Τα  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ -NPs δεν εκχυλίζονται καθόλου πιθανώς λόγω της πολύ φορτισμένης επιφάνειάς τους (Huang K. et al., 2015) σε αντίθεση με άλλα AgNPs που έχουν ισοηλεκτρικό σημείο (point of

zero charge) σε τιμές pH μεταξύ 4 και 5 (Hartmann G. et al., 2014). Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη το γινόμενο διαλυτότητας του  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  ( $9 \times 10^{-17}$ ) και των επιπέδων των φωσφορικών και των ιόντων αργύρου σε ύδατα και απόβλητα, δεν αναμένεται να βρεθούν Ag-NPs με επικάλυψη φωσφορικών σε περιβαλλοντικά υδατικά δείγματα (Hartmann G. et al., 2014). Επομένως, η μέθοδος είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό ποικίλων ειδών AgNPs διαφορετικού μεγέθους, μορφολογίας και επικάλυψης που πιθανόν να βρίσκονται σε πραγματικά δείγματα.



**Σχήμα 2.7.** Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης με χρήση AgNPs (α) διαφορετικού μεγέθους και (β) διαφορετικών επιφανειακών επικαλύψεων.

### 2.5.7 Εκλεκτικότητα

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες μελέτες (Liu J.-F. et al., 2009), τα ιόντα  $\text{Ag}^+$  μπορούν να απορροφηθούν στην επιφάνεια των AgNPs είτε απευθείας είτε μετά από συμπλοκοποίηση με τη διαλυμένη οργανική ύλη και συνεπώς να εκχυλίστούν μαζί με τα AgNPs εμφανίζοντας θετικώς εσφαλμένα αποτελέσματα κατά την ανάλυση. Αν και ο διαλυμένος άργυρος έχει αναφερθεί ότι καταλαμβάνει λιγότερο από 0,1% της συνολικής μάζας αργύρου σε περιβαλλοντικά ύδατα (Jin X. et al., 2010), εξετάσαμε την εκχύλιση ιόντων  $\text{Ag}^+$  σε υψηλές συγκεντρώσεις ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) παρουσία και απουσία AgNPs επικαλυμμένων με κιτρικά ιόντα ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  ως  $\text{Ag}^+$  ή  $3.3 \text{ nM}$  υπολογισμένα με βάση AgNPs  $5 \text{ nm}$ ) και απουσία/παρουσία διαλυμένης οργανικής ύλης ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  ως χουμικό οξύ). Απουσία AgNPs επικαλυμμένων με κιτρικά ιόντα (citrate@AgNPs) ή χουμικών οξέων, δεν ανιχνεύθηκε  $\text{Ag}^+$ , ενώ ίχνη Ag ανιχνεύτηκαν παρουσία χουμικών οξέων υποδηλώνοντας ότι α) από μόνα τους τα ιόντα  $\text{Ag}^+$  δεν μπορούν να εκχυλίστούν και β) η οργανική ύλη είχε αμελητέα επίδραση στην συν-εκχύλιση των ιόντων  $\text{Ag}^+$ . Σε διαλύματα που περιέχουν τόσο  $\text{Ag}^+$  όσο και κιτρικά AgNPs, το σήμα απορρόφησης αυξήθηκε περίπου  $1,7 \pm 0,4\%$  ( $n = 5$ ), υποδηλώνοντας ότι μικρές ποσότητες ιόντων  $\text{Ag}^+$  εκχυλίστηκαν ταυτόχρονα με τα AgNPs. Αυτό αποδίδεται στη χρήση των κιτρικών AgNPs τα οποία θα μπορούσαν να συμπλοκοποιήσουν ιόντα  $\text{Ag}^+$  μέσω των καρβοξυλικών ομάδων. Όταν τα ίδια πειράματα επανελήφθησαν με PVP-AgNPs δεν παρατηρήσαμε διαφορά στις τιμές απορρόφησης (δηλαδή δεν συνεκχυλίσθηκε  $\text{Ag}^+$ ). Ως εκ τούτου, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι μικρές ποσότητες ελεύθερων ιόντων  $\text{Ag}^+$  μπορούν να απορροφηθούν ανάλογα με την επιφανειακή τροποποίηση των AgNPs αλλά η επίδρασή τους στην ανάλυση των AgNPs είναι ελάχιστη λόγω του συναγωνισμού από συνυπάρχοντα ιόντα (π.χ.  $\text{Na}^+$  ή άλλα περιβαλλοντικά σχετικά κατιόντα σε φυσικά ύδατα όπως το  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Η ποσότητα των ιόντων  $\text{Ag}^+$  που εκχυλίζονται ταυτόχρονα με citrate@AgNPs αυξάνεται παρουσία οργανικής ύλης επειδή η οργανική ύλη μπορεί σχηματίζει σύμπλοκα με τα ιόντα  $\text{Ag}^+$  ενώ ταυτόχρονα να σχηματίζει δυνατούς δεσμούς με μεταλλικά νανοσωματίδια (Diegoli S. et al., 2008, Gatselou V.A. et al., 2014, Klaine S.J. et al., 2008, Pallem V.L. et al., 2009, Su S. et al., 2014, Zhang Y. et al., 2009).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το σήμα απορρόφησης αυξήθηκε κατά  $6,7 \pm 2,1\%$  ( $n = 4$ ) υποδηλώνοντας έτσι ότι ένα μέρος των ιόντων  $\text{Ag}^+$  συνεκχυλίζεται με AgNPs. Αν και το ποσοστό αυτό δεν αποτελεί σημαντική παρεμπόδιση, δεδομένου ότι τα επίπεδα συγκέντρωσης του διαλυμένου  $\text{Ag}^+$  είναι μικρότερα από  $0,1\%$  σε αυτό του συνολικού αργύρου (Jin X. et al., 2010), η προσθήκη 5mM θειοθειικού άλατος μπορούσε (Liu J.-F. et al., 2009, López-García I. et al., 2014) να καταστείλει τελείως την συν-εκχύλιση ιόντων  $\text{Ag}^+$ . Κατά συνέπεια, κατά τη διάρκεια της ανάλυσης πραγματικών δειγμάτων προτείνεται η προσθήκη θειοθειικού για να ελαχιστοποιηθεί η ταυτόχρονη εκχύλιση των ιόντων  $\text{Ag}^+$ .

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε επίσης σε σχέση με άλλα είδη νανοσωματιδίων που είναι πιθανόν να συνυπάρχουν στα φυσικά ύδατα. Υδατικά διαλύματα AuNPs με επικάλυψη κιτρικών ιόντων (4 nm), ZnO NPs (35-100 nm) και CuO (<50 nm), εκχυλίστηκαν υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες και η συγκέντρωση του κάθε μεταλλικού ιόντος (δηλ. Au, Zn και Cu) προσδιορίστηκε με FAAS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, δεν ανιχνεύθηκαν νανοσωματίδια στο τελικό εκχύλισμα. Τα ZnO και CuO δεν μπορούσαν να εκχυλιστούν εξαιτίας του γεγονότος ότι το ισοηλεκτρικό σημείο τους είναι περίπου στην τιμή  $\text{pH} = 9,0$ . Συνεπώς, στο pH εργασίας είχαν αρνητικό φορτίο γεγονός που εμπόδιζε τη διασπορά τους στη διεπιφάνεια οκτανόλης/νερού. Επιπλέον, ένα ποσοστό του ZnO και ένα μεγαλύτερο ποσοστό του CuO μπορεί να είχαν διαλυτοποιηθεί στα πρόδρομα ιόντα των μετάλλων τους κατά τη διάρκεια της ρύθμισης του pH στην τιμή 4 πριν την εκχύλιση. Όσον αφορά τα AuNPs παρατηρήσαμε ότι μπορούν να εκχυλιστούν στην φάση της οκτανόλης (όπως φάνηκε δια γυμνού οφθαλμού από την εμφάνιση συσσωματωμάτων στη φάση οκτανόλης σε υψηλές συγκεντρώσεις AuNPs) αλλά δεν μπορούσαν να επανεκχυλιστούν. Η διαλυτοποίηση των AuNPs θα απαιτούσε ισχυρότερα μέσα διαλυτοποίησης (π.χ.  $\text{Br}_2$  / HCl / NaCl (Tsogas G.Z. et al., 2014), βασιλικό ύδωρ (Li Z.-P. et al., 2005)) και ειδικές συνθήκες (π.χ. μεγαλύτεροι χρόνοι επαφής, θερμά διαλύματα, κ.α.). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος είναι εκλεκτική για την εκχύλιση των AgNPs ενώ άλλα είδη νανοσωματιδίων δεν συνεκχυλίζονται και δεν παρεμποδίζουν την ανάλυση.

### 2.5.8 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου.

Για την βαθμονόμηση της μεθόδου εκχυλίστηκαν διαλύματα όγκου 35 mL υδατικών αιωρημάτων AgNPs γνωστών συγκεντρώσεων. Η γραμμικότητα της συνάρτησης βαθμονόμησης ήταν πολύ καλή ( $R^2 > 0.998$ ) για έξι σημεία βαθμονόμησης σε συγκεντρώσεις Ag-NP που κυμαίνονται από 10 έως 120  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ως προς  $\text{Ag}^+$ ). Το όριο ανίχνευσης ήταν 4  $\mu\text{g L}^{-1}$  ως  $\text{Ag}^+$ , υπολογιζόμενο από το διάστημα εμπιστοσύνης της συνάρτησης γραμμικής παλινδρόμησης (Vogelgesang J. and Hädrich J., 1998), το οποίο αντιστοιχεί σε 100 fM των AgNPs (υπολογιζόμενη για AgNPs με μέση διάμετρο 20 nm). Περαιτέρω βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου μπορεί να επιτευχθεί με προσυγκέντρωση μεγαλύτερου όγκου δείγματος (όπως συζητήθηκε προηγουμένως) ή με επανεκχύλιση οκτανόλης σε μικρότερο όγκο χρησιμοποιώντας ένα σύστημα έγχυσης μικρο-δειγματοληψίας για τη FAAS ή καταφεύγοντας στη χρήση πιο ευαίσθητων ανιχνευτών όπως το ICP-MS. Η αναπαραγωγικότητα της μεθόδου, εκφραζόμενη ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD,%) πέντε μετρήσεων σε συγκέντρωση AgNPs που αντιστοιχεί σε 15  $\mu\text{g L}^{-1}$  ως  $\text{Ag}^+$  ήταν 6,8% που δείχνει την καλή ακρίβεια της μεθόδου.

### 2.5.9 Επικύρωση και εφαρμογή μεθόδου

Η επίδραση της σύστασης της μήτρας των δειγμάτων στην απόδοση της μεθόδου αξιολογήθηκε με τη βοήθεια εμβολιασμένων δειγμάτων νερού με μήτρα διαφορετικής πολυπλοκότητας (δηλαδή εμφιαλωμένο νερό, νερό ποταμού και υγρά απόβλητα) και σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις PVP-AgNPs, συγκρίνοντας την κλίση των καμπυλών σε σχέση με του απεσταγμένου νερού. Η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης σε απεσταγμένο νερό ήταν 0,0768 που σύμφωνα με το κριτήριο Student σε επίπεδο πιθανότητας 0,05 δεν ήταν στατιστικά διαφορετικό από αυτό που παρατηρήθηκε σε άλλα δείγματα (εμφιαλωμένο νερό: 0,0803, νερό ποταμού: 0,0756 και υγρά απόβλητα: 0,08). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν την έλλειψη αναλογικών και σταθερών συστηματικών σφαλμάτων από το υπόστρωμα της μήτρας των πραγματικών δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα από πειράματα ανάκτησης σε περιβαλλοντικά δείγματα εμβολιασμένα με διαφορετικές συγκεντρώσεις PVP-AgNP παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1. Οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 90% στα λύματα έως 104% σε εμφιαλωμένο νερό οι οποίες ήταν πολύ ικανοποιητικές και εντός του εύρους των ανακτήσεων που αναφέρονται σε προηγούμενες μεθόδους (Chao J.-B. et al., 2011, Choleva T.G. et al., 2016, Li L. et al., 2012, Liu J.-F. et al., 2009, López-García I. et al., 2014, López-Lorente A.I. et al., 2012, Majedi S.M. and Lee H.K., 2016). Επιπλέον, η μέθοδος που αναπτύχθηκε προσφέρει παρόμοια τεχνικά χαρακτηριστικά (π.χ. χρόνος εκχύλισης, απόδοση του δείγματος, μετρήσεις δειγμάτων κλπ.) σε σύγκριση με προηγούμενες μεθόδους. Μια συγκριτική επισκόπηση της μεθόδου με άλλες μεθόδους για τον προσδιορισμό των AgNPs παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2.

**Πίνακας 2.1.** Ανάκτηση των AgNPs από περιβαλλοντικά δείγματα

| Δείγμα               | Εμβολιασμένα<br>AgNPs ( $\mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}$ ) | AgNPs που ανακτήθηκαν<br>( $\mu\text{g L}^{-1} \text{Ag}$ ) | Ανάκτηση (% , n=3) |
|----------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------|
| Εμφιαλωμένο νερό     | 10.0                                                     | $10.4 \pm 0.8$                                              | $104.0 \pm 7.7$    |
| Νερό ποταμού         | 10.0                                                     | $9.3 \pm 0.7$                                               | $93.0 \pm 7.5$     |
|                      | 30.0                                                     | $28.8 \pm 1.8$                                              | $96.0 \pm 6.2$     |
| Υγρά αστικά απόβλητα | 20.0                                                     | $17.9 \pm 1.8$                                              | $90.0 \pm 10$      |
| (επεξεργασμένα)      | 50.0                                                     | $45.8 \pm 3.8$                                              | $92.0 \pm 8.3$     |

**Πίνακας 2.2.** Συγκριτική επισκόπηση μεταξύ DSME και άλλων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των AgNPs σε περιβαλλοντικά δείγματα με τεχνικές ατομικής φασματοσκοπίας. <sup>α</sup>

| Μέθοδος                  | Όγκος<br>δείγματος<br>(mL) | Πειραματικά στάδια<br>/<br>Επανεκχύλιση | Χρόνος<br>ανάλυσης | Ειδοταύτιση<br>(AgNPs από<br>ιόντα Ag) | Ταχύτητα<br>αναλυσης<br>δείγματος | AgNPs<br>διαφορετικού<br>μεγέθους | AgNPs<br>διαφορετικών<br>επιφανειακών<br>επικαλύψεων | Αναφορά            |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------------------------|--------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| CPE                      | 50                         | 2 / Όχι                                 | 45 min-2h          | Ναι                                    | Medium-High                       | Ναι                               | Ναι                                                  | 6,13               |
| CPE                      | 50                         | 3 / MAE                                 | 75 min             | Ναι                                    | Medium                            | Ναι                               | Ναι                                                  | 49                 |
| Μικροεκχύλιση<br>διαλύτη | 10                         | 5 /MAE                                  | >2.5 h             | Ναι                                    | Low                               | Ναι                               | Ναι                                                  | 21                 |
| SPE                      | 500                        | 5 /LLE                                  | >45 h              | Ναι                                    | Low                               | Ναι                               | Ναι                                                  | 17                 |
| IL-DLME                  | 15                         | 3 / MAE                                 | 35 min             | Ναι                                    | High                              | Ναι                               | Ναι                                                  | 24                 |
| DSME /<br>επανεκχύλιση   | 100                        | 3 / LLE                                 | 80 min             | Ναι                                    | Medium                            | Ναι                               | Ναι                                                  | Παρούσα<br>εργασία |

<sup>α</sup> CPE: Cloud Point Extraction (Εκχύλιση Σημείου Νεφέλωσης), SPE: Solid Phase Extraction (Εκχύλιση Στερεάς Φάσης), IL-DLME: Μικροεκχύλιση Διασποράς με ιοντικά υγρά, DSME: Dispersive Suspended Microextraction (Μικροεκχύλιση Διασποράς), MAE: Microwave Assisted Extraction (Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Μικροκύματα), LLE: Liquid-Liquid Extraction (Υγρή-Υγρή Εκχύλιση).

## 2.6 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό, αναπτύχθηκε μια μέθοδος που χρησιμοποιεί τη DSME για την εκλεκτική εκχύλιση νανοσωματιδίων αργύρου από περιβαλλοντικά δείγματα. Η μέθοδος περιλαμβάνει την κατανομή των AgNPs στη διεπιφάνεια των σταγονιδίων οκτανόλης και την επακόλουθη διαλυτοποίηση των AgNPs στα πρόδρομα μεταλλικά ιόντα σε ισχυρά οξειδωτικό μέσο. Η μέθοδος είναι εξίσου αποτελεσματική για την εκχύλιση AgNPs διαφορετικών μεγεθών και επιφανειακών επικαλύψεων επιτρέποντας έτσι τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης των AgNPs σε πραγματικά δείγματα. Τα διαλυτοποιημένα ιόντα  $\text{Ag}^+$  δεν μπορούν να διαπεράσουν στη φάση της οκτανόλης ελαχιστοποιώντας έτσι τον κίνδυνο λανθασμένων θετικών αποτελεσμάτων από την εκχύλιση μη νανοκολλοειδών μορφών του αργύρου. Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς για τον προσδιορισμό των AgNPs σε εμβολιασμένα υδατικά δείγματα με ικανοποιητικές ανακτήσεις. Η υψηλή εκλεκτικότητα της συνολικής διαδικασίας για τα διάφορα είδη AgNPs θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί για επιλεκτική ανάκτηση AgNPs σε σύνθετα μίγματα νανοσωματιδίων. Η χρήση πιο ευαίσθητων ανιχνευτών όπως η ICP-MS θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου και να επεκταθεί η χρήση της και σε άλλες εφαρμογές περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος (όπως για παράδειγμα ο προσδιορισμός των συντελεστών (ψευδο)κατανομής των ιχνοποσοτήτων AgNPs σε συστήματα δύο φάσεων).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°

### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΧΡΥΣΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΦΥΛΛΟΜΟΡΦΑ ΔΙΥΔΡΟΞΕΙΔΙΑ Mg/Al

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτό το κεφάλαιο, περιγράφεται για πρώτη φορά η χρήση διαλυτοποιούμενων φυλλόμορφων διυδροξειδίων (Layered double hydroxides, LDH) για την εκχύλιση και προσυγκέντρωση μεταλλικών νανοσωματιδίων από υδατικά δείγματα. Τα LDH μαγνησίου-αργιλίου παρασκευάστηκαν στο υδατικό διάλυμα του δείγματος με αλκαλική συγκαταβύθιση και διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση. Διαπιστώθηκε ότι τόσο τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) όσο και τα ιόντα χρυσού, μπορούσαν να εκχυλίστούν ταυτόχρονα από τα LDH με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αντιδράσεις ανταλλαγής ανιόντων, αντίστοιχα. Ο διαχωρισμός των AuNPs από ιόντα χρυσού επιτευχθηκε με υπερφυγοκέντρηση επιτρέποντας τον εκλεκτικό προσδιορισμό των AuNPs στο δείγμα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο αναλυτικές τεχνικές βασισμένες στη μοριακή και ατομική φασματοσκοπία (φασματοφωτομετρία και φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση) για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των AuNPs σε εμβολιασμένα περιβαλλοντικά υδατικά δείγματα σε επίπεδα συγκέντρωσης της τάξεως των femto-mole. Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των AuNPs σε επίπεδα συγκέντρωσης τόσο χαμηλά όσο 16 femto-mole L<sup>-1</sup> με ικανοποιητικές ανακτήσεις (71-91%) και καλή αναπαραγωγιμότητα (<9%).

### 3.1 Εισαγωγή

Κατά την τελευταία δεκαετία, η χρήση νανοϋλικών έχει αυξηθεί ραγδαία σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών και τεχνολογιών και αναμένεται να αυξηθεί ακόμη περισσότερο στο εγγύς μέλλον (Hendren C.O. et al., 2011, Piccinno F. et al., 2012). Κατά συνέπεια, είναι λογικό να δημιουργηθούν προβληματισμοί σχετικά με τη δυνητική απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον και τις επιδράσεις τους στα οικοσυστήματα και τους ζωντανούς οργανισμούς (Giese B. et al., 2018, Sun T. et al., 2017). Για το λόγο αυτό, αρκετές αρχές ρύθμισης έχουν ταξινομήσει τα νανοσωματίδια ως αναδυόμενους περιβαλλοντικούς ρύπους και προσπαθούν να διατυπώσουν μέτρα πρόληψης (European Commission, Nanomaterials, OECD, Safety of manufactured nanomaterials).

Το πρώτο βήμα για την εκτίμηση της τύχης, της μεταφοράς και τους πιθανούς κινδύνους των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον, είναι ο προσδιορισμός τους σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα, όπως τα λύματα και τα φυσικά νερά. Ωστόσο, ο προσδιορισμός δεν είναι εύκολος για διάφορους λόγους: α) οι συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων αναμένονται σε επίπεδα pg/L έως ng/L και οι τρέχουσες ενόργανες τεχνικές ανάλυσης δύσκολα επιτυγχάνουν τέτοια ευαισθησία β) οι επιδράσεις της μήτρας μπορεί να επηρεάσουν την ανάλυση και κατά συνέπεια την ακρίβεια των αποτελεσμάτων και γ) τα διαλυμένα ιόντα της ίδιας φύσης μπορεί να συνπροσδιοριστούν και να ερμηνευτούν εσφαλμένα ως νανοσωματίδια (Heithmar E.M., 2011, Zanker H. and Schierz A., 2012). Επομένως, η ανάλυση των νανοσωματιδίων σε περιβαλλοντικά δείγματα απαιτεί ένα συνδυασμό κατάλληλων αναλυτικών μεθόδων για την εκχύλιση και προσυγκέντρωση τους και ευαίσθητων αναλυτικών τεχνικών για την ανίχνευσή τους, οι οποίες κατά κανόνα βασίζονται στην ατομική φασματοσκοπία λόγω της χαμηλής ευαισθησίας και της υψηλής εκλεκτικότητας (Da Silva B.F. et al., 2011).

Η εκχύλιση και η προσυγκέντρωση νανοσωματιδίων από περιβαλλοντικά δείγματα μπορεί να επιτευχθεί μέσω μεθόδων που βασίζονται στις αρχές της υγρής και στερεάς εκχύλισης όπως μικκύλια και άλλα επιφανειοδραστικά συσσωματώματα (π.χ. εκχύλιση σημείου νεφέλωσης) (Choleva T.G. et al., 2016, Hartmann G. and Schuster M., 2013, Liu J.F. et al., 2009, Tsogas G.Z. et al., 2014),

δυναδικά ή τριαδικά μίγματα διαλυτών (π.χ. LPME και τροποποιήσεις) (Choleva T.G. et al., 2019, Liu Y. et al., 2016, Majedia S.M. et al., 2013), εκχύλιση και μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (π.χ. ρητίνες, μαγνητικά νανοσωματίδια,) (Li L. and Leopold K., 2012, Li L. et al., 2012, Su S. et al., 2014, Zhang L. et al., 2015) κλπ. Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το χημικό αποτύπωμα των νανοσωματιδίων (όπως σύνθεση, μάζα και συγκέντρωση) ενώ ορισμένες μέθοδοι μπορούν επίσης να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα φυσικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων (π.χ. μέγεθος, σχήμα, συσσωμάτωση). Είναι σημαντικό ότι σχεδόν όλες οι μέθοδοι επιτρέπουν τον εκλεκτικό προσδιορισμό νανοσωματιδίων έναντι των πρόδρομων μεταλλικών ιόντων τους, αποφεύγοντας έτσι λανθασμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης νανοσωματιδίων στο περιβάλλον. Όμως, οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους δεν μπορούν να εκχυλίσουν και να προσυγκεντρώσουν ταυτόχρονα τα μεταλλικά νανοσωματίδια και τα αντίστοιχα μεταλλικά ιόντα τους κάτι που είναι απαραίτητο όταν διερευνάται η συνολική περιβαλλοντική τύχη των νανοσωματιδίων και στην οποία περιλαμβάνονται αρκετοί μετασχηματισμοί και τροποποιήσεις μεταξύ νανοσωματιδίων και ιόντων (π.χ. διαλυτοποίηση, ανασύσταση, κλπ.) (Lowry G.V. et al., 2012).

Παρόλο που πολλές συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης και προκατεργασίας δειγμάτων έχουν τροποποιηθεί ώστε να είναι δυνατή η εφαρμογή τους στην εκχύλιση νανοσωματιδίων, η χρήση φυλλόμορφων διυδροξειδίων (Layered Double Hydroxides, LDH) για την εκχύλιση και την προσυγκέντρωση νανοσωματιδίων δεν έχει ακόμα αναφερθεί. Τα LDH είναι ιονικά ελασματοειδή στερεά που δημιουργούνται από τη στοίβαξη θετικά φορτισμένων (βρουκτοειδών) στιβάδων μεταλλικών υδροξειδίων (Mishra G. et al., 2018, Wang Q. and O'Hare D., 2012). Αυτές οι στιβάδες συνδέονται μαζί με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου. Τα LDH συνήθως συντίθενται από δισθενή και τρισθενή μεταλλικά κατιόντα (όπως  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  ή  $Fe^{3+}$ ) και ένα ανιόν εξισορρόπησης φορτίου μεταξύ των στιβάδων (όπως  $NO_3^-$ ,  $Cl^-$ ,  $CO_3^{2-}$ , κλπ.). Λόγω της υψηλής ικανότητας ανταλλαγής ανιόντων, του αυξημένου πορώδους και της υψηλής ειδικής επιφάνειας, τα LDH θεωρήθηκαν ως πολλά υποσχόμενο προσροφητικό υλικό για τον εμπλουτισμό ανόργανων και οργανικών ανιόντων (Abdolmohammad-Zadeh H.

et al., 2011, Gissawong N. et al., 2017, Tang S. and Lee H.K., 2013). Επιπλέον, η κατεργασία της επιφάνειας και της δομής των LDH, επεκτείνει τις δυνατότητες τους ως προσροφητικά υλικά για την εκχύλιση και μη πολικών οργανικών ενώσεων (Li X. et al., 2018, Seidi S. and Sanati S.E., 2019, Wang X. et al., 2018, Zhao X. et al., 2015).

Σε αυτό το κεφάλαιο, εξετάσαμε για πρώτη φορά την αναλυτική χρησιμότητα των LDH ως προσροφητές για την εκχύλιση μεταλλικών νανοσωματιδίων από δείγματα νερού. Χρησιμοποιώντας τα AuNPs ως πρότυπο είδος νανοσωματιδίων, εξετάστηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι πειραματικές παράμετροι που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των AuNPs διαφορετικού μεγέθους και επιφανειακής επικάλυψης. Αναπτύξαμε επίσης, μια απλή διαδικασία για τον διαχωρισμό των ιόντων Au από τα AuNPs και μελετήσαμε την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό AuNPs σε ιχνοποσότητες σε εμβολιασμένα περιβαλλοντικά δείγματα νερού με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση.

## **3.2 Υλικά και μέθοδοι**

### **3.2.1 Αντιδραστήρια**

Τριένυδρο τετραχλωριούχος χρυσός ( $\geq 99,9\%$ ), εννεαένυδρο νιτρικό αργίλιο ( $\geq 98\%$ ), εξαένυδρο νιτρικό μαγνήσιο ( $\geq 99\%$ ), βοροϋδρίδιο του νατρίου, κιτρικό νάτριο και νιτρικό οξύ υψηλής καθαρότητας (TraceSELECT® Ultra) αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία). Η μεθανόλη για HPLC ελήφθηκε από την Fisher Scientixc (Loughborough, UK).

