

DISSERTATION

**„Vorkommen und Verhalten von Fullerenen in der
Österreichischen Umwelt- Analytik, Bewertung und
toxikologische Interpretation“**

eingereicht von

Mag.rer.nat. Susanna Zakaria

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Medizinischen Wissenschaft

Dr. scient. med.

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt im

Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF)

Umweltbundesamt Ges.m.b.H. Wien

Graz und Wien, Österreich

unter der Anleitung von

Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. Dipl.Biochem. Eleonore Fröhlich

Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Günter Fauler

Ao.Univ.-Prof. Dr. phil. Anna Gries

Graz, Mai 2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und abgefasst, und jene Personen und Institutionen, die am Zustandekommen der Forschungsdaten beteiligt waren, namentlich genannt habe. Andere als die angegebenen Quellen habe ich nicht verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit an der Dissertation und daraus entstandener Publikationen wurde gemäß den Regeln der „Good Scientific Practice“ durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Journal Environmental Science and Pollution Research unter dem Titel "First determination of fullerenes in the Austrian market and environment: Quantitative analysis and assessment" Susanna Zakaria, Eleonore Fröhlich, Günter Fauler, Anna Gries, Sigrid Scharf, Stefan Weiß, DOI: 10.1007/s11356-017-0213-x, September 2017 (in press) zur Publikation angenommen. Die Verwendung von Textpassagen, Abbildungen und Tabellen in dieser Dissertation sind von Seiten des Springer- Verlages genehmigt.

Graz, September 2017

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. Dipl.Biochem. Eleonore Fröhlich (Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung- ZMF, Universität Graz), Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Günter Fauler (Klinisches Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik- KIMCL, Universität Graz) und Ao.Univ.-Prof. Dr. phil. Anna Gries (Institut für Physiologie, Universität Graz) bedanken, da sie mich während der vergangenen Jahre meiner Dissertation umfangreich betreut und unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. Sigrid Scharf (Organische Analysen, Umweltbundesamt Wien Ges.m.b.H.) die mir einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht hat und stets als Ansprechpartnerin zur Verfügung stand. Sie hat durch die ausgezeichnete Betreuung und fachliche Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. Stefan Weiß und Dr. Sandra Kulcsar (Organische Analysen, Umweltbundesamt Wien Ges.m.b.H.) für ihre freundliche Unterstützung, Geduld und ständige Hilfsbereitschaft bei der praktischen Arbeit der LC-MS Analysen.

Schließlich möchte ich meine tiefe Dankbarkeit an meine ganze Familie und meine Freunde, sowie der Koptisch Orthodoxen Kirche für ihre kontinuierliche Unterstützung und Herzlichkeit aussprechen.

Kurzfassung

Hintergrund

Fullerene gehören zur Klasse der kohlenstoffhaltigen Nanomaterialien. Ihnen wird aufgrund ihrer Stabilität und breiten Palette an Modifikationsmöglichkeiten ein großer Einsatz in der Biomedizin und Materialwissenschaft zugeschrieben. Seit Mitte 2013 gibt es in Europa eine Melde- und Kennzeichnungspflicht für Nanopartikel in Kosmetika (EU-Kosmetikverordnung (VO-EG Nr. 1223/2009)). Auch wurden bereits in einigen Studien beachtliche Fullerenkonzentrationen in Klärschlamm-, Boden- und Abwasserproben gemessen (*Farre et al.* (2010), *Nunez et al.* (2012), *Emke et al.* (2015) etc.). Aufgrund dieser Tatsachen sind ein besseres Verständnis und eine Prüfung über den Einsatz von Fullerenen auch in der Österreichischen Umwelt immer notwendiger, besonders da aus manchen Studien (*Tsuchiya et al.* 1996, *Snyder et al.* 2015, *Oberdörster et al.* 2006, etc.) hervorgeht, dass Fullerene toxische Wirkungen haben können.

Ziele

Im Vordergrund dieser Studie steht die Etablierung und Validierung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Fullerenen C_{60} , C_{70} und NMFP bei niedrigen ng/L und ng/g Konzentrationen in ausgewählten Abwasser-, Klärschlamm- und Kosmetikprodukten Österreichs.

Mit der Entwicklung dieser Methode soll zum ersten Mal in Österreich aufgeklärt werden, welche Produkte für den Menschen und die Umwelt potentielle Problemquellen darstellen und ob ein toxikologisches Risiko für den Menschen besteht. Zu Zweck der Bewertung einer toxikologischen Gefahr für Mensch und Umwelt wird abschließend auch der Stand der toxikologischen Datenlage von Fullerenen diskutiert.

Methoden

Diese Studie basiert auf der Verwendung einer Flüssigchromatographie-Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) bei Abwasserproben bzw. Fest-Flüssig-Extraktion (SLE) bei Klärschlamm und Kosmetika, sowie der zusätzlichen Reinigung von fettreichen Kosmetikprodukten mittels Carrez-Klärung zur Identifizierung und Quantifizierung von Fullerenen.

Bei der Methodenentwicklung wurden LC-MS/MS-Analysen durchgeführt. Zur Erstellung der Messmethode wurden zunächst die substanzspezifischen MS-Parameter mittels Infusion, im Anschluss die chromatographischen Bedingungen sowie die quellenabhängigen MS-Parameter mittels Fließinjektion optimiert und zuletzt die Basisvalidierung durchgeführt. Die Prozesskontrolle und zuverlässige Reproduzierbarkeit der Methode wird durch die Zugabe eines Surrogates gewährleistet.

Resultate

Die Analyse von C₆₀, C₇₀ und N-Methylfulleropyrrolidin (NMFP) Fullerenen in den Abwasser- und Klärschlammproben wurde mit den optimierten, chromatographischen Bedingungen der etablierten Methode durchgeführt. Die Resultate zeigten, dass C₆₀, C₇₀ und NMFP Fullerene in den untersuchten Abwasser- und Klärschlammproben nicht oberhalb der Nachweisgrenze detektiert wurden. In den kosmetischen Produkten wurden Fullerene zum Teil in hohen ng/ml und ng/g Konzentrationen gemessen. Bei den gemessenen Werten von 10-340ng/g kann man von keiner zytotoxischen Wirkung ausgehen, da vergleichsweise in verschiedenen anderen Studien (*Tsuchiya et al.* 1996, *Snyder et al.* 2015, *Oberdörster et al.* 2006, etc.) die zytotoxischen Effekte erst bei höheren Konzentrationen gefunden wurden.

Schlussfolgerung

Die Untersuchungsergebnisse lassen den Schluss zu, dass die österreichische Population zwar in Kontakt mit fullerenhaltigen Produkten kommt, jedoch bis jetzt keine Gefahr für die Umwelt und die Gesundheit des Menschen besteht, da alle gemessenen Werte als zu niedrig einzustufen sind, als dass man von einem Risiko ausgehen könnte. Dies könnte sich aber mit steigendem Trend und Verbrauch fullerenhaltiger Produkte in den nächsten Jahren noch ändern.

Finanzierung

BMLFUW (Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft) und Umweltbundesamt Wien

Schlagwörter Fulleren C₆₀, C₇₀ und NMFP, Abwasser, Klärschlamm, kosmetische Produkte, Österreichische Umwelt, LC-MS/MS, LLE, Carrez- Klärung

Abstract

Background

Fullerenes are carbon nanomaterials and attributed to an increased production and use in biomedical and material science, because of their stability and wide range of modification options. Since mid-2013 in Europe there is also a reporting and mandatory labeling obligation of nanoparticles in cosmetics (EU-cosmetic decree (VO- EG Nr. 1223/2009). Already substantial measuring values of fullerene concentrations became certain in some studies of sewage sludge, waste water and soil samples (Farre et al. (2010), Nunez et al. (2012), Emke et al. (2015) etc.).

Due to these facts, a better understanding and an examination of the use of fullerenes are also becoming more and more necessary in the Austrian environment, especially since some studies (Tsuchiya et al. 1996, Snyder et al. 2015, Oberdörster et al. 2006, etc.) have shown that fullerenes can have toxic effects.

Objectives

Therefore the purpose of the present study is to develop and validate an analytical method (LC-MS/MS) for the quantification of C₆₀, C₇₀ and N-Methylfulleropyrrolidin (NMFP) fullerenes at low ng/mL and ng/g levels of concentration in wastewater, sewage sludge and cosmetic products in Austria. With the development of this method, for the first time in Austria products with potential hazards for humans and the environment were determined and also the fact if there is a toxicological risk to humans was clarified.

Methods

This study is based on the use of liquid chromatography– tandem mass spectrometry (LC- MS/MS) and liquid-liquid extraction (LLE) for waste water samples or solid-liquid extraction (SLE) for sewage sludge and cosmetic samples, as well as the additional cleaning of high-fat cosmetic products using Carrez clarification for the identification and quantification of fullerenes. For the development of the measurement method, the compound-specific MS parameters were determined and also the chromatographic conditions, as well as the source-dependent MS parameters were optimized and the validation was performed.

The process control and reliable reproducibility of the method was ensured by the addition of a surrogate.

Results

The analysis of C₆₀, C₇₀ and N-Methylfulleropyrrolidin (NMFP) fullerenes in the samples of waste water and sewage sludge were carried out with the optimized chromatographic conditions of the established method. The results showed that the amounts of C₆₀, C₇₀ and NMFP fullerenes in the analyzed waste water- and sewage sludge samples were below the detection limit. In the branded cosmetic products fullerenes were found in high ng/ml and ng/g concentrations. In the case of the measured values of 10-340ng/g, no cytotoxic effect can be assumed, since comparatively the cytotoxic effect in several other studies Tsuchiya et al. (1996), Snyder et al. (2015) Oberdörster et al. (2009) is determined by higher concentrations.

Conclusions

This study lead to the conclusion that the Austrian population is already coming into contact with fullerene-containing products, but so far there is no health risk. But this could be easily changed with increasing trend and consumption of these products in the coming years.

Funding

BMLFUW (Austrian Federal Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management) and Federal Environment Agency of Vienna

Key words C₆₀, C₇₀, NMFP fullerenes, waste water, sewage sludge, cosmetics, Austrian environment, LLE, LC-MS/MS, Carrez clarification

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	2
Danksagung	3
Kurzfassung	4
Abstract	6
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis	14
1 EINLEITUNG	16
1.1 Fullerene	18
1.1.1 Historischer Hintergrund	18
1.1.2 Struktur	18
Fulleren C ₆₀	19
Fulleren C ₇₀	20
Fulleren N-Methylfulleropyrrolidin (NMFP)	21
1.1.3 Eigenschaften und Modifikationen	22
1.1.4 Herstellung	25
1.1.5 Vorkommen in der Umwelt	26
1.1.6 Anwendungsgebiete und Gesetzgebung	27
1.2 LC-MS Analytik	28
1.2.1 Flüssigchromatographie (LC)	28
1.2.2 Tandem- Massenspektrometrie (MS/MS)	30
1.2.3 Elektrospray-Ionisation (ESI)	31
1.2.4 Basisvalidierung	32
1.3 Prozess der Abwasserreinigung in einer Kläranlage	36
1.4 Toxikologie	38
1.4.1 Ökotoxizität	38
1.4.2 Humantoxizität	41
2 MATERIAL UND METHODEN	46
2.1 Material	46
2.1.1 Geräte	46
2.1.2 Chemikalien	47
2.2 Methode	49
2.3 Probenahme aus Abwasser und Klärschlamm	60
2.4 Auswahl von kosmetischen Produkten	63

3	ERGEBNISSE	65
3.1	Massenspektrometrie.....	65
3.2	Chromatographie	67
3.3	Wiederfindungsraten der Messungen von C ₆₀ , C ₇₀ und NMFP in Wassermatrix	69
3.4	Stabilitätstests anhand von C ₆₀ -Dotierung in Leitungswasser.....	70
3.5	Ergebnisse der 24 Abwasser- und Klärschlammproben	71
3.6	Ergebnisse der Batch-und Adsorptionstests.....	74
3.7	Ergebnisse von Fullerenen in kosmetischen Produkten	78
4	DISKUSSION	82
4.1	Relevanz der gefundenen Konzentrationen	88
5	LITERATURVERZEICHNIS	91

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** überarbeitete Darstellung eines C_{60} Fulleren (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 45. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag).....19
- Abbildung 2:** (5,6)- und (6,6)-Bindungen in einem Fulleren C_{60} Molekül (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 38. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag).....20
- Abbildung 3:** überarbeitete Darstellung eines [5,6] Fulleren C_{70} (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 56. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)..... 20
- Abbildung 4:** überarbeitete Darstellung eines Fulleren N-Methylfulleropyrrolidine (NMFP) (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 103. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)..... 21
- Abbildung 5:** Darstellung der N- Methylfulleropyrrolidin (NMFP)- Synthese nach Prato (Fullerenes: Principiles and Applications von Fernando Langa, Jean- Francois Nierengarten, 2011. Verwendung genehmigt durch John Wiley & Sons..... 22
- Abbildung 6:** Mechanismus der nucleophilen Addition an ein Fulleren (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 95. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)..... 24
- Abbildung 7:** Bildung eines Radikals durch Additionsreaktion von C_{60} mit einem Alkylradikal (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 107. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)..... 25
- Abbildung 8:** überarbeitete Darstellung einer Fullerensynthese- Apparatur mittels Graphitverdampfung nach Krätschmer und Huffman (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 52. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)..... 26
- Abbildung 9:** Shungit als Kohlenstoffmineral (links) besitzt eine graphitartige Struktur (rechts) (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien-Eine Einführung. Seite: 49. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)..... 27
- Abbildung 10:** überarbeitete Darstellung eines Triple-Quadrupol Massenanalysators (Ohtsuki S. et al. 2011. Quantitative targeted absolute proteomics-based ADME research as a new path to drug discovery and development: methodology, advantages, strategy, and prospects. J Pharm Sci.3547-59. doi: 10.1002/jps.22612. Verwendung genehmigt durch Elsevier)..... 30
- Abbildung 11:** CRM- Modellvorstellung (Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation. Tatiana C. Rohner et al. 2004, Verwendung genehmigt durch Royal Society of Chemistry)..... 31

Abbildung 12: überarbeitete Darstellung des Arbeitsbereiches (Determination of trace elements. Zeev Alfassi et al. 2008, Verwendung genehmigt durch Wiley & Sons).....	33
Abbildung 13: überarbeitete Darstellung der Nachweisgrenze (Determination of trace elements. Zeev Alfassi et al. 2008, Verwendung genehmigt durch Wiley & Sons).....	34
Abbildung 14: überarbeitete Darstellung der Bestimmungsgrenze (Determination of trace elements. Zeev Alfassi et al. 2008, Verwendung genehmigt durch Wiley & Sons).....	34
Abbildung 15: Darstellung der Abwasserreinigung in einer kommunalen Kläranlage (Förstner U. 2008 Umweltschutztechnik, Seite:225. ISBN: 978-3-540-77883-7. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag Berlin Heidelberg).....	35
Abbildung 16: Wege von Fullerenen in den Körper (überarbeiteter Auszug aus Meili et al. 2007. Open access article).....	42
Abbildung 17: Beispiel für eine Kalibrierkurve von Fulleren C ₆₀ (MultiQuant 2.0 Software).....	55
Abbildung 18: Vergleich der Wiederfindungsraten von C ₆₀ anhand verschiedener Matrices (c=180 µg/L) unter Verwendung von LLE- und SPE Extraktion (Benn et al.2010. Evaluation of extraction methods for quantification of aqueous fullerenes in urine. Anal Bioanal Chem. PubMed Central PMCID: PMC3711233. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag).....	56
Abbildung 19: Infusion von C ₆₀ , C ₇₀ und NMFP Fullerenen (100ng/mL) dargestellt mittels AB Sciex Analyst Version 1.6.1. Molekülion C ₆₀ 720.0g/mol (links), Molekülion C ₇₀ 840.1g/mol (mitte) und NMFP 777.1g/mol (rechts) (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse).....	65
Abbildung 20: Spektrum Fulleren NMFP- Übergang 778.2-> 721.0 dargestellt mittels AB Sciex Analyst Version 1.6.1. (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse). 66	66
Abbildung 21: Gradientenzusammensetzung (MeOH und Toluol in %) mittels Excel 2015 dargestellt. (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse).....	68
Abbildung 22: Stabilitätstest- Fulleren C ₆₀ über 3 Wochen in ALU- und Glasflaschen mit 1ng/mL C ₆₀ -Dotierung mittels Excel 2015 ausgewertet. (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse).....	71
Abbildung 23: Chromatogramme a) Abwasserprobe #1, b) Abwasserprobe #5, c) Abwasserprobe #6 and d) ¹³ C ₆₀ interner Standard wurden mittels AB Sciex Analyst Version 1.6.1 ausgewertet. 1ng/mL Standards (links) und Abwasserproben (rechts) sind dargestellt. Die Elutionszeit ist auf der x-Achse bei bis zu 7 min angegeben. Die y-Achse zeigt die maximale Intensität jedes Fulleren in cps an. (n.n: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017).....	73

- Abbildung 24:** Graphische Darstellung der Ergebnisse des Batchtests mit 1mg/L C₆₀-Dotierung in Belebtschlamm (BB)- und Ablaufproben (AB) innerhalb von 0, 1, 4 und 7 Tagen mittels Excel 2015 ausgewertet. (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)..... 76
- Abbildung 25:** Graphische Darstellung der Ergebnisse des Adsorptionstests mit 1mg/L C₆₀-Dotierung, doppelte TS, halbe TS und viertel TS in Belebtschlamm (BB)- und Ablaufproben (AB) mittels Excel 2015 ausgewertet. (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse).....78
- Abbildung 26:** Probe 5 ohne Carrez-Klärung (links) und mit Carrez-Klärung (rechts) mittels AB Sciex Analyst Version 1.6.1. dargestellt (Zakaria et al. 2017).....79
- Abbildung 27:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der 11 kosmetischen Produkte mittels Excel 2015. C₆₀ Werte sind in blau (erste Zeile), C₇₀ Werte in rot (zweite Zeile) und NMFP Werte in grün (dritte Zeile) angezeigt. Alle Ergebnisse sind in ng/g angegeben. (Zakaria et al. 2017)..... 81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Löslichkeit von C ₆₀ und C ₇₀ bei 25°C (M.V. Korobov et al. 2001. Solubility of C ₆₀ Fullerenes, Verwendung genehmigt durch American Chemical Society).....	24
Tabelle 2: Allgemeine Validierungsparameter (Kromidas 2011, Verwendung genehmigt durch John Wiley & Sons).....	33
Tabelle 3: In vivo- und in vitro Untersuchungen zur Ökotoxizität (2004-2009).....	41
Tabelle 4: In vivo- und in vitro Untersuchungen zur Humantoxizität (1995-2015)....	45
Tabelle 5: Verwendete Geräte, Hersteller und Typ	47
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien, Hersteller und CAS- Nummern.....	48
Tabelle 7: Verwendete Standards, Hersteller und CAS- Nummern.....	49
Tabelle 8: Ausgetestete Laufmittelzusammensetzung (A: Toluol, B: MeOH).....	53
Tabelle 9: Ausgetestete FIA-Optimierungsparameter.....	54
Tabelle 10: Herstellung einer Kalibrierung anhand einer Standardreihe im Konzentrationsbereich [ng/mL] von 0,0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 und 2,5	55
Tabelle 11: Extraktionsvorgehensweise bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion	58
Tabelle 12: Carrez- Klärung bei hydrophoben Kosmetika.....	59
Tabelle 13: Auflistung der Abwasser- und Belebtschlammproben aus fünf österreichischen Abwasserreinigungsanlagen (ARA)	62
Tabelle 14: Belebtschlamm (BB)- und Ablaufproben mit/ohne C ₆₀ Dotierung des Batchtests	63
Tabelle 15: Belebtschlamm (BB)- und Ablaufproben mit/ohne C ₆₀ Dotierung des Adsorptionstests	63
Tabelle 16: Auflistung der kosmetischen Produkte und Inhaltsstoffe.....	65
Tabelle 17: Optimierte substanzabhängige MS-Parameter im MRM Modus. Retentionszeit (RT) in Minuten, Übergänge (Vorläufer und Produkt-Ionen (Da)), Declustering Potential (DP) in Volt, Entrance Potential (EP) in Volt, Collision Energy (CE) in Volt, Collision Cell Exit Potential (CXP) in Volt (Zakaria et al. 2017).....	67
Tabelle 18: Optimierte Quellenabhängige MS-Parameter (Zakaria et al. 2017).....	68