### **3.2.2 Εξοπλισμός**

Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) ελήφθησαν με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm σε φασματοφωτόμετρο Jenway (Essex, UK) 6405 UV / Vis. Για την λήψη φασμάτων υπερύθρου χρησιμοποιήθηκε διάταξη Perkin Elmer Spectrum Two εξασθενημένης ολικής ανακλαστικότητας (ATR-IR) για τον προσδιορισμό των δονητικών διεγέρσεων των LDH. Μικρογραφίες σαρωτικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (SEM) ελήφθησαν με διάταξη JEOL JSM-6300 η οποία ήταν εξοπλισμένη με φασματοφωτόμετρο ακτίνων X με διασπορά ενέργειας Oxford

ISIS 300 (EDS). Για τον προσδιορισμό των ιόντων χρυσού χρησιμοποιήθηκε διάταξη φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση Shimadzu AA-6800 (ETAAS) εξοπλισμένη με αυτόματο δειγματολήπτη ASC-6100. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση λυχνίας κοίλης καθόδου (Heraeus, Hanau, Γερμανία) με αυτοαναστροφή (self-reversal) που λειτουργεί σε τάση ρεύματος 10 mA. Η ένταση του σήματος συλλέχθηκε στα 242,8 nm. .

### 3.2.3 Σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού

Η σύνθεση των AuNPs επικαλυμμένων με κιτρικά (CA@AuNPs), διαφόρων μεγεθών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αυτούσιες τις πειραματικές διαδικασίες που περιγράφηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια και σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας (Choleva T.G. et al., 2016, Mandyla S.P. et al., 2017). Η μέση κατανομή μεγέθους και η συγκέντρωση των AuNPs υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των Haiss et al. (Haiss W. et al., 2007) υπολογίζοντας την αναλογία απορρόφησης των εναιωρημάτων AuNPs στην κορυφή του επιφανειακού συντονισμού πλασμονίων με την απορρόφηση στα 450 nm.

### 3.3 Πειραματική πορεία

Σε ένα υδατικό δείγμα (που πιθανόν να περιέχει τόσο AuNPs όσο και ιόντα Au) προστέθηκαν διαδοχικά 0,5 mL διαλύματος 1 mol L<sup>-1</sup> KOH και 0,5 mL διαλύματος Mg<sup>2+</sup> / Al<sup>3+</sup> (3:1, 100 mmol L<sup>-1</sup>) σε 50 mL υδατικού διαλύματος δείγματος. Το διάλυμα αναμίχθηκε με ανάδευση σε στροβιλισμό για 1 λεπτό και φυγοκεντρήθηκε στις 6000 στροφές/λεπτό για 25 λεπτά. Το ίζημα συλλέχθηκε στον πυθμένα του φιαλιδίου και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 0,5 mL από 2,5 mol L<sup>-1</sup> HCl.

Για να διαχωριστούν τα ιόντα Au από τα AuNPs και να απομακρυνθεί η περίσσεια Mg<sup>2+</sup> και Al<sup>3+</sup>, το εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε βαθμονομημένο φιαλίδιο Eppendorf με 1.0 mL απεσταγμένο νερό (συνολικός όγκος 1.5 mL) και φυγοκεντρήθηκε στις 18000 στροφές/λεπτό (15.120 g) για 20 λεπτά για να καταβυθιστούν τα AuNPs αφήνοντας τα ιόντα χρυσού και άλλα ιόντα στο υπερκείμενο διάλυμα. Στη συνέχεια, 1.4 mL του υπερκείμενου υγρού απομακρύνθηκε προσεκτικά με γυάλινη πιπέτα Pasteur και αντικαταστάθηκε αργά με 1.4 mL 6 M HNO<sub>3</sub> ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επαναιώρηση των AuNPs. Η

διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε συνολικά 3 φορές ώστε να απομακρυνθούν ποσοτικά τα διαλυτά ιόντα. Από το εκχύλισμα αυτό ελήφθησαν 20  $\mu\text{L}$  για την ανάλυση με ETAAS σύμφωνα με το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του Πίνακα 3.1.

**Πίνακας 3.1.** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ETAAS για τον προσδιορισμό AuNPs.

| Στάδια      | Θερμοκρασία<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | Ramp<br>time<br>(sec) | Hold time<br>(sec) | Argon flow rate<br>( $\text{L min}^{-1}$ ) | Read |
|-------------|---------------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------------------------|------|
| Ξήρανση 1   | 120                                   | 20                    | 0                  | 1.0                                        | OFF  |
| Ξήρανση 2   | 250                                   | 10                    | 0                  | 1.0                                        | OFF  |
| Πυρόλυση    | 500                                   | 10                    | 3                  | 1.0                                        | OFF  |
| Ατομοποίηση | 1700                                  | 0                     | 3                  | 0                                          | ON   |
| Καθαρισμός  | 2500                                  | 1                     | 2                  | 1.0                                        | OFF  |

### 3.4 Πραγματικά δείγματα

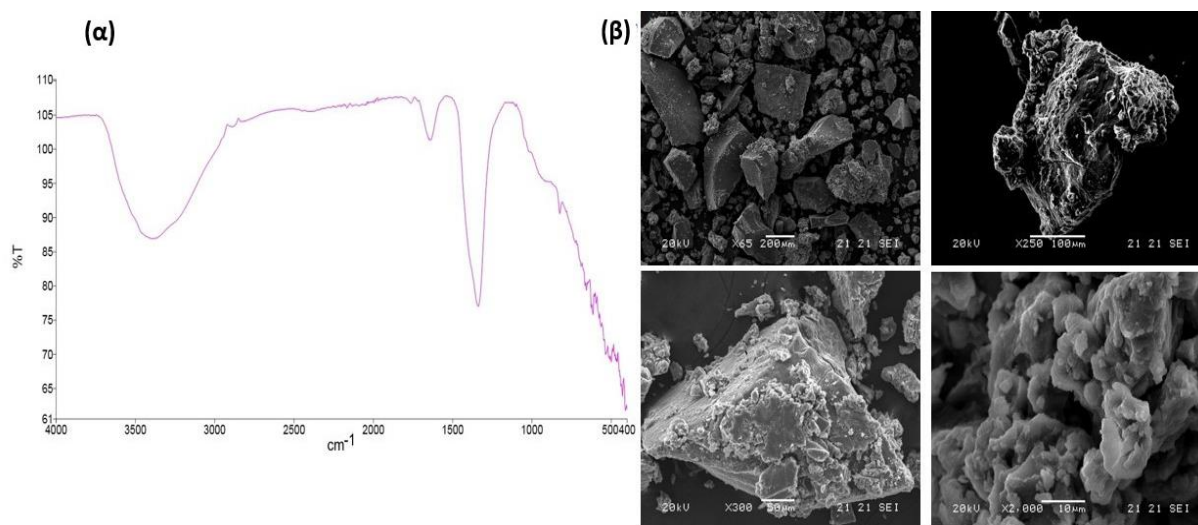
Πραγματικά δείγματα (νερό ποταμού, λίμνης και απόβλητα) διηθήθηκαν από γυάλινα φίλτρα μικροϊνών (glass microfiber) μεγέθους οπών 0,45  $\mu\text{m}$ . Στη συνέχεια, γνωστές ποσότητες AuNPs εμβολιάστηκαν και τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν χωρίς άλλη κατεργασία.

### 3.5 Αποτελέσματα και συζήτηση

#### 3.5.1 Χαρακτηρισμός των LDH και μηχανισμός εκχύλισης των AuNPs

Τα LDH που σχηματίστηκαν παρουσίαζαν τα γενικά χαρακτηριστικά των LDH, όπως αναφέρθηκαν και σε προηγούμενες μελέτες, και συγκεκριμένα τις χαρακτηριστικές κορυφές IR στα  $3450\text{ cm}^{-1}$  των O-H δονήσεων, τις δονήσεις κάμψης O-H περίπου στα  $1630\text{ cm}^{-1}$ , τις δονήσεις των  $\text{NO}_3$  στα  $1380\text{ cm}^{-1}$  και τις δονήσεις Mg-O-Al στα  $450\text{ cm}^{-1}$  (Σχήμα 3.1α) (Tang S. and Lee H.K., 2013). Οι εικόνες SEM (Σχήμα 3.1β) δείχνουν ότι τα LDH έχουν την μορφή ελάσματος και γενικά έχουν μια

εξαγωνική μορφολογία που είναι χαρακτηριστική για πολλά LDH (Murath S. et al., 2017, Saber O. and Tagaya H., 2008).



**Σχήμα 3.1.** (α) Φάσμα ATR-IR των  $Mg^{2+} / Al^{3+}$  LDH. (β) Εικόνες SEM των LDH σε διαφορετική μεγέθυνση (από αριστερά προς τα δεξιά: 65, 100, 300, 2000).

### 3.5.2 Βελτιστοποίηση της πειραματικής πορείας για την εκχύλιση των AuNPs

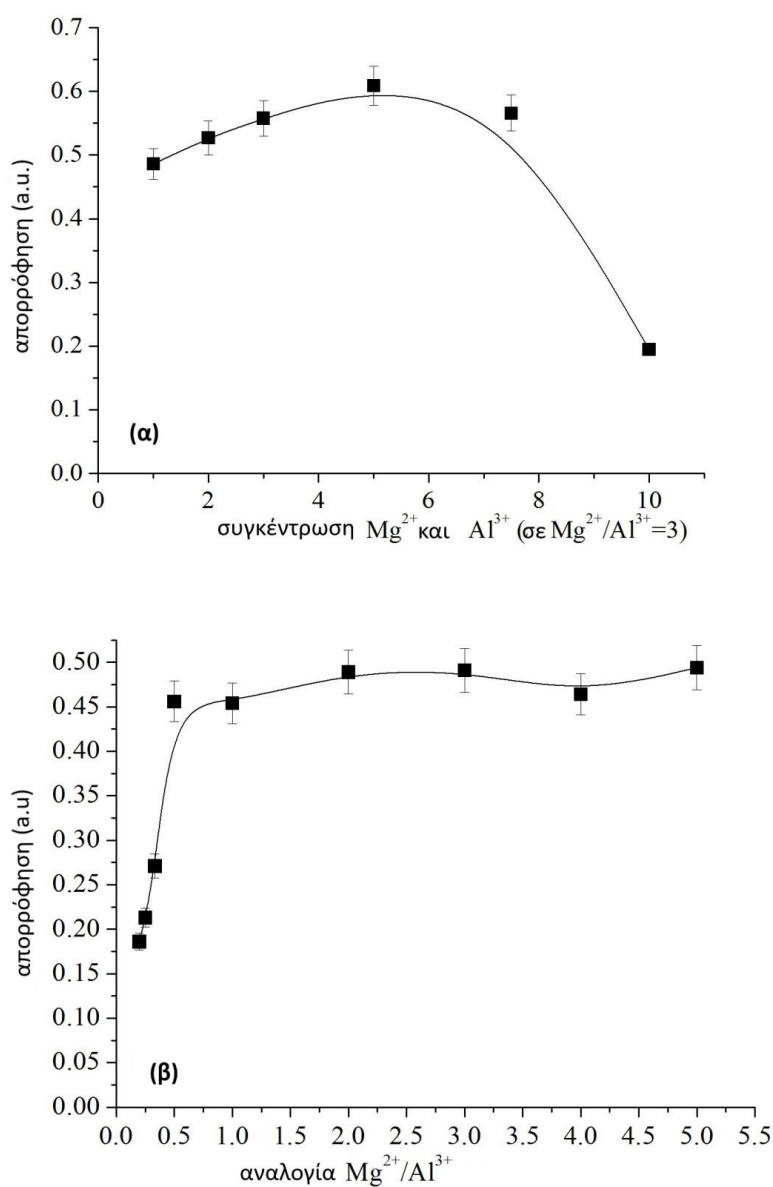
Η αποτελεσματικότητα των LDH στην εκχύλιση των AuNPs από υδατικά δείγματα βελτιστοποιήθηκε με διερεύνηση της συγκέντρωσης και της αναλογίας των πρόδρομων μεταλλικών ιόντων ( $Mg^{2+}$  και  $Al^{3+}$ ), της συγκέντρωσης του KOH, του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης καθώς και των παραμέτρων που σχετίζονται με τη συλλογή και την έκλυση των AuNPs (δηλ. τα στάδια φυγοκέντρησης και έκλυσης). Όλα τα πειράματα βελτιστοποίησης πραγματοποιήθηκαν σε 10 mL υδατικών διαλυμάτων εμβολιασμένα με  $15,8 \text{ nmol L}^{-1}$  CA@AuNPs (4nm). Λόγω του γεγονότος ότι τα AuNPs παρουσιάζουν χαρακτηριστικό μέγιστο μήκος κύματος που σχετίζεται με τον συντονισμό των επιφανειακών πλασμονίων τους, οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά καταγράφοντας την απορρόφηση των εκχυλισμάτων (0,5 mL από  $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  HCl) στο μέγιστο μήκος κύματος. Υπό τις βέλτιστες συνθήκες, η μέθοδος εφαρμόστηκε με χρήση ETAAS ώστε να επιτευχθούν χαμηλά όρια ανίχνευσης. Λόγω όμως του γεγονότος ότι η ETAAS δεν μπορεί να

διαχωρίσει σωματίδια από μεταλλικά ιόντα υλοποιήθηκε ένα επιπλέον πειραματικό στάδιο για την απομόνωση των AuNPs (20nm) από τα ιόντα χρυσού με χρήση υπερφυγοκέντρωσης προκειμένου να απαλλαχθεί το εκχύλισμα από τα συνεκχυλιζόμενα είδη που μπορούν να παρεμποδίζουν την ανάλυση και να παρερμηνευτούν ως AuNPs.

### 3.5.3 Επίδραση της συγκέντρωσης $Mg^{2+}$ και $Al^{3+}$ και της αναλογίας τους

Η συγκέντρωση καθώς και η αναλογία δισθενών και τρισθενών μεταλλικών ιόντων επηρεάζουν τόσο τη δομή όσο και το επιφανειακό φορτίο των LDH. Ο λόγος  $M^{2+} / M^{3+}$  πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 2 και 4 ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός των LDH (Mishra G. et al., 2018). Επομένως, η επίδραση της συγκέντρωσης  $Mg^{2+}$  και  $Al^{3+}$  αρχικά διερευνήθηκε σε αναλογία  $Mg^{2+} / Al^{3+}$  1:3 μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση των ολικών κατιόντων από 1,0 έως 10,0 mmol L<sup>-1</sup> (Σχήμα 3.2α). Η ένταση της απορρόφησης αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των κατιόντων έως 5 mmol L<sup>-1</sup> αλλά μειώνεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, η βέλτιστη συγκέντρωση των  $Mg^{2+}$  και  $Al^{3+}$  ρυθμίστηκε σε 5 mmol L<sup>-1</sup> (3.75 mmol L<sup>-1</sup>  $Mg^{2+}$  και 1.25 mmol L<sup>-1</sup>  $Al^{3+}$ ).

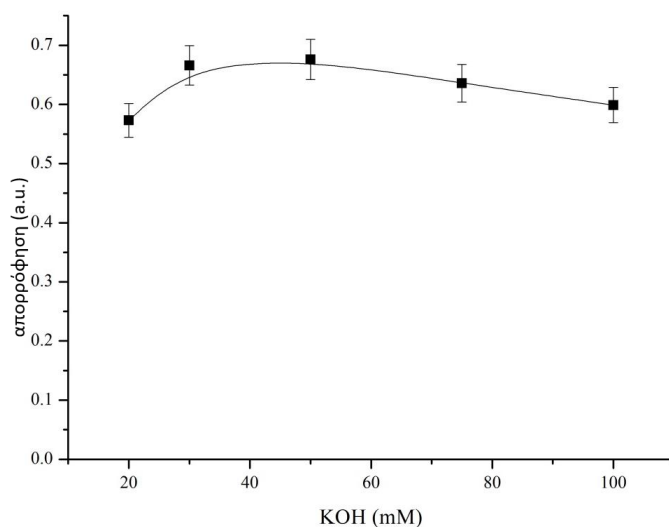
Όσον αφορά την αναλογία  $Mg^{2+}/Al^{3+}$ , παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη απόδοση εκχύλισης επιτυγχάνεται με λόγο  $Mg^{2+}/Al^{3+}$  μεγαλύτερο από 1:2 (Σχήμα 3.2β). Εφόσον μία γραμμομοριακή αναλογία 3:1 χρησιμοποιείται συνήθως σε εκχυλίσματα με τη χρήση των LDH, θεωρήσαμε την τυπική αναλογία  $Mg^{2+}/Al^{3+} = 3$  ως βέλτιστη.



**Σχήμα 3.2.** Επίδραση (α) της συγκέντρωσης  $Mg^{2+}/Al^{3+}$  και (β) της αναλογίας στην εκχύλιση. Συνθήκες: 15,8 nmol  $L^{-1}$  κίτρινα AuNPs (4 nm), 100 mmol  $L^{-1}$  KOH, θερμοκρασία δωματίου, χρόνος ανάμιξης 1 λεπτό, φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στις 6000 rpm (4200 g), διαλυτοποίηση σε 0,5 mL 0,5 mol  $L^{-1}$  HCl.

### 3.5.4 Επίδραση της συγκέντρωσης ΚΟΗ

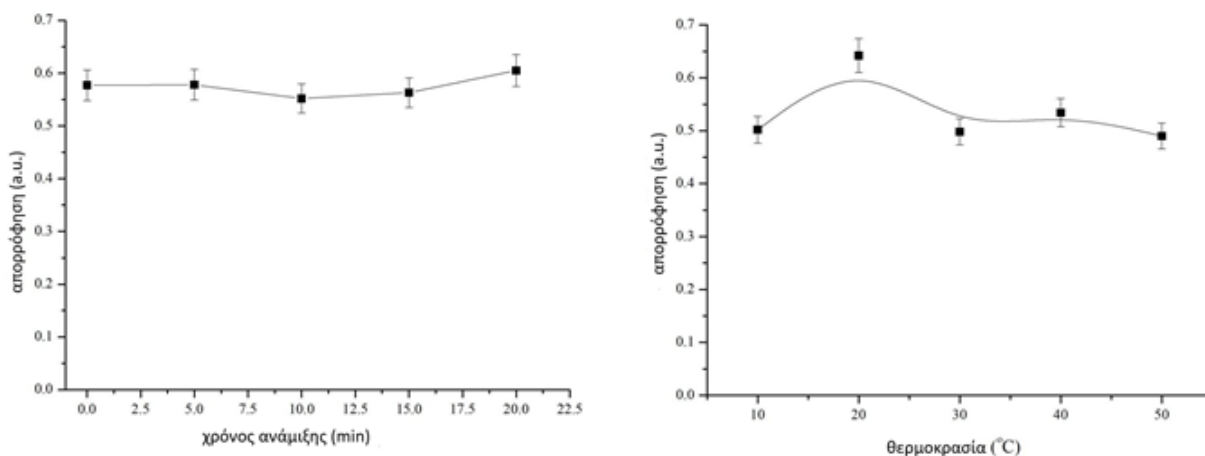
Η προσθήκη αλκαλίων δεν αποτελεί μόνο βασική προϋπόθεση για τον σχηματισμό LDH με συγκαταβύθιση, αλλά καθορίζει επίσης, το επιφανειακό φορτίο των AuNPs και συνεπώς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την θετικά φορτισμένη επιφάνεια των LDH. Η επίδραση της συγκέντρωσης  $\text{OH}^-$  μελετήθηκε από 10-100 mmol  $\text{L}^{-1}$  με ταχεία προσθήκη διαλύματος ΚΟΗ στο δείγμα που περιείχε τα AuNPs και τα διαλυτά άλατα των  $\text{Mg}^{2+}$  και  $\text{Al}^{3+}$ . Από τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο Σχήμα 3.3 καθίσταται σαφές ότι το υψηλότερο σήμα απορρόφησης λαμβάνεται μεταξύ 30 και 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  ιόντων υδροξυλίου ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις το σήμα μειώνεται ελάχιστα πιθανώς λόγω του ισχυρού ανταγωνισμού των ανιόντων  $\text{OH}^-$  με τα κιτρινά AuNPs (τα οποία σε αλκαλικές συνθήκες είναι αρνητικά φορτισμένα), για το θετικό επιφανειακό φορτίο των στιβάδων των LDH. Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση ΚΟΗ 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  καθ' όλη την υπόλοιπη εργασία για τον σχηματισμό των LDH.



**Σχήμα 3.3.** Επίδραση της συγκέντρωσης ΚΟΗ στην απόδοση της εκχύλισης των AuNPs.

### 3.5.5 Επίδραση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης

Ο χρόνος και η θερμοκρασία εκχύλισης μελετήθηκαν σε εύρος από 2 έως 45 λεπτά και 10-50°C, αντίστοιχα (Σχήμα 3.4). Τα δεδομένα δείχνουν ότι η εκχύλιση επιτυγχάνει ραγδαία ισορροπία σε θερμοκρασία δωματίου πιθανώς επειδή ο επί τόπου σχηματισμός των LDH διευκολύνει την αυθόρμητη αλληλεπίδραση των AuNPs με τα LDH. Οι μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης ή η αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος δεν βελτιώνουν την απόδοση της εκχύλισης, όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι το σήμα απορρόφησης φτάνει σε πλατώ ή μειώνεται, αντίστοιχα. Αυτές οι συνθήκες είναι ιδιαιτέρως ευνοϊκές επειδή μπορεί να πραγματοποιηθεί κατεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων χωρίς την ανάγκη για αυστηρό έλεγχο του χρόνου αντίδρασης και της θερμοκρασίας σε κάθε δείγμα.

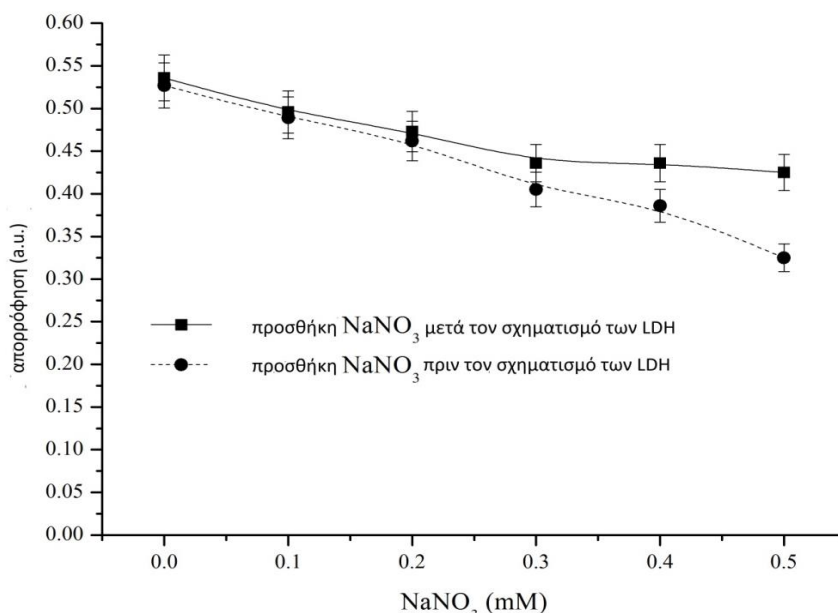


**Σχήμα 3.4.** Επίδραση του χρόνου εκχύλισης και της θερμοκρασίας στην απόδοση της εκχύλισης των AuNPs.

### 3.5.6 Επίδραση της ιοντικής ισχύος

Η προσθήκη ανόργανων ηλεκτρολυτών για τη ρύθμιση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος μπορεί να επηρεάσει την απόδοση της εκχύλισης με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος είναι αντισταθμίζοντας το αρνητικό επιφανειακό φορτίο των AuNPs, το οποίο μπορεί να διευκολύνει τη συσσωμάτωσή τους και να μειώσει την ηλεκτροστατική τους αλληλεπίδραση με την θετικά φορτισμένη επιφάνεια των LDH. Ο δεύτερος είναι η επίδραση της δομής και της μορφολογίας των LDH καθώς και η εκλεκτικότητα της ανιονανταλλαγής των LDH. Τα LDH παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας νιτρικά ως αντισταθμιστικά ιόντα

χρησιμοποιώντας νιτρικά άλατα  $Mg^{2+}$  και  $Al^{3+}$ . Επομένως, μελετήσαμε την επίδραση της ιοντικής ισχύος χρησιμοποιώντας  $NaNO_3$  προκειμένου να αποφύγουμε αντιδράσεις ανταλλαγής ανιόντων με άλλα ανιόντα. Η προσθήκη  $NaNO_3$  εξετάστηκε για συγκεντρώσεις από 0 έως  $500\text{ mmol L}^{-1}$  σε δύο πειράματα. Στο πρώτο πείραμα προστέθηκε  $NaNO_3$  μετά τον σχηματισμό των LDH ενώ στο δεύτερο πείραμα προστέθηκε  $NaNO_3$  πριν από το σχηματισμό των LDH. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.5 δείχνουν ότι η προσθήκη συγκέντρωσης  $NaNO_3$  προκαλεί μείωση των σημάτων απορρόφησης. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η περίσσεια ποσότητας ανιόντων αντισταθμίζει το (αντίθετο) επιφανειακό φορτίο των LDH (Pavlovic M. et al., 2016, Saber O. and Tagaya H., 2008). Αυτό με τη σειρά του μειώνει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων CA@AuNPs και των θετικά φορτισμένων LDH, μειώνοντας την απόδοση της εκχύλισης. Παράλληλα, καθώς η συγκέντρωση αντισταθμιστικών ιόντων  $Na^+$  αυξάνεται, το αρνητικό επιφανειακό φορτίο των CA@AuNPs αντισταθμίζεται (μειώνεται). Επομένως, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ CA@AuNPs και LDH καταστέλλονται σημαντικά.

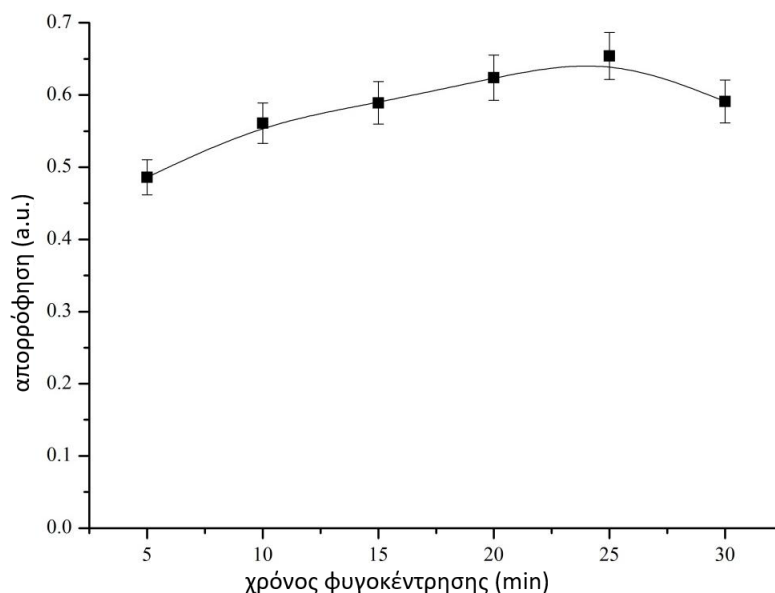


**Σχήμα 3.5.** Επίδραση της ιοντικής ισχύος στην εκχύλιση. Συνθήκες:  $15,8\text{ nmol L}^{-1}$  AuNPs επικαλυμμένα με κιτρικά (4nm), θερμοκρασία δωματίου, συγκέντρωση  $Mg^{2+}$  και  $Al^{3+}$   $6,7\text{ mmol L}^{-1}$  (1/3),  $50\text{ mmol L}^{-1}$  KOH, χρόνος ανάμιξης 1 min, φυγοκέντρωση για 30 min στις 6000 rpm (4200 g), διαλυτοποίηση σε 0,5 mL  $0,5\text{ mol L}^{-1}$  HCl.