Tabelle 19: Optimierte Gradientenzusammensetzung A: Toluol, B: MeOH (Zakaria et al. 2017).....	69
Tabelle 20: Nachweis- Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN32645.....	69
Tabelle 21: MW und STABW der unverdünnten und (1:10) verdünnten Wiederfindungen (WF in %) im Leitungswasser und Oberflächengewässer (Zakaria et al. 2017).....	70
Tabelle 22: NG/BG Bestimmung von Fulleren C ₆₀ innerhalb von 3 Wochen (Zakaria et al.2017).....	71
Tabelle 23: MW der Konzentrationen in ALU- und Glasflaschen nach 3 Wochen mit 1ng/mL C ₆₀ -Dotierung (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse).....	72
Tabelle 24: Ergebnisse der Abwasserproben der fünf österreichischen Abwasserreinigungsanlagen (ARA) im Zeitraum von 17.09.2013 und 03.12.2013 (n.n: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017).....	73
Tabelle 25: Ergebnisse der Belebtschlammproben der fünf österreichischen Abwasserreinigungsanlagen (ARA) im Zeitraum von 17.09.2013 und 03.12.2013 (n.n: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017).....	75
Tabelle 26: Ergebnisse der Belebtschlamm (BB)- und Ablaufproben mit/ohne C ₆₀ -Dotierung des Batchtests (n.n: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse).....	76
Tabelle 27: Ergebnisse der Belebtschlamm- und Ablaufproben mit/ohne C ₆₀ Dotierung des Adsorptionstests (n.n: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse).....	78
Tabelle 28: Ergebnisse der 11 kosmetischen Produkte (n.n: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017).....	80

Abkürzungsverzeichnis

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BG	Bestimmungsgrenze
BW	Blindwert
CAD	Collisionally activated dissociation
CE	Collision Energy
CEP	Collision Cell Entrance
CID	Collision Induced Dissociation
CUR	Curtain Gas Flow
CXP	Collision Cell Exit Potential
DP	Declustering Potential
EG	Erfassungsgrenze
EP	Entrance Potential
ESI	Elektrospray-Ionisation
FIA	Fließinjektion
GS1	Ion Source Gas 1
GS2	Ion Source Gas 2
H ₂ O	Wasser
HA _c	Essigsäure
HPLC	High Performance Liquid CHromatography
Ihe	Interface Heater
IS	Ion Spray Voltage
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie
LLE	Liquid-Liquid Extraction
MeOH	Methanol
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MW	Mittelwert

NaCl	Natriumchlorid
NG	Nachweisgrenze
NMFP	N-Methylfulleropyrrolidin
Q	Quadrupol
QqQ	Triple-Quadrupol-Massenanalysator
SIM	Selected-Ion- Monitoring
SLE	Solid-Liquid Extraction
STDAW	Standardabweichung
TEM	Temperatur
Tol	Toluol
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
WF	Wiederfindung
XIC	extracted-ion chromatogram

1 EINLEITUNG

Die Entwicklung von Nanomaterialien, wie zum Beispiel die Fullerene, nahm über die letzten zehn Jahre einen stürmischen Verlauf. Jedoch fehlten lange Zeit Untersuchungen zu ihrem Verhalten in der Umwelt und zu ihrer Toxizität [109].

Aufgrund der großen Vielfalt an Fullerenen und dem unterschiedlichen Verbrauch in den verschiedenen Ländern ist keine allgemeingültige Aussage über das Auftreten in der Umwelt und über ihr toxisches Risiko zu treffen. Bisher sind folgende, bedeutsame Ergebnisse zum Nachweis dieser Nanopartikel in Abwasser und Klärschlamm sowie in der Atmosphäre zu nennen.

- In der Studie von Gottschalk et al. 2009 „*Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions*“ wurden geringe Fulleren-Konzentrationen von 0,017 und 0,04 ng/L in Oberflächengewässern und 0,012 und 0,0107 mg/kg in Klärschlamm für Europa und die Schweiz berechnet. Diese Werte liegen in etwa um das 2000-fache unter der höchsten von aquatischen Organismen noch tolerierten Konzentration. Boxall et al. (2007) hingegen vermuten Fullerenkonzentrationen von bis zu 0.3 µg/L in England und liegen damit eine Größenordnung höher als Gottschalk et al. (2009).
- Farre et al. berichtet 2010 in seiner Studie „*First determination of C₆₀ and C₇₀ fullerenes and N-methylfulleropyrrolidine C₆₀ on the suspended material of wastewater effluents by liquid chromatography hybrid quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry*“, dass in der Hälfte der 22 untersuchten Abwasser- und Klärschlammproben aus spanischen Kläranlagen, Fullerene zwischen 0,5ng/L- 67µg/L nachgewiesen wurden.
- In der Arbeit von Sanchis et al. 2011 „*Occurrence of aerosol-bound fullerenes in the Mediterranean Sea atmosphere*“ wurde das Vorkommen von C₆₀, C₇₀ und N-methylfulleropyrrolidin (NMFP) in der Atmosphäre im Mittelmeer (Barcelona, Istanbul und Alexandria) untersucht. In 28 von 43 Proben wurden Fullerene in einer Aerosolphasen-Konzentration von 0.06- 0.48 ng/m³ in der Atmosphäre wiedergefunden.

- Bruchet et al. 2013 zeigten in ihrer französischen Studie „*Monitoring and treatment of selected nanoparticles*“, dass nur im Ablauf von einer aus fünf untersuchten französischen Kläranlagen Fullerene nachgewiesen werden konnten.
- 2015 detektierten Emke et al. ebenfalls in einer spanischen Studie „*Determination of several fullerenes in sewage water by LC hr-MS using atmospheric pressure photo ionisation*“, Fullerenkonzentrationen von 20ng/L in Abwasserproben.
- Carboni et al. 2016 entdeckten in ihrer Studie aus den Niederlanden „*Analysis of fullerenes in soils samples collected in The Netherlands*“ in 91 Bodenproben aus 6 verschiedenen Standorten, dass C₆₀ Fullerene in 48% der Proben im Konzentrationsbereich von ng/kg gefunden wurden.

In Österreich sind derzeit noch keine Daten über Fullerene in Abwasser, Klärschlamm oder Produkten vorhanden. Deshalb soll in dieser Studie zum ersten Mal für Österreich aufgeklärt werden, ob Fullerene und wenn ja, in welchen Umweltmedien diese in Österreich vorkommen. Im ersten Teil meiner Studie habe ich in Zusammenarbeit mit dem NanoDESTINARA Projekt 2015, Abwasser- und Klärschlammproben aus fünf österreichischen Kläranlagen untersucht. Im zweiten Teil meiner Arbeit habe ich die Konzentrationen von kosmetischen Produkten aus Österreich, die laut Firmenangaben Fullerene enthalten, analysiert. Für alle Untersuchungen wurden als Fulleren-Standards C₆₀, C₇₀, N-Methylfulleropyrrolidin (NMFP) gewählt, da diese Substanzen sowohl nach Farre et al. 2010 und Sanchis et al. 2011 in der Umwelt nachgewiesen wurden.

Für die toxikologische Interpretation meiner Dissertation habe ich zunächst die bisherige Datenlage zusammengefasst und anhand dieser das toxikologische Risiko der untersuchten Produkte und nachgewiesenen Konzentrationen im Diskussionsteil beurteilt.

Zur Toxizität von Fullerenen liegen nur wenige Untersuchungen vor, die leider kein einheitliches Ergebnis über eine tatsächliche toxikologische Wirkung von Fullerenen zulassen. Beispielsweise befürworteten Studien nach Oberdörster et al. 2004 und 2006, EPA 2007, Royal Commission 2008, etc. eine toxische Wirkung von Fullerenen, andere wiederum sehen kein Risiko für den Organismus [111, 153, 17]. Wiesner et al. 2006, berichteten sogar über einen gewollten therapeutischen Effekt, nämlich, dass einige Arten von Fullerenen für Krebszellen toxisch sein könnten.

1.1 Fullerene

1.1.1 Historischer Hintergrund

Eine erste theoretisch fundierte Arbeit zu C_{60} Fullerenen wurde 1970 von *E. Osawa* publiziert, der sich bei der Betrachtung superaromatischer π -Systeme durch den Fußball seines Sohnes inspirieren ließ und eine analoge Struktur mit Ikosaeder-Symmetrie für das C_{60} -Molekül postulierte, deren Stabilität er mit Hilfe von *Hückel*-Rechnungen vorhersagte [59]. Seine Arbeiten fanden erst nach der experimentellen Entdeckung der Fullerene die verdiente Anerkennung.

Erstmals gaben 1985 *Curl, Kroto und Smalley* die Herstellung von C_{60} und C_{70} in sehr geringen Mengen bekannt und wurden dafür 1996 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet [20] [27]. Später entwickelten *Krättschmer* und *Huffman* im Jahr 1990 ein einfaches und effizientes Verfahren zur Herstellung von Fullerenen in größeren Mengen [97]. Ihren Namen erhielten diese Kohlenstoffmoleküle nach dem Architekten *R. Buckminster Fuller* (1895-1983), da Fullerene den von ihm konstruierten geodätischen Kuppeln ähneln [20].

1.1.2 Struktur

Fullerene sind Polyeder und bestehen aus mehr als n dreifach koordinierten Kohlenstoffatomen [128]. Ebenso wie Graphit oder Diamant sind Fullerene eine Modifikation des Kohlenstoffs mit käfigförmiger Struktur und gehören zur Klasse der kohlenstoffhaltigen Nanomaterialien [128]. Im Vergleich zu Graphit ($2,1-2,3 \text{ g/cm}^3$) oder Diamant ($3,51 \text{ g/cm}^3$) haben Fullerene eine sehr geringe Dichte ($1,68 \text{ g/cm}^3$) [44]. Fullerene haben einen Durchmesser von $0,7 \text{ nm}$ und sind eigentlich zu klein, um zur Klasse der Nanomaterialien zu gehören, jedoch wurde für diese Moleküle eine Ausnahme gemacht. Das derzeit best erforschte Fulleren ist das sogenannte Buckminsterfulleren C_{60} (Bucky Ball), das aus 12 Fünfringen und 20 Sechsringen besteht [44].

Der Grad der Oberflächenkrümmung bzw. Spannungsenergie in der Käfigstruktur der Fullerene wird durch die Fünfringe im hexagonalen Gitternetz bestimmt [20]. In der Fullerenstruktur sind Doppelbindungen bevorzugt in den Sechsringen lokalisiert, da sie dort energetisch günstiger sind als in den Fünfringen. Die stabilsten Fullerene weisen gleichmäßig verteilte Fünfringe auf, die voneinander isoliert (isolated pentagon rule - IPR) sind [59]. Die Summenformeln der bekanntesten und stabilsten Vertreter der Fullerene sind C_{60} , C_{70} , C_{76} , C_{80} , C_{82} , C_{84} , C_{86} , C_{90} und C_{94} . Für meine Studie habe ich C_{60} , C_{70} und N-Methylfulleropyrrolidin (NMFP) Fullerene in Abwasser- und Klärschlammproben sowie kosmetischen Produkten untersucht. Diese drei Fullerene werde ich im kommenden Abschnitt genauer beschreiben.

➤ Fulleren C_{60}

Molekulargewicht: 720.64 g/mol

CAS Nummer: 99685-96-8

Schmelzpunkt : >360 °C

Dichte: 1,65 g/cm³

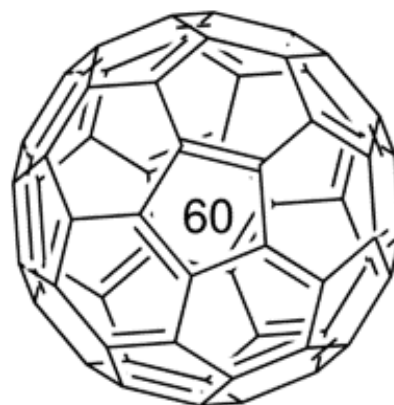


Abbildung 1: überarbeitete Darstellung eines C_{60} Fulleren (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 45. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)

Das C_{60} Molekül ist im Vergleich zu den klassischen Kohlenstoffmodifikationen ein mehr oder weniger punktförmiges Molekül, das keine sich dreidimensional im Raum wiederholende Struktur besitzt [59]. Die sechzig äquivalenten Kohlenstoffatome im C_{60} besetzen die Ecken eines ikosaedersymmetrischen Polyeders mit 20 Sechsringen und 12 Fünfringen. Jeder einzelne Fünfring wird von 5 Sechsringen und jeder Sechsring von 3 Fünfringen und 3 Sechsringen umgeben [59].

Bindungen, die zwischen zwei Sechsringen liegen, werden (6,6)-Bindung genannt, diejenigen zwischen einem Fünf- und einem Sechsring (5,6)-Bindung, wie in Abbildung 2 ersichtlich.

Die (6,6)-Bindungen zwischen zwei benachbarten Sechsringen sind kürzer als die (5,6)-Bindungen zwischen einem Fünf- und einem Sechsring. Die Doppelbindungen befinden sich in den Sechsringen und haben Bindungslängen von 139 pm und 145 pm, aus denen sich in den Fünfringen [9]-Radialencharakter und in den Sechsringen jeweils einen 1,3,5-Zyklohexatriencharakter ableiten lassen [59]. Fullerene sind besonders aufgrund ihrer Stabilität, die auf der dreidimensionalen Aromatizität beruht, beliebt. C_n -Moleküle sind immer dann besonders aromatisch, wenn die bindenden π -Orbitale vollständig besetzt und diese Orbitale energiearm sind, und ein deutlicher Energieunterschied zum ersten unbesetzten Orbital besteht [59]. Fullerene sind als einzige allotrope Modifikationen des Kohlenstoffs in organischen Lösungsmitteln löslich. Beispielsweise bildet das C_{60} Fulleren beim Lösen in organischen Lösungsmitteln wie Toluol eine markante weinrote Färbung [9].

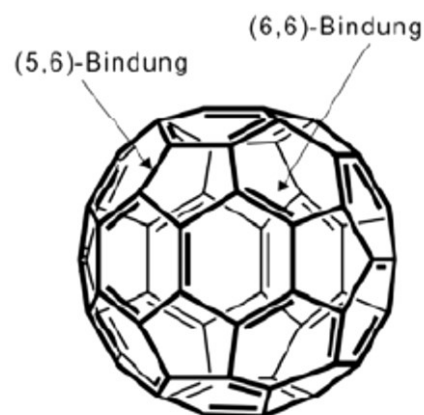


Abbildung 2: (5,6)- und (6,6)-Bindungen in einem Fulleren C_{60} Molekül (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 38. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)

➤ [5,6] Fulleren C_{70}

Formel: C_{70}

Molekulargewicht: 840.75 g/mol

CAS Number: 115383-22-7

Schmelzpunkt: $>280^{\circ}\text{C}$

Dichte: $1,68 \text{ g/cm}^3$



Abbildung 3: überarbeitete Darstellung eines [5,6] Fulleren C_{70} (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 56. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)

Das nächstgrößere Fulleren C_{70} hat die Struktur eines Rugbyballs und besteht aus 70 Kohlenstoffatomen, siehe Abbildung 3 [59]. Es besteht aus 25 Sechsecken und 12 Fünfecken, mit jeweils einem Kohlenstoffatom an den Ecken jedes Polygons und einer Bindung an jeder Polygonkante. Seine Struktur ähnelt dem C_{60} -Molekül bis auf die 5 Hexagone im Äquator, der den Bereich geringster Spannung darstellt [118].

Im C_{70} Fulleren ist jeder Fünfring von 5 Sechsringen, jeder Sechsring nur unsymmetrisch von 2 Fünfringen und 4 Sechsringen umgeben [97].

Auch variieren die Bindungslängen stärker als im hochsymmetrischen C_{60} . C_{70} besteht aus acht Bindungslängen zwischen 0.137 und 0.146 nm [59]. Im Molekül existieren fünf unterscheidbare Kohlenstoff-Atome und acht verschiedene C-C-Bindungen. Die Struktur weist Bereiche mit unterschiedlicher Krümmung auf, wobei der am stärksten gekrümmte Bereich an den Polen strukturell dem C_{60} -Molekül sehr ähnlich ist. Das C_{70} Fulleren bildet beim Lösen in organischen Lösungsmitteln wie Toluol eine rot-braune Färbung [9].

➤ Fulleren N-Methylfulleropyrrolidin (NMFP)

Formel: $C_{63}H_7N$

Molekulargewicht: 777.74 g/mol

CAS Nummer: 151872-44-5

Schmelzpunkt: $\sim 203^\circ\text{C}$

Dichte: 1,03 g/cm³

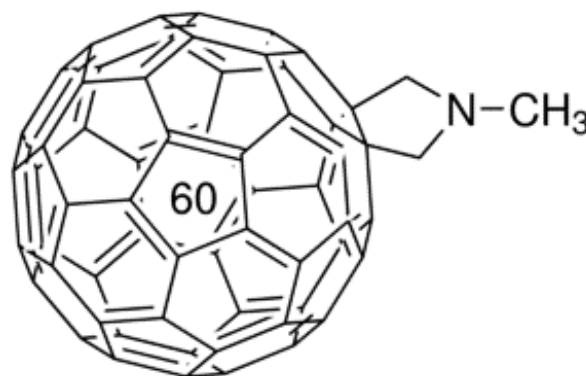


Abbildung 4: überarbeitete Darstellung eines Fulleren N-Methylfulleropyrrolidine (NMFP) (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 103. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)

Das N-Methylfulleropyrrolidin (NMFP) besteht aus einem C_{60} Molekül, an das eine $N-CH_3$ Kette gebunden ist (Abbildung 4). Wie in Abbildung 5 dargestellt, erfolgt die Herstellung über eine [3+2] Zykladdition nach Prato und Maggini, wobei Azomethinylid in C_{60} umgesetzt wird [61]. Das benötigte Ylid wird über die Kondensation eines α -Aminosäure-Derivates (z.B.: N-Methylglycin) durch ein Aldehyd bzw. Keton erzeugt [61].

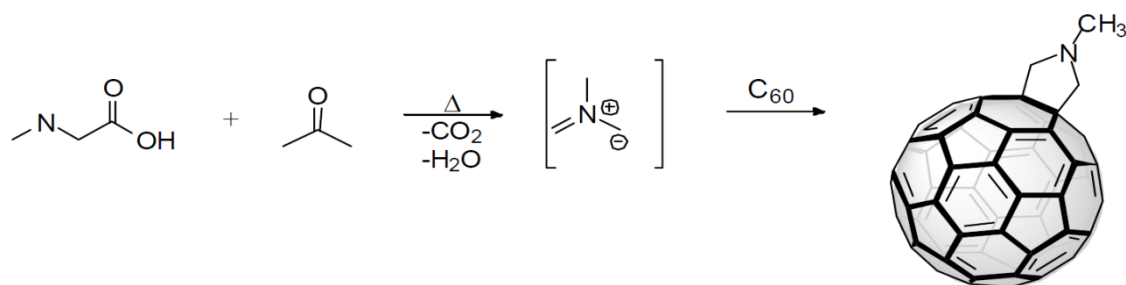


Abbildung 5: Darstellung der N- Methylfulleropyrrolidin (NMFP)- Synthese nach Prato
 (Fullerenes: Principiles and Applications von Fernando Langa, Jean- Francois Nierengarten, 2011.
 Verwendung genehmigt durch John Wiley & Sons)

Die große Anzahl an Aldehyden macht die Synthese mit verschiedensten [3+2] Donor-Akzeptoren möglich. Das dabei substituierte Kohlenstoffatom des Pyrrolidin-Ringes ist chiral angeordnet und das korrespondierende Stereoisomer wird gebildet [61]. Das N-Methylfulleropyrrolidin bildet beim Lösen in organischen Lösungsmitteln wie Toluol eine gelbliche Färbung [9].

1.1.3 Eigenschaften und Modifikationen

Fullerene sind braunschwarze Pulver von metallischem Glanz und sind ebenso wie Diamant oder Graphit eine Kohlenstoffmodifikation. Die Kohlenstoffatome im Fulleren-Molekül sind sp^2 bzw. sp^3 hybridisiert [44]. Die freien Valenzelektronen bilden ein auf der Käfigstruktur verteiltes π -Elektronensystem, das je nach Ladung und Anzahl der Kohlenstoffatome verschieden lokalisiert ist. Die Lokalisation ist auch für die chemischen Eigenschaften verantwortlich [59]. Fullerene lösen sich unter charakteristischer Färbung in aromatischen Lösemitteln wie Benzol, Toluol und chlorierten Aromaten [59]. Als Lösungsmittel ist auch Kohlenstoffdisulfid geeignet, welches aber aufgrund seiner akuten Toxizität nur selten eingesetzt wird. Durch ihre hohe Elektronegativität können Fullerene als Elektronenakzeptoren in *charge transfer*-Komplexen fungieren [59]. Dieser Umstand sorgt dafür, dass sie sich deutlich besser in Solvenzien lösen, die freie Elektronenpaare zur Verfügung stellen können bzw. als elektronenreiche Aromaten zur Komplexierung mit der π -Elektronenwolke fähig sind [59]. Je elektronenreicher der Aromat, desto größer ist die Löslichkeit (vgl. Toluol und Benzol), wie in Tabelle 1 ersichtlich. In Wasser lösen sich Fullerene durch ihren ausgeprägt hydrophoben Charakter praktisch gar nicht [59].

Tabelle 1: Löslichkeit von C₆₀ und C₇₀ bei 25°C
(M.V. Korobov et al. 2001. Solubility of C₆₀ Fullerenes, Verwendung genehmigt durch American Chemical Society)

Solvens	Kohlenstoffdisulfid	Benzol	Toluol	Wasser
Löslichkeit von C ₆₀ in mmol/L	11,0	2,36	3,89	1,3*10 ⁻¹¹
Löslichkeit von C ₇₀ in mmol/L	11,8	1,55	1,67	1,6*10 ⁻¹⁰

Thermodynamisch gesehen, stellen Fullerene im Vergleich zu Graphit und Diamant deutlich energiereichere Modifikationen des Elementes Kohlenstoff dar. Graphit besitzt eine Standardbildungsenthalpie von 0 kJ mol⁻¹, Diamant von 1,7 kJ*mol⁻¹ pro C-Atom und ist bei Raumtemperatur metastabil [59]. Erst beim Erhitzen wandelt sich Diamant in Graphit um. C₆₀ weist bei Raumtemperatur eine Standardbildungsenthalpie von 42,5 kJ*mol⁻¹ pro C-Atom auf. C₇₀ liegt bei 40,4 kJ*mol⁻¹ [59]. Größere Fullerene zeigen, dass sich mit zunehmender Größe und damit abnehmender Krümmung und Spannung die Bildungsenthalpie bei 0 kJ*mol⁻¹ befindet [59].

Andere thermodynamische Eigenschaften der Fullerene sind ebenfalls von der Größe des betrachteten Kohlenstoffkäfigs abhängig. Darunter fallen z.B. der Schmelzpunkt und die Bindungsenergie pro Kohlenstoffatom. Letztere beträgt für C₆₀ 7,18 eV und für C₇₀ 7,21 eV. Graphit zum Vergleich weist eine Bindungsenergie von 7,37 eV auf [59]. Fullerene können bei ca. 400°C sublimieren und sind im Gegensatz zu Graphit nicht elektrisch leitend. Für die Siedepunkte wurden bisher keine exakten Daten erhalten.

Im chemischen Sinne handelt es sich bei Fullerenen um Polyolefine bzw. aromatische Systeme [59]. Wie bereits beschrieben, beobachtet man eine Bindungsalternanz zwischen den (5,6)- und den (6,6)-Bindungen. Letztere weisen Doppelbindungscharakter auf und π -Elektronen sind nur mäßig delokalisiert [59]. Bemerkenswert ist die große Elektronenaffinität der Fullerene. Sie sind stark elektrophil und nehmen bereitwillig ein oder mehrere Elektronen auf, was ihre Reaktivität entscheidend beeinflusst. Fullerene können auch als Elektronendonoren fungieren, jedoch ist diese Fähigkeit weit weniger ausgeprägt als die Akzeptoreigenschaften [59].

Bei der klassischen Fullerenchemie handelt es sich um eine exohedrale Funktionalisierung (Modifikation an der Außenseite) durch einen oder mehrere Substituenten an den Kohlenstoffatomen [97]. Bei der endohedralen Chemie finden Modifikationen im Hohlraum des Fullerenkäfigs statt [97]. Der elektrophile Charakter der Fullerene begünstigt beispielsweise Additionsreaktionen mit Nucleophilen bzw. Radikalen an der Fullerenoberfläche. Außerdem können Fullerene auch pericyclische Reaktionen durch Cycloadditionen eingehen [59].

Abbildung 6 zeigt eine nucleophile Additionsreaktion bei der sich zunächst ein anionischer Komplex bildet, in dem ein Elektron des Amins auf das C₆₀ übertragen wird und anschließend eine Rekombination unter Zwitterionbildung mit darauf folgendem Protonentransfer, was ein hydroaminiertes Produkt liefert [59].

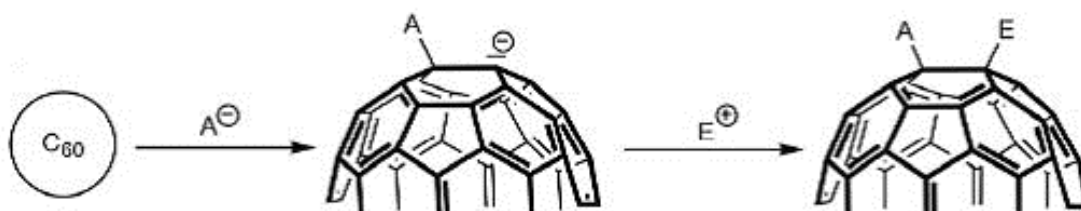


Abbildung 6: Mechanismus der nucleophilen Addition an ein Fulleren (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 95. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)

Abbildung 6 zeigt eine Additionsreaktion von C₆₀ mit einem Alkylradikal, welches ein Radikal liefert, in dem sich das ungepaarte Elektron auf dem Fullerenengerüst befindet. Der Hauptanteil der Spindichte liegt auf dem in α -Position zum Alkylrest befindlichen C1-Atom [59]. Die zweithöchste Spindichte wird an den Kohlenstoffatomen C3 und C3' beobachtet und bei C5 ist praktisch keine Spindichte vorhanden. Additionsreaktionen bei denen Alkylfullerenylradikale entstehen, weisen eine Tendenz zur Dimerisierung auf, die umso stärker ausgeprägt ist, je kleiner der Alkylrest ist [59].

Fullerene stellen mit ihrer Eigenschaft, leicht mit Hydroxyl- und Peroxid-Radikalen zu reagieren, die ein frühzeitiges Absterben von Zellen bewirken, hocheffiziente Radikalfänger (siehe Abbildung 7) dar und können somit als Antioxidanzien den verfrühten Zelltod verhindern [59]. Diese Eigenschaft wird in Anti-Aging Cremes eingesetzt.

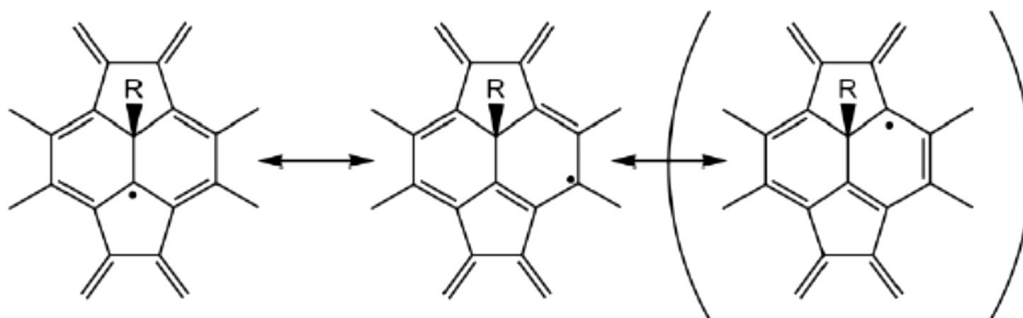


Abbildung 7: Bildung eines Radikals durch Additionsreaktion von C_{60} mit einem Alkylradikal (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung. Seite: 107. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)

Fullerene können auch Wasserstoff und Halogene addieren und so zu hochfunktionalisierten Verbindungen umgesetzt werden. Sie bieten nämlich eine große Anzahl von Doppelbindungen an, die durch Hydrierung in gesättigte C-C-Einfachbindungen übergeführt werden können und je nach Reaktion der angewandten Methode zu einfach oder mehrfach hydrierten Produkten führen [59].

Eine wesentliche Eigenschaft hydrierter Fullerene ist ihre Acidität. In einigen Fällen kann diese den Grad organischer Säuren, wie z.B. Essigsäure, annehmen [59].

Eine weitere Form von Fullerenmodifikationen stellt die Klasse supramolekularer Systeme dar, in denen das Fullerenmolekül nicht als Gast in einen Hohlraum eingelagert wird, sondern durch Funktionalisierung Teil einer größeren Komponente ist, welche dann supramolekulare Wechselwirkungen eingehen kann [4]. In der Krebstherapie ist dies von großem Interesse.

Diese Modifikationen in der Fullerenchemie liefern ein großes Spektrum wertvoller Derivate, die für die Herstellung neuer, weiter funktionalisierter Materialien anwendbar sind.

1.1.4 Herstellung

Eigentlich war im Jahr 1985 die Entdeckung und Identifizierung der Fullerene zufällig, da es das eigentliche Ziel von *H. W. Kroto*, *J. R. Heath*, *S. C. O'Brien*, *R. F. Curl* und *R. Smalley* war, stellare Bedingungen in Sternen der Klasse der Roten Riesen zu simulieren [20]. Das Experiment bestand darin, Laserstrahlen in einer Heliumatmosphäre auf ein Graphit-Target zu konzentrieren und die entstandenen Teilchen in einem Massenspektrometer zu untersuchen [27].

Erwartungsgemäß wurden hauptsächlich Moleküle in der Zusammensetzung HC_7N und HC_9N , wie sie auch im All vorkommen, gefunden. Neben diesen Molekülen fanden sie auch Teilchen mit der Massenzahl 720 und 840, die C_{60} und C_{70} entsprechen [59]. Im Jahr 1996 wurden sie dafür mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Dieser erste Nachweis war jedoch nicht geeignet, um ausreichende Mengen für die Untersuchung der chemischen und physikalischen Eigenschaften der neuen Verbindungen herzustellen. 1990 entwickelten *Krättschmer* und *Huffman* ein einfaches und effizientes Verfahren zur Herstellung von Fullerenen in Gramm und Kilogramm Mengen, welches die Fullerenforschung forcieren sollte [52]. Bei dieser Technik wird Ruß (natürliches Vorkommen von Fullerenen) in einer Heliumgas Atmosphäre produziert.

Wie in Abbildung 8 gezeigt, wird dabei Graphit im elektrischen Lichtbogen zwischen zwei hochreinen Graphitelektroden verdampft [59]. Alternativ kann dieser Kohlenstoff-Ruß auch durch Laserablation von Graphit oder Pyrolyse von aromatischen Kohlenwasserstoffen produziert werden. Der Fullerenruß enthält neben den gewünschten Fullerenmolekülen auch eine Reihe unlöslicher Bestandteile, z.B. Rußpartikel und Graphitbruchstücke [52]. Die Abtrennung von den unlöslichen Bestandteilen gelingt durch Extraktion mittels geeigneter organischer Lösungsmittel wie z.B.: Toluol. Die dabei entstehende Lösung enthält bis zu 70% C_{60} und 15% C_{70} sowie andere Fullerene, welche mittels Chromatographie getrennt werden können [65].

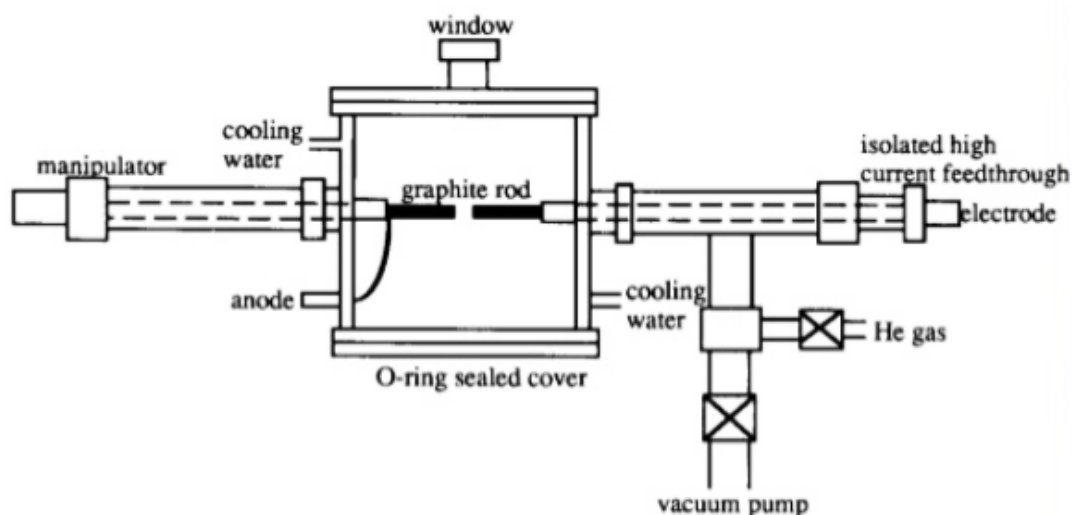


Abbildung 8: überarbeitete Darstellung einer Fulleren synthese- Apparatur mittels Graphitverdampfung nach Krättschmer und Huffman (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung, Seite: 52. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)

1.1.5 Vorkommen in der Umwelt

Natürliche Fullerene kommen unter anderem in Form von verschiedenen Gesteinen vor, beispielsweise im Shungit (Russland) [146]. Dieses vollständig aus Kohlenstoff bestehende Mineral zeigt eine wellenförmig deformierte Graphitstruktur, die teilweise fullerenartige Einschlüsse enthält, wie in Abbildung 9 dargestellt [59].

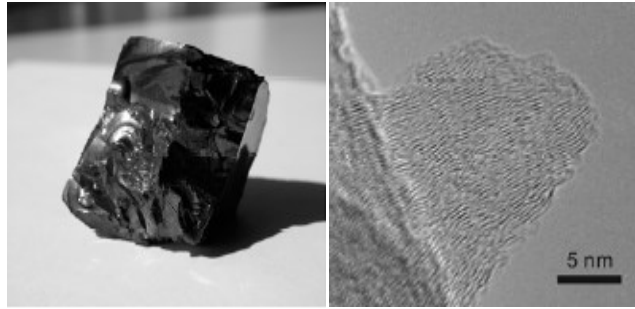


Abbildung 9: Shungit als Kohlenstoffmineral (links) besitzt eine graphitartige Struktur (rechts) (A. Krüger, Neue Kohlenstoffmaterialien-Eine Einführung. Seite: 49. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)

Fullerene kommen ebenfalls in Kreide-Tertiär-Grenzsichten (Neuseeland), in Meteoriten und Sedimenten meteoritischer Impakte (Gissar, Tadschikistan), in stark kohlenstoffhaltigen Substraten wie Fulgurit (Entstehung durch Blitzeinschlag) und in Verbrennungsrückständen (Ruß) aus Kerzen, Motoren und aus Flugzeug-Turbinen vor [59] [105].

1.1.6 Anwendungsgebiete und Gesetzgebung

Kohlenstoffhaltigen Nanomaterialien wird ein großer Einsatz in der Biomedizin und Materialwissenschaft zugeschrieben. Dabei sind Fullerene besonders attraktiv wegen ihrer Stabilität und breiten Palette an Modifikationsmöglichkeiten [59]. Heutzutage kommen Fullerene beispielsweise in Anti Aging Cremes als Radikalfänger vor, um dem Alterungsprozess der Haut entgegenzuwirken [128], zur photochemischen Erzeugung von Singulett-Sauerstoff, um gezielt DNS abzubauen bzw. zur Zerstörung von Tumorgewebe in der Krebstherapie [20]. Beispielsweise können geeignete Fullenderivate mit Oligonucleotiden als Substituenten ortsspezifische Wechselwirkungen mit der DNS eingehen und so die DNS-Doppelstränge aufbrechen [20].

Fullerenderivate sind auch von besonderem Interesse für die Herstellung photoleitender Polymere und elektrolumineszenter Materialien mittels photoinduzierten Elektronentransfers [59]. Der Einsatz von Fullerenen zeigt hier eine deutliche Verbesserung der Materialeigenschaften bei Solarzellen, insbesondere in der Phasenstabilität. Bei der Entwicklung chemischer Sensoren ist die Bindung von C_{60} an eine feste Phase besonders bei Oberflächenfilmen von Vorteil [59].

Der Einsatz von Hydrofullerenen ist sehr interessant für die Anwendung von Lithium-Ionen-Akkumulatoren, da sie die Lebensdauer dieser Batterien signifikant erhöhen können. Auch für bildgebende Verfahren in der Medizin sind Fullerene eine wertvolle Bereicherung, beispielsweise können hochiodierte Derivate als Röntgenkontrastmittel angewendet werden [20,128].

Fullerene finden ihren Einsatz auch in der Produktion von Sportartikeln (Tennis, Badminton- oder Golfschlägern) und auch zur energiesparenden und kostengünstigen Umwandlung in Diamant (im Gegensatz zu Graphit) [59].