Αυτοί οι μηχανισμοί επαληθεύονται από το γεγονός ότι η μείωση στην απόδοση της εκχύλισης είναι πιο σημαντική όταν προστίθεται  $\text{NaNO}_3$  πριν από το σχηματισμό των LDH επειδή τα ιόντα  $\text{Na}^+$  μπορούν να αντισταθμίσουν το επιφανειακό φορτίο των  $\text{CA@AuNPs}$  πριν αλληλεπιδράσουν με τη θετικά φορτισμένη επιφάνεια των LDH. Από την άλλη πλευρά, όταν προστίθεται  $\text{NaNO}_3$  μετά τον σχηματισμό των LDH, η επίδραση του  $\text{NaNO}_3$  είναι μικρότερη, επειδή ένα μέρος των  $\text{CA@AuNPs}$  έχει ήδη αλληλεπιδράσει με τα LDH. Ως εκ τούτου, στην περίπτωση αυτή, η μείωση της απόδοσης της εκχύλισης μπορεί να οφείλεται στον ανταγωνισμό για τα υπόλοιπα κιτρικά AuNPs. Βάσει αυτών των παρατηρήσεων καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε δείγματα νερού χαμηλής ιοντικής ισχύος (π.χ. ποτάμι, λίμνη κλπ.) αλλά όχι σε δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι, όπως θαλασσινό νερό, ύδατα εκβολών ποταμών κλπ.

### 3.5.7 Εκχύλιση και έκλουση των AuNPs

Το τελικό στάδιο στην εκχύλιση των AuNPs περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των LDH από την υδατική φάση και τη διαλυτοποίησή τους. Από το Σχήμα 3.6 μπορούμε να συμπεράνουμε ότι είναι απαραίτητη η φυγοκέντρωση για 25 λεπτά στις 6000 στροφές ανά λεπτό (4.200 g) για να συλλεχθούν ποσοτικά τα LDH. Σε μικρότερους χρόνους φυγοκέντρωσης δεν διαχωρίζονται αποτελεσματικά τα LDH που παραμένουν στο διάλυμα, όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι τα διαλύματα παραμένουν θολά και παρεμποδίζουν την ανάλυση. Επομένως, η ικανότητα εκχύλισης των AuNPs μειώνεται, όπως επίσης και η ένταση της απορρόφησης των AuNPs στο διάλυμα εκχύλισης (2.5 M HCl)(Σχήμα 3.6).



**Σχήμα 3.6.** Επίδραση του χρόνου φυγοκέντρωσης στις 6000 rpm στην απόδοση της SPE στα AuNPs.

Η διαλυτοποίηση των LDH που συλλέγεται μετά τη φυγοκέντρωση είναι ένα κρίσιμο βήμα στη συνολική διαδικασία. Τα LDH πρέπει να διαλυτοποιούνται ποσοτικά, προκειμένου να μην παρεμποδίζουν τις μετρήσεις και να απελευθερωθούν τα AuNPs τα οποία έχουν εκχυλιστεί. Η διαλυτοποίηση των LDH επιτυγχάνεται εύκολα με την προσθήκη HCl αλλά η συγκέντρωση του HCl που απαιτείται για τη διαλυτοποίηση των LDH, εξαρτάται από την ποσότητα των LDH που σχηματίστηκε κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, η οποία με τη σειρά της προσδιορίζεται από τον όγκο του δείγματος που εκχυλίζεται. Για παράδειγμα, για τη διατήρηση σταθερής συγκέντρωσης  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Mg}^{2+} / \text{Al}^{3+}$  (σε γραμμομοριακή αναλογία 3) απαιτούνται 50  $\mu\text{mol}$  ιόντων  $\text{Mg}^{2+}$  και  $\text{Al}^{3+}$  για 10 mL υδατικού διαλύματος δείγματος και 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  για 50 mL υδατικού διαλύματος δείγματος. Μέσω πειραματικών δοκιμών διαπιστώσαμε ότι η συγκέντρωση του HCl αυξάνεται σχεδόν αναλογικά με την ποσότητα LDH. Συγκεκριμένα, τα LDH που σχηματίστηκαν από 50  $\mu\text{mol}$  κατιόντων  $\text{Mg}^{2+}$  και  $\text{Al}^{3+}$  ( $1/3$ ) απαιτούν για την πλήρη διαλυτοποίηση τους 0,5 mL από διάλυμα  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  HCl ενώ τα LDH που σχηματίστηκαν από 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  κατιόντων  $\text{Mg}^{2+}$  και  $\text{Al}^{3+}$  ( $1/3$ ) απαιτούν για την πλήρη διαλυτοποίηση τους 0,5 mL από διάλυμα  $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  HCl. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις και για να διατηρηθεί μια σταθερή πειραματική διαδικασία, ανεξάρτητα από τον όγκο του δείγματος, διαλυτοποιήσαμε τα LDH σε 0,5 mL  $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  HCl.

### 3.5.8 Εκχύλιση AuNPs διαφορετικών μεγεθών και επικαλύψεων

Τα AuNPs χρησιμοποιούνται σε πληθώρα διαφορετικών εφαρμογών, επομένως, αναμένεται ότι θα απελευθερώνονται στο περιβάλλον σε μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών μεγεθών, μορφολογιών και επιφανειακών επικαλύψεων. Επιπλέον, τα AuNPs υφίστανται μια σειρά φυσικοχημικών μετασχηματισμών στο περιβάλλον που αλλάζουν τα αρχικά δομικά τους χαρακτηριστικά και ιδιότητες (Wang Q. and O'Hare D., 2012). Επομένως, για να καταστεί δυνατός ο προσδιορισμός των AuNPs σε περιβαλλοντικά δείγματα, οι αναλυτικές μέθοδοι θα πρέπει να είναι σε θέση να εκχυλίσουν και να προσδιορίσουν τη συνολική συγκέντρωση των AuNPs ανεξαρτήτως του μεγέθους και της επιφανειακής τους επικάλυψης.

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου ως προς την εκχύλιση AuNPs διαφορετικών μεγεθών και επιφανειακών επικαλύψεων αξιολογήθηκε με εκχύλιση 10 mL υδατικών διαλυμάτων που περιείχαν κιτρικά AuNPs από 4 έως 60 nm και AuNPs (4 nm) επικαλυμμένα με διάφορες επικαλύψεις (εκτός από κιτρικά) όπως πολυμερή (PVP και PVA) και βιομόρια (κυστεΐνη). Αυτές οι επιφανειακές επικαλύψεις καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα αντιδραστηρίων επικάλυψης AuNPs που χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση των AuNPs μέσω ηλεκτροστατικών, στερεοχημικών και ηλεκτροστερικών αλληλεπιδράσεων.

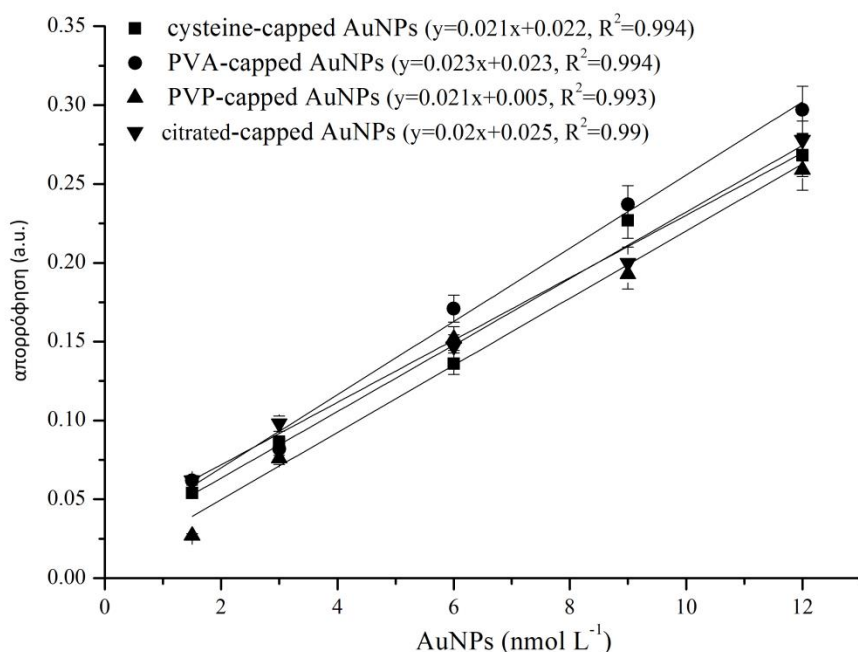
Ο Πίνακας 3.2 παρουσιάζει τις εξισώσεις βαθμονόμησης της μεθόδου με κιτρικά AuNPs διαφόρων μεγεθών. Για να γίνει εφικτή η άμεση σύγκριση μεταξύ διαφορετικών μεγεθών, οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη γραμμομοριακή συγκέντρωση των ιόντων χρυσού (που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των AuNPs) και τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε λογαριθμικές καμπύλες, καθώς για μεγαλύτερα AuNPs η απόκριση απέκλινε σημαντικά από τη γραμμικότητα. Οι κλίσεις των εξισώσεων βαθμονόμησης μειώνονταν με την αύξηση του μεγέθους των AuNPs, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο καθώς α) AuNPs διαφορετικών μεγεθών περιέχουν διαφορετικές ποσότητες ατόμων χρυσού β) τα εναιωρήματα AuNPs αποτελούνται από διάφορα μεγέθη νανοσωματιδίων (δηλαδή περιέχουν νανοσωματίδια διαφορετικών μεγεθών) με μέση κατανομή στο υπολογιζόμενο μέγεθος και γ) τα AuNPs έχουν διαφορετικό μέγιστο μήκος κύματος

απορρόφησης που μετατοπίζεται προς το ερυθρό καθώς αυξάνεται το μέγεθός τους. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί και σε άλλες μεθόδους (Hartmann G. and Schuster M. 2013, Mandyla S.P. et al., 2017). Από αυτές τις παρατηρήσεις καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για να εκτιμηθεί η συνολική συγκέντρωση των AuNPs με την προβολή του μετρούμενου σήματος σε εκείνο που λαμβάνεται από AuNPs συγκεκριμένου μεγέθους (δηλ. η συγκέντρωση εκφράζεται ως ισοδύναμα με τα AuNPs ενός συγκεκριμένου μεγέθους που χρησιμοποιήθηκε για βαθμονόμηση). Αυτή η προσέγγιση είναι κοινή σε όλες τις γενικές αναλυτικές μεθόδους που μετρούν τη συνολική συγκέντρωση μιας συγκεκριμένης κατηγορίας ενώσεων (π.χ. προσδιορισμοί για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος, μέθοδοι ολικής φαινολικής περιεκτικότητας ως ισοδύναμα trolox κλπ.) και έχει υιοθετηθεί ευρέως για την ανάλυση των μεταλλικών νανοσωματιδίων με διάφορες μεθόδους και τεχνικές που υπολογίζουν τη συγκέντρωση νανοσωματιδίων με βάση μια μέση διάμετρο νανοσωματιδίων (συνήθως μεταξύ 15-20 nm) (Choleva T.G. et al., 2019, Hartmann G. and Schuster M., 2013, Mandyla S.P. et al., 2017, Su S. et al., 2014).

**Πίνακας 3.2.** Λογαριθμική συνάρτηση βαθμονόμησης (σε μορφή  $y = a \ln x + b$ ) από την εκχύλιση των AuNPs επικαλυμμένων με κιτρινά διαφορετικού μεγέθους.

| Μέγεθος (nm) | Κλίση | Intercept | Εύρος<br>συγκέντρωσης<br>(Au <sup>3+</sup> mol L <sup>-1</sup> x<br>10 <sup>-6</sup> ) | R <sup>2</sup> |
|--------------|-------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 4            | 0,19  | 2,47      | 3-20                                                                                   | 0,991          |
| 7            | 0,16  | 2,20      | 1,5-10                                                                                 | 0,98           |
| 10           | 0,17  | 2,20      | 3-20                                                                                   | 0,98           |
| 14           | 0,11  | 1,44      | 3-30                                                                                   | 0,99           |
| 20           | 0,1   | 1,32      | 2-30                                                                                   | 0,994          |
| 30           | 0,09  | 1,30      | 5-30                                                                                   | 0,997          |
| 50           | 0,08  | 1,10      | 2-30                                                                                   | 0,98           |
| 60           | 0,05  | 0,76      | 3-30                                                                                   | 0,996          |

Για να μελετήσουμε την απόδοση εκχύλισης των AuNPs τα οποία έχουν σταθεροποιηθεί με διαφορετικές επιφανειακές επικαλύψεις, παρασκευάσαμε AuNPs επικαλυμμένα με PVP, PVA, κυστεΐνη και κιτρικά ιόντα και τα εκχύλισαμε υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Οι καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν έδειξαν ότι τα κιτρικά AuNPs εκχυλίζονται πιο αποδοτικά από ότι τα AuNPs επικαλυμμένα με άλλα μόρια. Αυτό αποδόθηκε στο επιφανειακό φορτίο των CA@AuNPs σε σχέση με άλλες επικαλύψεις όπως PVP, PVA και κυστεΐνη. Παρόλο που όλα τα AuNPs που εξετάστηκαν έχουν αρνητικό φορτίο, τα κιτρικά AuNPs έχουν μικρότερο ζήτα δυναμικό (Das T. et al., 2017, Zakaria H.M. et al., 2013). Επιπλέον, το κιτρικό ιον είναι ένα μικρό μόριο σε σύγκριση με μεγαλομόρια όπως το PVP και το PVA τα οποία ασκούν σημαντικές στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις. Τέλος, η κυστεΐνη, αν και έχει μια ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα όπως τα κιτρικά ιόντα, διαθέτει επίσης μια αμινομάδα η οποία είναι θετικά φορτισμένη στις πειραματικές συνθήκες ( $pK_a = 8,2$ ) και μπορεί να απωθήσει τα θετικά φορτισμένα LDH. Όταν τα κιτρικά AuNPs προστέθηκαν στο νερό της βρύσης, οι καμπύλες δόσης-απόκρισης ήταν παρόμοιες με εκείνες που παρατηρήθηκαν για άλλες επικαλύψεις AuNPs. Αυτό αποδόθηκε στη συμπλοκοποίηση των αλκαλικών γαιών με τις καρβοξυλικές ομάδες των κιτρικών ιόντων που εξουδετερώνουν το επιφανειακό φορτίο των CA@AuNPs (Koutsoulis N.P. et al., 2010). Αντίθετα, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στις καμπύλες απόκρισης-δόσης των AuNPs επικαλυμμένα με PVP, PVA και κυστεΐνη σε νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό. Ως εκ τούτου, σε πραγματικά δείγματα η απόκριση των AuNPs είναι ομοιόμορφη για διάφορες επικαλύψεις (Σχήμα 3.7).



**Σχήμα 3.7.** Καμπύλες βαθμονόμησης από την εκχύλιση 10 ml νερού βρύσης εμβολιασμένου με AuNPs (4nm) αυξανόμενων συγκεντρώσεων και διαφορετικών επικαλύψεων.

### 3.5.9 Συνδυασμός της μεθόδου με την ατομική φασματοσκοπία και μελέτη της εκλεκτικότητας της μεθόδου

Η φασματοφωτομετρία μπορεί να είναι μια εύκολη και απλή μέθοδος για τον προσδιορισμό των AuNPs λόγω της χαρακτηριστικής απορρόφησής τους στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Ωστόσο, η ευαισθησία της φασματοφωτομετρίας περιορίζεται στα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης των nmol L<sup>-1</sup>. Συγκεκριμένα, η λειτουργία βαθμονόμησης που προέκυψε από τη φασματοφωτομετρική ανίχνευση με εκχύλιση 50 mL υδατικών διαλυμάτων που περιέχουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις CA@AuNPs (4 nm, 8 σημεία βαθμονόμησης) ήταν γραμμική στην κλίμακα 0,14 - 2,1 nmol L<sup>-1</sup> (ή 0,09-1,4 mg L<sup>-1</sup> Au<sup>+</sup>) σύμφωνα με τη συνάρτηση βαθμονόμησης  $y = 0,28x - 0,02$ ,  $R^2 = 0.998$ . Τέτοιες συγκεντρώσεις μπορεί να βρεθούν μελλοντικά στα λύματα εργαστηρίων ή των

βιομηχανιών που παράγουν μεγάλες ποσότητες AuNPs αλλά οι συγκεντρώσεις των AuNPs που απελευθερώνονται στο περιβάλλον δεν αναμένεται να υπερβούν τα επίπεδα  $\text{ng L}^{-1}$  ή  $\text{pg L}^{-1}$ . Ως εκ τούτου, απαιτούνται πιο ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές που βασίζονται στην ατομική φασματοσκοπία για την παρακολούθηση των AuNPs στο περιβάλλον.

Η εφαρμογή της ETAAS εξετάστηκε ως μέσο βελτίωσης της ευαισθησίας της μεθόδου καθώς επιτρέπει τον προσδιορισμό των AuNPs σε επίπεδα  $\text{ng L}^{-1}$  και  $\text{pg L}^{-1}$ . Ωστόσο, η ETAAS δεν μπορεί να διακρίνει τα AuNPs από τα διαλυμένα ιόντα Au που μπορεί να συνυπάρχουν στα φυσικά ύδατα και τα οποία μπορούν να συνυπολογιστούν ως AuNPs προκαλώντας ψευδώς θετικές παρεμποδίσεις στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των AuNPs. Για να διερευνηθεί η εκλεκτικότητα της μεθόδου, εκχυλίσουμε υδατικά διαλύματα που περιέχουν CA@AuNPs (20 nm),  $\text{AuCl}_4^-$  και μίγματα 1: 1  $\text{AuCl}_4^-$  / CA@AuNPs (20 nm) σε ισογραμμομοριακά επίπεδα συγκέντρωσης χρυσού κάτω από τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι εκτός από τα AuNPs και τα ιόντα  $\text{AuCl}_4^-$  εκχυλίστηκαν αποτελεσματικά από τα LDH. Συγκεκριμένα τα ιόντα  $\text{AuCl}_4^-$  μπορούσαν να εκχυλιστούν ποσοτικά σε συγκεντρώσεις έως και  $6 \text{ mg L}^{-1}$  λόγω της ανταλλαγής ανιόντων με τα νιτρικά ιόντα που βρίσκονται ανάμεσα στις στοιβάδες των LDH, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ιόντα χρυσού σε περιβαλλοντικά δείγματα θα εκχυλίζονται επίσης ποσοτικά και θα παρερμηνεύονται ως AuNPs.

Για να αντιμετωπίσουμε αυτή την παρεμπόδιση εισάγαμε ένα βήμα καθαρισμού πριν από την ανάλυση με ETAAS. Σε αυτό το στάδιο, το όξινο εκχύλισμα που ελήφθη μετά τη διαλυτοποίηση των LDH με HCl, υπερφυγοκεντρήθηκε τρεις φορές σε 18000 rpm (15.120 g) για 20 min για να καταβυθιστούν τα AuNPs (<https://www.nanopartz.com/gold-nanoparticles-properties-centrifuge-speeds.asp>). Τα AuNPs που καταβυθίστηκαν στον πυθμένα του φιαλιδίου (Eppendorf 1,5 mL) επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα 6 M  $\text{HNO}_3$  και ένα κλάσμα 20  $\mu\text{L}$  αυτού του δείγματος αναλύθηκε απευθείας στη ETAAS. Επιπλέον, λόγω του βήματος καθαρισμού, αποφεύχθηκαν παρεμποδίσεις από άλλα ιόντα (όπως  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  και  $\text{Zn}^{2+}$ ) που μπορεί επίσης να καταβυθίζονται στο pH εργασίας.

### 3.5.10 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

Για την αξιολόγηση των αναλυτικών χαρακτηριστικών της μεθόδου εκχυλίσσαμε 50 mL υδατικών διαλυμάτων που περιείχαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις CA@AuNPs (20 nm) και υπολογίστηκε η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης, η αναπαραγωγιμότητα και οι ανακτήσεις από διάφορα υδατικά δείγματα.

Τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι οι καμπύλη βαθμονόμησης που ελήφθησε από 8 σημεία βαθμονόμησης περιγράφεται από ένα πολυώνυμο πρώτης τάξης στην περιοχή των 50-500 fmol L<sup>-1</sup> (12–120 ng L<sup>-1</sup> ιόντα Au) σύμφωνα με την εξίσωση  $y = 5 \times 10^{-4} - 0,01$ ,  $R^2 = 0,998$ . Η γραμμική περιοχή που λαμβάνεται με την χρήση ETAAS καλύπτει τις περιοχές συγκέντρωσης που προβλέπονται για τα νανοϋλικά σε περιβαλλοντικά δείγματα με βάση μαθηματικά μοντέλα και αλγορίθμους (<https://www.nanopartz.com/gold-nanoparticles-properties-centrifuge-speeds.asp>, Giese B. et al., 2018). Το όριο ανίχνευσης (LOD), που ορίζεται ως ο τριπλάσιος λόγος σήματος προς θόρυβο ήταν 19 fmol L<sup>-1</sup> ή 4,6 ng L<sup>-1</sup> Au<sup>+</sup> (υπολογιζόμενη με βάση σφαιρικά AuNPs με μέση διάμετρο 20 nm), τα οποία είναι καλύτερα ή συγκρίσιμα με τα όρια ανίχνευσης που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες (Choleva T.G. et al., 2016, Hartmann G. and Schuster M., 2013, Li L. and Leopold K., 2012, Li L. et al., 2012, Liu Y. et al., 2016, Mahapatra I. et al., 2015, Mandyla S.P. et al., 2017, Su S. et al., 2014, Tsogas G.Z. et al., 2014, Zhang L. et al., 2015). Το LOD μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω με την αύξηση του λόγου του δείγματος προς τον όγκο του εκχυλίσματος (δηλ. αυξανόμενος όγκος δείγματος ή μείωση του όγκου του HNO<sub>3</sub> στο τελικό στάδιο της διαδικασίας) ή με την προσφυγή σε πιο ευαίσθητους ανιχνευτές όπως το ICP-MS. Υποθέτουμε ότι υψηλότεροι λόγοι σε συνδυασμό με ICP-MS θα μπορούσαν να φέρουν το LOD στα επίπεδα των attomol L<sup>-1</sup>. Το RSD (% , n=5) των μετρήσεων σε επίπεδο συγκέντρωσης 200 fmol L<sup>-1</sup> εκτιμήθηκε σε εμβολιασμένα πραγματικά δείγματα απ και κυμαινόταν από 7,8 έως 8,9% σε απεσταγμένο νερό και νερό ποταμού, αντίστοιχα, το οποίο θεωρήθηκε ικανοποιητικό για την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.

### 3.5.11 Εφαρμογή της μεθόδου και ανακτήσεις

Αν και τα νανοϋλικά θεωρούνται ήδη ως αναδυόμενος περιβαλλοντικός ρύπος, η απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον είναι ακόμα περιορισμένη. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκαν πειράματα εμβολιασμού για την αξιολόγηση της εφαρμοσιμότητας της μεθόδου στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων. Πραγματικά υδατικά δείγματα (νερό ποταμών, νερό λίμνης και υδατικά απόβλητα) εμβολιάστηκαν με AuNPs και εκχυλίστηκαν υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα αποτελέσματά η βαθμονόμηση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε εκχυλίζοντας πρότυπα διαλύματα που αποτελούνται από 50 mL νερό βρύσης εμπλουτισμένο με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CA@AuNPs (20 nm).

Παρά τα πολύ χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων των AuNPs (στα επίπεδα των femto-mol L<sup>-1</sup>), οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 71-91,5% (Πίνακας 3.3), τα οποία είναι εντός του εύρους των ποσοστών ανάκτησης που αναφέρονται και σε άλλες μελέτες (Choleva T.G. et al., 2016, Hartmann G. and Schuster M., 2013, Li L. and Leopold K., 2012, Li L. et al., 2012, Liu Y. et al., 2016, Su S. et al., 2014, Tsogas G.Z. et al., 2014, Zhang L. et al., 2015). Συνεπώς, η μέθοδος είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων AuNPs σε περιβαλλοντικά δείγματα.

**Πίνακας 3.3.** Ανάκτηση AuNPs επικαλυμμένων με κιτρικά από εμβολιασμένα περιβαλλοντικά δείγματα.

| Δείγμα       | Εμβολιασμένα AuNPs (fM) | AuNPs που ανακτήθηκαν (fM) | Ανάκτηση (%) | RSD (% , n=3) |
|--------------|-------------------------|----------------------------|--------------|---------------|
| Νερό ποταμού | 100.0                   | 91                         | 91           | 6.7           |
|              | 200.0                   | 183                        | 91.5         | 6.3           |
| Νερό λίμνης  | 100.0                   | 71                         | 71           | 7.4           |
|              | 200.0                   | 160                        | 80           | 7.1           |
| Απόβλητα     | 200.0                   | 157                        | 78.5         | 8.2           |
|              | 400.0                   | 340                        | 85           | 7.9           |

### 3.6 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφηκε για πρώτη φορά η ικανότητα των φυλλόμορφων διυδροξειδίων να εκχυλίζουν AuNPs από περιβαλλοντικά υδατικά δείγματα. Η εκχύλιση επιτυγχάνεται σε ένα μόνο βήμα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φορτισμένων AuNPs και των LDH με επί τόπου σχηματισμό και διαλυτοποίηση των LDH στο δείγμα ρυθμίζοντας το pH του διαλύματος. Επιπρόσθετα, με τη χρήση αυτής της μεθόδου μπορούν να εκχυλισθούν τόσο τα AuNPs όσο και τα ιόντα Au ενώ ο διαχωρισμός των ειδών επιτυγχάνεται με υπερφυγοκέντρωση. Σε συνδυασμό με ETAAS, η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των AuNPs σε επίπεδα συγκεντρώσεων της τάξης των  $\text{femto-mol L}^{-1}$  με ικανοποιητικά αναλυτικά χαρακτηριστικά και ευαισθησία, που είναι συγκρίσιμα με πιο πολύπλοκες μεθόδους ή προηγμένες αναλυτικές τεχνικές ανίχνευσης. Ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι η χρήση υπερφυγοκέντρωσης πριν από την ανίχνευση. Ωστόσο, η απλότητα της πειραματικής διαδικασίας, η δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων (μπορούν να εκχυλιστούν 36 ή περισσότερα δείγματα ταυτόχρονα ανάλογα με την χωρητικότητα της φυγόκεντρου) και τα πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης (επίδεδα  $\text{femtomoL L}^{-1}$  και ενδεχομένως  $\text{attomoL L}^{-1}$  με πιο ευαίσθητους ανιχνευτές) καθιστούν τη μέθοδο μια εναλλακτική λύση για την ανάλυση AuNPs σε περιβαλλοντικά δείγματα.

### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΕΔΑΦΗ

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σ' αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη μιας μεθόδου διαδοχικής εκχύλισης για την αξιολόγηση της κινητικότητας και της βιοδιαθεσιμότητας μεταλλικών νανοσωματιδίων σε εδάφη. Η διαδικασία, η οποία αναπτύχθηκε με τη χρήση νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs), στηρίζεται στην κλασματοποίηση των νανοσωματιδίων με διαδοχική διαλυτοποίηση των συστατικών της μήτρας του χώματος (ανθρακικά άλατα, μεταλλικά οξείδια, οργανική ύλη και ορυκτά) προκειμένου να απελευθερωθούν τα νανοσωματίδια στο κατάλληλο διάλυμα εκχύλισης. Αθροίζοντας την συγκέντρωση των ανακτηθέντων AuNPs σε κάθε κλάσμα, διαπιστώθηκε ότι μπορούσε να ανακτηθεί το 93,5 % της συγκέντρωσης των εμβολιασμένων AuNPs. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου βρέθηκε ότι εξαρτάται από πειραματικά στάδια εκτός της διαδικασίας διαδοχικής εκχύλισης που σχετίζονται με τον διαχωρισμό των AuNPs από τα κολλοειδή μικρο/νανο-σωματίδια του χώματος και τη δραστηριότητα των αντιδραστηρίων εκχύλισης με τα AuNPs και τα πρόδρομα ιόντα μετάλλων τους (δηλαδή τα ιόντα χρυσού). Με βάση τα αποτελέσματα αναπτύχθηκε επίσης ένα πρωτόκολλο για την ειδοταυτοποίηση των AuNPs και των ιόντων Au σε δείγματα εδαφών. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι τόσο τα AuNPs όσο και τα ιόντα Au σχετίζονται κυρίως με την οργανική ύλη του χώματος, η οποία μειώνει σημαντικά την κινητικότητά τους, ενώ μικρή ποσότητα (<10%) συνδέεται με μεταλλικά οξείδια τα οποία είναι πιο ευκίνητα και δυνητικά βιοδιαθέσιμα.