Nanomaterialien fließen auch immer mehr in die Gesetzgebung ein, wie z.B. in die Kosmetik-Verordnung oder Biozid-Verordnung. Arbeitsgruppen bei der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA) sowie CARACAL befassen sich derzeit mit der verbesserten Integration von Nanomaterialien in die Chemikalien-Verordnung REACH. Seit Mitte 2013 gibt es in Europa eine Melde- und Kennzeichnungspflicht für Nanopartikel in Kosmetika (EU-Kosmetikverordnung (VO-EG Nr. 1223/2009).

Aufgrund der vermehrten Produktion und Verwendung dieser kohlenstoffhaltigen Nanopartikel in Verbraucherprodukten können Fullerene direkt in Kontakt mit der Haut kommen und die meisten Gewebearrieren durchdringen [59]. Daher stellt sich die Frage der Anreicherung im Menschen bzw. in der Umwelt, besonders da Fullerene nicht biologisch abbaubar sind und kaum eine Datenlage zur Toxizität vorhanden ist.

In Österreich sind derzeit noch keine Daten über Fullerene in Abwasser, Klärschlamm bzw. kosmetischen Produkten und deren Auswirkung auf den menschlichen Organismus vorhanden. Deshalb soll im Rahmen dieser Dissertation aufgeklärt werden, ob und von welchen Umweltmedien in Österreich ein toxikologisches Risiko der Fullerene zu erwarten ist. Hierzu ist die Entwicklung spezifischer Analysemethoden zur Bestimmung von C_{60} , C_{70} , und NMFP- Fullerenen in unterschiedlichen Umweltmatrices notwendig.

1.2 LC-MS Analytik

1.2.1 Flüssigchromatographie (LC)

In dieser Studie wurde für die Entwicklung der Analysenmethode eine Flüssigchromatographie mit gekoppelter Tandem- Massenspektrometrie (LC-MS/MS) verwendet. Bei der LC-MS handelt es sich um eine HPLC-Anlage (high performance liquid chromatography) mit einem Massenspektrometer. Diese besteht aus einem Laufmittelvorrat, einer Pumpe, einem Injektor, einer Trennsäule sowie einem Detektor [27]. Die Flüssigkeitschromatographie ist ein chemisches Verfahren zur Auftrennung und Bestimmung von Molekülen in einem Gemisch. Die anschließende Massenspektrometrie dient zur Identifikation und Quantifizierung der zu untersuchenden Proben [130]. Es existieren verschiedene Trennmethode, die auf dem Prinzip der Wechselwirkung einer stationären Phase (Säule) mit einer mobilen Phase (Eluenten) basieren.

Die Stärke der Wechselwirkung nimmt wesentlichen Einfluss darauf, wie schnell die Stoffe durch das System hindurch transportiert werden. Analyten, die mit der stationären Phase in starke Wechselwirkung treten, sind langsamer als Analyten, die nur schwach oder kaum damit interagieren [35].

Für die entwickelte Methode am Umweltbundesamt Wien wurde ein UPLC („Ultra-High Performance Liquid Chromatography“) Gerät mit massenspektrometrischer Detektion verwendet. Der Grundaufbau unterscheidet sich nicht von einer herkömmlichen HPLC-Anlage, jedoch bringt der Einsatz der UPLC mehrere Vorteile mit sich. Bei der UPLC werden Säulen mit einer kleineren Porengröße verwendet, wodurch schärfere Peaks entstehen und auch Analysenzeit und Laufmittel eingespart werden [59].

1.2.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) werden in der Analytik für eine hochsensitive- und selektive Detektion und Quantifizierung von reinen Stoffklassen, aber auch von gemischten Substanzen durch die Verwendung von nacheinander geschalteten Analysatoren eingesetzt [59]. Einer der Vorteile der MS/MS, ist die Schnelligkeit des Systems, da Messungen innerhalb von wenigen Millisekunden durchgeführt werden können. Als Geräte werden beispielsweise Triple Quadrupol Massenanalysatoren (QqQ) verwendet, die auch in meiner Studie zum Einsatz gekommen sind [9].

Quadrupole Massenanalysatoren bestehen aus vier Stabelektroden, an denen jeweils die gegenüberliegenden Elektroden an Gleich- bzw. Wechselstrom angeschlossen sind [20]. Nur Ionen mit bestimmten Masse-Ladungs-Verhältnissen (m/z) sind stabil genug,

um die Quadrupole zu einem bestimmten Zeitpunkt zu passieren, alle anderen

unerwünschten Ionen werden durch Neutralisierung nicht detektiert. Deshalb werden Quadrupole auch als

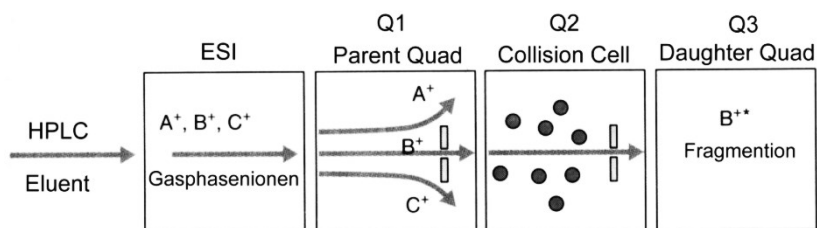


Abbildung 10: überarbeitete Darstellung eines Triple-Quadrupol Massenanalysators (Ohtsuki S. et al. 2011. Quantitative targeted absolute proteomics-based ADME research as a new path to drug discovery and development: methodology, advantages, strategy, and prospects. J Pharm Sci.3547-59. doi: 10.1002/jps.22612. Verwendung genehmigt durch Elsevier)

Massenfilter bezeichnet [20]. Ein Triple-Quadrupol besteht aus drei Quadrupolen (Q1, Q2 und Q3), siehe Abbildung 10. Multiple Reaction Monitoring (MRM) ist der am häufigsten verwendete Modus in der quantitativen Analytik mittels Triple-Quadrupol und wird als zweidimensionales Gegenstück zum Selected Ion Monitoring (SIM) bei einfachen Quadrupol Massenspektrometern aufgefasst [20]. Beim Triple-Quadrupol dient Q1 als Massenfilter und lässt nur spezifische Vorläufer-Ionen mit bestimmtem Masse-Ladungs-Verhältnis durch. Q2 stellt die Kollisionszelle dar, wobei die Vorläufer-Ionen durch die Kollision mit einem Gas (N_2 oder Ar) fragmentiert und Produkt-Ionen erzeugt werden [20]. Dieser Prozess wird Collision Induced Dissociation (CID) genannt. Die resultierenden Produkt-Ionen werden zu Q3 geleitet, wo nur die Ionen mit gewünschtem Masse-Ladungs-Verhältnis passieren dürfen. Dort treffen sie dann auf den Detektor (Electron Multiplier) [20]. Um die Messmethode zu optimieren, werden neben den chromatographischen Parametern zunächst die massenspektrometrischen-Parameter (DP, EP, CEP, CE, CXP) angepasst. Dies wird im Kapitel Material und Methode weiter ausgeführt.

1.2.3 Elektrospray- Ionisation (ESI)

Wie bereits in der Literatur beschrieben, ist der Einsatz der Elektrospray-Ionisation (ESI) als Ionisationsquelle in der LC-MS Analytik besser geeignet, wenn es sich um ionische und polare Verbindungen handelt. Im Gegensatz zu ESI besteht auch die Möglichkeit, APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) für mittelpolare und unpolare Verbindungen einzusetzen, jedoch nicht für ionische [59] [65].

1.2.4 Basisvalidierung

Analytische Ergebnisse haben oft ausschlaggebende Konsequenzen für Verbraucher und Umwelt. Demnach müssen die angewendeten Methoden nachweislich geeignet sein und valide Ergebnisse liefern. Der Prozess der Validierung soll bestätigen, dass ein Prüfverfahren, eine analytische Methode, eine Messeinrichtung und alle damit verbundenen Voraussetzungen zur Erfüllung einer bestimmten Aufgabe geeignet sind [55]. Dies ist vor allem wichtig, um die Qualitätssicherung der Analysenergebnisse gewährleisten zu können. Für meine Arbeit wurde die Basisvalidierung der Verfahrenskenndaten nach DIN 32645 ermittelt.

Validierungsparameter

Bevor ein Analyseverfahren auf seine Leistungsfähigkeit hin überprüft werden kann, müssen erst prüfrelevante Kriterien festgelegt werden [55]. Der Umfang dieser Kriterien richtet sich nach der zu validierenden Methode und sollte in einem angemessenen Verhältnis zu den entsprechenden Anforderungen stehen.

In Tabelle 2 sind die allgemeinen Validierungsparameter nach Kromidas aufgelistet und beschrieben.

Tabelle 2: Allgemeine Validierungsparameter
(Kromidas 2011, Verwendung genehmigt durch John Wiley & Sons)

Validierungsparameter	Beschreibung
Genauigkeit	Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision
Richtigkeit	Maß für die Abweichung vom richtigen Wert aufgrund systematischer Fehler
Präzision (Wiederhol-, Labor-, Vergleichspräzision)	Maß für die Streuung der Analysenwerte aufgrund zufälliger Fehler
Linearität	Mathematischer Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration
Wiederfindungsrate	Ausbeute nach allen Analyseschritten
Selektivität	Fähigkeit, unterschiedliche Komponenten nebeneinander störungsfrei zu bestimmen
Spezifität	Fähigkeit, eine Substanz ohne Störung durch andere Komponenten zu bestimmen

Robustheit (Methodenrobustheit, Verfahrensstabilität, Anwendbarkeit)	Störanfälligkeit durch variierende Bedingungen (Analysenparameter, Dauer der Analyse, Labor, Gerät, etc.
Methodenstabilität	Stabilität der Methode in Abhängigkeit von der Zeit
Stabilität	Stabilität von eingesetzten Lösungen, Chemikalien, etc.
Empfindlichkeit	Fähigkeit zur Bestimmung kleiner Konzentrationsdifferenzen
Nachweisgrenze	Kleinste nachweisbare Menge oder Konzentration
Bestimmungsgrenze	Kleinste Menge oder Konzentration eines Analyten, die quantitativ mit einer festgelegten Präzision bestimmt wird
Arbeitsbereich	Konzentrationsbereich für akzeptable Angaben über Richtigkeit, Präzision, etc.
Messunsicherheit	Schwankungsbereich des Messwertes
Methodenfähigkeit	Fähigkeit, Ergebnisse zu liefern, die innerhalb der Spezifikationsgrenze liegen

- Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich beginnt frühestens bei der Bestimmungsgrenze und wird durch die Kalibrations-Standards festgelegt (meist bestimmt durch den niedrigsten und höchsten Kalibrations-Standard). Die Linearität muss für die Gültigkeit der statistischen Auswertung nachgewiesen werden [35].

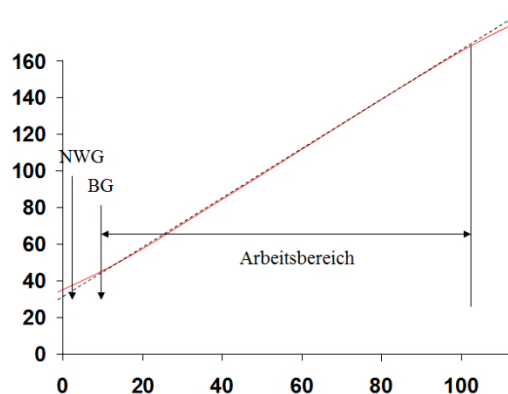


Abbildung 12: überarbeitete Darstellung des Arbeitsbereiches (Determination of trace elements. Zeev Alfassi et al. 2008, Verwendung genehmigt durch Wiley & Sons)

- Nachweisgrenze (limit of detection)

Die Nachweisgrenze (NG) stellt die Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein eines Analyten unter Verwendung einer Kalibrierung dar. Sie kann unter Berücksichtigung einer vorgegebenen Sicherheit den kleinsten Messwert vom Blindwert unterscheiden. [35]. Hat eine Probe einen Messwert im Bereich der Nachweisgrenze, kann mit einer Signifikanz von circa 99% und einer Unsicherheit von 1% (α - Fehler) davon ausgegangen werden, dass der Analyt vorhanden ist [35]. Das Signal/Rausch (S/N)-Verhältnis = 3:1

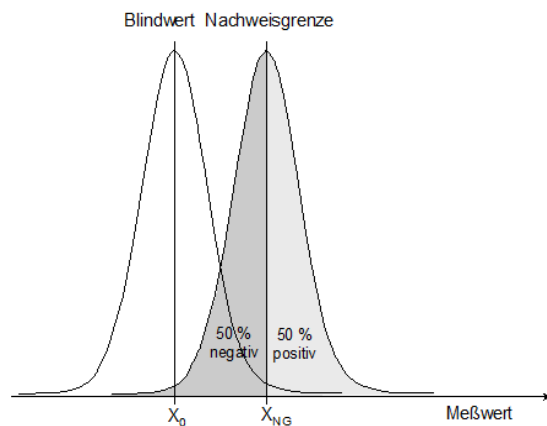


Abbildung 13: überarbeitete Darstellung der Nachweisgrenze (Determination of trace elements. Zeev Alfassi et al. 2008, Verwendung genehmigt durch Wiley & Sons)

Vorgegebene Sicherheit:

$$3\sigma = 99.7\%$$

$$\Rightarrow NG = 3 \times \sigma \text{ BW}$$

- Bestimmungsgrenze (limit of determination)

Die Bestimmungsgrenze (BG) ist die kleinste Konzentration eines Analyten, die quantitativ mit einem vorgegebenen relativen Fehler bestimmt werden kann und stellt die untere Grenze für die Quantifizierung dar [35]. Die BG entspricht jener Konzentration, ab der die geforderte Analysenpräzision (zumeist 33.3%) erfüllt ist. Der Bestimmungsfehler $\pm VB$ wird über das in die Kalibrierung umschließende Vertrauensband errechnet [35].

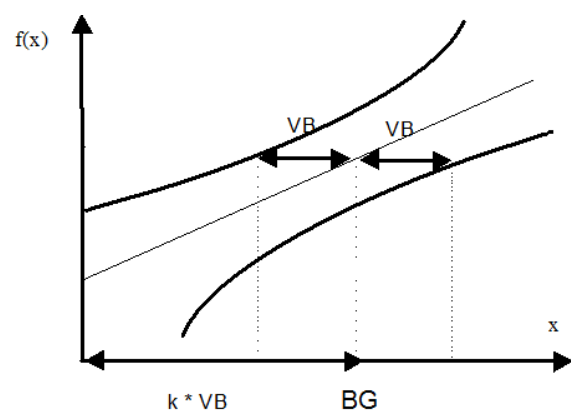


Abbildung 14: überarbeitete Darstellung der Bestimmungsgrenze (Determination of trace elements. Zeev Alfassi et al. 2008, Verwendung genehmigt durch Wiley & Sons)

$$\text{Annähernd: } BG \approx 3.33 \text{ NG}$$

$$\Rightarrow BG = 10 \times \sigma \text{ BW}$$

- Bestimmung von NG/BG lt. DIN 32645

NG/ BG werden über Vertrauensbänder und mehrmaliger Messung der Kalibrierung nach DIN 32645 berechnet [142]. NG und BG müssen für jede Probenart (Matrix) separat ermittelt bzw. angegeben werden und dürfen sich nicht nur auf Standardlösungen beziehen [142].

1.3 Prozess der Abwasserreinigung in einer Kläranlage

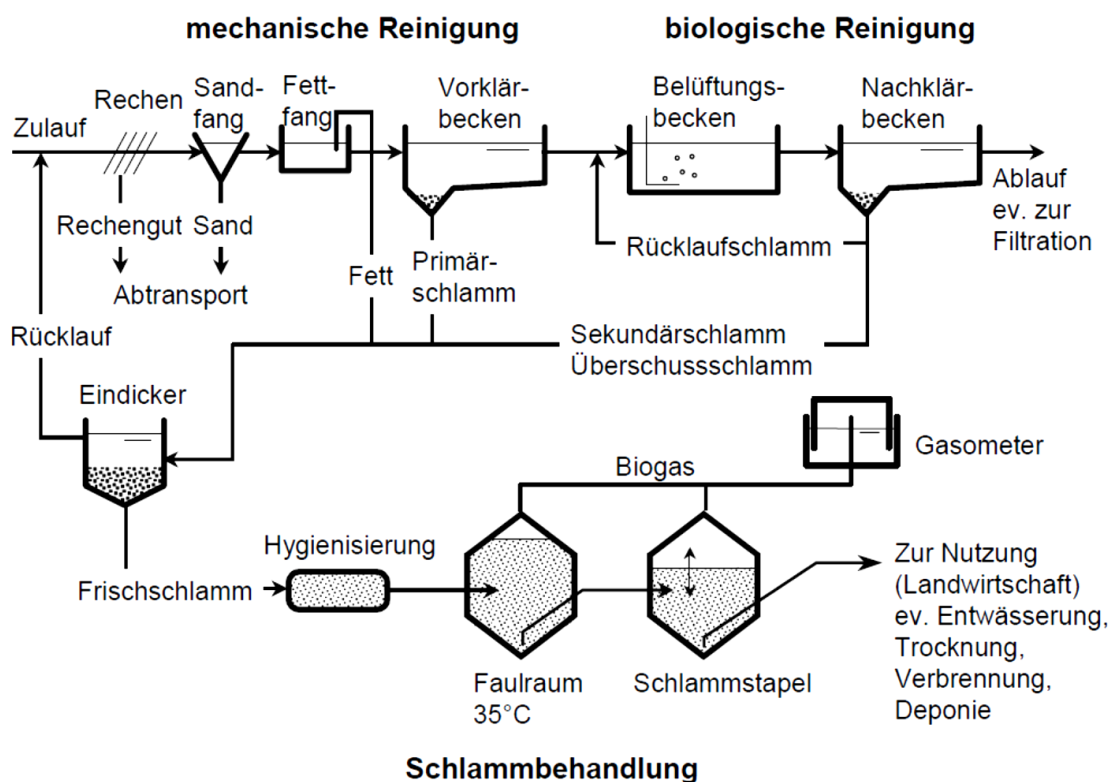


Abbildung 15: Darstellung der Abwasserreinigung in einer kommunalen Kläranlage (Förstner U. 2008 Umweltschutztechnik, Seite: 225. ISBN: 978-3-540-77883-7. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag Berlin Heidelberg)

Um abschätzen zu können, ob und inwieweit die österreichische Population mit Nanomaterialien wie Fullerenen in Kontakt kommt, ist es notwendig, Kenntnis über die relevanten Stoffströme von Nanomaterialien zu erhalten. Daher möchte ich im nachfolgenden Abschnitt die kommunale Abwasserreinigung in Österreich kurz beschreiben, um ihre Auswirkungen auf biologische Prozesse abschätzen und bestimmen zu können, inwiefern Kläranlagen als Zugang von Nanomaterialien in

Gewässer dienen. Der Prozess der Abwasserreinigung wird im nachfolgenden Teil genauer beschrieben.

In einer Kläranlage erfolgt die Abwasserreinigung in drei Schritten, nämlich die mechanische, biologische und chemische Reinigung (siehe Abbildung 15) [141].

- Mechanische Reinigung

Bei der mechanischen Vorreinigung werden über einen Schotterfang und Rechen grobe Verunreinigungen entfernt. Bei diesem ersten Reinigungsschritt werden z.B. Hygieneartikel, Laub, etc. beseitigt.

Diese Reste werden maschinell gewaschen, zerkleinert, verbrannt oder auf einer Deponie abgelagert. Mineralische Verunreinigungen wie Sand, Kies oder Glassplitter werden aus dem Abwasser über den Sandfang entfernt, damit die Maschinen in der Kläranlage durch starke Beanspruchung oder auch Verstopfung nicht beschädigt werden. Beim anschließenden Vorklärbecken werden durch Sedimentation alle kleinen organischen Substanzen aus dem Abwasser entfernt (ca. 30%). Papier oder Fäkalien setzen sich im Vorklärbecken als Primärschlamm ab oder bleiben an der Oberfläche [141].

- Biologische Reinigung

In diesem Schritt werden durch Mikroorganismen die organischen Abwasserinhaltsstoffe mit Hilfe von Sauerstoff im Belebungsbecken (Belebtschlamm mit Bakterien angereichert) abgebaut. Dabei werden neben den organischen Kohlenstoffverbindungen (Schmutzstoffe) auch die schädlichen Stickstoffverbindungen aus dem Abwasser entfernt (Denitrifikation). Im Nachklärbecken erfolgt die Trennung des Belebtschlammes vom gereinigten Abwasser. Ein Teil des Schlammes kommt als Rücklaufschlamm in das Belebungsbecken zurück, um dort die Bakterien anzureichern. Der übrige Schlamm (Überschussschlamm) kommt zusammen mit dem Primärschlamm in den Faulturn, um die Bakterien dann dort ohne Sauerstoff abzubauen. Die dabei entstehenden Methangase können thermisch genutzt werden [141].

- Chemische Reinigung

In dieser letzten Reinigungsstufe steht in erster Linie die Phosphorfällung im Vordergrund, damit eine Eutrophierung der Gewässer verhindert wird. Dabei wird der Phosphor durch Zugabe von Eisen- oder Aluminiumsalzen als Schlamm aus dem Abwasser abgetrennt. Bei der Schlammproduktion ist es wichtig, die enthaltenen organischen Kohlenstoffe so gut wie möglich abzubauen und das Volumen des Schlammes für die weitere Verwendung bzw. Entsorgung zu reduzieren [141].

1.4 Toxikologie

Allgemein versteht man unter dem Begriff der 'Toxizität' die Eigenschaft eines Stoffes in Zellen, bzw. in lebenden Organismen unerwünschte Wirkungen und Funktionsbeeinträchtigungen bis hin zum Tod des Organismus zu bewirken. Toxische Wirkungen können reversible und irreversible Effekte haben [72].

Um eine toxikologische Interpretation aufstellen zu können, ist es wichtig, die Öko- und Humantoxizität von Fullerenen zu beschreiben. Im folgenden Abschnitt werde ich auf diese Punkte näher eingehen und einen Überblick über die bisherigen toxikologischen Studien geben, um die Ergebnisse der 11 untersuchten kosmetischen Produkte beurteilen zu können.

1.4.1 Ökotoxizität

Mögliche Auswirkungen von Nanopartikeln auf die Umwelt

Die Ökotoxikologie von Nanomaterialien ist erst teilweise untersucht. Bisher wurden vor allem akute Effekte auf Bakterien, Wasserorganismen, einige Bodenorganismen und Pflanzen bestimmt, meist allerdings bei nicht umweltrelevanten Partikelkonzentrationen. Neben der Dosis, der Partikelzahl und der elementaren Zusammensetzung spielen auch die Art, Präparation, Oberflächenbeschichtung und -beschaffenheit, sowie mögliche Modifikationen der Nanopartikel eine entscheidende Rolle für die Aufnahme und die möglichen toxischen Wirkungen [78].

Einsicht in die Wirkungsweise von Umweltchemikalien auf der molekularen und zellulären Ebene ist damit grundlegend für das Verständnis ökotoxikologischer Wirkungen [28]. Im Vordergrund der Ökotoxizität stehen aquatische Organismen. Es liegt eine Reihe von Untersuchungen mit synthetischen Nanomaterialien vor, die in den folgenden Punkten näher erläutert werden [89, 25, 101].

- **Wirkung auf Bakterien und Viren**

Bei den Wirkungen auf Mikroorganismen können neben der antimikrobiellen Wirkung von Nanopartikeln Veränderungen der Reproduktionsfähigkeit, Mutationen oder die Inhibierung von Vitalfunktionen untersucht werden.

Untersuchungen zur Bakterientoxizität von Fullerenen kommen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Beispielsweise führten die Konzentrationen von 0,4mg/l und 4mg/l mit Tetrahydrofuran suspendierten C₆₀-Fullerenen zu einer Hemmung des Wachstums und der Atmung von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* [31]. In einer anderen Studie wurden Veränderungen im Stoffwechsel von *Bacillus subtilis* bereits ab einer Konzentration von 0,01mg/l gefunden [26]. Lyon et al. (2006) berichten in ihrer Arbeit ebenfalls von einer hohen antibakteriellen Aktivität der C₆₀-Fullerene gegenüber *Bacillus subtilis*, die höher liegt als die des Antibiotikums Vancomycin [71].

Der Mechanismus der Bakterientoxizität von Fullerenen ist bisher noch unklar. Vermutungen bestehen, dass eine Photoaktivierung der Fullerene zur Bildung von ROS führt. Allerdings spricht der Nachweis einer Bakterientoxizität auch unter Abwesenheit von Licht, das als Grundlage zur Stimulierung der Bildung von ROS dient, für weitere Wirkmechanismen [46].

- **Wirkung auf Wasserorganismen**

Bislang wurden nur wenige ökotoxikologische Untersuchungen mit Nanomaterialien an marinen Organismen verschiedener Trophiestufen vorgenommen. In vereinzelt Untersuchungen zeigen Salzwassermuscheln wie *Mytilus edulis*, die Inkorporation von Nanopartikeln durch Phagozytose [46].

Ökotoxizitätsstudien mit Fischen deuten auf eine deutliche Abhängigkeit der Wirkkonzentrationen von der Art der Suspensionsherstellung hin. Beispielsweise wiesen Oberdörster et al. (2004) oxidative Schäden im Gehirn und Veränderungen in der Enzymaktivität beziehungsweise des Gluthationstatus in den Kiemen infolge der Exposition gegenüber niedrigen C₆₀-Fulleren-Konzentrationen nach [87]. Dabei

zeigte es sich allerdings, dass zumindest die Intensität der beobachteten Effekte mit dem verwendeten organischen Lösungsmittel Tetrahydrofuran im Zusammenhang stand.

Studien an Fischen, in denen kein Lösungsmittel zur Herstellung der Testsuspension verwendet wurde, konnten in der Regel nur eine geringe Fulleren-Toxizität nachweisen. Dass C₆₀-Fullerene bei Fischembryonen eine höhere Wirkung aufweisen als hydroxylierte Derivate, wiesen Zhu et al. (2007) und Usenko et al. (2007) nach [140]. So zeigte sich in der Studie von Zhu et al. (2007) bei einer Fulleren-Konzentration von 1,5 mg/l eine verminderte Schlupf- und Überlebensrate, wogegen das derivatisierte Fulleren keine Effekte bei Konzentrationen von bis zu 50 mg/l hervorrief.

Außerdem zeigten Usenko et al. (2007), dass eine Photoaktivierung der Fullerene einen Einfluss auf deren Toxizität gegenüber Fischembryonen hatte [140]. So waren Effekte wie Fehlbildungen des Schwanzes unter Abwesenheit von Licht um rund 30-40% weniger ausgeprägt. Ein Schutz geringer Fulleren-Konzentrationen vor oxidativem Stress konnte anhand dieses Testsystems nicht bestätigt werden [125].

- **Wirkung auf Bodenorganismen und Wurzelsysteme**

Mehr noch als bei Untersuchungen im aquatischen Bereich ergeben sich bei der Untersuchung terrestrischer Ökosysteme Probleme hinsichtlich der homogenen Mischung von Nanomaterialien mit dem Bodenmaterial, der Unterscheidung zwischen technisch konfektionierten Nanopartikeln und Kolloiden, sowie der Transformation von Nanomaterialien (nach der Suspension von Bodenmaterial und Bodenlebewesen). Die Applikation von Fullerenen in Größenordnungen von bis zu 50mg/kg scheint auf mikrobielle Boden-Biozönosen nur in geringem Maße eine Wirkung zu haben. Auf Kompostwürmer haben Fullerene ab Konzentrationen >1g/kg Nahrung einen Effekt. Sehr uneinheitlich sind auch die Ergebnisse zur Wirkung von Fullerenen auf terrestrische Bakterien und Protozoen. So führte die Exposition gegenüber einer Fullerenkonzentration von 5 mg/kg Boden zu Veränderungen in der Bakterien- und Protozoenzusammensetzung, nicht aber in der mikrobiellen Biomasse [44]. Auch Scott-Fordsmand et al. (2008) wiesen nach 28 Tagen Exposition gegenüber 1g Fullerenen pro kg Trockengewicht Boden einen um 78% geminderten Fortpflanzungserfolg bei Rotwürmern (*Eisenia veneta*) nach [112].

Im Unterschied dazu wiesen Tong et al. 2007 keine Effekte auf die Struktur der Bakterienzusammensetzung im Boden infolge der Exposition gegenüber Fulleren-

konzentrationen von 1 und 1.000 mg/kg nach, sowie keine Modifikationen in den Respirationsraten und der Enzymaktivität des Bodens [121].

Dabei wurden die Fullerene trocken in den Boden eingebracht, was eventuell die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte.

Untersuchungen zur Ökotoxizität

Im folgenden Abschnitt sind die wichtigsten umweltrelevanten Studien zur Toxizität von Fullerenen aufgelistet:

Tabelle 3: In vivo- und in vitro Untersuchungen zur Ökotoxizität (2004-2009)

Referenz	Applikation	Untersuchungsart	Effekt
<i>Oberdörster (2004)</i>	C ₆₀	In vivo am Forellenbarsch	Gehirnstörungen und Stresssymptome
<i>Lyon et al. (2006)/Johannsen et al. (2008)</i>	versch. Fullerene	In vitro an Bakterien	Antibakterielle Eigenschaften unabh. von Licht
<i>Lovern et al. (2007)</i>	C ₆₀	In vivo an Dahnien	Verhaltensänderung-Störung des Ökosystems
<i>Isaacson et al. (2007)</i>	C ₆₀	In vivo an Zebrafisch Embryonen	Erhöhte Sterblichkeit abh. von Licht und verstärkte Expression von Stressgenen
<i>Usenko et al. (2008)</i>	C ₆₀	In vivo an Zebrafisch Embryonen	Gehirnstörungen und Stresssymptome
<i>Baun et al. (2008)</i>	C ₆₀	In vivo an Algen und Wasserflöhen	Bindung an Chemikalien bewirken eine Verstärkung des toxischen Effektes
<i>Ringwood et al. (2009)</i>	C ₆₀	In vivo an Austern/Embryonen	Schädigung von Leberzellen

1.4.2 Humantoxizität

Mögliche Eintrittspforten in den menschlichen Körper

Die allgemeine Bevölkerung kommt mit dem vermehrten Verbrauch von Nanopartikeln, die auf dem Markt in Kosmetika, Sportartikeln, Arzneistoffen etc. vorkommen, in Kontakt. Es stellt sich daher die Frage, ob die verwendeten Nanomaterialien in den menschlichen Körper eindringen und ob sie dort gesundheitliche Schäden auslösen können. Als mögliche Eintrittspfade von Nanopartikeln in den Körper kommen der Atemtrakt, die Haut und der Magen-Darm-Trakt, der verschiedene Substanzen wie Wasser, Nährstoffe oder Sauerstoff aufnehmen kann, in Betracht [82]. Einige Studien deuten darauf hin, dass Nanopartikel aufgrund ihrer Größe diese Eintrittsstellen durchdringen können [83, 86, 84, 54,103].

Nanopartikel können auch durch ihre hohe Redoxaktivität reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) generieren, was zu oxidativem Stress, DNA-Schädigung und schließlich Apoptose und Zytotoxizität führen kann.

Zur Dauer und Höhe der Exposition des Menschen gegenüber Nanomaterialien sind kaum Erkenntnisse vorhanden. Ein Grund dafür liegt darin, dass es noch keine standardisierten Messverfahren und konkrete Daten über die Konzentration von Nanomaterialien in Umweltmedien gibt.

Noch zu berücksichtigen sind das Verhalten und die Veränderung dieser Nanopartikel in der Atmosphäre und in anderen Umweltmedien, die die Abschätzung der Konzentrationen in den Umweltmedien noch dazu erschweren [63].

Im nachfolgenden Abschnitt möchte ich die möglichen Eintrittspforten für die untersuchten Proben (Magen-Darm-Trakt und Haut) genauer beschreiben.

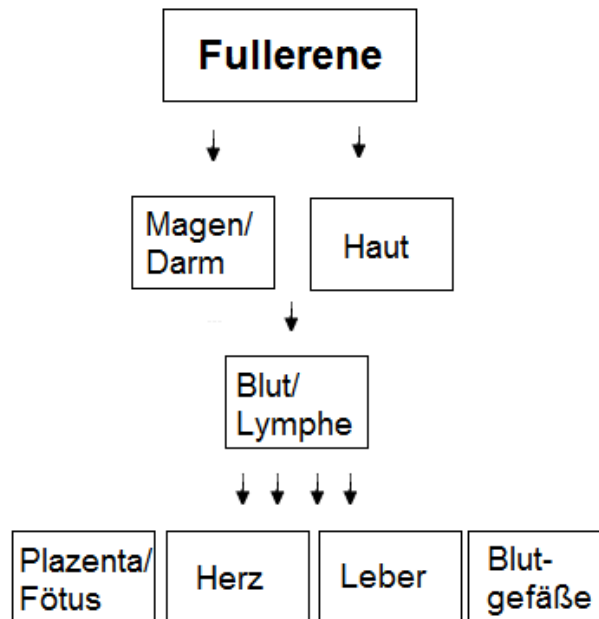


Abbildung 16: Wege von Fullerenen in den Körper (überarbeiteter Auszug aus Meili et al. 2007. Open access article)

- **Aufnahme über den Magen- Darmtrakt**

Der gesamte Magen-Darm-Trakt ist in engem Kontakt mit allen oral aufgenommenen Materialien. Es wird geschätzt, dass eine Person täglich durchschnittlich 10^{12} bis 10^{14} Nano- und Mikropartikel oral aufnimmt [67]. Die Adsorption von Nanopartikeln erfolgt nicht nur über die Peyer-Plaques (aggregierte lymphatische Knötchen, Teil des Immunsystems des Magen-Darm-Traktes), sondern auch durch Epithelzellen, die die große Oberfläche des Darms auskleiden. Chronische Nanopartikel-Adsorption kann die Erzeugung von oxidativem Stress und den gesamten Entzündungsprozess aktivieren, was zu pro-inflammatorischen Bedingungen führen kann [79].

Oberdörster et al. (2005) untersuchten die Aufnahme von radioaktiv markierten, intravenös verabreichten Fullerenen im Vergleich zur Aufnahme durch den Magen-Darm-Trakt in Ratten [88]. Das oral aufgenommene Material wurde zu 98% ausgeschieden, während das intravenös verabreichte Material nach einer Woche zu ca. 80% in der Leber deponiert war. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass die Aufnahme von Nanopartikeln über den Darm eher von geringer Bedeutung ist.

Jedoch kann die schnelle Entwicklung der künstlichen Nanomaterialien die bereits in vielen Lebens- und Nahrungsergänzungsmitteln vorhanden sind, zu einer zunehmenden Nanopartikel-Exposition im Magen-Darm-Trakt führen [36].

Obwohl immer mehr Studien die toxikologischen Wirkungen von Nanopartikeln im Magen-Darm-Trakt untersuchen, gibt es noch zu viele Wissenslücken die durch mehr Forschung geschlossen werden müssen.

- **Aufnahme über die Haut**

Die Fläche der menschlichen Haut beträgt im Durchschnitt $1,5\text{--}2\text{m}^2$, wobei die erste Schicht der Haut aus einer relativ dicken sogenannten keratinisierten toten Zellschicht ($10\mu\text{m}$) besteht. Nanopartikel, wie Fullerene gelangen über Sonnencremen, Anti-Aging Cremen etc. auf die Haut. Zudem können sich auch am Arbeitsplatz luftgetragene Nanopartikel auf der Haut ablagern [76]. Ob diese Produkte bzw. Nanomaterialien die oberen Hautschichten überwinden können und so in das tiefergelegene Gewebe gelangen, ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen worden. *Lademann et al. (1999)* zeigten, dass sich Nanopartikel zumindest in den Haarfollikeln anreichern können [60]. Da während des Haarwachstums die Haarfollikel geöffnet sind, könnten die Nanopartikel so in die tieferen Schichten eindringen.

Eine Translokation über die gesunde Haut wurde bislang aber nicht nachgewiesen, da Nanopartikel zu groß für einen passiven Transport durch die Haut sind [35, 110]. Durch Hautverletzungen oder durch erkrankte Haut (Schuppenflechte, Barfußlaufen, etc.) können Nanopartikel diese Barriere jedoch überwinden und bis in nahe gelegene Lymphknoten vordringen [88]. Tinkle et al. 2003 zeigten aber, dass auch die unverletzte Epidermis an Gelenken durch Beugung so durchlässig wird, dass fluoreszierende Partikel bis zu einer Größe von $1\mu\text{m}$ zur Lederhaut vordringen können. Als wahrscheinliche Vehikel für den anschließenden Transport in Lymphknoten werden z.B. Hautmakrophagen diskutiert [126].

Eine Aufnahme von C_{60} -Fullerenen in humane Makrophagen konnte anhand von Transmissions-Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden [94]. Dort wurden sie insbesondere entlang der Zellmembran, in den Lysosomen, im Zytoplasma und im Zellkern gefunden. Der Nachweis im Zellkern ist von besonderer Relevanz, da somit für Fullerene die Möglichkeit besteht, mit der DNA zu interagieren bzw. Mutationen auszulösen. Eine einzige Studie, die mit der Haut von Schweinen durchgeführt wurde, zeigte, dass Phenylalanin derivatisierte Fullerene bis in die Lederhaut vordringen konnten [102].

Die Lederhaut ist reich an Blut und Lymphgefäßen, an Makrophagen und sensorischen Nervenendigungen. So könnte der Transport von Nanopartikeln über Hautmakrophagen oder spezifische Abwehrzellen der Haut in die lymphatischen Organe möglich sein [91,106]. Die Forschungsgruppe von Vicki Colvin (Rice University, Houston, Texas) zeigte, dass menschliche Leber- und Hautzellen, die verschiedenen Konzentrationen von Buckminsterfullerenen ausgesetzt wurden, selbst noch in stark verdünnter Lösung (20ppb) die Hälfte aller Zellen abtöteten. Inwieweit die Haut Nanopartikel einschleust, ist bis heute noch unklar und Gegenstand der derzeitigen Forschung. Man ist sich jedoch sicher, dass die Barrierefunktion nicht vollständig gewährleistet ist und so das Eindringen von Nanopartikeln möglich macht [100].