#### 4.1 Εισαγωγή

Η διαδεδομένη και εκτεταμένη χρήση μεταλλικών νανοσωματιδίων σε πολλούς τομείς της σύγχρονης βιομηχανικής παραγωγής έχει δημιουργήσει σημαντικές ανησυχίες σχετικά με την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον και τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις τους στους ζωντανούς οργανισμούς. Λόγω αυτών των ανησυχιών και λόγω της έλλειψης στοιχείων σχετικά με τα επίπεδα συγκέντρωσης νανοσωματιδίων στο περιβάλλον, αρκετές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει αλγόριθμους και υπολογιστικά μοντέλα προκειμένου να προσδιορίσουν τις κύριες πηγές νανοσωματιδίων και να αξιολογήσουν την έκθεση κάθε περιβαλλοντικού διαμερίσματος (νερό, χώμα / ιζήματα και αέρα) σε νανοσωματίδια (Gottschalk et al., 2009, Gottschalk et al., 2013). Παρά τα διαφορετικά μαθηματικά μοντέλα και τις πηγές δεδομένων που έχουν χρησιμοποιηθεί (Gottschalk et al., 2013), όλα τα αποτελέσματα μοντελοποίησης προβλέπουν ότι οι συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων στα εδάφη και τα ιζήματα πρέπει να είναι σημαντικά υψηλότερες από ότι στα φυσικά ύδατα και τον αέρα λόγω της άμεσης χρήσης νανοσωματιδίων σε διάφορες εφαρμογές (π.χ. εφαρμογές περιβαλλοντικής αποκατάστασης, γεωργία, καθαρισμός των υδάτων, βιομηχανία, κ.λ.π.) καθώς και από έμμεσες πηγές όπως η χρήση της λυματολάσπης ως εδαφοβελτιωτικό, η διάθεση αποβλήτων σε χωματερές κλπ. (Gottschalk et al., 2009, Gottschalk et al., 2013, Tiede et al., 2009, Zanker, Schierz, 2012). Επομένως, ο προσδιορισμός των νανοσωματιδίων στα εδάφη και τα ιζήματα μπορεί να παρέχει σημαντικά στοιχεία σχετικά με την κατανόηση της συμπεριφοράς τους και των πιθανών επιπτώσεων τους στο περιβάλλον.

Ο προσδιορισμός των μεταλλικών νανοσωματιδίων σε εδάφη και ιζήματα απαιτεί μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την εκχύλιση των νανοσωματιδίων από τη σύνθετη μήτρα των στερεών δειγμάτων, τον διαχωρισμό τους από τα γεωγενή μικρο / νανο-κολλοειδή και την ανίχνευσή τους στα χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων μερικών  $\text{ng L}^{-1}$  (Cornelis et al., 2014, Wagner et al., 2014, Wijnhoven et al., 2009). Αν και η ανίχνευση νανοσωματιδίων με τη χρήση τεχνικών ατομικής φασματοσκοπίας βρίσκεται σήμερα σε προχωρημένο επίπεδο, υπάρχει σημαντική έλλειψη μεθόδων εκχύλισης και διαχωρισμού νανοσωματιδίων σε εδάφη. Προηγούμενες μελέτες έχουν διερευνήσει την εκχύλιση νανοσωματιδίων

από εδάφη χρησιμοποιώντας διάφορα αντιδραστήρια όπως απιονισμένο νερό (Mahdi et al., 2017), ανόργανους ηλεκτρολύτες (Cornelis et al., 2012; Peyrot et al., 2014), συμπλεκτικά αντιδραστήρια (Antisari et al., 2013) και αλκαλικά αντιδραστήρια εκχύλισης (Schwertfeger et al., 2017) σε συνδυασμό με διάφορες μεθόδους διαχωρισμού κολλοειδών σωματιδίων (καθίζηση, διήθηση, φυγοκέντρηση). Ως αποτέλεσμα, οι αναφερόμενες ανακτήσεις των νανοσωματιδίων από εδάφη ποικίλουν σημαντικά και κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα (<25-30%). Ωστόσο, όλες οι μελέτες συγκλίνουν στο ότι η οργανική ύλη παίζει καθοριστικό ρόλο στη χημική προσρόφηση των νανοσωματιδίων στο χώμα. Υπό αυτή την έννοια, η μελέτη των Schwertfeger et. al. (2017) έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς περιγράφει μια μέθοδο ποσοτικής ανάκτησης των νανοσωματιδίων (νανοσωματίδια αργύρου) από εδάφη χρησιμοποιώντας το πυροφωσφορικό νάτριο (tetrasodium perorphosphate ή TSPP) ως μέσο εκχύλισης της οργανικής ύλης σε συνδυασμό με καθίζηση ως τεχνική διαχωρισμού των νανοσωματιδίων από άλλα κολλοειδή του χώματος. Συνεπώς, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμεύσει για την εκτίμηση της συνολικής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων στο εδαφικό δείγμα.

Ενώ ο προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων επιτρέπει την αξιολόγηση της έκθεσης και της απελευθέρωσης τους στο περιβάλλον, δεν παρέχει στοιχεία όσον αφορά τη βιοδιαθεσιμότητα ή τη δυνητική βιοδιαθεσιμότητα των νανοσωματιδίων στα εδάφη. Για να ληφθούν αυτές οι πληροφορίες είναι απαραίτητο τα νανοσωματίδια να εκχυλιστούν διαδοχικά από τα συστατικά της μήτρας του χώματος. Στην επιστημονική βιβλιογραφία δεν έχει παρουσιαστεί μία τέτοια μέθοδος ενώ αντίθετα, πληθώρα μελετών είναι διαθέσιμες σχετικά για την κλασμάτωση βαρέων μετάλλων από εδάφη και ιζήματα με τη μέθοδο της διαδοχικής εκχύλισης (Sequential Extraction Procedures - SEPs) (Rodgers et al., 2015, Vodyanitskii, 2006, Zimmerman and Weindorf, 2010). Όλες οι SEP ακολουθούν παρόμοια λογική που βασίζεται στην εφαρμογή μιας σειράς αντιδραστηρίων που μπορούν να διαλυτοποιήσουν, διαδοχικά, συγκεκριμένα συστατικά της μήτρας του χώματος και να απελευθερώνουν τα παγιδευμένα μεταλλικά είδη στο διάλυμα εκχύλισης με βάση την κινητικότητά τους (δηλαδή, τα πιο ευκίνητα και βιοπροσβάσιμα μέταλλα εκχυλίζονται στα πρώτα εκχυλίσματα / κλάσματα). Τα εκχυλιζόμενα κλάσματα είναι το ανταλλάξιμο κλάσμα (το οποίο

περιλαμβάνει τα ασθενώς προσροφημένα χημικά είδη), τα μεταλλικά ιόντα που συνδέονται με ανθρακικά άλατα, τα μεταλλικά ιόντα που είναι προσροφημένα σε (υδρο)οξείδια Fe, Al και Mn, το οργανικά δεσμευμένο (οξειδώσιμο) κλάσμα συμπεριλαμβανομένων των μετάλλων που συνδέονται με θειούχα ορυκτά και το υπολειμματικό κλάσμα στο οποίο τα μέταλλα είναι ισχυρά συνδεδεμένα με τις κρυσταλλικές φάσεις. Το πρωτόκολλο διαδοχικής εκχύλισης θεωρείται ότι είναι επιτυχές εάν το άθροισμα της συνολικής συγκέντρωσης του κάθε μετάλλου που προκύπτει από την προσθήκη των επιμέρους συγκεντρώσεων που προσδιορίζεται σε κάθε κλάσμα ταυτίζεται με την συνολική συγκέντρωση του(των) μεταλλικού(ών) ιόντος(ων) που προσδιορίζεται με ανεξάρτητη χημική ανάλυση του δείγματος.

Σε αυτό το κεφάλαιο οι αρχές των μεθόδων διαδοχικής εκχύλισης εφαρμόζονται για την κλασμάτωση και τη συσσώρευση μεταλλικών νανοσωματιδίων σε χώματα. Χρησιμοποιώντας ως αναφορά την μέθοδο που αναπτύχθηκε από το Community Bureau of Reference (BCR) Procedure για την κλασμάτωση μετάλλων σε χώματα (Ure et al., 1993α), μελετήσαμε και αναπτύξαμε τις συνθήκες εργασίας για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό AuNPs και ιόντων Au από τα δείγματα εδαφών. Με βάση τα αποτελέσματα, αναπτύχθηκε η πρώτη μέθοδος διαδοχικής εκχύλισης, ειδικά σχεδιασμένη για την αξιολόγηση της κινητικότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των AuNPs και των ιόντων Au σε εδάφη που μπορεί να συμβάλλει στην αξιολόγηση της τύχης και της συμπεριφοράς τους στο περιβάλλον.

## **4.2 Υλικά και μέθοδοι**

### **4.2.1 Αντιδραστήρια**

Τριένυδρος τετραχλωριούχος χρυσός ( $\geq 99,9\%$  ιχνοστοιχεία), παγόμορφο οξικό οξύ, οξικό αμμώνιο, υδροχλωρική υδροξυλαμίνη, πυροφωσφορικό τετρανάτριο, βοροϋδρίδιο του νατρίου, θειοθειικό νάτριο, Triton X-114, κιτρικό τρινάτριο, πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP10, μέσο MW 10.000) και υψηλής καθαρότητας νιτρικό οξύ για ανάλυση ανόργανων ιχνών (TraceSELECT® Ultra)

αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Αιθανόλη βαθμού HPLC ελήφθη από την Fisher Scientific (Loughborough, UK).

#### 4.2.2 Εξοπλισμός

Οι εκχυλίσσεις πραγματοποιήθηκαν σε τροχιακό αναδευτήρα WITEG SHO-2D (Wertheim, Γερμανία), ενώ η υπερήχηση πραγματοποιήθηκε σε λουτρό υπερήχων Elmasonic S 30 (Elma, Singen, Germany) (37 KHz). Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης με ατομοποίηση φλόγας (FAAS) Shimadzu AA-6800 (Shimadzu Corp., Kyoto, Ιαπωνία) με λυχνία κοίλης καθόδου με αυτοαναστροφή (self reversal) (Heraeus, Hanau, Γερμανία) που λειτουργεί στα 10 mA, για τις μετρήσεις ιόντων Au και AuNPs που έγιναν στα 242,8 nm. Η βαθμονόμηση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα ιόντων Au εύρους 0-20 mg L<sup>-1</sup>. Η γραφική παράσταση βαθμονόμησης παριστάνεται από την εξίσωση  $y = 0,0205(\pm 0,001)x + 0,067(\pm 0,018)$ ,  $R^2 = 0,997$ , αποδίδοντας όριο ανίχνευσης 0,01 mg L<sup>-1</sup> (υπολογίζεται ως το σήμα του τυφλού συν 3 φορές την τυπική απόκλιση του τυφλού από 10 μετρήσεις). Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Jenway 6405 UV/Vis (Essex, UK) με κυψελίδες χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής 1 cm. Το pH του χώματος που προσδιορίστηκε σε αιώρημα απεσταγμένου νερού (1: 2,5 w/v) με γυάλινο ηλεκτρόδιο (Mettler Toledo F20). Η ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC) μετρήθηκε σε αιώρημα χώματος:νερού 1:5 (w/v) χρησιμοποιώντας διάταξη μέτρησης της αγωγιμότητας Corning 441. Η οργανική ύλη (OM) και το CaCO<sub>3</sub> υπολογίστηκε ως τη διαφορά κατά την ανάφλεξη (% Loss-On-Ignition - LOI) από τη αρχική καύση του δείγματος στους 550 °C σε σταθερό βάρος και στη συνέχεια καύση στους 990 °C, αντίστοιχα.

#### 4.2.3 Σύνθεση AuNPs επικαλυμμένων με κιτρικά και PVP

Συντέθηκαν AuNPs επικαλυμμένων με κιτρικά και PVP σε δύο διαφορετικά μεγέθη (5 nm και 30 nm), σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στα προηγούμενα κεφάλαια και στην βιβλιογραφία (Choleva et al., 2016, Mandyla et al.,

2017; Tsogas et al., 2014). Η συγκέντρωση των ιόντων χρυσού σε κάθε εναιώρημα AuNP προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με ατομοποίηση φλόγας.

#### 4.2.4 Πειράματα φυγοκέντρωσης

Υδατικά εκχυλίσματα χώματος παρασκευάστηκαν με προσθήκη 20 mL απεσταγμένου νερού σε 2,5 g χώματος και ανάμειξη για 24 ώρες σε τροχιακό αναδευτήρα σε 150 rpm. Τα εκχυλίσματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στα 4180 g ώστε να αφαιρεθούν τα σωματίδια και εμβολιάστηκαν με γνωστές συγκεντρώσεις AuNPs. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές επιφανειακές επικαλύψεις (PVP και κιτρικά) και δύο μεγέθη (5 και 30 nm). Τα εκχυλίσματα των εμβολιασμένων χωμάτων επωάστηκαν για 24 ώρες σε τροχιακό αναδευτήρα στις 150 rpm. Κάθε διάλυμα φυγοκεντρήθηκε σε διαφορετικές ταχύτητες περιστροφής (από 700 έως 4180g) σε δυο χρόνους (15 και 30 λεπτά). Ένα μέρος του υπερκείμενου διαλύματος αναρροφήθηκε προσεκτικά με πιπέτα Pasteur και εισρροφήθηκε στο νεφελοποιητή της FAAS.

#### 4.2.5 Εμβολιασμός χώματος

Μη ρυπασμένα δείγματα χώματος (pH = 7,5, EC = 165 mS cm<sup>-1</sup>, OM = 10,4% w/w, CaCO<sub>3</sub> = 13% w/w) συλλέχθηκαν από την Πανεπιστημιούπολη της πόλης των Ιωαννίνων από την επιφάνεια του εδάφους (βάθος έως 10 cm) και ξηράθηκαν για τουλάχιστον 1 εβδομάδα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα κοσκινίστηκαν από κόσκινα διαμέτρου πόρων <2 mm ώστε να αφαιρεθούν τα χοντρόκοκκα συστατικά, αλέστηκαν σε σφαιρόμυλο και, στη συνέχεια, κοσκινίστηκαν ξανά μέσω κόσκινων από ανοξείδωτο χάλυβα διαμέτρου πόρων 63 μm. Το μέρος του χώματος που συλλέχθηκε (<63 μm) εμβολιάστηκε με υγρό εμβολιασμό με γνωστές ποσότητες PVP-AuNPs (5 nm) και Au (Miglietta et al., 2015). Συγκεκριμένα, προστέθηκε πρότυπο υδατικό διάλυμα AuNP ή Au και κατάλληλη ποσότητα ξηρού χώματος σε γυάλινο δοχείο σε αναλογία νερού προς χώμα ίση με 8 προκειμένου να επιτευχθεί συγκέντρωση Au 344 mg g<sup>-1</sup>. Το δοχείο σφραγίστηκε για να αποφευχθεί

η εξάτμιση του νερού και το εναιώρημα παρέμεινε για 48 ώρες σε τροχιακό αναδευτήρα στις 80 rpm. Εν συνεχεία το εναιώρημα ξηράθηκε με σταδιακή ανάμιξη, για τουλάχιστον 1 εβδομάδα σε συνθήκες δωματίου (θερμοκρασία ~22-24 °C και υγρασία ~50-60%). Με τον τρόπο αυτό, θεωρείται ότι μπορεί να επιτευχθεί φυσικοχημική ψευδο-ισορροπία μεταξύ των συστατικών του χώματος με τα AuNPs και τα ιόντα Au (Peyrot et al., 2014).

#### 4.2.6 Μέθοδος διαδοχικής εκχύλισης

Η διαδοχική εκχύλιση των AuNPs πραγματοποιήθηκε σε 2,5 g (εμβολιασμένου) χώματος σε κωνικές φιάλες των 250 ml με την προσθήκη 20 mL των αντιδραστηρίων εκχύλισης. Οι πειραματικές συνθήκες για κάθε στάδιο εκχύλισης περιγράφονται στον Πίνακα 4.1. Κάθε εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε σε 700g για 15 min για τον διαχωρισμό των κολλοειδών του χώματος από τα AuNPs και αναλύθηκε με FAAS.

**Πίνακας 4.1.** Πειραματικές συνθήκες της διαδοχικής εκχύλισης των AuNPs από εδάφη.

| Στάδιο | Αντιδραστήριο εκχύλισης                | Εκχυλίσσεις <sup>α</sup> | Συνθήκες εκχύλισης                                                               | Διαχωρισμός σωματιδίων |
|--------|----------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| A      | 0,11 M CH <sub>3</sub> COOH            | 1                        | Τροχιακή ανάδευση (150rpm), 16h, θερμοκρασία περιβάλλοντος                       | 700g, 15 min           |
| B      | 0,5 M NH <sub>2</sub> OH.HCl           | 1                        | Τροχιακή ανάδευση (150rpm), 16h, θερμοκρασία περιβάλλοντος                       | 700g, 15 min           |
| Γ      | 1 M CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> | 1                        | Τροχιακή ανάδευση (150rpm), 16h, θερμοκρασία περιβάλλοντος                       | 700g, 15 min           |
| Δ      | 2,5 mM TSPP                            | 3                        | Τροχιακή ανάδευση (150rpm), 16h, θερμοκρασία περιβάλλοντος, 1h υπέρηχοι (37 KHz) | 700g, 15 min           |
| E      | 8 M HNO <sub>3</sub>                   | 2                        | 70°C, 3h, ανάδευση                                                               | 4180g, 15 min          |

<sup>α</sup> Αριθμός εκχυλίσεων που πραγματοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο κλάσμα

#### 4.2.7 Ειδοταυτοποίηση των AuNPs και ιόντων Au

Για την ειδοταυτοποίηση των AuNPs και των ιόντων Au, εκχυλίστηκαν 2,5 g του (εμβολιασμένου) χρώματος με 20 mL 2,5 mM TSPP σύμφωνα με την πειραματική πορεία που περιγράφεται στο Στάδιο Δ της μεθόδου της διαδοχικής εκχύλισης (Πίνακας 4.1). Τα εκχυλίσματα από τρεις εκχυλίσεις συνενώθηκαν και κατεργάστηκαν με εκχύλιση σημείου νεφέλωσης (Cloud Point Extraction - CPE) για να διαχωρίσουν τα AuNPs από τα ιόντα Au. Για την εκχύλιση με CPE, 20 mL του εδαφικού εκχυλίσματος μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο falcon. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 3,0 με HCl. Στη συνέχεια, προστέθηκαν διαδοχικά 0,05 M θειοθειικού άλατος και 0,2% (w/v) Triton X-114, αναμίχθηκαν με ανάδευση υπό στροβιλισμό για 1 min και επώαστηκαν για 20 min σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο στους 40 °C. Ο διαχωρισμός φάσεων ολοκληρώθηκε με φυγοκέντριση σε 4180 g για 10 min. Τα φιαλίδια ψύχθηκαν σε παγόλουτρο προκειμένου να αυξηθεί το ιξώδες της μικκυλιακής φάσης που συγκεντρώνεται στον πυθμένα του φιαλιδίου.

Μετά τη διαδικασία CPE, το υπερκείμενο διάλυμα περιέχει το διαλυμένα ιόντα Au με τη μορφή  $[\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$  (Regelink et al., 2013), τα οποία δεν εκχυλίζονται λόγω του αρνητικού τους φορτίου, ενώ η μικκυλιακή φάση (που έχει τη μορφή ενός κολλοειδούς διαλύματος με μεγάλο ιξώδες στον πυθμένα του φιαλιδίου), περιέχει τα AuNPs. Το υπερκείμενο διάλυμα και η μικκυλιακή φάση διαχωρίζονται με μεταφορά του υπερκειμένου σε άλλη φιάλη ενώ η μικκυλιακή φάση επαναδιαλυτοποιείται σε μίγμα αιθανόλης /  $\text{HNO}_3$  1M. Κάθε κλάσμα αναλύεται ξεχωριστά για το περιεχόμενό του σε ιόντα Au (υπερκείμενο διάλυμα) και AuNPs (μικκυλιακή φάση).

### 4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Η πειραματική πορεία διαδοχικής εκχύλισης που αναπτύχθηκε από το Community Bureau of Reference (BCR), επιλέχθηκε ως βάση για την ανάπτυξη μιας μεθόδου για την κλασμάτωση των μεταλλικών νανοσωματιδίων, καθώς είναι η πιο ευρέως εφαρμοζόμενη μέθοδος για την κλασμάτωση μετάλλων σε χώματα (Ure et al., 1993a) και πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια: τη διαλυτοποίηση των ανθρακικών αλάτων του χώματος με ασθενές οξύ, τη διαλυτοποίηση των (υδρο)οξειδίων Fe/Mn/Al υπό αναγωγικές συνθήκες, την οξείδωση/διαλυτοποίηση της οργανικής ύλης με  $H_2O_2$  υπό όξινες συνθήκες και την διάσπαση των ανθεκτικών συστατικών του χώματος (δηλαδή κρυσταλλικές δομές και πυριτικά) με ισχυρά ανόργανα οξέα.

Αν και αυτή η αλληλουχία αντιδραστηρίων μπορεί να διαλύει επιλεκτικά συγκεκριμένα συστατικά του χώματος και να απελευθερώνει τα παγιδευμένα μεταλλικά ιόντα, η προσαρμογή της στη διαδοχική εκχύλιση μεταλλικών νανοσωματιδίων θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη τη δραστικότητα των εξεταζόμενων νανοσωματιδίων σε κάθε ένα από τα αντιδραστήρια εκχύλισης. Ο λόγος είναι ότι μερικά νανοσωματίδια, όπως μεταλλικά οξείδια, είναι ασταθή υπό όξινες συνθήκες (Avramescu et al., 2017, Khan et al., 2019, Omar et al., 2014) ενώ άλλα (όπως τα νανοσωματίδια αργύρου) διαλύονται σε  $H_2O_2$  (Tsogas et al., 2014), που χρησιμοποιείται για την αποσύνθεση της οργανικής ύλης. Ως εκ τούτου, δεν είναι εφικτή η άμεση προσαρμογή της μεθόδου BCR στη διαδοχική εκχύλιση όλων των μεταλλικών νανοσωματιδίων από το χώμα. Αντ' αυτού, θεωρήσαμε ως πιο ρεαλιστική την ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου για κάθε συγκεκριμένη κατηγορία μεταλλικών νανοσωματιδίων. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν AuNPs, επειδή είναι πιο σταθερά από άλλα νανοσωματίδια και έχουν διευρυμένη χρήση σε πολλές εφαρμογές. Επιπλέον, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για την διερεύνηση της τύχης και της συμπεριφοράς των AuNPs σε εδάφη και ιζήματα (Antisari et al., 2013, Cornelis et al., 2012, Cornelis et al., 2014, Peyrot et al., 2014, Wijnhoven et al., 2009) προσδιορίζοντας μηχανισμούς που καθορίζουν την αλληλεπίδραση των

AuNPs με το χώμα, και ως εκ τούτου η συμπεριφορά τους σε εδάφη είναι πιο καλά μελετημένη σε σχέση με άλλα νανοσωματίδια.

Ένα άλλο ζήτημα που ελήφθη υπόψη είναι ότι κατά τη διαδοχική εκχύλιση των νανοσωματιδίων αναπόφευκτα θα συνεκχυλιστούν και μεταλλικά ιόντα που βρίσκονται στο έδαφος από φυσικές και ανθρωπογενείς πηγές ή απελευθερώνονται κατά την αποσύνθεση των νανοσωματιδίων από γεωλογικές ή βιολογικές διεργασίες. Οι τεχνικές ατομικής φασματοσκοπίας δεν μπορούν να διακρίνουν τα κολλοειδή από τα ιοντικά μεταλλικά είδη. Ως εκ τούτου, τα μεταλλικά ιόντα θα ερμηνευτούν λανθασμένα ως νανοσωματίδια, οδηγώντας σε υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στο δείγμα. Ως εκ τούτου, εκτός της κατανομής των νανοσωματιδίων σε κάθε κλάσμα του χώματος μελετήθηκε, και η κατανομή των ειδών (ειδοταυτοποίηση) των νανοσωματιδίων και των μεταλλικών ιόντων.

Τέλος, το τελευταίο βήμα στη πειραματική πορεία κλασματοποίησης των μετάλλων είναι ο προσδιορισμός του κλάσματος το οποίο είναι δεσμευμένο στην κρυσταλλική δομή των πυριτικών ορυκτών (Rodgers et al., 2015, Ure et al., 1993a, Vodyanitskii, 2006, Zimmerman και Weindorf, 2010). Για την απελευθέρωση των μεταλλικών ιόντων, οι πυριτικές δομές υποβάλλονται σε όξινη εκχύλιση υπό θέρμανση. Ως αποτέλεσμα μεταλλικά νανοσωματίδια που μπορεί να συνυπάρχουν θα διαλυτοποιηθούν στα μεταλλικά τους ιόντα με αποτέλεσμα οι μετρούμενες συγκεντρώσεις να αντιστοιχούν στα μεταλλικά ιόντα που απελευθερώνονται από την όξινη διαλυτοποίηση των νανοσωματιδίων και τη συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων (συγκέντρωση υποβάθρου) που περιέχονται στις πυριτικές δομές, οδηγώντας σε υποεκτίμηση της συγκέντρωσης νανοσωματιδίων (ή σε υπερεκτίμηση συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων) στο υπολειμματικό κλάσμα. Ωστόσο, τα μεταλλικά ιόντα που συνδέονται με τις κρυσταλλικές δομές, είναι κυρίως γεωγενούς προέλευσης (Borgese et al., 2013) και χημικά αδρανή (Tessier et al., 1979). Αντίθετα, τα μεταλλικά νανοσωματίδια είναι ιδιαίτερα δραστικά και προέρχονται κυρίως από ανθρωπογενείς πηγές. Ως εκ τούτου, η σύζευξη των ανθρωπογενών νανοσωματιδίων με πυριτικά ορυκτά δεν θα πρέπει να ευνοείται φυσικοχημικά και η ποσότητα των νανοσωματιδίων που σχετίζονται με αυτό το κλάσμα υπό πραγματικές συνθήκες εκτιμάται πως να είναι αμελητέα.