Untersuchungen zur Humantoxizität

Im folgenden Abschnitt sind die wichtigsten in vivo- und in vitro Studien zur Toxizität von Fullerenen bis 2016 aufgelistet:

Tabelle 4: In vivo- und in vitro Untersuchungen zur Humantoxizität (1995-2015)

Referenz	Applikation	Untersuchungsart	Effekt
<i>Tsuchiya et al. (1996)</i>	50mg/kg Fullerenen	In vivo an trächtigen Mäusen	Reduzierte Schlüpf- und Überlebensrate und vermehrte Ödembildung im Herzen
Snyder et al. (2015)	¹⁴ C ₆₀ (0,2mg)	In vivo an trächtigen Ratten	Föten verstarben innerhalb von 24 Stunden bis 8 Tagen nach der Injektion
<i>Radomski et al. (2005)</i>	C ₆₀	In vivo an Ratten	Vermehrte Bildung von vaskulären Thrombosen
<i>Adelmann et al. (1994)</i>	Verschiedene Fullerene	In vitro an primären Rinder-Alveolarmakrophagen und HL-60-Makrophagen	Reduzierte Vitalität der Zellen und erhöhte Bildung an proinflammatorischen Zytokinen
<i>Kamat et al. (1998)</i>	C ₆₀	In vitro an Mikrosomen der Rattenleber	oxidative Schäden in biologischen Membranen
<i>Rancan et al. (2002)</i>	C ₆₀ -Derivate	In vitro an dendritischen Mono-Addukten	Schädigung der Membranen abhängig von UV-Dosis
<i>Yamawaki und Iwai (2006)</i>	100µg/mL. C ₆₀ (OH) ₂₄	In vitro an Endothelzellen von Nabelvenen	Autophagischer Zelltod

Xia et al. (2006)	C ₆₀ (OH) _m , m=22-26	In vitro an Makrophagen der Maus (RAW 264.7)	signifikante Produktion von ROS
Canesi et al. (2010)	C ₆₀	In vitro an Blutzellen der Miesmuschel	Entzündungsreaktionen und Produktion von ROS
<i>Bobylév et al. (2012)</i>	C ₆₀	In vitro an HEp-2-Zellen	toxische Wirkung auf Zellkulturen
<i>Nakagawa et al. (2014, 2015)</i>	Polycarbonsäure-Derivate	In vitro an Rattenhepatozyten	DNA-Schäden und Zytotoxizität
Yang et al. (2016)	50 µM C ₆₀ (OH) ²⁴	In vitro an isolierten Zellen von Mitochondrien	Mitochondriale Dysfunktion

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Geräte beziehungsweise Chemikalien und Reagenzien sowie die methodischen Parameter zur Durchführung der Basisvalidierung beschrieben.

2.1.1 Geräte

Bei der Methodenentwicklung wurden die LC-MS/MS-Analysen mittels UPLC-Gerät und gekoppeltem Triple-Quadrupol-Massenanalysator unter Verwendung des negativen Elektrospray-Ionisationsmodus (ESI (-)) durchgeführt. Für die Infusion in das Massenspektrometer wurde ein Harvard Apparatus 11 plus (Spritzenpumpe) verwendet. Die verwendeten Geräte sowie Hersteller und Typ sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Geräte, Hersteller und Typ

Geräte	Hersteller/Typ
UPLC	Agilent Technologies 1290 Infinity Series (Pumpe, Autosampler, Thermostat Probensampler, Entgaser)
Triple-Quadrupol-Massenanalysator	Applied Biosystems-Sciex, API 4000 Q TRAP Massenspektrometer
Elektrospray-Ionisation	Turbo V Ion Source; S.-Nr.: 21680080418
Infusionsapparatur	Harvard Apparatus 11
Trennsäule	Phenomenex Luna C18 (100 x 2mm; 5µm; 100A) S.-Nr.: 664199-8, S.-Nr.: 755497-2
Software	Auswertung: Applied Biosystems-Sciex, Analyst-Software 1.6 (2011) und MultiQuant 2.0, Basisvalidierung: SQS 2010 Version 1.46

Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Germany) Eppendorf Reference 2-20 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl und 500-5000µl
Zentrifugen- Tubes	Sarstedt (Nümbrecht, Germany) 15 ml, 120x17mm und 50ml, 115.8x27,95mm PP
Vortex	IKA GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, Germany) Vibrofix VF 1 Electronic
Autosampler vials und caps	Markus Bruckner Analysetechnik (Linz, Austria) 1.5 ml, winding 8-425; 32x11.6 mm, brown glass; caps 0.1 ml microinsert/15 mm. Caps: Macherey-Nagel GmbH & Co.KG (Düren, Germany) Caps: Screw Caps N9
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel, Germany) Typ 1086
Zentrifuge	Sigma (Osterode am Harz, Germany) Typ 3-18K
Evaporation	SuperVap™ Concentrator (12x50mL)

2.1.2 Chemikalien

Tabellen 6 und 7 enthalten alle verwendeten Chemikalien, Standards sowie deren Hersteller und CAS-Nummern.

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien, Hersteller und CAS- Nummern

Chemikalien	Hersteller	CAS-Nummer
Water Optigrade HPLC	Promochem, LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland)	7732-18-5
Essigsäure 100% (HAc)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	64-19-7
Methanol hypergrade LC-MS (MeOH)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	67-56-1
Toluol PESTINORM® SUPRA TRACE für die organische Spurenanalyse	VWR Chemicals (Wien, Österreich)	108-88-3
Natriumchlorid (NaCl)	EMSURE® Merck (Darmstadt, Deutschland)	7647-14-5

Kaliumhexacyanoferrat(II)- Trihydrat (Carrez- Lösung I)	EMSURE® Merck (Darmstadt, Deutschland)	14459-95-1
Zinksulfat-Heptahydrat (Carrez- Lösung II)	EMSURE® Merck (Darmstadt, Deutschland)	7446-20-0

Tabelle 7: Verwendete Standards, Hersteller und CAS- Nummern

Chemikalien	Hersteller	CAS-Nummer
Fullerene C ₆₀ (98% HPLC)	Sigma-Aldrich, Co. (Missouri, USA)	99685-96-8
[5,6]-Fullerene-C ₇₀ (98% HPLC)	Sigma-Aldrich, Co. (Missouri, USA)	115383-22-7
N- Methylfulleropyrrolidi ne (NMFP) (99% HPLC)	Sigma-Aldrich, Co. (Missouri, USA)	151872-44-5
20-30% C-13 Enriched 99+% C60	MER Corporation (Arizona, USA)	99685-96-8

2.2 Methode

Zur Erstellung der Methode bin ich nach folgenden Schritten vorgegangen

- Auswahl von Fullerenen anhand umfangreicher Literaturrecherche. Herstellung der Standards
- Erstellung der MS-Methode:
 - Bestimmung und Optimierung der substanzabhängigen MS- Parameter mittels Infusion der Reinsubstanzen in das Massenspektrometer und Ermittlung der Übergänge von C₆₀, C₇₀ und N-methylfulleropyrrolidine
 - Optimierung der chromatographischen Trennung
 - Optimierung der quellenabhängigen MS- Parameter durch FIA
- Basisvalidierung
- Optimierung der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) bzw. Fest- Flüssig- Extraktion, sowie der Reinigung von Kosmetika mittels Carrez- Klärung

- Herstellung der Standards

Für die Untersuchung von Fullerenen in der österreichischen Umwelt wurden anhand der Literaturrecherche C₆₀, C₇₀ und NMFP als geeignete Vertreter dieser Substanzgruppe ausgewählt, da diese laut Farré et al. 2010 und Sanchis et al. 2011 nach Analysen in Spanien in der Umwelt gefunden wurden. Für die Prozesskontrolle und zuverlässige Reproduzierbarkeit der Methode wurde der isotonenmarkierte interne Standard ¹³C₆₀ Fulleren verwendet. Der interne Standard muss chemisch gesehen dem Analyten ähnlich, darf aber nicht ident sein.

Bei der Massenspektrometrie eignen sich insbesondere isotoopenmarkierte Standards, weil diese dazu dienen, gleiche Arten von Molekülen anhand der unterschiedlichen Markierung mit Isotopen zu unterscheiden [119]. Dabei wird der interne Standard in bekannter Konzentration zu jeder Probe und jedem Standard hinzugefügt und dient als relative Bezugsgröße [143,46]. Wenn der interne Standard seine Konzentration während der Probenaufbereitung verändert, wird angenommen, dass sich die Konzentration des Analyten in gleicher Weise verändert.

Fullerene lösen sich, wie bereits beschrieben, in Toluol aufgrund seiner hohen elotropischen Eigenschaften sehr gut. Um die Stammlösung herzustellen, wurden jeweils 10mg von C₆₀-, C₇₀- und NMFP- Pulver in je 50mL Toluol im Ultraschallbad für eine Stunde gelöst. Die Konzentration der Stammlösung beträgt jeweils 0,2mg/mL.

➤ Erstellung der MS- Methode

Für die Erstellung der MS- Methode ist zunächst die Infusionsanalyse notwendig, gefolgt von der Optimierung der chromatographischen Bedingungen und zuletzt die Fließinjektionsanalyse (FIA). Für die Infusionsanalyse wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, um das Molekulargewicht und die zu erwartenden Fragmentionen (Übergänge) von jeder zu analysierenden Substanz festzustellen. Danach wurden Einzelstandardlösungen mit einer Konzentration von 100ng/mL in MeOH:Toluol = 9:1 hergestellt und mit einem Fluss von 20 µl/min direkt mittels Spritzenpumpe in die Ionenquelle gespritzt, um die Vorläufer- und Fragmentionen der Analyten mittels Software (Analyst 1.6.1) im Tuning Modus zu ermitteln. Es wurden die Vorläufer- und Produktionen gesucht, die einen Peak mit bestmöglicher Signalintensität liefern. Neben der Auswahl der Vorläufer- und Produktionen wurden auch die substanzabhängigen MS-Parameter (Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP), Collision Energy (CE), Collision Cell Exit Potential (CXP)) für jede Substanz optimiert. Dabei wurde jeder Parameter nach und nach erhöht bzw. gesenkt, um so die maximale Signalintensität für jedes Ion zu erreichen. Aufgrund der chemischen Stabilität der Fullerene konnten diese teilweise nicht fragmentiert werden, weswegen die Vorläufer Ionen (Q1) auch als Fragment Ionen (Q3) dienten (Quasi-MRM-Übergänge).

Substanzabhängige MS-Parameter mittels Infusion

Nachfolgend sind die substanzabhängigen MS-Parameter (Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP), Collision Energy (CE), Collision Cell Exit Potential (CXP)) [27], die in der Multi-Reaction-Monitoring-Methode (MRM) zusammengestellt wurden, beschrieben.

- Declustering Potential (DP) – kontrolliert die Potentialdifferenz zwischen dem Einlass ins MS und dem Q0 und hat großen Einfluss auf die Ionenintensität der zu bestimmenden Analyten und die Reproduzierbarkeit der Messungen. Es minimiert die Anzahl der verbliebenen Analytionen-Lösungsmittelcluster und transferiert die bereits gebildeten Ionen in Richtung des MS
- Entrance Potential (EP) – leitet den Ionenstrom durch Q0
- Collision Cell Entrance Potential (CEP) – fokussiert Ionen in der Kollisionszelle
- Collision Energy (CE) – stellt die Energie dar, mit der Ionen durch Gasmoleküle in Q2 fragmentiert werden
- Collision Cell Exit Potential (CXP) – transferiert die Ionen von Q2 zu Q3

Optimierung der chromatographischen Trennung

Für die Optimierung der chromatographischen Trennung wurde als idealste Trennsäule eine Luna 5u C18 (2), 100A (100x2.0mm, Phenomenex) eingesetzt. Als Eluenten der mobilen Phase dienten Toluol und Methanol (LC/MS grade). Um die Basislinientrennung sowie die Signalintensität zu verbessern, wurden mehrmalige Injektionen pro unterschiedlicher Laufmittel-Zusammensetzung durchgeführt und mit der besten Kombination weiterverfahren. Farre et al. 2010 verwendeten für ihre Analysen eine isokratische Elution, jedoch zeigt sich, dass die Verwendung eines Gradienten vergleichsweise eine bessere Signalintensität des Peaks bewirkt. Für die Optimierung des Gradienten wurden eine Reihe von Experimenten mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Laufmittel und Säulenofentemperatur (30°C, 35°C, 40°C, 45°C und 50°C) durchgeführt, siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Ausgetestete Laufmittelzusammensetzung (A: Toluol, B: MeOH)

Getestete Laufmittelzusammensetzung	Flow Rate ($\mu\text{l}/\text{min}$)	A (%) (Toluol)	B (%) (MeOH)
1)	400	10,00	90,00
2)	400	20,00	80,00
3)	400	30,00	70,00
4)	400	40,00	60,00

HPLC mit Säulenschaltung „Column- switching“

Für diese Arbeit wurde eine HPLC mit automatisierter Säulenschaltung verwendet, welches ein Verfahren mit guter Trennleistung und hoher Flexibilität ist und der Entlastung des MS dient (siehe Abbildung 20). Neben den normalen Komponenten einer HPLC-Anlage benötigt man auch eine zweite Pumpe und ein motorisiertes 6-Wege-Säulenschaltventil [150]. Durch das Ventil wird der zusätzliche Eluentenstrom in den Abfall geleitet und so eine unnötige Belastung des MS vermieden.

Quellenabhängige MS- Parameter

Nach der Optimierung der chromatographischen Trennparameter (Flussrate, Fließmittelzusammensetzung und Gradient) wurden die quellenabhängigen MS-Parameter (Curtain Gas flow, Ion Source Gas 1 (nebulizer gas) und Ion Source Gas 2 (heating gas), Ion Spray Transfer Voltage, Interface Heater, Vaporizer Temperature und Collision Gas) [27] mittels Fließinjektionsanalyse (Flow Injection Analysis – FIA) optimiert. Dabei wurden Mischstandards von 1ng/mL hergestellt, anhand mehrerer Injektionen des Analyten in das Massenspektrometer injiziert und verschiedene Varianten aller Quellparameter ausgetestet um die optimalsten Bedingungen festzulegen (siehe Tabelle 9).

- Curtain Gas flow (CUR) – Steuert den Gasfluss des Schutzgases, damit keine Umgebungsluft oder Lösungsmitteltröpfchen in das MS kommen.

- Ion Source Gas 1 (GS1) – Steuert den Fluss des Zerstäubergases (nebulizer gas), der die Spray-Stabilität und Aerosolbildung beeinflusst.
- Ion Source Gas 2 (GS2) – Steuert das Trocknungsgas, welches die Tröpfchen der versprühten Probe völlig verdampfen lässt.
- Ion Spray Transfer Voltage (IS) – Steuert die Spannung, um eine Probe zu ionisieren.
- Interface Heater (ihe) – Erhitzt die Schnittstelle um das Ionensignal zu verstärken.
- Vaporizer Temperature (TEM) – Steuert die Verdampfungstemperatur des Trocknungsgases.
- Collision gas (CAD) – Bestimmt die Fragmentierung der Probe in Q2 durch die Kollision mit Stickstoffgas.

Tabelle 9: Ausgetestete FIA-Optimierungsparameter

Getestete Quellenabhängige- MS Parameter	Einheit
Curtain gas flow (CUR)	20, 25, 30
Ion Spray transfer voltage (IS)	4000, 4200, 4500
Vaporizer temperature [°C]	300, 400, 500, 600, 700
Ion source gas 1(GS1)	30, 40, 50, 60
Ion source gas 2 (GS2)	30, 40, 50, 60
Collision Gas (CAD)	low, medium, high

Kalibrierung

Die Quantifizierung wurde unter Verwendung einer externen Kalibrierkurve durchgeführt. Die Standardreihe (9 Standardpunkte) wurde mittels quadratischer Regression über den Konzentrationsbereich von 0,01-2,5 ng/ml erstellt (siehe Tabelle 10) und dann mittels MultiQuant 2.0 Software dargestellt, wie in Abbildung 23 ersichtlich. Standards oberhalb der Konzentration von 2,5 ng/ml wurden ausgetestet, aber für die Kalibrierung nicht verwendet, da die Kalibrierkurve ab dieser Konzentration abgeflacht ist und eine schlechtere Signalintensität der Substanzen aufwies.

Tabelle 10: Herstellung einer Kalibrierung anhand einer Standardreihe im Konzentrationsbereich [ng/mL] von 0,0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 und 2,5

Bezeichnung	2,5 ng/ml	1,0 ng/ml	0,5 ng/ml	0,25 ng/ml	0,1 ng/ml	0,075 ng/ml	0,05 ng/ml	0,025 ng/ml	0,01 ng/ml	0,0 ng/ml
Endvolumen [ml]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Endkonzentration [ng/ml]	2,5	1,0	0,5	0,25	0,1	0,075	0,05	0,025	0,01	0,0
Fullerene-Dot MIX 100 ng/ml	25	10								
Interner Standard 100ng/ml	25	10								
Fullerene 1 ng/ml			500	250	100	75	50	25	10	0
MeOH	950	980	500	750	900	925	950	975	990	1000

Zur Beurteilung der Linearität wurden die bekannten Konzentrationen der Kalibrierkurve herangezogen und der Zusammenhang zwischen den Standardpunkten und den errechneten Peak-Flächenverhältnissen (Area Ratio) hergestellt und über die Berechnung des Determinationskoeffizienten (r^2), welcher sich im Idealfall dem Wert 1,0 annähert (C_{60} : $r^2 > 0.99946$, C_{70} : $r^2 > 0.99904$, NMFP: $r^2 > 0.99960$) bestimmt (siehe Abbildung 17).

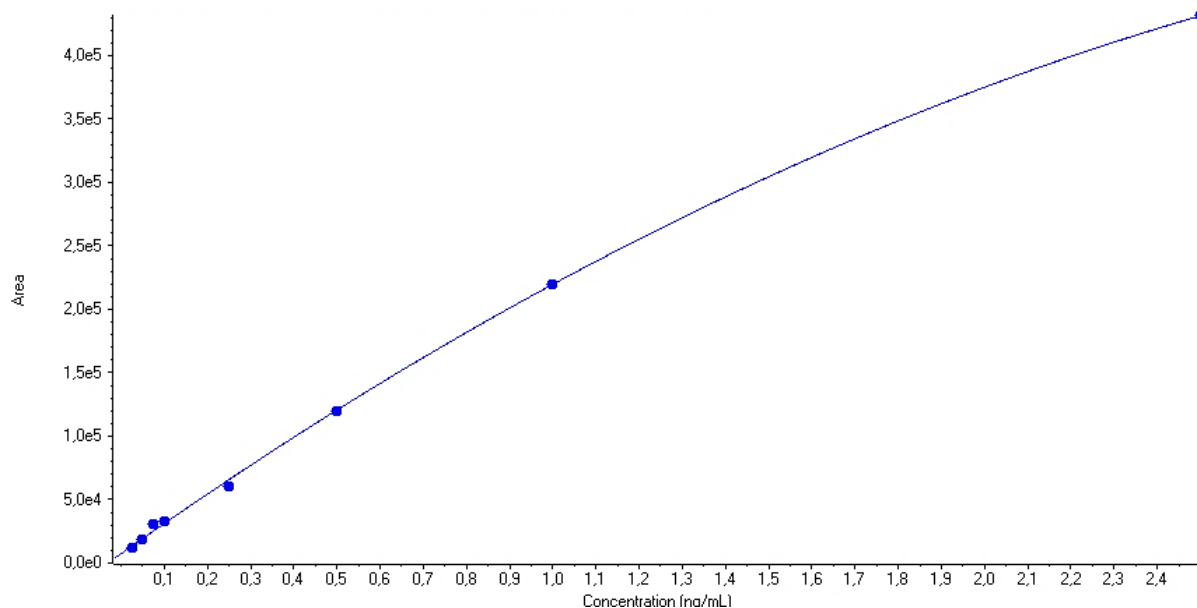


Abbildung 17: Beispiel für eine Kalibrierkurve von Fulleren C₆₀, dargestellt mittels MultiQuant 2.0 Software.