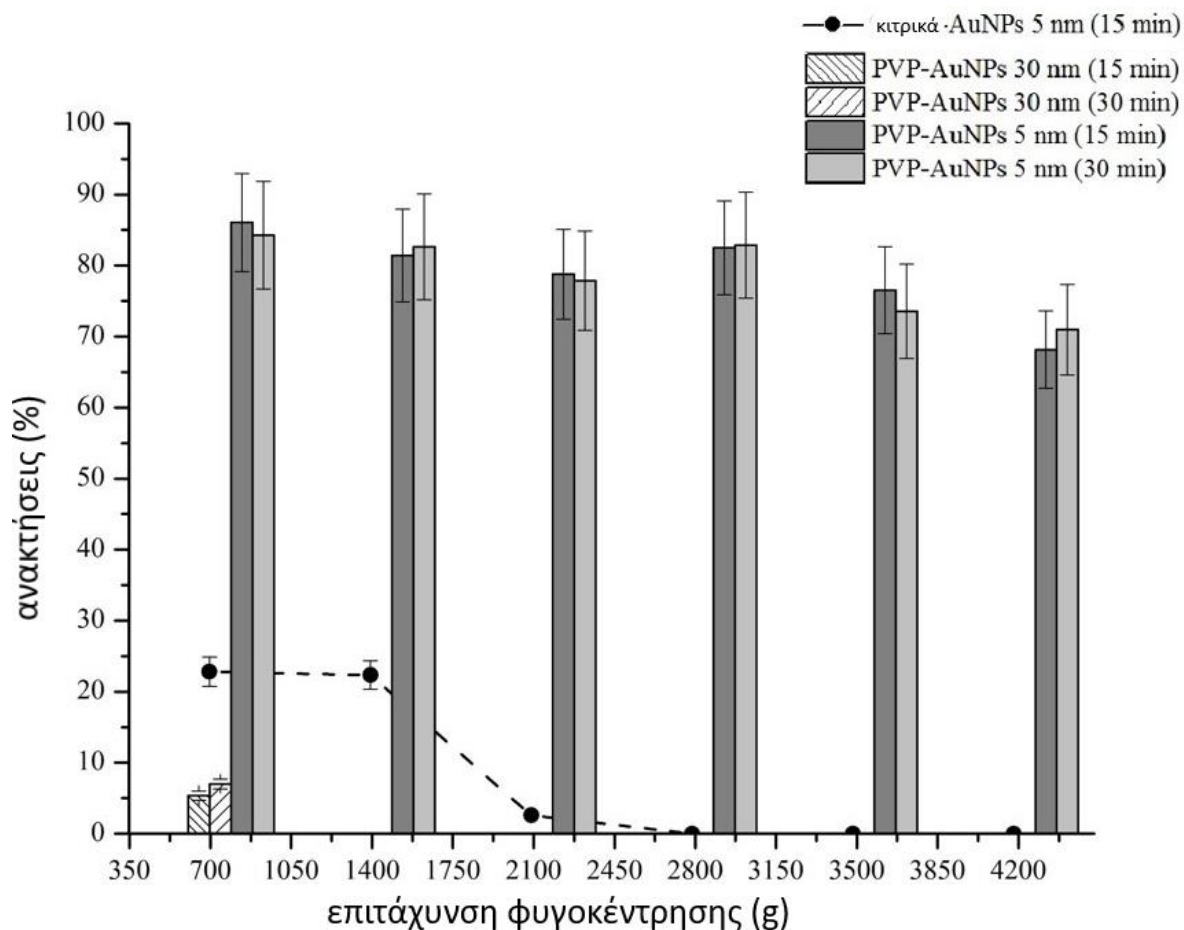
#### 4.3.1 Διαχωρισμός νανοσωματιδίων από κολλοειδή του χώματος.

Ο προσδιορισμός μεταλλικών νανοσωματιδίων σε εκχυλίσματα χώματος απαιτεί τον διαχωρισμό τους από τα μικρο/νανο-κολλοειδή του χώματος, επειδή τα τελευταία παρεμποδίζουν στη διαδικασία ατομοποίησης κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού τους με ανιχνευτές ατομικής φασματοσκοπίας. Σε προηγούμενες μελέτες έχουν εξεταστεί τρεις μέθοδοι για τον διαχωρισμό μεταλλικών νανοσωματιδίων από τα κολλοειδή του χώματος (καθίζηση, διήθηση και φυγοκέντρηση), αλλά δεν υπάρχει ακόμη ομοφωνία για τον τρόπο προετοιμασίας των αιωρημάτων χώματος για αναλύσεις που απαιτούν το διαχωρισμό των μικροσωματιδίων από νανοσωματίδια. Η καθίζηση έχει αποδειχθεί ότι διαχωρίζει αποτελεσματικά τα μεγαλύτερα σωματίδια, αλλά η παρατεταμένη καθίζηση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων ή την επαναιώρηση των σωματιδίων του χώματος, ενώ σε μικρούς χρόνους καθίζησης δεν απομακρύνονται επαρκώς τα κολλοειδή του χώματος (Gimbert et al., 2005, Gimbert et al., 2006). Και στις δύο περιπτώσεις, η παρουσία κολλοειδών μικρο/νανο-σωματιδίων του χώματος παρεμποδίζει την ανάλυση κατά τη διάρκεια της νεφελοποίησης του δείγματος σε ανιχνευτές ατομικής φασματοσκοπίας. Όσον αφορά τη διήθηση, έχει αποδειχθεί ότι κατακρατεί μεγάλη ποσότητα νανοσωματιδίων (παρά το γεγονός ότι το συνηθισμένο μέγεθος οπών των φίλτρων κυμαίνεται από 0,2 και 0,45  $\mu\text{m}$ , που είναι τουλάχιστον μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από το μέγεθος των νανοσωματιδίων) εξαιτίας της φραγής των πόρων του φίλτρου (Gimbert et al., 2005, Schwertfeger et al., 2017). Πειραματικά, παρατηρήθηκε φραγή των φίλτρων (ειδικά των 0,2  $\mu\text{m}$ ) μετά από διήθηση μερικών μόνο mL του δείγματος κάτι που είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ανάκτησης νανοσωματιδίων στο διάλυμα εκχύλισης (<5%).

Με βάση τα ανωτέρω, η φυγοκέντρηση θεωρήθηκε η πιο πρακτική επιλογή. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της φυγοκέντρησης στον διαχωρισμό νανοσωματιδίων από τα μικρο/νανο σωματίδια του χώματος απαιτεί διερεύνηση καθώς στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διαφορετικά ποσοστά ανάκτησης. Για παράδειγμα, ο Schwertfeger et al., (2017) διαπίστωσε ότι το 80-87% των PVP-AgNPs μπορούσαν να ανακτηθούν από αιώρημα χώματος μετά από φυγοκέντρηση σε 1000

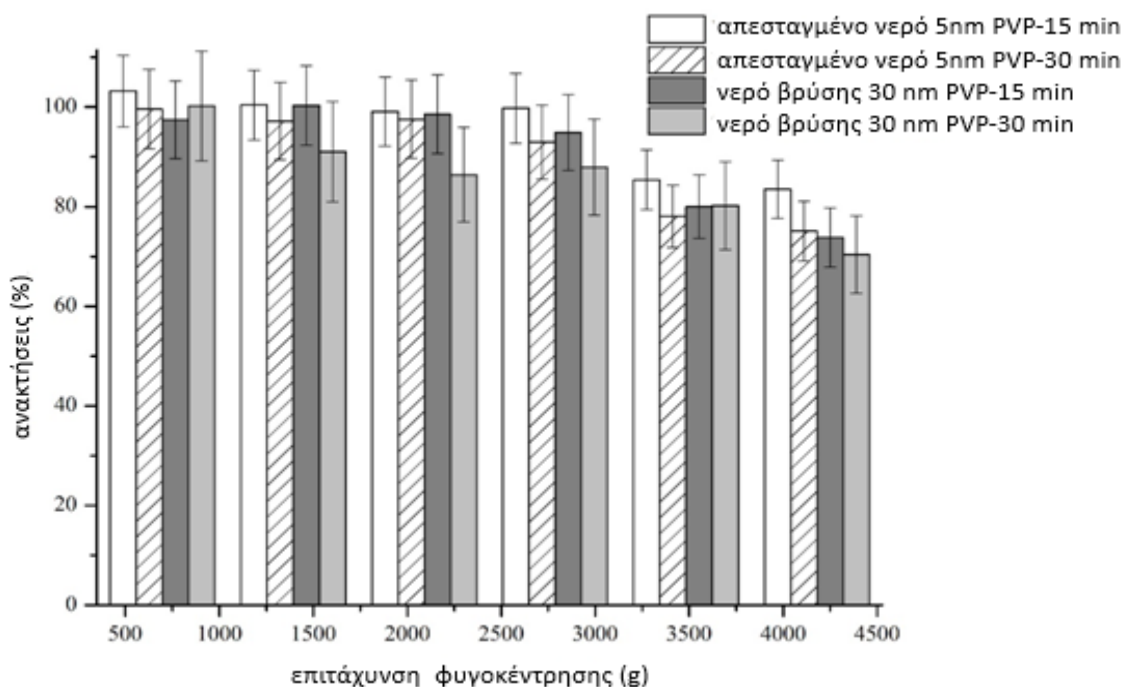
g για 30 min, αλλά οι Gimbert et al. (2006) και Hadri et al. (2018) ανέφεραν σημαντική απώλεια τόσο μικροσωματιδίων όσο και νανοσωματιδίων (ανακτήσεις <20%) ακόμη και σε χαμηλή ταχύτητα φυγοκέντρησης (<700g). Με βάση τις πειραματικές παρατηρήσεις από διαφορετικά χρώματα, ο Gimbert et al. (2006) απέδωσε αυτές τις διαφορές στη σύσταση του χρώματος καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι είναι αρκετά δύσκολο να αναπτυχθεί μια γενική μέθοδος βασισμένη στη φυγοκέντρηση που είναι κατάλληλη για όλους τους τύπους χρωμάτων.

Λόγω αυτών των αβεβαιοτήτων, αξιολογήσαμε την αποτελεσματικότητα της φυγοκέντρησης σε υδατικά εδαφικά εκχυλίσματα για τον προσδιορισμό της ανάκτησης των AuNPs με διαφορετικές επιφανειακές επικαλύψεις (PVP και κιτρικά) και μεγέθη (5 και 30 nm) σε διάφορες ταχύτητες φυγοκέντρησης (επιταχύνσεις) και χρόνους φυγοκέντρησης. Σε όλα τα πειράματα, η ανάκτηση των AuNPs μειωνόταν με την αύξηση της ταχύτητας φυγοκέντρησης και του χρόνου. Το Σχήμα 4.1 δείχνει ότι η ανάκτηση των PVP-AuNPs (30 nm) είναι μικρότερη από 10% ακόμα και στη χαμηλότερη επιτάχυνση των 700g. Αντίθετα, τα μικρότερα PVP-AuNPs (5 nm) είχαν μεγαλύτερες ανακτήσεις (> 80%). Αυτό δεν επαληθεύτηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν AuNPs επικαλυμμένα με κιτρικά (5 και 30 nm) καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης δεν ξεπερνούσε το 20% για τα citr-AuNPs 5 nm σε επιτάχυνση 700g ( για 15 λεπτά) ενώ, υπό τις ίδιες συνθήκες, τα μεγαλύτερα κιτρικά-AuNPs είχαν απομακρυνθεί πλήρως.



**Σχήμα 4.1.** Ανάκτηση των AuNPs (5 nm, 30 nm, επικαλυμμένα με κίτρικά και PVP) στα υπερκείμενα των υδατικών εδαφικών εκχυλισμάτων μετά από φυγοκέντρηση σε διαφορετικές ταχύτητες φυγοκέντρησης και χρόνους. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για  $n=3$ .

Στη συνέχεια εξετάσαμε αν η σύνθεση της μήτρας του χώματος επηρεάζει την ανάκτηση των PVP-AuNPs με την επανάληψη των πειραμάτων φυγοκέντρησης σε νερό βρύσης και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά του υδατικού εδαφικού εκχυλίσματος. Η ανάκτηση των PVP-AuNPs στο το νερό της βρύσης ήταν σχεδόν ποσοτική ανεξάρτητα από το μέγεθός τους (Σχήμα 4.2). Ως εκ τούτου, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η χαμηλή ανάκτηση των AuNPs στο υδατικό εδαφικό εκχύλισμα οφείλεται στην επίδραση της μήτρας του υποστρώματος του χώματος.



**Σχήμα 4.2.** Ανάκτηση των PVP-AuNPs (5 και 30 nm) σε νερό βρύσης μετά από φυγοκέντρωση σε διάφορες επιταχύνσεις και χρόνους. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για  $n=3$ .

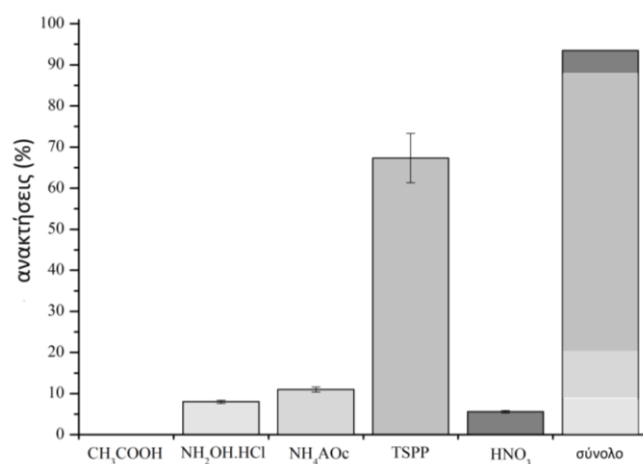
Από τα ανωτέρω αποτελέσματα προκύπτει ότι η απομάκρυνση των AuNPs εξαρτάται από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των πειραματικών συνθηκών (δηλ. χρόνος και ταχύτητα φυγοκέντρωσης), τις φυσικοχημικές ιδιότητες των AuNPs (όπως το μέγεθος και η επιφανειακή επικάλυψή τους) και τη μήτρα του δείγματος (Gimbert et al., 2006). Συνεπώς, η ανάπτυξη μιας γενικευμένης μεθοδολογίας διαχωρισμού των νανοσωματιδίων από τα μικρο/νανο-κolloειδή των εδαφικών εκχυλισμάτων δεν είναι εύκολη και απαιτεί την υλοποίηση στοχευμένων ερευνητικών προσπαθειών με σκοπό να βρεθεί μια κοινά αποδεκτή και γενική λύση για όλα (ή τουλάχιστον τα περισσότερα) είδη νανοσωματιδίων και εδαφικών υποστρωμάτων. Δεδομένου ότι ο κύριος στόχος της έρευνας αυτής ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου για την διαδοχική εκχύλιση των AuNPs από το χώμα, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε PVP-AuNPs μεγέθους 5 nm επειδή παρουσιάζουν καλή σταθερότητα κατά την φυγοκέντρωση του υδατικού εδαφικού εκχυλίσματος οπότε ελαχιστοποιείται η απώλεια νανοσωματιδίων που θα μπορούσε να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της (συνολικής) εκχυλίσιμης συγκέντρωσης των νανοϋλικών.

#### 4.3.2 Ανάπτυξη της μεθόδου κλασματοποίησης

Το πρώτο βήμα της μεθόδου διαδοχικής εκχύλισης BCR περιλαμβάνει την ταυτόχρονη εκχύλιση του ανταλλάξιμου κλάσματος και του κλάσματος που είναι δεσμευμένο με ανθρακικά άλατα μέσω της επεξεργασίας του χώματος με οξικό οξύ. Αυτό το κλάσμα περιέχει μεταλλικά είδη που είναι χαλαρά συνδεδεμένα με τη μήτρα του χώματος και παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη κινητικότητα και βιοδιαθεσιμότητα σε φυτά και άλλους οργανισμούς. Σε όλα τα πειράματα, δεν παρατηρήθηκε εκχύλιση AuNPs στο κλάσμα αυτό γεγονός που υποδηλώνει ότι τα AuNPs δεν συνδέονται ασθενώς με τη μήτρα του χώματος. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει χαμηλές ανακτήσεις νανοσωματιδίων από το χώμα με αντιδραστήρια εκχύλισης όπως το απεσταγμένο νερό και οι ανόργανοι ηλεκτρολύτες που θα μπορούσαν να εκχυλίσουν τα ανταλλάξιμα είδη νανοσωματιδίων (Antisari et al., 2013, Gimbert et al., 2006, Hadri et al., 2018, Karrar et al., 2017). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και επιπλέον δείχνουν ότι τα νανοσωματίδια δεν αλληλεπιδρούν ούτε τα ανθρακικά άλατα του χώματος.

Το επόμενο στάδιο της διαδοχικής εκχύλισης περιλαμβάνει την εκχύλιση των πιθανώς βιοδιαθέσιμων νανοσωματιδίων που σχετίζονται με μεταλλικά οξείδια και υδροξείδια (κυρίως Fe, Mn και Al) τα οποία μπορούν να απελευθερωθούν από τη μήτρα του χώματος υπό ανοξικές (αναγωγικές) συνθήκες. Για την εκχύλιση των νανοσωματιδίων που σχετίζονται με το κλάσμα αυτό χρησιμοποιήθηκε η υδροχλωρική υδροξυλαμίνη, διότι είναι πολύ αποτελεσματική στην εκχύλιση οξειδωτικών φάσεων σε σύγκριση με άλλα αντιδραστήρια (Wang et al., 1987) ενώ δεν απομακρύνει την οργανική ύλη (Tessier et al., 1979) η οποία είναι κύριο συμπλεκτικό αντιδραστήριο των νανοσωματιδίων στο χώμα (Antisari et al., 2013, Cornelis et al., 2012, Hadri et al., 2018, Khan et al., 2019, Omar et al., 2014, Peyrot et al., 2014, Schwertfeger et al., 2017). Τα αποτελέσματα του Σχήματος 4.3 δείχνουν ότι σε αυτό το κλάσμα ανακτήθηκαν περίπου  $8,0 \pm 2,9\%$  των νανοσωματιδίων, επαληθεύοντας την απόθεση των PVP-AuNPs σε (υδρο)οξείδια. Αυτό το συμπέρασμα συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες που παρατήρησαν ότι τα νανοσωματίδια επικαλυμμένα με PVP αλληλεπιδρούν με (υδρο)οξείδια για να

σχηματίσουν ετεροσυσσωματώματα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των νανοσωματιδίων και των φορτισμένων επιφανειών των (υδρο)οξειδίων (Cornelis et al., 2012, Cornelis et al., 2013).

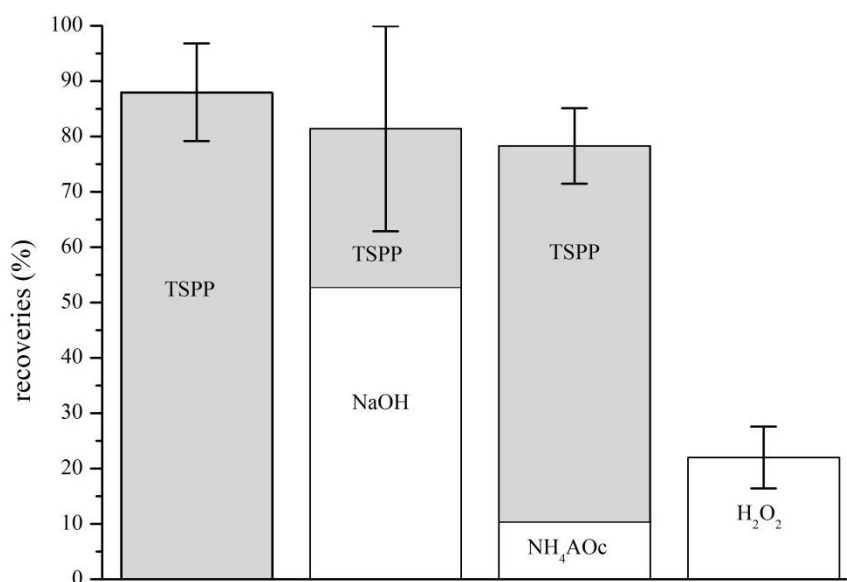


**Σχήμα 4.3.** Ανακτήσεις από την διαδοχική εκχύλιση PVP-AuNPs (5 nm) από το χώμα. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για n=3.

Το τρίτο κλάσμα που εκχυλίζεται με τη μέθοδο διαδοχικής εκχύλισης των μεταλλικών ιόντων είναι το κλάσμα που συνδέεται με την οργανική ύλη. Σε όλες τις προηγούμενες μελέτες αναφέρεται ότι τα νανοσωματίδια συνδέονται ισχυρά με την οργανική ύλη (Antisari et al., 2013, Cornelis et al., 2012, Hadri et al., 2018, Khan et al., 2019, Omar et al., 2014, Peyrot et al., 2014, Schwertfeger et al., 2017), επομένως η οργανική ύλη διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην κλασματοποίηση των νανοσωματιδίων στα χώματα. Στο πρωτόκολλο BCR η οργανική ύλη αποσυντίθεται με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> υπό θέρμανση. Ωστόσο, η εκχύλιση των PVP-AuNPs με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ήταν αναποτελεσματική δεδομένου ότι ανακτήθηκε μόνο το 22 ± 4% της συγκέντρωσης των εμβολιασμένων AuNPs (Σχήμα 4.4). Η χαμηλή ανάκτηση των AuNPs αποδόθηκε στην αποσύνθεση της επικάλυψης με PVP που έχει ως αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση των AuNPs και την καθίζησή τους κατά τη διάρκεια του σταδίου της φυγοκέντρωσης.

Στη συνέχεια εξετάστηκε το πυροφωσφορικό νάτριο (TSPP) ως ένα εναλλακτικό αντιδραστήριο για την εκχύλιση νανοσωματιδίων από την οργανική ύλη του χώματος με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που ανέφεραν

την ποσοτική εκχύλιση νανοσωματιδίων από το χώμα (Regelink et. al., 2013, Schwertfeger et al., 2017). Τα αποτελέσματα μας επαληθεύουν τα αποτελέσματα αυτών των μελετών καθώς οι ανακτήσεις που επετεύχθησαν με την χρήση 2,5 mM TSPP (χωρίς διαδοχική εκχύλιση) έφταναν το 88% των εμβολιασμένων PVP-AuNPs (Σχήμα 4.4). Ωστόσο, λόγω της χρήσης ενός λουτρού υπερήχων (αντί της ράβδου υπερήχων που χρησιμοποιήθηκε από τον Schwertfeger et al., 2017) εφαρμόστηκαν τρεις κύκλοι εκχύλισης (δηλαδή 16 ώρες ανάμιξης σε τροχιακό αναδευτήρα στις 150 στροφές ανά λεπτό και υπέρηχους για 1 ώρα) για να επιτευχθεί ποσοτική ανάκτηση των AuNPs. Συγκεκριμένα, το  $53,5 \pm 8,4\%$  των εμβολιασμένων AuNPs ανακτήθηκε στην πρώτη εκχύλιση, το  $25,0 \pm 4,3\%$  στη δεύτερη εκχύλιση και  $9,3 \pm 5,0\%$  στην τρίτη εκχύλιση.



**Σχήμα 4.4.** Αποτελεσματικότητα διάφορων αντιδραστηρίων στην εκχύλιση PVP-AuNPs (5 nm) από την οργανική ύλη του χώματος. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για  $n=3$ .

Παρά την υψηλή απόδοση του TSPP, όταν η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε στο εμβολιασμένο χώμα μετά από διαδοχική εκχύλιση (δηλ. μετά από την εκχύλιση των κλασμάτων που σχετίζονται με τα ανθρακικά άλατα και τα οξείδια), η ανάκτηση μειώθηκε στο 20% της συγκέντρωσης εμβολιασμού των AuNPs. Η χαμηλή ανάκτηση αποδόθηκε στο χαμηλό pH του χώματος καθώς τα προηγούμενα στάδια διαδοχικής εκχύλισης περιελάμβαναν τη χρήση δύο όξινων διαλυμάτων (CH<sub>3</sub>COOH και

NH<sub>2</sub>OH.HCl). Αντίθετα, το ακατέργαστο (μη επεξεργασμένο) χώμα είχε pH περίπου 7,5.

Για να αντιμετωπιστεί η παρεμπόδιση που προέκυψε από το χαμηλό pH του χώματος κατά την διαδοχική εκχύλιση, προσθέσαμε ένα επιπλέον στάδιο που περιλαμβάνει την επώαση του χώματος με ένα κατάλληλο αντιδραστήριο εξουδετέρωσης της οξύτητας του χώματος. Εξετάστηκαν δύο αντιδραστήρια: διάλυμα οξικού αμμωνίου (1,0 M, pH = 7) και διάλυμα NaOH (0,25M, pH ~ 13,5). Το οξικό αμμώνιο χρησιμοποιήθηκε επειδή έχει ουδέτερη τιμή pH και είναι ένα ήπιο αντιδραστήριο εκχύλισης το οποίο δεν συνεκχυλίζει την οργανική ύλη (Ure et al., 1993b). Το NaOH αντίθετα ως ισχυρή βάση μπορεί να διαλυτοποιήσει την οργανική ύλη του χώματος συμβάλλοντας έτσι τόσο στην εξουδετέρωση της οξύτητας του χώματος όσο και στην εκχύλιση των AuNPs από το χώμα. Η επώαση του χώματος με NaOH είχε σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του  $53 \pm 18\%$  των εμβολιασμένων PVP-AuNPs ενώ το οξικό αμμώνιο μπορούσε να εκχυλίσει μόνο το  $11,0 \pm 5,4\%$  των PVP-AuNPs (Σχήμα 4.4). Προφανώς, η υψηλή απόδοση του NaOH στην εκχύλιση των AuNPs οφείλεται στην αποτελεσματική διασπορά/διάλυση της οργανικής ύλης του χώματος, ενώ τα AuNPs που εκχυλίζονται από το οξικό αμμώνιο μπορεί να οφείλονται σε AuNPs που σχετίζονται με οξείδια σιδήρου-μαγγανίου που δεν εκχυλίστηκαν στο προηγούμενο στάδιο ή βρισκόταν ασθενώς δεσμευμένα στην οργανική ύλη.

Μετά την επεξεργασία με NaOH ή CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, το χώμα εκχυλίστηκε τρεις φορές με TSPP (16 ώρες σε 150 rpm και 1 h σε υπέρηχους). Η ανάκτηση των AuNPs που εκχυλίστηκαν με TSPP ήταν  $28,3 \pm 13,0\%$  στο δείγμα που είχε προεπεξεργαστεί με NaOH και  $67,3 \pm 9,0\%$  στο δείγμα είχε προεπεξεργαστεί με CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>. Οι συνολικές ανακτήσεις ανέρχονταν στο 81,4% με τη χρήση NaOH-TSPP και 78,3% με τη χρήση οξικού αμμωνίου-TSPP (Σχήμα 4.4). Οι ανακτήσεις που επετεύχθησαν και με τους δύο συνδυασμούς αντιδραστηρίων ήταν χαμηλότερες από αυτές που παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο το TSPP ως αντιδραστήριο εκχύλισης (~88%) αλλά και στις δύο περιπτώσεις είναι αποδεκτές για ποσοτικούς σκοπούς. Επιπλέον, το εκχύλισμα NaOH ήταν ιξώδες και η αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων ήταν χαμηλή (RSD≤18%, n = 3) σε σύγκριση με το οξικό αμμώνιο (RSD =

<8%,  $n = 3$ ). Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε οξικό αμμώνιο για την εξουδετέρωση της οξύτητας του χώματος.

Το τελευταίο στάδιο διαδοχικής εκχύλισης είναι η διαλυτοποίηση των κρυσταλλικών δομών των πρωτογενών και δευτερογενών ορυκτών (όπως τα πυριτικά άλατα). Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιούνται ισχυρά ανόργανα οξέα. Συνεπώς, όσα AuNPs υπάρχουν σε αυτό το κλάσμα μπορούν να διαλυθούν στα πρόδρομα μεταλλικά ιόντα τους. Ωστόσο, δεν αναμένεται σημαντική αλληλεπίδραση και συσσώρευση νανοσωματιδίων με τις κρυσταλλικές δομές του εδάφους για δύο λόγους: α) οι ορυκτές φάσεις είναι ως επί το πλείστον λιθογενούς (δηλ. φυσικής) προέλευσης ενώ τα AuNPs είναι κατά κύριο λόγο ανθρωπογενούς προέλευσης (Palleiro et al., 2016), και β) τα μεταλλικά ιόντα συνδέονται στα κρυσταλλικά πλέγματα των πυριτικών στρώσεων κατά το στάδιο σχηματισμού τους ενώ τα AuNPs συμπλοκοποιούνται κατά κύριο λόγο με την οργανική ύλη του χώματος η οποία μειώνει σημαντικά την κινητικότητα και την προσβασιμότητά τους στις αδρανείς κρυσταλλικές δομές του χώματος (Antisari et al., 2013, Cornelis et al., 2014, Hadri et al., 2018, Santiago-Martin et al., 2016, Schwertfeger et al., 2017). Προκειμένου να η μέθοδος να μπορεί να συνεκτιμά τη συνολική ρύπανση του υποστρώματος του εδάφους αποφασίσαμε να συμπεριληφθεί και αυτό το κλάσμα στο πρωτόκολλο διαδοχικής εκχύλισης. Συγκεκριμένα, το υπολειπόμενο κλάσμα των AuNPs εκχυλίστηκε δύο φορές με θερμό  $\text{HNO}_3$  (8M) το οποίο είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση περίπου  $5,5 \pm 5,0\%$  της συγκέντρωσης των εμβολιασμένων AuNPs (Σχήμα 4.3). Ωστόσο, για τους λόγους που αναφέρθηκαν προηγουμένως, η ανίχνευση των AuNPs σε αυτό το κλάσμα δεν συνεπάγεται και το ότι τα AuNPs έχουν προσκολληθεί στις κρυσταλλικές δομές. Είναι πιο πιθανό τα AuNPs που έχουν προσδιοριστεί σε αυτό το εκχύλισμα, να έχουν καταβυθιστεί κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης στα προηγούμενα στάδια ή δεν εκχυλίστηκαν αποτελεσματικά κατά τη διάρκεια της μεθόδου διαδοχικής εκχύλισης με αποτέλεσμα να διαλυτοποιηθούν στα πρόδρομα μεταλλικά ιόντα τους κατά την κατεργασία με πυκνό θερμό  $\text{HNO}_3$ . Η υψηλή τυπική απόκλιση των ανακτήσεων που λαμβάνονται σε αυτό το στάδιο (όπως υπολογίστηκε από την εκχύλιση τριών ανεξάρτητων δειγμάτων) σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια υποστηρίζουν αυτή την άποψη. Συνολικά, χρησιμοποιώντας την μέθοδο διαδοχικής εκχύλισης η ολική

ανάκτηση των AuNPs είναι ίση με 93,5% (Σχήμα 4.3) η οποία είναι αντιπροσωπευτική της συνολικής συγκέντρωσης των AuNPs που εμβολιάστηκαν στο χώμα. Συνεπώς, θεωρήσαμε ότι η μέθοδος διαδοχικής εκχύλισης μπορεί να παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την κατανομή των AuNPs σε εδαφικά δείγματα.

#### **4.3.3 Αξιολόγηση της κινητικότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των AuNPs**

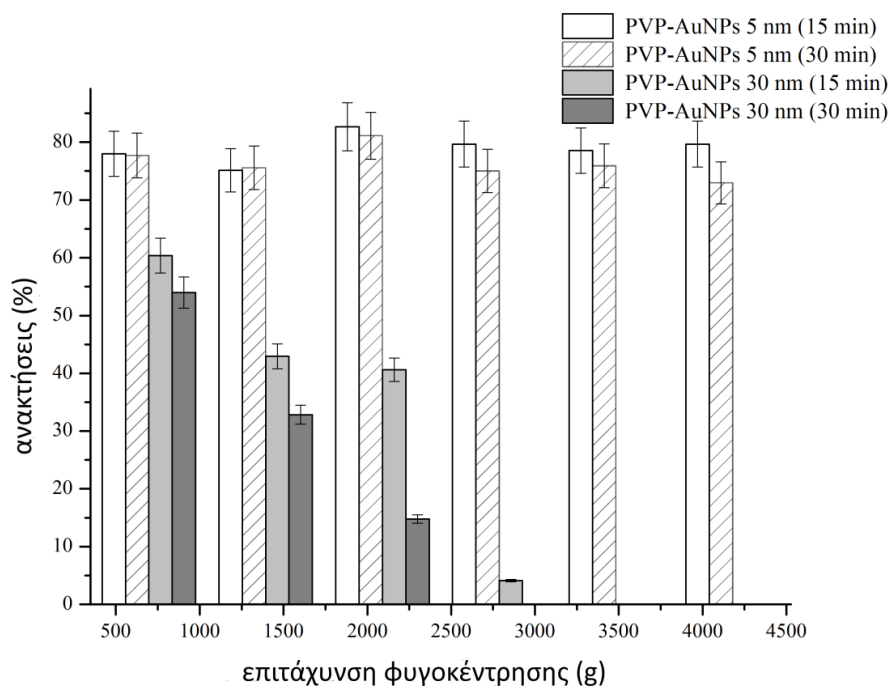
Σε ότι αφορά την κινητικότητα/βιοδιαθεσιμότητα των AuNPs, τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι τα AuNPs στο χώμα παρουσιάζουν χαμηλή φυσικοχημική κινητικότητα και βιοδιαθεσιμότητα επειδή είναι κατά κύριο λόγο συμπλοκοποιημένα με την οργανική ύλη η οποία θεωρείται ότι συσχετίζεται με μεγάλου μοριακού-βάρους χουμικές ουσίες οι οποίες είναι ανθεκτικές στην οξείδωση και την αποσύνθεση (Singh et al., 1998). Δεδομένου ότι δεν ανιχνεύτηκαν AuNPs στο εκχύλισμα οξικού οξέος (το οποίο αντιπροσωπεύει τα ανταλλάξιμα και δεσμευμένα με ανθρακικά AuNPs) μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα AuNPs στα χώματα δεν κινητοποιούνται εύκολα και συνεπώς δεν είναι άμεσα βιοδιαθέσιμα σε φυτά και ζωντανούς οργανισμούς. Ένα μικρό ποσοστό, περίπου 8%, που εκχυλίστηκαν από μεταλλικά οξείδια, ωστόσο, μπορεί να είναι ευκίνητο και προσβάσιμο για πρόσληψη από τα φυτά. Το ίδιο μπορούμε επίσης να υποθέσουμε για την ποσότητα των AuNPs που εκχυλίστηκαν στο οξικό αμμώνιο (περίπου 11%) υποθέτοντας ότι αντιπροσωπεύει τα AuNPs που σχετίζονται με οξείδια σιδήρου-μαγγανίου ή ασθενώς συμπλοκοποιημένα με την οργανική ύλη. Βάσει αυτών των δεδομένων, υπολογίστηκε ο παράγοντας κινητικότητας (Mobility Factor-MF) των AuNPs (Kabala and Singh, 2001). Ο παράγοντας κινητικότητας είναι ένας δείκτης που αναπτύχθηκε για να περιγράφει τη δυνητική μετακίνηση των μετάλλων από το ρυπασμένο μέσο και υπολογίζεται ως ο λόγος της συνολικής συγκέντρωσης μετάλλων στα κινητά κλάσματα (δηλαδή ανταλλάξιμα/συνδεδεμένα με ανθρακικό άλας και μεταλλικά οξείδια) προς τη συνολική συγκέντρωση των AuNPs που προσδιορίζεται σε όλα τα κλάσματα σύμφωνα με τον τύπο:

$$MF = \frac{[\text{ανθρακικό}] + [\text{μεταλλικά οξείδια}]}{[\text{ανθρακικό}] + [\text{μεταλλικά οξείδια}] + [\text{οργανική ύλη}] + [\text{υπόλειμμα}]} \times 100$$

Με βάση αυτή την σχέση, ο παράγοντας κινητικότητας για τα AuNPs υπολογίστηκε σε 23%. Αυτή η τιμή δείχνει ότι τα AuNPs δεν είναι σημαντικά βιοπροσβάσιμα και βιοδιαθέσιμα.

#### 4.3.4 Ανάκτηση των AuNPs κατά τη φυγοκέντρηση των εκχυλισμάτων

Μετά την ανάπτυξη της μεθόδου διαδοχικής εκχύλισης και την παρατήρησή ότι η μήτρα του χώματος επηρεάζει την ανάκτηση των AuNPs, αξιολογήσαμε την ανάκτηση των AuNPs από τα εκχυλίσματα του χώματος για κάθε αντιδραστήριο εκχύλισης. Αρχικά, μη εμβολιασμένο χώμα εκχυλίστηκε διαδοχικά με κάθε αντιδραστήριο (οξικό οξύ, υδροξυλαμίνη, οξικό αμμώνιο και TSPP) και φυγοκεντρήθηκε σε 4180 g για 30 min για να αφαιρεθούν τα μικρο/νανο κολλοειδή σωματίδια του χώματος. Στη συνέχεια, κάθε εκχύλισμα εμβολιάστηκε με PVP-AuNPs δύο διαφορετικών μεγεθών (5 και 30 nm) και αναμείχθηκαν σε έναν τροχιακό αναδευτήρα στις 150 rpm για 24 h. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε σε 700g για 15 λεπτά και το υπερκείμενο αναλύθηκε για AuNPs. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτό το πείραμα συγκρίθηκαν με εκείνα που λάβαμε από τη φυγοκέντρηση των AuNPs σε απεσταγμένο νερό. Η ανάκτηση των AuNPs σε οξικό οξύ, υδροξυλαμίνη και οξικό αμμώνιο ήταν παρόμοια με εκείνη σε απεσταγμένο νερό, που δείχνει ότι αυτά τα αντιδραστήρια δεν επηρέασαν τη σταθερότητα των AuNPs κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης. Ωστόσο, βρέθηκε ότι το TSPP αυξάνει την σταθερότητα των μεγαλύτερων AuNPs (Σχήμα 4.5). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η ανάκτηση μεγαλύτερων PVP-AuNP (30 nm) βελτιώθηκε από < 10% σε απεσταγμένο νερό σε 60% σε 2,5 mM TSPP. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με τις παρατηρήσεις προηγούμενων μελετών σχετικά με την ικανότητα του TSPP να δρα ως σταθεροποιητικός παράγοντας σε αιωρήματα AuNPs (Schwertfeger et al., 2017).

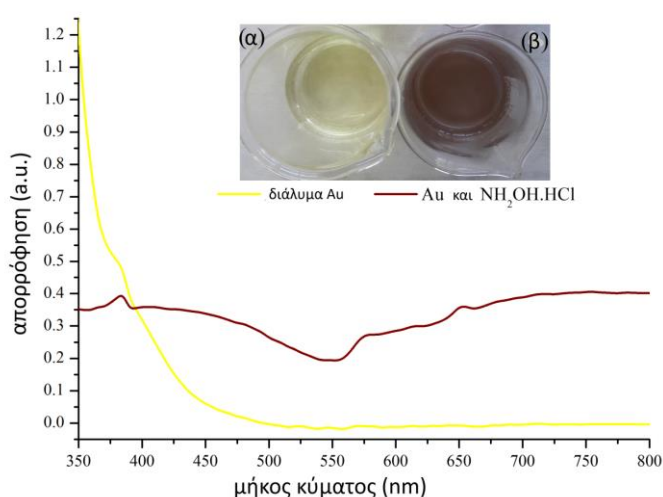


**Σχήμα 4.5.** Ανάκτηση των PVP-AuNPs (5 nm και 30 nm) μετά από φυγοκέντρηση σε διάλυμα που ελήφθησε μετά από εκχύλιση του χώματος με TSPP. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για  $n=3$ .

#### 4.3.5 Ειδοταυτοποίηση μεταλλικών νανοσωματιδίων και μεταλλικών ιόντων στα εκχυλίσματα χώματος

Εκτός των νανοσωματιδίων μεταλλικά ιόντα της ίδιας προέλευσης με τα νανοσωματίδια μπορεί να υπάρχουν στα δείγματα χώματος τόσο από φυσικές όσο και από ανθρωπογενείς πηγές. Ως εκ τούτου, για να προσδιοριστεί με ακρίβεια η συγκέντρωση και η κλασματοποίηση των νανοσωματιδίων στα χώματα, είναι απαραίτητο να διαχωριστούν τα νανοσωματίδια από τα αντίστοιχα είδη μεταλλικών ιόντων. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος είναι αναγκαίο να διασφαλιστούν ταυτόχρονα τρεις προϋποθέσεις: α) τα νανοσωματίδια και τα μεταλλικά ιόντα να εκχυλίζονται αποτελεσματικά από το χώμα β) ούτε τα νανοσωματίδια ούτε τα μεταλλικά ιόντα να υπόκεινται σε χημικούς μετασχηματισμούς κατά τη διάρκεια της διαδοχικής εκχύλισης και γ) να διαχωρίζονται αποτελεσματικά μεταξύ τους πριν τον προσδιορισμό τους.

Δεδομένου ότι η μέθοδος διαδοχικής εκχύλισης βασίζεται στην σταδιακή διαλυτοποίηση της μήτρας του υποστρώματος του χώματος θα ήταν λογικό να υποθέσουμε ότι μπορεί να εκχυλιστούν αποτελεσματικά τόσο τα AuNPs όσο και τα ιόντα Au. Ωστόσο, όλες οι μέθοδοι (SEP) που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα (συμπεριλαμβανομένης της μεθόδου που αναπτύχθηκε σε αυτό το κεφάλαιο) χρησιμοποιείται υδροχλωρική υδροξυλαμίνη για να εκχυλίσει τα νανοσωματίδια που συνδέονται με το αναγωγίμο κλάσμα (υδροξείδια Fe και Mn) (Rodgers et al., 2015, Zimmerman and Weindorf, 2010). Τα Ιόντα χρυσού (καθώς και άλλα μεταλλικά ιόντα) που βρίσκονται στο δείγμα ανάγονται από την υδροξυλαμίνη στα αντίστοιχα είδη νανοσωματιδίων (Σχήμα 4.6).



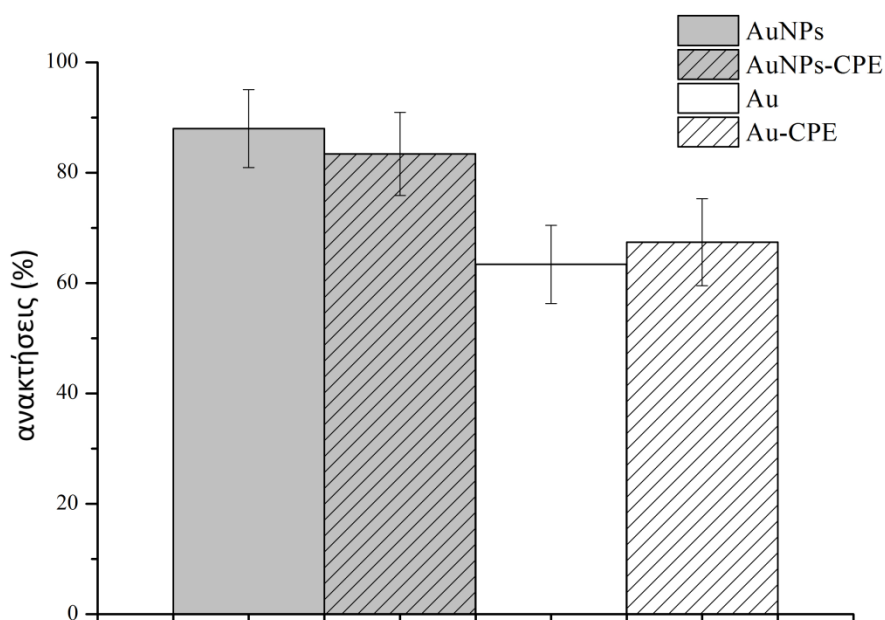
**Σχήμα 4.6.** Φάσματα UV-Vis και φωτογραφίες διαλυμάτων ιόντων χρυσού (1.0 mM) (α) πριν και (β) μετά την επώαση με 0.5 M υδροχλωρική υδροξυλαμίνη για 30 min.

Για να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός αποφασίσαμε να εκχυλιστούν ταυτόχρονα τα AuNPs και τα ιόντα Au από το αρχικό δείγμα χώματος (χωρίς εφαρμογή της μεθόδου διαδοχικής εκχύλισης) και στη συνέχεια να διαχωριστούν με μια κατάλληλη μέθοδο διαχωρισμού. Αυτή η προσέγγιση δεν παρέχει πληροφορίες όσον αφορά τη ειδοταυτοποίηση των AuNPs και των ιόντων Au σε κάθε κλάσμα χώματος αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της (συνολικής) σχετικής κατανομής κάθε είδους στο εδαφικό δείγμα.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το TSPP μπορεί να εκχυλίσει αποτελεσματικά τα AuNPs από τη μήτρα του χώματος μέσω διασποράς και διάλυτοποίησης της οργανικής ύλης του χώματος υπό αλκαλικές συνθήκες. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα ιόντα Au βρίσκονται στην γενική ιοντική τους μορφή του τύπου  $[AuCl_x(OH)_{4-x}]^{-x}$  ( $x < 2$ ) (Wang et al., 2009) οπότε δεν καταβυθίζονται ως αδιάλυτα υδροξείδια. Επομένως, εάν το TSPP μπορεί επίσης να εκχυλίζει και τα ιόντα Au αποτελεσματικά, θα ήταν κατάλληλο αντιδραστήριο για την ταυτόχρονη εκχύλιση των AuNPs και των ιόντων Au από τα δείγματα χώματος.

Για να ελέγξουμε αυτήν την υπόθεση, εμβολιάσαμε τρία δείγματα χώματος με PVP-AuNPs, ιόντα Au και PVP-AuNPs/ιόντα Au σε ισομοριακές συγκεντρώσεις και τα εκχυλίσαμε με TSPP (Στάδιο Δ, Πίνακας 4.1). Τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν από το χώμα που ήταν εμβολιασμένο με ιόντα Au και PVP-AuNPs αναλύθηκαν απευθείας με FAAS, ενώ τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν από το χώμα που ήταν εμβολιασμένο τόσο με AuNPs όσο και με ιόντα Au διατηρήθηκαν για περαιτέρω επεξεργασία ώστε να διαχωριστούν τα AuNPs από τα ιόντα Au. Αυτό ήταν απαραίτητο διότι φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης δεν διακρίνει κάθε είδος και επομένως η μετρούμενη συγκέντρωση αντιστοιχεί στη συνολική συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων στο δείγμα (δηλ. μεταλλικά ιόντα που περιέχονται στα νανοσωματίδια και διαλυμένα μεταλλικά ιόντα). Από την πληθώρα αναλυτικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν για την εκχύλιση μεταλλικών νανοσωματιδίων (Leopold et al., 2016) επιλέξαμε την εκχύλιση σημείου νεφέλωσης (CPE) για τρεις λόγους α) μπορεί να παρέχει πληροφορίες τόσο για το χημική σύσταση των νανοσωματιδίων (δηλ. μάζα ή συγκέντρωση) όσο και τη φυσική τους κατάσταση (μέγεθος και μορφολογία) ανάλογα με τις ανάγκες της ανάλυσης, β) είναι εύκολη στη χρήση και δεν απαιτεί τη σύνθεση νέων υλικών ή αντιδραστηρίων και γ) μπορεί να προσαρμοστεί στις ανάγκες της ανάλυσης και να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα πειραματικών συνθηκών (δηλ. pH, ιοντικής ισχύος, θερμοκρασίας, κ.λπ.) ανάλογα με τις ανάγκες της ανάλυσης.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.7 δείχνουν ότι το TSPP μπορεί να εκχυλίσει τα περισσότερα ιόντα Au (περίπου 65%) ενώ η CPE μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά τον διαχωρισμό των AuNPs και των ιόντων Au στο εκχύλισμα χρώματος.



**Σχήμα 4.7.** Αποτελέσματα από την ανάλυση ειδοταυτοποίησης των AuNPs και των ιόντων Au σε εκχυλίσματα χρώματος μετά την εκχύλιση του σημείου νεφέλωσης. Τα διαγράμματα χωρίς διαγράμμιση ελήφθησαν από την εκχύλιση του εμβολιασμένου χρώματος με AuNPs ή με ιόντα Au, ενώ τα διαγράμματα με εσωτερική διαγράμμιση παρουσιάζουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση του χρώματος που έχει εμβολιαστεί με AuNPs και ιόντα Au μετά από διαχωρισμό με εκχύλιση σημείου νεφέλωσης. Οι μπάρες αναπαριστούν το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων για  $n=3$ . Επομένως, συνδυάζοντας την εκχύλιση TSPP με CPE είναι εφικτό να λάβουμε πληροφορίες σχετικά με τη σχετική κατανομή και την ειδοταυτοποίηση της συνολικής συγκέντρωσης των ιόντων Au και των AuNPs σε δείγματα χρώματος.

#### 4.4 Συμπεράσματα

Σ' αυτό το κεφάλαιο διερευνήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης μιας μεθόδου διαδοχικής εκχύλισης που χρησιμοποιεί μια σειρά αντιδραστηρίων για τη διαδοχική διαλυτοποίηση των συστατικών της μήτρας του χώματος, για την εκτίμηση της κινητικότητας και της βιοπροσβασιμότητας των AuNPs σε χώματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα χώματος, τα AuNPs συμπλοκοποιούνται ισχυρά από την οργανική ύλη του χώματος, γεγονός που περιορίζει την κινητικότητά τους, ενώ η ποσότητα των AuNPs που διατηρείται στα κλάσματα χώματος τα οποία είναι πιο βιοδιαθέσιμα όπως μεταλλικά οξείδια, είναι λιγότερο σημαντική. Επομένως, τα χώματα με πλούσια οργανική ύλη λειτουργούν ως εμπόδιο στη διασπορά και τη βιοδιαθεσιμότητα των AuNPs στο περιβάλλον, ενώ τα οξείδια ορυκτών μπορούν να χρησιμεύσουν ως αποθήκη απελευθερώνοντας σταδιακά τα AuNPs, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους και την πιθανή πρόσληψη τους από ζωντανούς οργανισμούς.

Στη μέθοδο που αναπτύχθηκε σε αυτό το κεφάλαιο διευκρινίστηκαν επίσης μερικές προκλήσεις που πρέπει να ξεπεραστούν προκειμένου να καταστεί δυνατή η προτυποποίηση ενός πρωτοκόλλου διαδοχικής εκχύλισης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οικοτοξικολογικές μελέτες και για μελέτες αξιολόγησης των επιπτώσεων των μεταλλικών νανοσωματιδίων σε περιβαλλοντικά στερεά. Αυτές οι προκλήσεις σχετίζονται με τον διαχωρισμό των νανοσωματιδίων από τα φυσικά μικρο/νανο-κολλοειδή και την εκλεκτικότητα των αντιδραστηρίων εκχύλισης έναντι των μεταλλικών νανοσωματιδίων και των πρόδρομων μεταλλικών ιόντων τους. Η αντιμετώπιση των προκλήσεων αυτών θα επιτρέψει όχι μόνο την εκτίμηση της κλασμάτωσης των μεταλλικών νανοσωματιδίων στις μήτρες των στερεών αλλά και την ειδοταυτοποίηση μεταξύ των μεταλλικών νανοσωματιδίων και των μεταλλικών ιόντων, έτσι ώστε να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την τύχη, τον μετασχηματισμό και την πορεία μεταφοράς των νανοσωματιδίων σε περιβαλλοντικά στερεά (όπως για παράδειγμα ιζήματα, λάσπη κλπ).

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Abdolmohammad-Zadeh H., Rezvani Z., Sadeghi G.H., Zorufi E., Layered double hydroxides: A novel nano-sorbent for solid-phase extraction, *Anal. Chim. Acta* 685 (2011) 212–219.

Adam N., Schmitt C., Galceran J., Companys E., Vakurov A., Wallace R., Knapen D., Blust R., The chronic toxicity of ZnO nanoparticles and ZnCl<sub>2</sub> to *Daphnia magna* and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution, *Nanotoxicology* 8 (2014) 709–717.

Ahn J.-M., Eom H.-J., Yang X., Meyer J.N., Choi J., Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*, *Chemosphere* 108 (2014) 343–352.

Ajazzuddin M., Jeswani G., Kumar Jha A., Nanocosmetics: Past, Present and Future Trends, *Recent Pat. Nanomed.* 5 (2015) 3–11.

Amde M., Liu J.F., Tan Z.Q., Bekana D., Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review, *Environ. Pollut.* 230 (2017) 250–267.

Antisari L.V., Carbone S., Gatti A., Vianello G., Nannipieri P., Toxicity of metal oxide (CeO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, SnO<sub>2</sub>) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil, *Soil Biol. Biochem.* 60 (2013) 87-94.

Aruoja V., Dubourguier H.-C., Kasemets K., Kahru A., Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 1461–1468.

Avramescu M.L., Rasmussen P.E., Chenier M., Gardner H.D., Influence of pH, particle size and crystal form on dissolution behaviour of engineered nanomaterials, *Environ. Sci Pollut. Res.* 24 (2) (2017) 1553–1564.

Balmes O., Bovin J.-O., Ja -O., Malm, Self-healing and self-organized gold nanoparticle films at a water/organic solvent interface, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006) 130–134.

Bar-Ilan O., Albrecht R.M., Fako V.E., Furgeson D.Y., Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos, *Small* 5 (2009) 1897–1910.

Baughman R.H., Zakhidov A.A., De Heer W.A., Carbon nanotubes--the route toward applications, *Science* (2002) 297 787-792.

Baysal A., Saygin H., Ustabasi G.S., Interaction of PM2.5 airborne particulates with ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles and their effect on bacteria, *Environ. Monit. Assess.* 190 (2018) 1–15.

Beachley V. and Wen X., Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length, *Mater. Sci. Eng. C.* (2009) 29 663-668.

Benedé J.L., Chisvert A., Giokas D.L., Salvador A., Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media. *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 25–33.

Benedé J.L., Giokas D.L., Chisvert A., Salvador A., In-situ suspended aggregate microextraction: A sample preparation approach for the enrichment of organic compounds in aqueous solutions, *J. Chromatogr. A* 1408 (2015) 63–71.

Benoit R., Wilkinson K.J., Sauve S., Partitioning of silver and chemical speciation of free Ag in soils amended with nanoparticles, *Chem. Cent. J.* 7 (2013) 75.

Bhattacharjee S., Ershov D., Islam M.A., Kämpfer A.M., Maslowska K.A., van der Gucht J., Alink G.M., Marcelis A.T.M., Zuilhofa H., Rietjens I.M.C.M., Role of membrane disturbance and oxidative stress in the mode of action underlying the toxicity of differently charged polystyrene nanoparticles, *RSC Adv.* 4 (2014) 19321-19330.

Bhuvaneshwari M., Iswarya V., Archanaa S., Madhu G.M., Kumar G.K.S., Nagarajan R., Chandrasekaran N., Mukherjee A., Cytotoxicity of ZnO NPs towards fresh water algae *Scenedesmus obliquus* at low exposure concentrations in UV-C, visible and dark conditions, *Aquat. Toxicol.* 162 (2015) 29–38.

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., Biotic and abiotic interactions in aquatic microcosms determine fate and toxicity of Ag nanoparticles: part 2-toxicity and Ag speciation, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6925–6933.

Borgese L., Federici S., Zacco A. Gianoncelli A., Rizzo L., Smith D.R., Donna F., Lucchini R., Depero L.E., Bontempi E., Metal fractionation in soils and assessment of environmental contamination in Vallecmonica, Italy, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (7) (2013) 5067-5075.

Brown D.M., Wilson M.R., MacNee W., Stone V., Donaldson K., Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 175 (2001) 191–199.

Camargo P.H.C., Satyanarayana K.G., Wypych F., Nanocomposites: Synthesis, Structure, Properties and New Application Opportunities, *Mater. Res.* (2009) 12 1-39.

Cassella R.J., Brum D.M., Lima C.F., Fonseca T.C.O., Stabilization of aviation gasoline as detergent emulsion for lead determination by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Fuel Process. Technol.* 92 (2011) 933–938.

Cayuelaa A., Sorianoa M.L., Carrión M.C., Valcárcel M., Functionalized carbon dots as sensors for gold nanoparticles in spiked samples: Formation of nanohybrids, *Anal. Chim. Acta* 820 (2014) 133–138.

Chandran P., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A., Surface chemistry of gold nanoparticles determines the biocorona composition impacting cellular uptake, toxicity and gene expression profiles in human endothelial cells, *Nanotoxicology* 11 (2017) 507–519.

Chao J.-B., Liu J.-F., Yu S.-J., Feng Y.-D, Tan Z.-Q., Liu R., Yin Y.-G., Speciation analysis of silver nanoparticles and silver ions in antibacterial products and environmental waters via cloud point extraction-based separation, *Anal. Chem.* 83 (2011) 6875–6882.