➤ Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid-liquid extraction, LLE)

Um Fullerene aus den Abwasserproben zu extrahieren, wurde die Flüssig-Flüssig-Extraktion angewendet. Studien von Benn et al. (2010, 2011) und Astefanei et al. (2012) zeigten, dass die Einsetzung der LLE- Methode eine deutlich effizientere Extraktion von Fullerenen aus Wasser, biologischem Material, Kosmetika, etc. darstellt als die Festphasenextraktion (SPE), wie in Abbildung 18 gezeigt. Vergleicht man beide Methoden, so zeigten die SPE eine $43 \pm 4\%$ und die LLE eine $80 \pm 6\%$ Wiederfindungsrate für C₆₀ in gespikten humanen Urinproben. Eine weitere wichtige Komponente für die Extraktion von Fullerenen, besonders aus sehr fettreichen Kosmetika, stellte die Einsetzung von Eisessig dar. Laut den oben genannten Arbeiten verhindert diese Säure die Bildung einer Emulsion während der LLE-Extraktion und begünstigt eine Phasentrennung.

Benn et al. stellten fest, dass durch die Verwendung der Essigsäure die LC-MS Detektion von C₆₀ negativ beeinflusst wurde, was aber durch völlige Verdampfung des Extrakts mittels Stickstoff vermindert werden kann [2] [4].

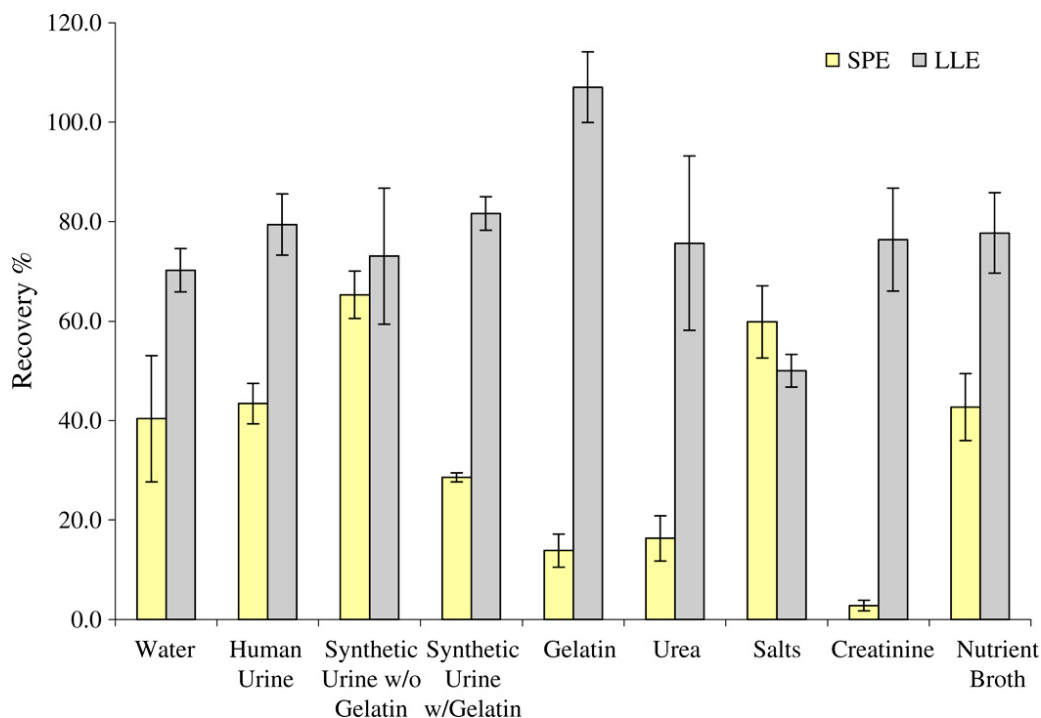


Abbildung 18: Vergleich der Wiederfindungsraten von C_{60} anhand verschiedener Matrices ($c=180 \mu\text{g/L}$) unter Verwendung von LLE- und SPE Extraktion (Benn TM et al. 2010. Evaluation of extraction methods for quantification of aqueous fullerenes in urine. Anal Bioanal Chem. PubMed Central PMCID: PMC3711233. Verwendung genehmigt durch Springer-Verlag)

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion wird die Trennung in einem Scheidetrichter durchgeführt. Dieser enthält zwei nicht bis wenig mischbare Lösungen verschiedener Dichte. Die dichtere Flüssigkeit (meist Wasser) in die Unterphase sinkt und die weniger dichte Flüssigkeit (z.B.: Hexan, Benzol, Toluol, etc.) bildet die Oberphase. In der wässrigen Unterphase sind auch häufig gelöste Salze, wie z. B. Natriumchlorid, enthalten, wodurch deren Dichte sich noch erhöht [148]. Die Verteilung zwischen den beiden Phasen wird auch durch das Nernstsche Verteilungsgesetz beschrieben. Je nach Größe der Gleichgewichtskonstante geht eine bestimmte Menge an Substanz in das Extraktionsmittel über und kann dann mit diesem abgetrennt werden [69].

Die Flüssig- Flüssigextraktion beinhaltet folgende Schritte:

Alle verwendeten Gefäße wurden vor der Probenaufarbeitung mittels Toluol gründlich gespült und über Nacht getrocknet.

Tabelle 11: Extraktionsvorgehensweise bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion

Herstellung der Lösungen
Extraktionslösung pro Probe: 0,5-1g NaCl + 40ml Toluol
Probenvorbereitung
<p>① Einwaage von 400mL Probe in einen Scheidetrichter</p> <p>② Dotation:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Surrogat: 10µl von $^{13}\text{C}_{60}$ Fulleren (c=100ng/mL in Toluol) - Dotations-Mix: je 10µl von C_{60}, C_{70}, NMFP (c=100ng/mL in Toluol) <p>③ Zugabe von Extraktionslösung und für eine Stunde auf dem Überkopfschüttler schütteln.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kurzes Abwarten der Phasentrennung - Zentrifugieren bei max. Umdrehungszahl, 15 min bei 5°C - Ablassen der Toluol Phase in ein SuperVap™ Gefäß <p>④ Toluolphase mittels N_2 bis auf 0,1mL einengen und anschließend mit MeOH auf 1mL auffüllen -> LC-MS/MS Messung</p>

Im Falle von Klärschlammproben und Kosmetika wurde die Fest- Flüssig- Extraktion vorgenommen, bei der die gleichen Schritte wie in Tabelle 11 beschrieben, angewendet wurden.

➤ Fest-Flüssig-Extraktion mit Carrez-Klärung

Zusätzlich wurde für die Extraktion von Fullerenen aus Kosmetika mit hohem Fettanteil die Reinigung mittels Carrez-Klärung optimiert.

Die Carrez-Klärung ist eine Methode zur Entfernung von Trübstoffen aus Lösungen [146]. Dabei werden Lösungen von gelbem Blutlaugensalz (Carrez I) und Zinksulfat (Carrez II) zu gleichen Teilen in die zu extrahierende Lösung gegeben [146]. Der entstehende Niederschlag von Kalium-Zink-hexacyanoferrat(II) $\text{K}_2\text{Zn}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ [43]

fällt gleichzeitig Kolloide aus und kann zusammen mit diesen abfiltriert werden. Farbstoffe hingegen adsorbiert er nur gering [34].

Die Carrez- Klärung beinhaltet folgende Schritte:

Tabelle 12: Carrez-Klärung bei hydrophoben Kosmetika

Herstellung der Lösungen
Extraktionslösung pro Probe: 0,5-1g NaCl + 11.0mL Essigsäure (100%) + 5ml Toluol
Carrez I - Lösung (150g Kaliumhexacyanoferrat (II) - $K_4[Fe(II)(CN)_6] \cdot 3H_2O$ in 1L HPLC - Wasser gelöst)
Carrez II - Lösung (300g Zinksulfat - $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ in 1L HPLC-Wasser gelöst)

Probenvorbereitung
① Einwaage von 0,05-0,2g Probe in ein 50mL Plastikzentrifugenröhrchen
② Zugabe von Extraktionslösung
③ Kräftig schütteln, anschließend kurz am Vibrofix, dann für 10 min bei 35°C ins Ultraschallbad
④ Dotation: <ul style="list-style-type: none">- Surrogat: 10µl von $^{13}C_{60}$ Surrogat (c=100ng/ml in Toluol)- Dotations-Mix: je 10µl von C_{60}, C_{70}, NMFP (c=100ng/ml in Toluol)
⑤ Kräftig schütteln, anschließend kurz am Vibrofix, dann für 10 min bei 35°C ins Ultraschallbad
⑥ Fällung: Zugabe von 1 mL Carrez I - Lösung, kräftig schütteln, danach Zugabe von 1mL Carrez II - Lösung, wieder kräftig schütteln
⑦ Nochmal am Vibrofix schütteln und anschließend bei max. Umdrehungszahl 15min bei 5°C zentrifugieren
⑧ Toluolphase mittels N_2 bis zur Trockenheit einengen und (90:10 MeOH/Toluol) wiederherstellen -> LC-MS/MS Messung

➤ Basisvalidierung

Wie bereits beschrieben stellt die Nachweisgrenze (NG) das kleinste messbare Signal und die Bestimmungsgrenze (BG) die niedrigste Konzentration eines Analyten, die quantitativ gemessen werden kann, dar. Die Basisvalidierung dient der Berechnung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 [17].

Dabei wird die instrumentelle Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze mittels Validierungssoftware (SQS 2010 Version 1.46) anhand der Peakflächen von mindestens 3 Serien der Standardreihe (Zusammenstellung siehe Tabelle 15) ermittelt. Für die Berechnung der NG, EG und BG müssen die 5 kleinsten Konzentrationen linear sein. Die Berechnung des Arbeitsbereiches erfolgt über die Formel $y=cx^2+bx+a$. Aus den Messungen werden NG, EG und BG automatisch von der Software berechnet und festgelegt. Für die Auswertung der Proben wird aus der berechneten BG und NG die festgesetzte BG und NG (BG/2) abgeleitet.

- Analyse

Vor Beginn der Messung muss das HPLC-Gerät für 5 Minuten mit einer Lösungsmittelkombination aus 95% Eluent A (Toluol) und 5% Eluent B (MeOH) bei einem Fluss von 5 ml/min und dann für weitere 5 Minuten mit der umgekehrten Lösungsmittelzusammensetzung gespült werden. Dieses „Purgen“ dient dem Durchspülen der Rohrleitungen und Kapillaren und der Entfernung von möglichen Luftblasen. Danach wird die Methode geladen, um die Anfangsbedingungen des Gradienten zu erzielen. Für konstanten Druck und Vakuum wird das System für 10 Minuten äquilibriert und die dabei erhaltenen Werte mit Werten aus früheren Messungen verglichen. Die Kalibrierungsstandards werden mehrmals bei verschiedenen Konzentrationen gemessen und die Chromatogramme mit zuvor gemessenen verglichen um eine ausreichende Empfindlichkeit zu gewährleisten. Danach kann die Analyse gestartet werden. Jede Sequenz enthielt etwa 10- 15 Proben (verdünnt und unverdünnt), einen Blindwert, eine Wiederfindung, einen Kontrollstandard und die Kalibrierungsstandards. Nach jeder gemessenen Probe folgte die Messung von zwei Kalibrierungsstandards mit verschiedenen Konzentrationen.

- Auswertung

Die Analyse und die Auswertung wurden mit der Analyst bzw. MultiQuant 2.0 Software durchgeführt. Die resultierenden Chromatogramme aus den Messungen wurden integriert und die Konzentrationen mittels MultiQuant Software quantifiziert. Für jede Sequenz der verschiedenen Fulleren-Proben wurde eine frische Kalibrierkurve hergestellt, basierend auf den verschiedenen Konzentrationen des analysierten internen Standards mit quadratischer Regression und auf 1/x gewichtet.

Weitere Berechnungen (zB Wiederfindungen) wurden in Microsoft Excel 2010 gemacht. Signale unterhalb der Nachweisgrenze (NG) wurden als n.n. (nicht nachweisbar) ausgewertet und Werte zwischen der Nachweisgrenze (NG) als unterste Grenze und der Bestimmungsgrenze (BG) als oberste Grenze, wurden als < BG angegeben.

- Kalkulation

Alle Berechnungen wurden in Microsoft Excel 2010 durchgeführt, basierend auf Daten aus der Analyst Software. Verdünnte Proben wurden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Wenn die Werte aus den verdünnten und unverdünnten Proben nicht mehr als 30% Unterschied ergaben, wurde der Mittelwert als Endkonzentration verwendet [ng/ml]. War bei beiden Werten ein Unterschied von mehr als 30% vorhanden, wurde der Wert der unverdünnten Probe gewählt. Mögliche Blindwerte wurden von den entsprechenden Proben subtrahiert. Die Wiederfindung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Wiederfindung [\%]} = \left(\frac{\text{Fläche des Peaks der Probe}}{\text{MW der Fläche von IS}} \right) * 100 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

IS...Interner Standard

Verdünnungsfaktor für verdünnte Proben...10, Unverdünnte Proben...1

2.3 Probenahme aus Abwasser und Klärschlamm

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, habe ich für meine Studie Fullerene in Abwasser- und Klärschlammproben von fünf repräsentativen Kläranlagen aus ganz Österreich (siehe Tabelle 13) getestet und auch im Rahmen des NanoDESTINARA Projekts 2015 und mit der Technischen Universität Wien das Adsorptionsverhalten dieser Nanomaterialien untersucht. Alle nachfolgenden Messungen der Fullerene wurden von mir durchgeführt. Die Probenahme erfolgte zwischen 2013-2014, die Proben wurden in Aluminiumflaschen bei -20°C im Tiefkühler der Umweltbundesamt Wien Ges.m.b.H. bis zur Analyse aufbewahrt.

Tabelle 13: Auflistung der Abwasser- und Belebtschlammproben aus fünf österreichischen Abwasserreinigungsanlagen (ARA)

Bezeichnung	1. Beprobung	2. Beprobung
ARA 1 Ablauf	17.09.13	03.12.13
ARA 2 Ablauf	17.09.13	03.12.13
ARA 3 Ablauf	17.09.13	03.12.13
ARA 4 Ablauf	17.09.13	03.12.13
ARA 5 Ablauf, 1.Stufe	17.09.13	03.12.13
ARA 5 Ablauf, 2.Stufe	17.09.13	03.12.13
ARA 1 Belebtschlamm	17.09.13	03.12.13
ARA 2 Belebtschlamm	17.09.13	03.12.13
ARA 3 Belebtschlamm	17.09.13	03.12.13
ARA 4 Belebtschlamm	17.09.13	03.12.13
ARA 5 Belebtschlamm, 1.Stufe	17.09.13	03.12.13
ARA 5 Belebtschlamm, 2.Stufe	17.09.13	03.12.13

Zur Bestimmung der Stoffströme von Nanopartikeln in Kläranlagen wurde mittels Batchtest das Adsorptionsverhalten durch Dotierung von C_{60} in Belebtschlamm (BB) und dem zugehörigen Ablauf untersucht (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Auflistung der Belebtschlamm (BB)- und Ablaufproben mit/ohne C_{60} Dotierung des Batchtests

Bezeichnung	Beprobung
Belebtschlamm vor C_{60} -Dosierung (Tag 0 (T0))	07.10.14
Ablauf von BB-T0	07.10.14
Belebtschlamm mit 1mg/L C_{60} (Tag1 (T1))	08.10.14
Ablauf von BB-T1	08.10.14
Belebtschlamm mit 1mg/L C_{60} (Tag4 (T4))	11.10.14
Ablauf von BB-T4	11.10.14
Belebtschlamm mit 1mg/L C_{60} (Tag7 (T7))	14.10.14
Ablauf von BB-T7	14.10.14

Um die Adsorptionskinetik bei unterschiedlichen Verhältnissen von Adsorbens und Adsorbanten mit zu berücksichtigen, wurden Ansätze mit unterschiedlichem Trockensubstanzgehalt (TS) untersucht (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Auflistung der Belebtschlamm (BB)- und Ablaufproben mit/ohne C_{60} Dotierung des Adsorptionstests

Bezeichnung	Beprobung
Belebtschlamm ohne C_{60} -Dotierung	16.10.14
Ablauf von BB-TS ohne C_{60}	16.10.14
Belebtschlamm mit 10mg/L C_{60}	16.10.14
Ablauf von BB-TS	16.10.14
Belebtschlamm mit C_{60} (doppelte TS)	16.10.14
Ablauf von BB-TSx2	16.10.14

Belebtschlamm mit C ₆₀ (halbe TS)	16.10.14
Ablauf von BB-TS/2	16.10.14
Belebtschlamm mit C ₆₀ (viertel TS)	16.10.14
Ablauf von BB-TS/4	16.10.14

2.4 Auswahl von kosmetischen Produkten

Wie zuvor in Kapitel 1 erklärt, beschäftigt sich meine Dissertation auch mit der Untersuchung fullerenhaltiger Kosmetik-Produkte, die am österreichischen Markt erhältlich sind. Anhand einer Internet- und Literaturrecherche habe ich dazu eine Reihe von kosmetischen Produkten (siehe Tabelle 16) ausgewählt.

Beim Einsatz von Kosmetika ist der Mensch einer direkten Exposition ausgesetzt. Boxall et al. 2007 berichten von ca. 5-6% Fullerenanteilen in bestimmten kosmetischen Produkten.

Hansen et al. 2008 schätzen die tägliche Belastung durch Hautkontakt mit höchstens 26µg/kg Körpergewicht ein. Dies gilt für die Zufuhr von 0,1% Fullerenen in Kosmetikprodukten. Auch Benn et al. beschäftigten sich 2011 in ihrer Studie *“Detection of fullerenes (C₆₀ and C₇₀) in commercial cosmetics”* mit dem Nachweis von Fullerenen in kosmetischen Produkten. Sie fanden dabei in Produkten der Marke Dr. Brandt, Derma Science, Jeudis Surpris Essence und Dr. Wu für C₆₀ 0.04- 1.1 µg/g und für C₇₀ 0.07 µg/g wieder.