Chekli L., Bayatsarmadi B., Sekine R., Sarkar B., Shen A., Scheckel K., Skinner W., Naidu R., Shon H., Lombi E., Donner E., Analytical Characterisation of Nanoscale Zero-Valent Iron: A Methodological Review, *Anal. Chim. Acta* (2016) 903 13–35.

Chen G., Liu X., Su C., Distinct effects of humic acid on transport and retention of TiO<sub>2</sub> rutile nanoparticles in saturated sand columns, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 7142–7150.

Chen J., Dong X., Xin Y., Zhao M., Effects of titanium dioxide nanoparticles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure, *Aquat. Toxicol.* 101 (2011) 493–499.

Chen S., Sun Y., Chao J., Cheng L., Chen Y., Liu J., Dispersive liquid–liquid microextraction of silver nanoparticles in water using ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, *J. Environ. Sci.* 41 (2016) 211–217.

Chia S.L., Tay C.Y., Setyawati M.I., Leong D.T., Biomimicry 3D gastrointestinal spheroid platform for the assessment of toxicity and inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles, *Small* 11 (2015) 702–712.

Cho E., Jang H., Lee J., Jang E., Modeling on the size dependent properties of InP quantum dots: a hybrid functional study, *Nanotechnology* (2013) 24 21.

Choi J.E., Kim S., Ahn J.H., Youn P., Kang J.S., Park K., Yi Y., Ryu D.-Y., Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish, *Aquat. Toxicol.* 100 (2010) 151–159.

Choleva T.G., Kappi F.A., Tsogas G.Z., Vlessidis A.G., Giokas D.L., In-situ suspended aggregate microextraction of gold nanoparticles from water samples and determination by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 151 (2016) 91–99.

Choleva T.G., Tsogas G.Z., Giokas D.L., Determination of silver nanoparticles by atomic absorption spectrometry after dispersive suspended microextraction followed by oxidative dissolution back-extraction, *Talanta* 196 (2019) 255–261.

Cidu R., Fahfani L., Shand P., Edmunds W.M., Van't dack L., Gijbels R., Determination of gold at the ultratrace level in natural waters, *Anal. Chim. Acta* 296 (1994) 295–304.

Clarkson J., Campbell C., Rospendowski B.N., Smith W.E., Molecular recognition using surface-enhanced Raman scattering from citrate-reduced silver colloids in non-aqueous solvents, *J. Raman Spectrosc.* 22 (1991) 771–775.

Cornelis G., DooletteMadeleine Thomas C., McLaughlin M.J., Kirby J.K., Beak D.G., Chittleborough D., Retention and dissolution of engineered silver nanoparticles in natural soils, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 76 (2012) 891–902.

Cornelis G., Hund-Rinke K., Kuhlbusch T., Brink N., Nickel C., Fate and bioavailability of engineered nanoparticles in soils: A review, critical reviews in environmental science and technology, *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 44 (24) (2014) 2720–2764.

Cornelis G., Pang L., Doolette C., Kirby J.K., McLaughlin M.J., Transport of silver nanoparticles in saturated columns of natural soils, *Sci. Total Environ.* 463–464 (2013) 120–130.

Cornelis G., Ryan B., McLaughlin M.J., Kirby J.K., Beak D., Chittleborough D., Solubility and batch retention of CeO<sub>2</sub> nanoparticles in soils, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 2777–2782.

Cornelis G., Thomas C.D., McLaughlin M.J., Kirby J.K., Beak D.G., Chittleborough D., Retention and dissolution of engineered silver nanoparticles in natural soils, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 76 (2012) 891-902.

Da Silva B.F., Perez S., Gardinalli P., Singhal R.K., Mozeto A.A., Barcelo D., Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 528–540.

Dahle J.T. and Arai Y., Effects of Ce(III) and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on soil-denitrification kinetics, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2014) 474-482.

Das T., Kolli V., Karmakar S., Sarkar N., Functionalisation of polyvinylpyrrolidone on gold nanoparticles enhances its anti-amyloidogenic propensity towards hen egg white lysozyme, *Biomedicines* 5 (2017) 19.

Davies T.S., Ketner A.M., Raghavan S.R., Self-assembly of surfactant vesicles that transform into viscoelastic wormlike micelles upon heating, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 6669–6675.

Dawson K.A., Salvati A., Lynch I., Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids, *Nat. Nanotechnol.* 4 (2009) 84–85.

De Volder M.F.L., Tawfick S.H., Baughman R.H., Hart A.J., Carbon nanotubes: present and future commercial applications, *Science* (2013) 339, 535–539.

Debia M., Bakhiyi B., Ostiguy C., Verbeek J.H., Brouwer D.H., Murashov V., A systematic review of reported exposure to engineered nanomaterials, *Ann. Occup. Hyg.* 60 (2016) 916–935.

Dhand C., Arya S.K., Singh S.P., Singh B.P., Datta M., Malhotra B.D., Preparation of polyaniline/multiwalled carbon nanotube composite by novel electrophoretic route, *Carbon* (2008) 46 1727–1735.

Dhyani H., Dhand C., Malhotra B.D., Sen P., Polyaniline-CdS Quantum Dots Composite for Mediator Free Biosensing, *J. Biosens. Bioelectron.* (2011) 3 112.

Diegoli S., Manciuola A.L., Begum S., Jones I.P., Lead J.R., Preece J.A., Interaction between manufactured gold nanoparticles and naturally occurring organic macromolecules, *Sci. Total Environ.* 402 (2008) 51–61.

Ding Y., Kuhlbusch T.A.J., Van Tongeren M., Jimenez A.S., Tuinman I., Chen R., Alvarez I.L., Mikolajczyk U., Nickel C., Meyer J., Kaminski H., Wohlleben W., Stahlmecke B., Clavaguera S., Riediker M., Airborne engineered nanomaterials in the workplace-a review of release and worker exposure during nanomaterial production and handling processes, *J. Hazard. Mater.* 322 (2017) 17–28.

Ealia A.M.S. and Saravanakumar M.P., A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application, IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering (2017) 263 032019.

Eixenberger J.E., Anders C.B., Hermann R.J., Brown R.J., Reddy K.M., Punnoose A., Wingett D.G., Rapid Dissolution of ZnO Nanoparticles Induced by Biological Buffers Significantly Impacts Cytotoxicity, Chem. Res. Toxicol. 30 (2017) 1641–1651.

El Badawy A.M., Silva R.G., Morris B., Scheckel K.G., Suidan M.T., Tolaymat T.M., Surface chargedependent toxicity of silver nanoparticles, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 283–287.

Endo M., Suzuki K., Abe S., Novel preconcentration technique for trace metal ions by aggregate film formation. Spectrophotometric determination of copper(II), Anal. Chim. Acta 364 (1998) 13–17.

Erbis S., Ok Z., Isaacs J.A., Benneyan J.C., Kamarthi S., Review of research trends and methods in nano environmental, health, and safety risk analysis, Risk Analysis 36 (2016) 1644–1665.

European Commission, Nanomaterials, Available from: [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/index\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/index_en.htm), 2019, accessed 21 August 2019.

Fabricius A.L., Duester L., Meermann B., Ternes T.A., ICP-MS-based characterization of inorganic nanoparticles—sample preparation and off-line fractionation strategies, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 467–479.

Fajardo C., Saccà M.L., Costa G., Nande M., Martin M., Impact of Ag and Al<sub>2</sub> O<sub>3</sub> nanoparticles on soil organisms: in vitro and soil experiments, Sc. Total Environ. 473-474 (2014) 254–261.

Fent K., Weisbrod C.J., Wirth-Heller A., Pielkes U., Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (Danio rerio) early life stages, Aquat. Toxicol. 100 (2010) 218–228.

Fischer H., Polymer nanocomposites: from fundamental research to specific applications, *Mater. Sci. Eng. C.* (2003) 23 763-772.

Frederik Hetsch N.Z., Kershaw S.V., Rogach A.L., Quantum dot field effect transistors, *Mater. Today* (2013) 16 312-325.

Gabbasov R., Polikarpov M., Cherepanov V., Chuev M., Mischenko I., Lomov A., Wang A., Panchenko V., Mössbauer, magnetization and X-ray diffraction characterization methods for iron oxide nanoparticles, *J Magn. Magn. Mater.* (2015) 380 111–116.

Gaiser B.K., Fernandes T.F., Jepson M.A. Lead J.R., Tyler C.R., Baalousha M., Biswas A., Britton G.J., Cole P.A., Johnston B.D., Ju-Nam Y., Rosenkranz P., Scown T.M., Stone V., Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 144–154.

Galloway J.M., Talbot J.E., Critchley K., Miles J.J., Bramble J.P., Developing Biotemplated Data Storage: Room Temperature Biomineralization of L10 CoPt Magnetic Nanoparticles, *Adv. Funct. Mater.* (2015) 25 4590–4600.

García-Gómez C., Babin M., Obrador A., Alvarez J.M., Fernandez M.D., Toxicity of ZnO nanoparticles, ZnO bulk, and ZnCl<sub>2</sub> on earthworms in a spiked natural soil and toxicological effects of leachates on aquatic organisms, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2014) 465–473.

Gatselou V.A., Giokas D.L., Vlessidis A.G., Determination of dissolved organic matter based on UV-light induced reduction of ionic silver to metallic nanoparticles by humic and fulvic acids, *Anal. Chim. Acta* 812 (2014) 121–128.

Ghosh D., Sarkar D., Girigoswami A., Chattopadhyay N., A fully standardized method of synthesis of gold nanoparticles of desired dimension in the range 15 nm–60 nm, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11 (2011) 1141–1146.

Giese B., Klaessig F., Park B., Kaegi R., Steinfeldt M., Wigger H., von Gleich A., Gottschalk F., Risks, release and concentrations of engineered nanomaterial in the environment, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1565.

Gimbert L.J., Haygarth P.M., Beckett R., Worsfold P.J., Comparison of centrifugation and filtration techniques for the size fractionation of colloidal material in soil suspensions using sedimentation field-flow fractionation, *Environ. Sci. Technol.* 39 (6) (2005) 1731-1735.

Gimbert L.J., Haygarth P.M., Beckett R., Worsfold P.J., The influence of sample preparation on observed particle size distributions for contrasting soil suspensions using flow field-flow fractionation, *Environ. Chem.* 3 (3) (2006) 184–191.

Giokas D.L., Tsogas G.Z., Vlessidis A.G., Karayannis M.I., Metal ion determination by flame atomic absorption spectrometry through reagentless coacervate phase separation-extraction into lamellar vesicles, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1302–1309.

Gissawong N., Sansuk S., Srijaranai S., The alternative use of layered double hydroxides as extraction medium coupled with microcomplexation for determination of phosphate in water samples, *Spectrochim. Acta, Part A* 173 (2017) 994–1000.

Gladkova M. and Terekhova V., Engineered nanomaterials in soil: Sources of entry and migration pathways, *Moscow Univ. Soil Sci. Bull.* 68 (2013) 129–134.

Glenn J.B. and Klaine S.J., Abiotic and biotic factors that influence the bioavailability of gold nanoparticles to aquatic macrophytes, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 10223–10230.

Goodman C.M., McCusker C.D., Yilmaz T., Rotello V.M., Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains, *Bioconjug Chem* 15 (2004) 897–900.

Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W., Nowack B., Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions, *Environ. Sci. Technol.* 43 (24) (2009) 9216–9222.

Gottschalk F., Sun T., Nowack B., Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies, *Environ. Pollut.* 181 (2013) 287-300.

Grabner D., Zhai L., Talmon Y., Schmidt J., Freiberger N., Glatter O., Herzog B., Hoffmann H., Phase behavior of aqueous mixtures of 2-Phenylbenzimidazole- 5-sulfonic acid and cetyltrimethylammonium bromide: Hydrogels, vesicles, and ribbons, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 2901–2908.

Gräfe M., Donner E., Collins R.N., Lombi E., Speciation of metal(loid)s in environmental samples by X-ray absorption spectroscopy: a critical review, *Anal. Chim. Acta* (2014) 822 1–22.

Graham C.D., High-sensitivity magnetization measurements, *J. Mater. Sci. Technol.* (2000) 16 97–101.

Griffitt R.J., Luo J., Gao J., Bonzongo J.-C., Barber D.S., Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1972–1978.

Hadri H.E., Louie S.M., Hackley V.A., Assessing the interactions of metal nanoparticles in soil and sediment matrices – a quantitative analytical multi-technique approach, *Environ. Sci. Nano* 5 (2018) 203-214.

Haiss W., Thanh N.T.K., Aveyard J., Fernig D.G., Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV–vis spectra, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4215–4221.

Harivardhan Reddy L., Arias J.L., Nicolas J., Couvreur P., Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications, *Chem. Rev.* (2012) 112 5818–5878.

Hartmann G. and Schuster M., Species selective preconcentration and quantification of gold nanoparticles using cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 761 (2013) 27–33.

Hartmann G., Baumgartner T., Schuster M., Influence of particle coating and matrix constituents on the cloud point extraction efficiency of silver nanoparticles (Ag-NPs) and application for monitoring the formation of Ag-NPs from Ag<sup>+</sup>, *Anal. Chem.* 86 (2014) 790–796.

Hartmann G., Hutterer C., Schuster M., Ultra-trace determination of silver nanoparticles in water samples using cloud point extraction and ETAAS, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 567–572.

Hassellöv M., Readman J.W., Ranville J.F., Tiede K., Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles, *Ecotoxicology* 17 (2008) 344–361.

He H., Pham-Huy L.A., Dramou P., Xiao D., Zuo P. Pham-Huy C., Carbon nanotubes: applications in pharmacy and medicine, *Int. J. Biomed. Res.* (2013) 2013, 1-12.

He Y.T., Wan J., Tokunaga T., Kinetic stability of hematite nanoparticles: the effect of particle sizes, *J. Nanopart. Res.* 10 (2008) 321–332.

Heckmann L.H., Hovgaard M.B., Sutherland D.S., Autrup H., Besenbacher F., Scott-Fordsmand J.J., Limit test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*, *Ecotoxicology* 20 (2011) 226–233.

Heithmar E.M., Screening methods for metal-containing nanoparticles in water, United States Environmental Protection Agency (EPA), Washington, 2011.

Hendren C.O., Mesnard X., Droge J., Wiesner M.R., Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 2562–2569.

Hristovski K.D., Westerhoff P.K., Posner J.D., Octanol-water distribution of engineered nanomaterials, *J. Environ. Sci. Heal. A* 46 (2011) 636–647.

Hristozov D. and Malsch I., Hazards and risks of engineered nanoparticles for the environment and human health, *Sustainability* 1 (2009) 1161–1194.

Hsiao I.-L., Huang Y.-J., Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells, *Sci Total Environ.* 409 (2011) 1219–1228.

Hu C., Liu H., Dong W., Zhang Y., Bao G., Lao C., Wang Z.L., La(OH)<sub>3</sub> and La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanobelts—Synthesis and Physical Properties, *Adv. Mater.* (2007) 19 470-474.

Huang K., Lv Y., Zhang W., Sun S., Yang B., Chi F., Ran S., Liu X., One-step synthesis of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Ag photocatalyst with visible-light photocatalytic activity, *Mater. Res.* 18 (2015) 939–945.

Huang L., Chen X., Li Q., Synthesis of microporous molecular sieves by surfactant decomposition, *J. Mater. Chem.* 11 (2001) 610-615.

Hyun J.K., Zhang S., Lauhon L.J., Nanowire Heterostructures, *Annu. Rev. Mater. Res.* (2013) 43 451–479.

Jamiesona T., Bakhshi R., Petrova D., Imani M., Seifalian A.M., Biological applications of quantum dots, *Biomaterials* (2007) 28 4717-4732.

Jiang X., Tong M., Kim H., Influence of natural organic matter on the transport and deposition of zinc oxide nanoparticles in saturated porous media, *J. Colloid Interface Sci.* 386 (2012) 34–43.

Jin X., Li M., Wang J., Marambio-Jones C., Peng F., Huang X., Damoiseaux R., Hoek E.M.V., High-throughput screening of silver nanoparticle stability and bacterial inactivation in aquatic media: influence of specific ions, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 7321–7328.

Johnson V.R., Nanotechnology, environmental risks, and regulatory options, *Penn St. L. Rev.* 121 (2016) 471–503.

Jones P., Sugino S., Yamamura S., Lacy F., Biju V., Impairments of cells and genomic DNA by environmentally transformed engineered nanomaterials, *Nanoscale* 5 (2013) 9511–9516.

Joye I.J. and McClements D.J., Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: fabrication, characterization, and application, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* (2014) 19 1-11.

Kabala C., Singh B.R., Fractionation and mobility of copper, lead, and zinc in soil profiles in the vicinity of a copper smelter, *J. Environ. Qual.* 30 (2) (2001) 485–492.

Kabata-Pendias A., Soil–plant transfer of trace elements— an environmental issue, *Geoderma* 122 (2004) 143–149.

Kaiser J.P., Roesslein M., Diener L., Wichser A., Nowack B., Wick P., Cytotoxic effects of nanosilver are highly dependent on the chloride concentration and the presence of organic compounds in the cell culture media, *J. Nanobiotechnol.* 15 (2017) 1–11.

Kaler E.W., Murthy A.K., Rodriguez B.E., Zasadzinski J.A.N., Spontaneous vesicle formation in aqueous mixtures of single-tailed surfactants, *Science* 245 (1989) 1371–1374.

Kapakoglou N.I., Giokas D.L., Tsogas G.Z., Ladavos A.K., Vlessidis A.G., Development of a chromium speciation probe based on morphology-dependent aggregation of polymerized vesicle-functionalized gold nanoparticles, *Analyst* 134 (2009) 2475–2483.

Kapakoglou N.I., Giokas D.L., Tsogas G.Z., Vlessidis A.G., Coacervation of surface-functionalized polymerized vesicles derived from ammonium bromide surfactants. Application to the selective speciation of chromium in environmental samples, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9787–9796.

Kappi F.A., Tsogas G.Z., Giokas D.L., Christodouleas D.C., Vlessidis A.G., Colorimetric and visual read-out determination of cyanuric acid exploiting the interaction between melamine and silver nanoparticles. *Microchim. Acta* 181 (2014) 623–629.

Khan R., Inam M.L., Zam S.Z., Akram M., Shin S., Yeom I.T., Coagulation and dissolution of CuO nanoparticles in the presence of dissolved organic matter under different pH values, *Sustainability* 11 (10) (2019) 2825.

Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R., Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1825–1851.

Kolahalam L.A., Viswanath I.V.K., Diwakar B.S., Govindh B., Reddy V., Murthy Y.L.N., Review on nanomaterials: Synthesis and applications, *Materials Today: Proceedings* 18 (2019) 2182–2190.

Korshed P., Li L., Ngo D.T., Wang T., Effect of Storage Conditions on the Long-Term Stability of Bactericidal Effects for Laser Generated Silver Nanoparticles, *Nanomaterials* 8 (2018) 218.

Koutsoulis N.P., Giokas D.L., Vlessidis A.G., Tsogas G.Z., Alkaline earth metal effect on the size and color transition of citrate-capped gold nanoparticles and analytical implications in periodate-luminol chemiluminescence, *Anal. Chim. Acta* 669 (2010) 45–52.

Kralchevsky P. and Nagayama K., *Particles at Fluid Interfaces and Membranes: Attachment of Colloid Particles and Proteins to Interfaces and Formation of Two-dimensional Arrays*, Elsevier, Amsterdam, 2001.

Krieg E., Weissman H., Shirman E., Shimoni E., Rybtchinski B., A recyclable supramolecular membrane for size-selective separation of nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 141–146.

Krzyminiewski R., Dobosz B., Schroeder G., Kurczewsk J., Focusing of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles using a rotating magnetic field in various environments, *Phys. Lett. A* (2018) 382 3192–3196.

Kubickova S., Vejpravova J., Holec P., Niznansky D., Correlation of crystal structure and magnetic properties of  $\text{Co}(1-x)\text{Ni}_x\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  nanocomposites, *J. Magn. Magn. Mater.* (2013) 334 102–106.

Laborda F., Jiménez-Lamana J., Bolea E., Castillo J.R., Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1362–1371.

Lahive E., Jurkschat K., Shaw B.J., Handy R.D., Spurgeon D.J., Svendsenet C., Toxicity of cerium oxide nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*: subtle effects, *Environ Chem* 11 (2014) 268-278.

Lakshmanan B.R., Infrared absorption spectrum of sodium citrate, *J. Indian Inst Sci.* 39 (1957) 27-29.

Lapied E., Nahmani J.Y., Moudilou E., Chaurand P., Labille J., Rose J., Exbrayat J.M., Oughton D.H., Joner E.J., Ecotoxicological effects of an aged TiO<sub>2</sub> nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil, *Environ. Int.* 37 (2011) 1105–1110.

Law N., Ansari S., Livens F.R., Renshaw J.C., Lloyd J.R., Formation of nanoscale elemental silver particles via enzymatic reduction by *Geobacter sulfurreducens*, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 7090–7093.

Layet C., Auffan M., Santaella C., Chevassus-Rosset C., Montes M., Ortet P., Barakat M., Collin B., Legros S., Bravin M.N., Angeletti B., Kieffer I., Proux O., Hazemann J.L., Doelsch E., Evidence that soil properties and organic coating drive the phytoavailability of cerium oxide nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 9756–9764.

Lei C., Sun Y., Tsang D.C.W., Lin D., Environmental transformations and ecological effects of iron-based nanoparticles, *Environ. Pollut.* 232 (2018) 10–30.

Lei C., Zhang L.Q., Yang K., Zhu L. Z., Lin D.H., Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging, *Environ. Pollut.* 218 (2016) 505–512.

Leopold K., Philippe A., Worle K., Schaumann G.E., Analytical strategies to the determination of metal-containing nanoparticles in environmental waters, *Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 107-120.

Leung V. and Ko F., Biomedical applications of nanofibers, *Polym. Advan. Technol.* (2011) 22 350-365.

Li L. and Leopold K., Ligand-assisted extraction for separation and preconcentration of gold nanoparticles from waters, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4340–4349.

Li L., Leopold K., Schuster M., Effective and selective extraction of noble metal nanoparticles from environmental water through a noncovalent reversible reaction on an ionic exchange resin, *Chem. Commun.* 48 (2012) 9165–9167.

Li L.-Z., Zhou D.-M., Peijnenburg W.J.G.M., van Gestel C.A.M., Jin S.-Y., Wang Y.-J., Wang P., Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn, *Environ. Int.* 37 (2011) 1098–1104.

Li X., Sun Y., Yuan L., Liang L., Jiang Y., Piao H., Song D., Yu A., Wang X., Packed hybrids of gold nanoparticles and layered double hydroxide nanosheets for microextraction of triazine herbicides from maize, *Microchim. Acta* 185 (2018) 336.

Li Y., Qian F., Xiang J., Lieber C.M., Nanowire electronic and optoelectronic devices, *Mater. Today* (2006) 9 18-27.

Li Z.-P., Wang Y.-C., Liu C.-H., Li Y.-K., Development of chemiluminescence detection of gold nanoparticles in biological conjugates for immunoassay, *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 85–91.

Lim J. and Majetich S.A., Composite magnetic–plasmonic nanoparticles for bio-medicine: Manipulation and imaging, *Nano Today* 8 (2013) 98–113.

Liu J.F., Chao J.B., Liu R., Tan Z.Q., Yin Y.G., Wu Y., Jiang G.B., Cloud point extraction as an advantageous preconcentration approach for analysis of trace silver nanoparticles in environmental waters, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6496–6502.

Liu J.F., Liu R., Yin Y.G., Jiang G.B., Triton X-114 based cloud point extraction: a thermoreversible approach for separation/concentration and dispersion of nanomaterials in the aqueous phase, *Chem. Commun.* 28 (2009) 1514–1516.

Liu J.-F., Yu S.-J., Yin Y.-G., Chao J.-B., Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles, *Trends Anal. Chem.* 33 (2012) 95–106.

Liu X., Atwater M., Wang J., Huo Q., Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands, *Colloid Surf. B* 58 (2007) 3–7.

Liu Y., He M., Chen B., Hu B., Ultra-trace determination of gold nanoparticles in environmental water by surfactant assisted dispersive liquid liquid microextraction coupled with electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Spectrochim. Acta, Part B* 122 (2016) 94–102.

López-García I., Vicente-Martínez Y., Hernández-Córdoba M., Speciation of silver nanoparticles and Ag(I) species using cloud point extraction followed by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 101 (2014) 93–97.

López-Lorente A.I., Simonet B.M., Valcárcel M., Rapid analysis of gold nanoparticles in liver and river water samples, *Analyst* 137 (2012) 3528–3534.

Lövestam G., Rauscher H., Roebben G., Klüttgen B.S., Gibson N., Putaud J.-P., Stamm H., Considerations on a Definition of Nanomaterial for Regulatory Purposes, *JRC Referencereports* (2010).

Lowry G.V., Gregory K.B., Apte S.C., Lead J.R., Transformations of nanomaterials in the environment, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6893–6899.

Ma Y., Elankumaran S., Marr L.C., Vejerano E.P., Pruden A., Toxicity of engineered nanomaterials and their transformation products following wastewater treatment on A549 human lung epithelial cells, *Toxicol. Rep.* 1 (2014) 871–876.

Mahapatra I., Sun T.Y., Clark J.R.A., Dobson P.J., Hungerbuehler K., Owen R., Nowack B., Lead J., Probabilistic modelling of prospective environmental concentrations of gold nanoparticles from medical applications as a basis for risk assessment, *J. Nanobiotechnol.* 13 (2015) 93.

Mahdi K.N.M., Peters R.J.B., Klumpp E., Bohme S., Ploeg M., Ritsema C., Geissen V., Silver nanoparticles in soil: aqueous extraction combined with single-particle ICP-MS for detection and characterization, *Environ. Nanotechnol. Monit. Manage.* 7 (2017) 24–33.

Mahmoudi M., Laurent S., Shokrgozar M.A., Hosseinkhani M., Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell “vision” versus physicochemical properties of nanoparticles, *ACS Nano* 5 (2011) 7263–7276.

Majedi M., Lee H. K., Kelly B.C., Chemometric analytical approach for the cloud point extraction and inductively coupled plasma mass spectrometric determination of zinc oxide nanoparticles in water samples, *Anal. Chem.* 84 (2012) 6546–6552.

Majedi S.M. and Lee H.K., Recent advances in the separation and quantification of metallic nanoparticles and ions in the environment, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 75 (2016) 183–196.

Majedi S.M., Kelly B.C., Lee H.K., Efficient hydrophobization and solvent microextraction for determination of trace nano-sized silver and titanium di- oxide in natural waters, *Anal. Chim. Acta* 789 (2013) 47–57.

Majedi S.M., Lee H.K., Kelly B.C., Chemometric analytical approach for the cloud point extraction and inductively coupled plasma mass spectrometric determination of zinc oxide nanoparticles in water samples, *Anal. Chem.* 84 (2012) 6546–6552.

Mandyla S.P., Tsogas G.Z., Vlessidis A.G., Giokas D.L., Determination of gold nanoparticles in environmental water samples by second-order optical scattering using dithiotreitol-functionalized CdS quantum dots after cloud point extraction, *J. Hazard. Mater.* 323 (2017) 67–74.

Marafatto F.F., Strader M.L., Gonzalez-Holguera J., Schwartzberg A., Gilbert B., Peña J., Rate and mechanism of the photoreduction of birnessite (MnO<sub>2</sub>) nanosheets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) 4600–4605.

Mariani V., Ponti J., Giudetti G., Broggi F., Marmorato P., Gioria S., Franchini F., Rauscher H., Rossi F., Online monitoring of cell metabolism to assess the toxicity of nanoparticles: the case of cobalt ferrite, *Nanotoxicology* 6 (2012) 272–287.

Maurer-Jones A.M., Gunsolus I.L., Murphy C.J., Haynes C.L., Toxicity of engineered nanoparticles in the environment, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3036–3049.

McHugh J.B., Concentration of gold in natural waters, *J. Geochem. Explor.* 30 (1988) 85–94.

Miglietta M.L., Rametta G., Manzo S., Salluzzo A., Rimauro J., Di Francia G., Methodological issues about techniques for the spiking of standard OECD soil with nanoparticles: evidence of different behaviours, *J. Nanopart. Res.* 17 (7) (2015) 312.

Milani N., Hettiarachchi G.M., Kirby J.K., Beak D.G., Stacey S.P., McLaughlin M.J., Fate of zinc oxide nanoparticles coated onto macronutrient fertilizers in an alkaline calcareous soil, *PLoS One* 10 (2015) e0126275.

Milani N., McLaughlin M.J., Stacey S.P., Kirby J.K., Hettiarachchi G.M., Beak D.G., Cornelis G., Dissolution kinetics of macronutrient fertilizers coated with manufactured zinc oxide nanoparticles, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 3991–3998.

Mishra G., Dasha B., Pandey S., Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials, *Appl. Clay Sci.* 153 (2018) 172–186.

Mitrano D.M., Barber A., Bednar A., Westerhoff P., Higgins C.P., Ranville J.F., Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1131–1142.

Miyama T. and Yonezawa Y., Aggregation of photolytic gold nanoparticles at the surface of chitosan films, *Langmuir* 20 (2004) 5918–5923.

Murath S., Somosi Z., Toth I.Y., Tombacz E., Sipos P., Palinko I., Delaminating and restacking MgAl-layered double hydroxide monitored and characterized by a range of instrumental methods, *J. Mol. Struct.* 1140 (2017) 77–82.

Myakonkaya O., Guibert C., Eastoe J., Grillo I., Recovery of nanoparticles made easy, *Langmuir* 26 (2010) 3794–3797.

Myakonkaya O., Hu Z., Nazar M.F., Eastoe J., Recycling functional colloids and nanoparticles, *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 11784–11790.

Nangia S. and Sureshkumar R., Effects of nanoparticle charge and shape anisotropy on translocation through cell membranes, *Langmuir* 28 (2012) 17666–17671.

Nanomaterial fact sheet. Oakland, CA, U.S.A., 2015, <https://archive.asyousow.org/wp-content/uploads/2015/03/nanomaterials-in-food-and-food-packaging-fact-sheet.pdf> (accessed Sept 21, 2019).

Nano-particles in baby formula: Tiny new ingredients are a big concern, 2016 [http://webiva-downton.s3.amazonaws.com/877/eb/2/8482/FOE\\_NanoBabyFormulaReport\\_13.pdf](http://webiva-downton.s3.amazonaws.com/877/eb/2/8482/FOE_NanoBabyFormulaReport_13.pdf) (accessed July 12, 2019).

Nanopartz Inc, <https://www.nanopartz.com/gold-nanoparticles-properties-centrifuge-speeds.asp>, accessed, 13 November 2019.

Nanotechnology prohibited from Australian certified organic beauty products, 2012 <http://www.fatcow.com.au/c/biological-farmers-of-australia-bfa/nanotechnology-prohibited-from-australian-certified-organic-beauty-productsn914841> (accessed Feb 12, 2020).

National Science and Technology, Science & engineering indicators (2000).

Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L., Behra R., Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8959–8964.

Nazar M.F., Myakonkaya O., Shah S.S., Eastoe J., Separating nanoparticles from microemulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 354 (2011) 624–629.

Nazar M.F., Shah S.S., Eastoe J., Khan A.M., Shah A., Separation and recycling of nanoparticles using cloud point extraction with non-ionic surfactant mixtures. *J. Colloid Interf. Sci.* 363 (2011) 490–496.

Nicolini C., Celli A., Gratton E., Winter R., Pressure tuning of the morphology of heterogeneous lipid vesicles: A two-photon-excitation fluorescence microscopy study, *Biophys. J.* 91 (2006) 2936–2942.

Nowack B. and Bucheli T.D., Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment, *Environ. Pollut.* 150 (2007) 5–22.

Oberdörster E., Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 1058–1062.

Oberdörster E., Zhu S., Blickley T.M., McClellan-Green P., Haasch M.L., Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: effects of fullerene (C60) on aquatic organisms, *Carbon* NY 44 (2006) 1112–1120.

Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J., Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 823–839.

Odzak N., Kistler D., Sigg L., Influence of daylight on the fate of silver and zinc oxide nanoparticles in natural aquatic environments, *Environ. Pollut.* 226 (2017) 1–11.

OECD, Safety of manufactured nanomaterials, Available from: <http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/>, 2019, accessed 21 August 2019.

Omar F.M., Aziz H.A., Stoll S., Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid, *Sci. Total Environ.* 468–469 (2014) 195–201.

Ortega M.T., Riviere J.E., Choi K., Monteiro-Riviere N.A., Biocorona formation on gold nanoparticles modulates human proximal tubule kidney cell uptake, cytotoxicity and gene expression, *Toxicol. In Vitro* 42 (2017) 150–160.

Palleiro L., Patinha C., Rodriguez-Blanco M.L., Taboada-Castro M.M., Taboada-Castro M.T., Metal fractionation in topsoils and bed sediments in the Mero River rural basin: bioavailability and relationship with soil and sediment properties, *Catena* 144 (2016) 34–44.

Pallem V.L., Stretz H.A., Wells M.J.M., Evaluating aggregation of gold nanoparticles and humic substances using fluorescence spectroscopy, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 7531–7535.

Pan Z.W., Dai Z.R., Wang Z.L., Nanobelts of Semiconducting Oxides, *Science* (2001) 291 1947-1949.

Panthani M.G. and Korgel B.A., Nanocrystals for Electronics, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* (2012) 3 287-311.

Parisis N.A., Giokas D.L., Vlessidis A.G., Evmiridis N.P., Concentration of organic compounds in water with solid phase dispersion based on advesicle modified silica prior to liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 17–24.

Pavlovic M., Huber R., Adok-Sipiczki M., Nardin C., Szilagyi I., Ion specific effects on the stability of layered double hydroxide colloids, *Soft Matter* 12 (2016) 4024–4033.

Pawliszyn J., *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Academic Press/Elsevier, United States (2012), p. 2995.

Peng Y.H., Tsai Y.C., Hsiung C.E., Lin Y.H., Shih Y.H., Influence of water chemistry on the environmental behaviors of commercial ZnO nanoparticles in various water and wastewater samples, *J. Hazard. Mater.* 322 (2017) 348–356.

Pettibone J.M., Gigault J., Hackley V.A., Discriminating the states of matter in metallic nanoparticle transformations: what are we missing? *ACS Nano* 7 (2013) 2491–2499.

Peyrot C., Wilkinson K.J., Desrosiers M., Sauvé S., Effects of silver nanoparticles on soil enzyme activities with and without added organic matter, *Environ. Toxicol. Chem.* 33 (2014) 115–125.

Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B., Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world, *J. Nanopart. Res.* 14 (2012) 1109-1120.

Pinto V.V., Ferreira M.J., Silva R., Santos H.A., Silva F., Pereira C.M., Long timeeffect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: effect of the synthesis and storage conditions, *Colloid Surf. A* 364 (2010) 19–25.

Popov A.P., Priezzhev A.V., Lademann J., Myllylä R., TiO<sub>2</sub> nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens, *J Phys D Appl Phys* 38 (2005) 2564–2570.

Pozdnyakov I.P., Plyusnin V.F., Grivin V.P., Vorobyev D.Y., Bazhin N.M., Vauthey E., Photolysis of sulfosalicylic acid in aqueous solutions over a wide pH range, *J. Photochem. Photobiol. A* 181 (2006) 37–43.

Praetorius A., Tufenkji N., Goss K.-U., Scheringer M., von der Kammerd F., Elimeleche M., The road to nowhere: equilibrium partition coefficients for nanoparticles, *Environ. Sci.: Nano* 1 (2014) 317–323.

Quik J.T.K., Stuart M.A.C., Wouterse M., Peijnenburg W., Hendriks A.J., Van de Meent D., Natural colloids are the dominant factor in the sedimentation of nanoparticles, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 1019–1022.

Rahme K., Minassian G., Sarkis M., Nakhl M., El Hage R., Souaid E., Holmes J.D., Ghanem E., Assessment of charged AuNPs: From synthesis to innate immune recognition, *J. Nanomater.* 9301912 (2018).

Ramakrishna S., Jose R., Archana P.S., Nair A.S., Balamurugan R., Venugopal J., Teo W.E., Science and engineering of electrospun nanofibers for advances in clean energy, water filtration, and regenerative medicine, *J. Mater. Sci.* 45 (2010) 6283–6312.

Regelink I.C., Weng L., Koopmans G.F., Riemsdijk W.H., Asymmetric flow field-flow fractionation as a new approach to analyse iron-(hydr)oxide nanoparticles in soil extracts, *Geoderma* 202–203 (2013) 134–141.

Reijnders L., Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles, *J. Clean. Prod.* 14 (2006) 124–133.

Ren S. and Wang Y., Energy conversion and storage through nanoparticles, in sustainable preparation of metal nanoparticles: Methods and applications, in: Rafael Luque, Rajender S. Varma (Eds.), *RSC Green Chemistry series*, RSC Publishing, 2012, 67–105.

Rispoli F., Angelov A., Badia D., Kumar A., Seal S., Shah V., Understanding the toxicity of aggregated zero valent copper nanoparticles against *Escherichia coli*, *J. Hazard Mater.* 180 (2010) 212–216.

Roco M. C., Harthorn B., Guston D., Shapira P., Innovative and Responsible Governance of Nanotechnology for Societal Development, *Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020* (2011) 619-629.

Rodgers K.J., Hursthouse A., Cuthbert S., The potential of sequential extraction in the characterisation and management of wastes from steel processing: a prospective review, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12 (9) (2015) 11724-11755.

Roseboro K., *Org. Non-GMO Rep.* 10 (2010) 1–24.

Rosenfeldt R.R., Seitz F., Schulz R., Bundschuh M., Heavy Metal Uptake and Toxicity in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles: A Factorial Approach Using *Daphnia magna*, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 6965–6972.

Saber O. and Tagaya H., Preparation and intercalation reactions of nano-structural materials, *Zn–Al–Ti LDH*, *Mater. Chem. Phys.* 108 (2008) 449–455.

Saha K., Rahimi M., Yazdani M., Kim S.T., Moyano D.F., Hou S., Das R., Mout R., Rezaee F., Mahmoudi M., Rotello V.M., Regulation of Macrophage Recognition through the Interplay of Nanoparticle Surface Functionality and Protein Corona, *ACS Nano* 10 (2016) 4421–4430.

Santiago-Martín A.D., Constantin B., Guesdon G., Kagambega N., Raymond S., Cloutier R.G., Bioavailability of engineered nanoparticles in soil systems, *J. Hazard., Toxic Radioact. Waste* 20 (2016) B4015001.

Schaumann G.E., Philippe A., Bundschuh M., Metreveli G., Klitzke S., Rakcheev D., Grün A., Kumahor S.K., Kühn M., Baumann T., Lang F., Manz W., Schulz R., Vogel H.J., Understanding the fate and biological effects of Ag- and TiO<sub>2</sub>-nanoparticles in the environment: The quest for advanced analytics and interdisciplinary concepts, *Sci. Total Environ.* 535 (2015) 3–19.

Schwertfeger D.M., Velicogna J.R., Jesmer A.H., Saatcioglu S., McShane H., Scroggins R.P., Princz J.I., Extracting metallic nanoparticles from soils for quantitative analysis: method development using engineered silver nanoparticles and SP-ICP-MS, *Anal. Chem.* 89 (4) (2017) 2505–2513.

Scientific committee on emerging and newly identified health risks SCENIHR, Risk Assessment of Products of Nanotechnologies, 2009, [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenihhr/docs/scenihhr\\_o\\_023.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_023.pdf) (accessed July 17, 2019).

Seidi S. and Sanati S.E., Nickel-iron layered double hydroxide nanostructures for micro solid phase extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, followed by quantitation by HPLC-UV, *Microchim. Acta* 186 (2019) 297.

Sheela Modani M.K. and Nijhawan M., Quantum Dots: A Novelty Of. Medical Field With Multiple Applications, *J. Curr. Pharm. Res.* (2013) 5 55-59.

Sheng Z.Y. and Liu Y., Potential impacts of silver nanoparticles on bacteria in the aquatic environment, *J. Environ. Manage.* 191 (2017) 290–296.

Silva B.F., Perez S., Gardinalli P., Singhal R.K., Mozeto A.A., Barcelo D., Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 528–540.

Singh S., Barick K.C., Bahadur D., Surface engineered magnetic nanoparticles for removal of toxic metal ions and bacterial pathogens, *J. Hazard. Mater.* 192 (2011) 1539–1547.

Singh S.P., Tack F.M., Verloo M.G., Heavy metal fractionation and extractability in dredged sediment derived surface soils, *Water Air Soil Pollut.* 102 (1998) 313–328.

Sinha A., Mollah A.K., Hardt S., Ganguly R., Particle dynamics and separation at liquid–liquid interfaces, *Soft Matter* 9 (2013) 5438–5447.

Soenen S.J., Parak W.J., Rejman J., Manshian B., (Intra)Cellular stability of inorganic nanoparticles: Effects on cytotoxicity, particle functionality, and biomedical applications, *Chem. Rev.* 115 (2015) 2109–2135.

Soil Association bans nanomaterials from organic products. The Guardian: London, United Kingdom, 2008, <https://www.theguardian.com/environment/2008/jan/15/organics.nanotechnology> (accessed Feb 12, 2020).

Sozer N. and Kokini J.L., Nanotechnology and its applications in the food sector, Trends Biotechnol. 27 (2009) 82–89.

Starnes D.L., Unrine J.M., Starnes C.P., Collin B.E., Oostveen E.K., Ma R., Lowry G.V., Bertsch P.M., Tsyusko O.V., Impact of sulfidation on the bioavailability and toxicity of silver nanoparticles to *Caenorhabditis elegans*, Environ. Pollut. 196 (2015) 239–246.

Stegemeier J.P., Schwab F., Colman B.P., Webb S.M., Newville M., Lanzirotti A., Winkler C., Wiesner M.R., Lowry G.V., Speciation Matters: Bioavailability of Silver and Silver Sulfide Nanoparticles to Alfalfa (*Medicago sativa*), Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 8451–8460.

Su S., Chen B., He M., Xiao Z., Hu B., A novel strategy for sequential analysis of gold nanoparticles and gold ions in water samples by combining magnetic solid phase extraction with inductively coupled plasma mass spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 29 (2014) 444–453.

Sun T., Mitrano D.M., Bornhoft N. A., Scheringer M., Hungerbuehler K., Nowack B., Envisioning nano release dynamics in a changing world: using dynamic probabilistic modeling to assess future environmental emissions of engineered nanomaterials, Environ. Sci. Technol. 51 (2017) 2854–2863.

Sun Y., Mayers B.T., Xia Y., Template-Engaged Replacement Reaction: A One-Step Approach to the Large-Scale Synthesis of Metal Nanostructures with Hollow Interiors, Nano Lett. (2002) 2 481-485.

Suryanarayana C. and Koch C.C., Nanocrystalline materials – Current research and future directions, Hyperfine. Interact. (2000) 130 5-44.

Swain P., Sasmal A., Nayak S.K., Barik S.K., Mishra S.S., Mohapatra K.D., Swain S.K., Saha J.N., Sen A.K., Jayasankar P., Evaluation of selected metal nanoparticles on

hatching and survival of larvae and fry of Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*). *Aquac. Res.* 47 (2014) 498-511.

Tang S. and Lee H.K., Application of dissolvable layered double hydroxides as sorbent in dispersive solid-phase extraction and extraction by co-precipitation for the determination of aromatic acid anions, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7426–7433.

Tarantola M., Pietuch A., Schneider D., Rother J., Sunnick E., Rosman C., Pierrat S., Sönnichsen C., Wegener J., Janshoff A., Toxicity of goldnanoparticles: synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells, *Nanotoxicology* 5 (2011) 254-268.

Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M., Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals, *Anal. Chem.* 51 (7) (1979) 844–851.

Thomas T., Thomas K., Sadrieh N., Savage N., Adair P., Bronaugh R., Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part VII: Evaluating Consumer Exposure to Nanoscale Materials, *Toxicol. Sci.* 91 (2006) 14–19.

Thoniyot P., Tan M.J., Karim A.A., Young D.J., Loh X.J., Nanoparticle–hydrogel composites: Concept, design, and applications of these promising, multi-functional materials, *Adv. Sci.* (2015) 2 1400010.

Tiede K., Boxall A.B.A., Wang X., Gore D., Tiede D., Baxter M., David H., Tear S.P., Lewis J., Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1149–1154.

Tiede K., Hasselov M., Breitbarth E., Chaudhry Q., Boxall A.B.A., Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles, *J. Chromatogr. A.* 1216 (3) (2009) 503–509.

Tiwari A.J. and Marr L.C., The role of atmospheric transformations in determining environmental impacts of carbonaceous nanoparticles, *J. Environ. Qual.* 39 (2010) 1883–1895.

Tourinho P.S., van Gestel C.A., Lofts S., Svendsen C., Soares A.M., Loureiro S., Metal-based nanoparticles in soil: fate, behavior, and effects on soil invertebrates, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 1679–1692.

Touriniemi J., Cornelis G., Hasselov M., Size discrimination and detection capabilities of single-particle icpms for environmental analysis of silver nanoparticles, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3965–3972.

Tsai S.J., Huang R.F., Ellenbecker M.J., Airborne nanoparticle exposures while using constant-flow, constant velocity, and air-curtain-isolated fume hoods, *Ann. Occup. Hyg.* 54 (2010) 78–87.

Tsogas G.Z., Giokas D.L., Vlessidis A.G., Evmiridis N.P., A single-reagent method for the speciation of chromium in natural waters by flame atomic absorption spectrometry based on vesicular liquid coacervate extraction, *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 957–965.

Tsogas G.Z., Giokas D.L., Vlessidis A.G., Ultratrace determination of silver, gold, and iron oxide nanoparticles by micelle mediated preconcentration/selective back-extraction coupled with flow injection chemiluminescence detection, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3484–3492.

United Nations Environment Programme: UNEP, Chapter 7: Emerging challenges-nanotechnology and the environment, in: *Proceedings of the United Nations Environment Programme Division of Early Warning and Assessment, Nairobi Kenya, 2007.*

Ure A.M., Quevauviller P., Muntau H., Griepink B., Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the commission of the European communities, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51 (1993)a 135–151.

Ure A.M., Thomas R., Littlejohn D., Ammonium acetate extracts and their analysis for the speciation of metal ions in soils and sediments, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51 (1993)b 65–84.

Van der Ploeg M.J.C., Handy R.D., Waalewijn-Kool P.L., van den Berg J.H.J., Herrera Rivera Z.E., Bovenschen J., Molleman B., Baveco J.M., Tromp P., Peters R.J.B., Koopmans G.F., Rietjens I.M.C.M., van den Brink N.W., Effects of silver nanoparticles (NM-300K) on *Lumbricus rubellus* earthworms and particle characterization in relevant test matrices including soil, *Environ. Toxicol. Chem.* 33 (2014) 743–752.

Vodyanitskii Y.N., Methods of sequential extraction of heavy metals from soils: New approaches and the mineralogical control (a review), *Eurasian Soil Sc.* 39 (2006) 1074-1083.

Vogelgesang J. and Hädrich J., Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners, *Accred. Qual. Assur.* 3 (1998) 242–255.

Waalewijn-Kool P.L., Ortiz M.D., Lofts S., van Gestel C.A.M., The effect of pH on the toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Folsomia candida* in amended field soil, *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (2013) 2349–2355.

Wagner S., Gondikas A., Neubauer E., Hofmann T., von der Kammer F., Spot the difference: engineered and natural nanoparticles in the environment -release, behavior and fate, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 12398–12419.

Wang C., Schuppli P.A., Ross G.J., A Comparison of Hydroxylamine and Ammonium Oxalate Solutions as Extractants for Al, Fe and Si from Spodosols and Spodosol-like Soils in Canada, *Geoderma* 40 (3-4) (1987) 345-355.

Wang Q. and O'Hare D., Recent advances in the synthesis and application of Layered Double Hydroxide (LDH) nanosheets, *Chem. Rev.* 112 (2012) 4124–4155.

Wang S., Qian K., Bi X., Huang W., Influence of speciation of aqueous  $\text{HAuCl}_4$  on the synthesis, structure, and property of Au colloids, *J. Phys. Chem. C* 113 (16) (2009) 6505–6510.

Wang X., Song J., Wang Z.L., J., Nanowire and nanobelt arrays of zinc oxide from synthesis to properties and to novel devices, *Mater. Chem.* (2007) 17 711-720.

Wang X., Zhou W., Wang C., Chen Z., In situ immobilization of layered double hydroxides onto cotton fiber for solid phase extraction of fluoroquinolone drugs, *Talanta* 186 (2018) 545–553.

Wang Z.Y., Zhang L., Zhao J., Xing B.S., Environmental processes and toxicity of metallic nanoparticles in aquatic systems as affected by natural organic matter, *Environ. Sci.: Nano* 3 (2016) 240–255.

Wei Q., *Functional Nanofibers and their Applications*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge (2012).

Wiench K., Wohlleben W., Hisgen V., Radke K., Salinas E., Zok S., Landsiedel R., Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO<sub>2</sub> and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*, *Chemosphere* 76 (2009) 1356–1365.

Wijnhoven S.W.P., Peijnenburg W.J.G.M., Herberts C.A., Hagens W.I., Oomen A.G., Heugens E.H.W., Roszek B., Bisschops J., Gosens I., Van De Meent D., Dekkers S., De Jong W.H., Van Zijverden M., Sips A.J.A.M., Geertsma R.E., Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicol.* 3 (2) (2009) 109–138.

Wilson O.M., Scott R.W.J., Garcia-Martinez J.C., Crooks R.M., Separation of dendrimer-encapsulated Au and Ag nanoparticles by selective extraction, *Chem. Mater.* 16 (2004) 4202–4204.

Xia T., Li N., Nel A.E., Potential health impact of nanoparticles, *Annu. Rev. Public Health* 30 (2009) 137–150.

Xia Y., Li W., Cobley C.M., Chen J., Xia X., Zhang Q., Yang M., Cho E.C., Brown P.K., Gold Nanocages: From Synthesis to Theranostic Applications, *Acc. Chem. Res.*, 2011, 44, 914-924.

Xiao Y., Peijnenburg W.J., Chen G., Vijver M.G., Toxicity of copper nanoparticles to *Daphnia magna* under different exposure conditions, *Sci. Total Environ.* 563-564 (2016) 81–88.

Xu X.-H.N., Huang S., Brownlow W., Salaita K., Jeffers R.B., Size and temperature dependence of surface plasmon absorption of gold nanoparticles induced by Tris (2,2'-bipyridine)ruthenium(II), *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 15543–15551.

Yamada M., Takaya M., Ogura I., Performance evaluation of newly developed portable aerosol sizers used for nanomaterial aerosol measurements, *Ind. Health* 53 (2015) 511–516.

Yang Z.-H., Liu Y., Lu Y.-L., Wu T., Zhou Z.-Q., Liu D.-H., Dispersive suspended microextraction, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 268–274.

Ye E., Loh X.J., Polymeric hydrogels and nanoparticles: a merging and emerging field, *Aus. J. Chem.* (2013) 66 997-1007.

Yin Y., Yang X., Zhou X., Wang W., Yu S., Liu J., Jiang G., Water chemistry controlled aggregation and phototransformation of silver nanoparticles in environmental waters, *J. Environ. Sci.* 34 (2015) 116–125.

Yogev D. and Efrima S., Chemical aspects of silver metal liquid-like films, *J. Colloid Interf. Sci.* 147 (1991) 88–97. ( $\alpha$ )

Yogev D. and Efrima S., Silver metal liquidlike films (MELLFs). The effect of surfactants, *Langmuir* 7 (1991) 267–271. ( $\beta$ )

Zakaria H.M., Shah A., Konieczny M., Hoffmann J.A., Nijdam A.J., Reeves M. E., Small molecule- and amino acid-induced aggregation of gold nanoparticles, *Langmuir* 29 (2013) 7661– 7673.

Zanker H. and Schierz A., Engineered nanoparticles and their identification among natural nanoparticles, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 5 (2012) 107–132.

Zhai L., Herzog B., Drechsler M., Hoffmann H., Novel nanotubes from a cationic surfactant and an anionic stiff aromatic counter-ion, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 17697–17701.

Zhang C., Yan Y., Zhao Y.S., Yao J., Synthesis and applications of organic nanorods, nanowires and nanotubes, *Annu. Rep. Prog. Chem.* (2013) 109 211-239.

Zhang C.Q., Hu Z.Q., Deng B.L., Silver nanoparticles in aquatic environments: Physiochemical behavior and antimicrobial mechanisms, *Water Res.* 88 (2016) 403–427.

Zhang H., Huang Q., Xu A., Wu L.J., Spectroscopic probe to contribution of physicochemical transformations in the toxicity of aged ZnO NPs to *Chlorella vulgaris*: new insight into the variation of toxicity of ZnO NPs under aging process, *Nanotoxicology* 10 (2016) 1177–1187.

Zhang J., Guo W., Li Q., Wang Z., Liu S., The effects and the potential mechanism of environmental transformation of metal nanoparticles on their toxicity in organisms, *Environ. Sci.: Nano* 5 (2018) 2482.

Zhang L., Chen B., He M., Liu X., Hu B., Hydrophilic polymer monolithic capillary microextraction online coupled to icpms for the determination of carboxyl group-containing gold nanoparticles in environmental waters, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1789–1796.

Zhang Y., Chen Y., Westerhoff P., Crittenden J., Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles, *Water Res.* 43 (2009) 4249–4257.

Zhang Z., Yang X.Y., Shen M.H., Yin Y.G., Liu J.F., Sunlight-driven reduction of silver ion to silver nanoparticles by organic matter mitigates the acute toxicity of silver to *Daphnia magna*, *J. Environ. Sci.* 35 (2015) 62–68.

Zhao J., Ren W., Dai Y., Liu L., Wang Z., Yu X., Zhang J., Wang X., Xing B., Uptake, distribution, and transformation of CuO NPs in a floating plant *Eichhornia crassipes* and related stomatal responses, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 7686–7695.

Zhao L.J., Hernandez-Viezcas J.A., Peralta-Videa J.R., Bandyopadhyay S., Peng B., Munoz B., Keller A.A., Gardea-Torresdey J.L., ZnO nanoparticle fate in soil and zinc bioaccumulation in corn plants (*Zea mays*) influenced by alginate, *Environ. Sci.: Processes Impacts* 15 (2013) 260–266.

Zhao X., Liu S., Wang P., Tang Z., Niu H., Cai Y., Wu F., Wang H., Meng W., Giesy J.P., Surfactant-modified flowerlike layered double hydroxide-coated magnetic

nanoparticles for preconcentration of phthalate esters from environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1414 (2015) 22–30.

Zhu T., Cloutier S.G., Ivanov I., Knappenberger Jr. K.L., Robel I., Zhang F., Nanocrystals for Electronic and Optoelectronic Applications, *J Nanomater.* (2012) 2012 1-2.

Zhu X., Chang Y., Chen Y., Toxicity and bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*, *Chemosphere* 78 (2010) 209–215.

Zimmerman A.J., Weindorf D.C., Heavy metal and trace metal analysis in soil by sequential extraction: a review of procedures. *Int. J. Anal. Chem.* 387803 (2010).

Zou X., Li P., Lou J., Fu X., Zhang H., Stability of single dispersed silver nanoparticles in natural and synthetic freshwaters: Effects of dissolved oxygen, *Environ. Pollut.* 230 (2017) 674–682.

Zou X.Y., Shi J.P., Zhang H.W., Coexistence of silver and titanium dioxide nanoparticles: Enhancing or reducing environmental risks?, *Aquat. Toxicol.* 154 (2014) 168–175.