Tabelle 16: Auflistung der kosmetischen Produkte und Inhaltsstoffe
 *Shungit: Natürliches Vorkommen von Fullerenen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
EviDenS de Beauté- Brightening Sonnencreme (SPF 25) 30ml	Sodium Hyaluronate, Vitis Vinifera extract (grapes), Ethylhexyl Methoxycinnamat, Alpha-Arbutin, Fullerene, etc.
(2) EviDenS de Beauté- Brightening Handcreme 75ml	Fullerene (Antipigmentflecken), Vitamin C, Eselsdistel Extrakt, Mandelöl, Mais Protein Extrakt, etc.
(3) EviDenS de Beauté- Intensive Brightening Maske 4x30ml	Arbutin, Fulleren, Weinblätter, Vitamin C-Derivate, Hyaluronsäure, Glycosyl Trehalose, Squalene, etc.
(4) EviDenS de Beauté- Brightening Body Lotion 200ml	Qal® Komplex, Das Wasser von La Foux, Fulleren, Weinblätter, Linalool, Hexyl Cinnamal etc.
(5) EviDenS de Beauté- Brightening Cream 30mL	Qal® Komplex, Das Wasser von La Foux, Fulleren, Weinblätter, Vitamin C-Derivate, Hyaluronsäure, Macadamiaöl, Jojobaöl etc.
(6) Dr. Brandt- Anti Aging Lineless cream 50g	Water, Methylsilanon Hydroxyproline Aspartate, Cyclomethicone, Fullerenes, etc.
(7) Dr. Brandt- Laser Lightning Nachtcreme 50g	Glyceryl Polymethacryalte, Vitis Vinifera (Grapeseed) Oil, Alcohol, Tricholoma Matsutake Singer Extract, Fullerenes, etc.
(8) Dr. Brandt- Laser Lightning Tages Lotion 50g	Aqua, Urea, Disopropyl Adipate, Behenyl, Alcohol, Glyceryl Distearate, Fullerenes, etc.
(9) *Shungit Shampoo gegen Haarausfall 300ml	Aqua, Sodium, Citric acid, Shungit, Parfum, Tetrasodium EDTA etc.
(10) *Shungit Haarmaske für fülliges Haar 220ml	Aqua, Cetearyl Alcohol, Citric acid, Shungit, Cocos Oil, Zingiber Officinale etc.
(11) *Shungit Gel für die Gelenke 75ml	Aqua, Seed Oil, Cocoa butter, Citric acid, Shungit, Propylparaben, Leaf Oil, Allantoin etc.

3 ERGEBNISSE

3.1 Massenspektrometrie

Massenübergänge

Wie im Kapitel Material und Methoden (Infusion) beschrieben, wurden für Fullerene C₆₀ und C₇₀ keine Massenübergänge bestimmt, da sie nicht fragmentiert werden. Für NMFP konnte der Massenübergang (Abbildung 20) bestimmt werden. In der folgenden Abbildung 19 sind die Molekülonen für C₆₀, C₇₀ und NMFP dargestellt. Molekülonen [M•-] werden unter den ESI-MS Bedingungen gebildet und stellen die häufigsten Ionen dar, einschließlich m/z 720.0 für C₆₀, m/z 840.1 für C₇₀ and m/z 777.1 für NMFP.

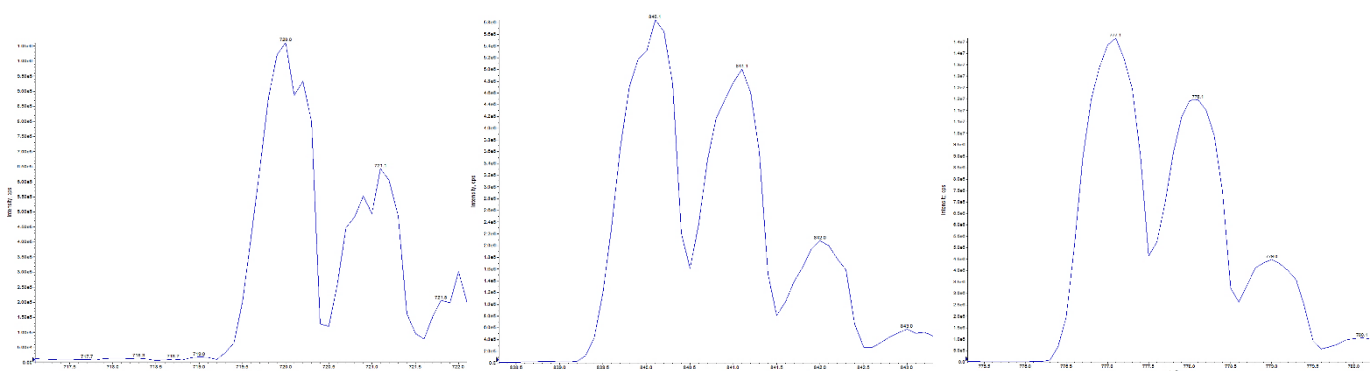


Abbildung 19: Infusion von C₆₀, C₇₀ und NMFP Fullerenen (100ng/mL) dargestellt mittels AB Sciex Analyst Version 1.6.1. Molekülon C₆₀ 720.0g/mol (links), Molekülon C₇₀ 840.1g/mol (mitte) und NMFP 777.1g/mol (rechts) (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

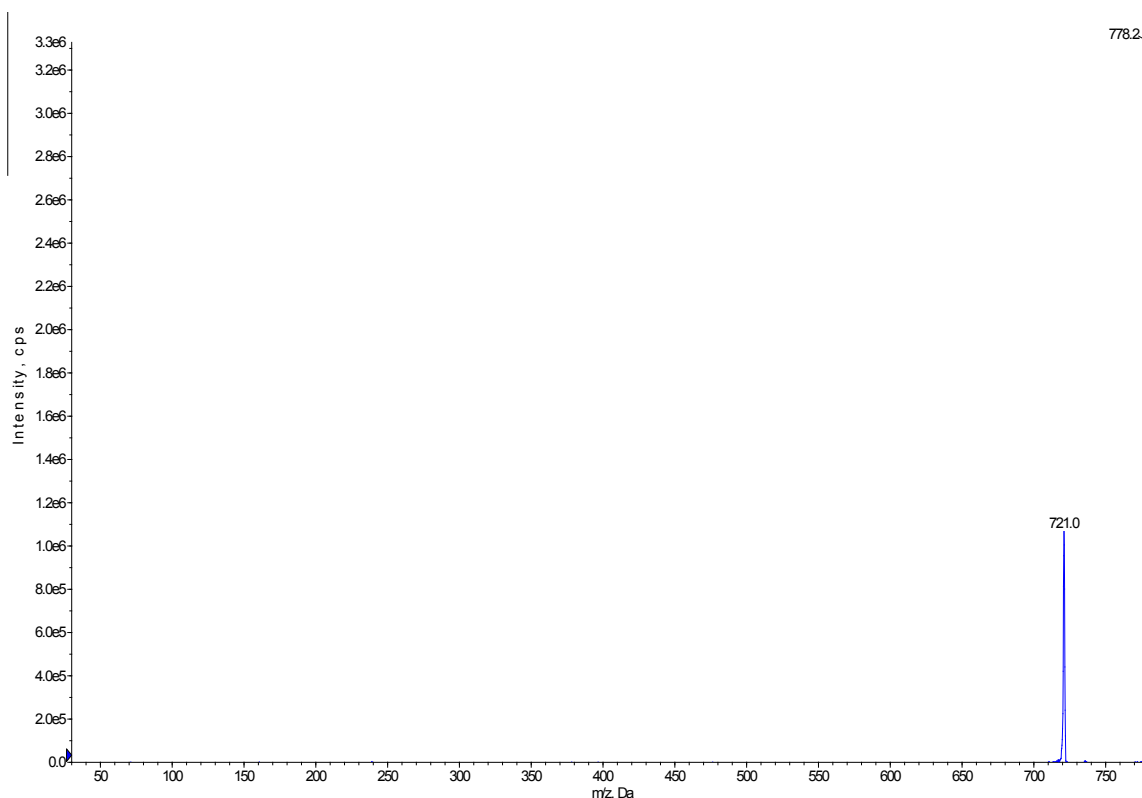


Abbildung 20: Spektrum Fulleren NMFP- Übergang 778.2-> 721.0 dargestellt mittels AB Sciex Analyst Version 1.6.1. (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

Substanzabhängige MS- Parameter

Tabelle 17 zeigt die optimierten substanzabhängigen MS-Parameter (Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP), Collision Energy (CE), Collision Cell Exit Potential (CXP)) [27], sowie die Übergänge die in der Multi-Reaction-Monitoring-Methode (MRM) zusammengestellt wurden [146].

Tabelle 17: Optimierte substanzabhängige MS-Parameter im MRM Modus. Retentionszeit (RT) in Minuten, Übergänge (Vorläufer und Produkt-Ionen (Da)), Declustering Potential (DP) in Volt, Entrance Potential (EP) in Volt, Collision Energy (CE) in Volt, Collision Cell Exit Potential (CXP) in Volt (Zakaria et al. 2017)

Substanz	RT [min]	Vorläufer-Ion [Da]	Produkt-Ion [Da]	DP [Volt]	EP [Volt]	CE [Volt]	CXP [Volt]
Fulleren C ₆₀	2,8	720.6	720.6	-120	-10	-5	-9
Fulleren C ₇₀	3,0	840.1	840.1	-120	-10	-5	-9
NMFP	2,41	777.1	720.6	-120	-10	-125	-25
Surrogat (¹³ C ₆₀)	2,79	738.0	738.0	-120	-10	-5	-9

Quellenabhängige MS-Parameter

Mittels Fließinjektionsanalyse wurden die optimalsten Bedingungen der quellenabhängigen MS-Parameter festgelegt (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Optimierte quellenabhängige MS-Parameter
(Zakaria et al. 2017)

Quellenabhängige- MS Parameter	Einheit
Curtain gas flow (CUR)	25
Ion source gas 1(GS1)	50
Ion source gas 2 (GS2)	50
Ion Spray transfer voltage (IS)	4200
Interface heater	ON
Vaporizer temperature [°C]	700
Collision Gas (CAD)	low

3.2 Chromatographie

Optimierung der chromatographischen Trennung

Nach mehrmaligen Injektionen pro unterschiedlicher Laufmittel-Zusammensetzung wurde mit der besten Laufmittel- Kombination (Eluent A: Toluol 40% und Eluent B: MeOH 60%) weiterverfahren. Für die Optimierung des Gradienten wurde eine Reihe von Experimenten mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Laufmittel durchgeführt. Tabelle 19 und Abbildung 21 zeigen das beste Ergebnis der Gradienten- Zusammensetzung [146].

Tabelle 19: Optimierte Gradientenzusammensetzung A: Toluol, B: MeOH (Zakaria et al. 2017)

Total Time (min)	Flow Rate (µl/min)	A (%) (Toluol)	B (%) (MeOH)	Temperatur
0,00	400	40,00	60,00	30°C
1,00	400	40,00	60,00	30°C
2,00	400	70,00	30,00	30°C
4,00	400	70,00	30,00	30°C
4,10	400	40,00	60,00	30°C
7,00	400	40,00	60,00	30°C

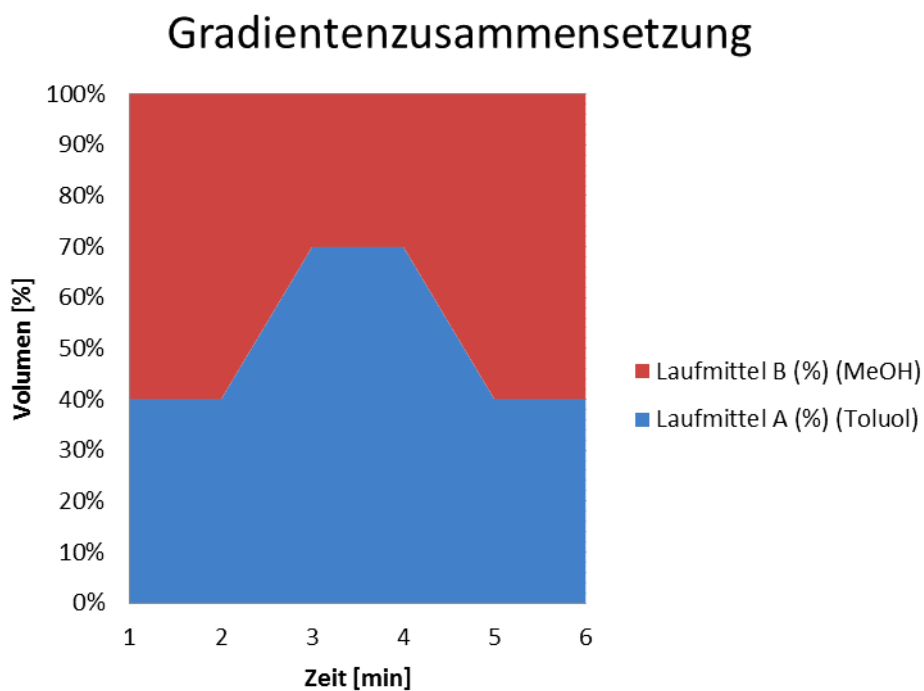


Abbildung 21: Gradientenzusammensetzung (MeOH und Toluol in %) mittels Excel 2015 dargestellt. (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

Verfahrenskennzahlen der Basisvalidierung

Die Verfahrenskennzahlen (NG, EG, BG) sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Tabelle 20: Nachweis- Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN32645 (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

Fulleren	Nachweisgrenze [ng/mL]	Erfassungsgrenze [ng/mL]	Bestimmungsgrenze [ng/mL]
C₆₀	0.02	0.04	0.1
C₇₀	0.05	0.1	0.2
NMFP	0.02	0.04	0.1

3.3 Wiederfindungsraten der Messungen von C₆₀, C₇₀ und NMFP in Wassermatrix

Die ersten Flüssig-Flüssig-Extraktionsversuche von C₆₀, C₇₀ und NMFP wurden mit Leitungswasser und Oberflächengewässer (Donau 2013) durchgeführt, dabei wurde mit den optimierten, chromatographischen Bedingungen der etablierten Methode gearbeitet [146]. Die Methode wurde charakterisiert, indem linearer Bereich, Bestimmungsgrenze (BG) und Nachweisgrenze (NG) bestimmt wurden.

Ergebnisse der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) der Wiederfindungen (WF) im Leitungswasser und Oberflächengewässer sind in Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21: MW und STABW der unverdünnten und (1:10) verdünnten Wiederfindungen (WF in %) im Leitungswasser und Oberflächengewässer (Zakaria et al. 2017)

Probe	MW und STABW [%]		MW und STABW [%]		MW und STABW [%]	
Leitungswasser	C₆₀		C₇₀		NMFP	
WF	61.9	5.1	57.1	4.7	54.6	8.9
WF (1:10)	86.7	6.4	81.8	8.2	75.7	8.6
Oberflächengewässer	C₆₀		C₇₀		NMFP	
WF	55.0	3.5	44.9	4.5	47.1	8.7
WF (1:10)	76.5	6.0	48.2	5.3	71.7	8.0

Die Wiederfindungen in den unverdünnten Proben sind niedriger, was auf Matrixeffekte hindeutet. Durch Verdünnungen konnten diese reduziert werden. Kolkman, Emke 2013 beschrieben die Wiederfindungen in Wasser in einer ähnlichen Größenordnung.

Tabelle 22: NG/BG Bestimmung- Fulleren C₆₀, C₇₀ und NMFP (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

	C ₆₀	C ₇₀	NMFP
instrumentelle NG [ng/mL]	0.02	0.05	0.02
instrumentelle BG [ng/mL]	0.10	0.20	0.10
Berechnete NG [ng/L]	0.10	0.30	0.10
Berechnete BG [ng/L]	0.50	1.1	0.50
festgesetzte NG [ng/L]	0.30	0.6	0.30
festgesetzte BG [ng/L]	0.60	1.2	0.60

Verglichen mit Kolkman et al. 2013 sind NG und BG für C₆₀ in Wasser etwa in der gleichen Größenordnung wie dort beschrieben (NG 0.28 ng/L und BG 0,57 ng/L).

3.4 Stabilitätstests anhand von C₆₀- Dotierung in Leitungswasser

Über einen Zeitraum von drei Wochen wurden Stabilitätstests (Leitungswasser mit 1ng/mL C₆₀-Dotierung in ALU- und Glasflaschen) gemacht, um festzustellen, wieviel von der Ausgangskonzentration von 1ng/ml in Glas bzw. Alufaschen nach Lagerung bei -20°C wiedergefunden werden kann (Tabelle 23 und Abbildung 22). Die Resultate zeigten, dass bei den Wiederfindungen zwischen Glas- und Alufaschen ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde, wobei in Alufaschen höhere Konzentrationen wiedergefunden wurden als in den Glasflaschen. Zunächst wurde nach der ersten Woche der Lagerung ein Abfall der Konzentrationen gemessen. Darauf folgende Messungen in den Wochen danach zeigten immer konstante Werte. Für diese Studie wurden alle untersuchten Abwasser- und Klärschlammproben bei -20°C eingefroren und in Alufaschen gelagert.

Tabelle 23: MW der Konzentrationen in ALU- und Glasflaschen nach 3 Wochen mit 1ng/mL C₆₀-Dotierung (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

	MW ALU	MW GLAS
Woche 0	0.9	0.9
Woche 1	0.7	0.4
Woche 2	0.7	0.4
Woche 3	0.7	0.4

Stabilitätstest- Fulleren C₆₀ [1ng/ml]

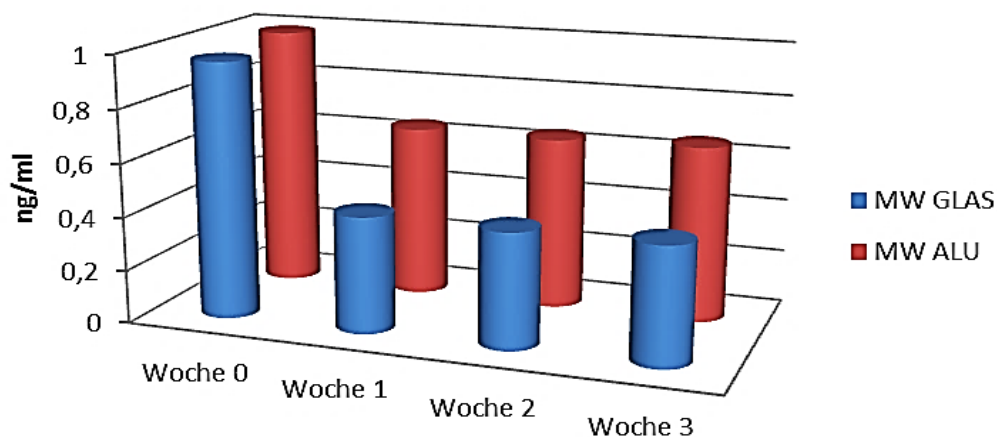


Abbildung 22: Stabilitätstest- Fulleren C₆₀ über 3 Wochen in ALU- und Glasflaschen mit 1ng/mL C₆₀-Dotierung mittels Excel 2015 ausgewertet. (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

3.5 Ergebnisse der 24 Abwasser- und Klärschlammproben

Insgesamt wurden fünf Proben österreichischer Kläranlagen in zwei Durchgängen (September 2013 und Dezember 2013) getestet. Von jeder Anlage wurden Tagesmischproben vom Ablauf sowie Stichproben des Belebtschlammes entnommen und auf C₆₀, C₇₀, NMFP Fullerene untersucht. Auf die Beprobung des Zulaufs wurde aufgrund der schwierigen Entnahme repräsentativer Proben von vornherein bewusst verzichtet.

Im Abwasser waren die Bestimmung (BG)- und Nachweisgrenze (NG) für alle Fullereene erwartungsgemäß niedriger als im Klärschlamm. Die Messungen zeigen, dass die Konzentrationen an Fullerenen in den geprüften Abwasser- und Klärschlammproben unterhalb der Nachweisgrenze liegen (siehe Tabelle 24, 25 und Abbildung 23) [146].

Tabelle 24: Ergebnisse der Abwasserproben der fünf österreichischen Abwasserreinigungsanlagen (ARA) im Zeitraum von 17.09.2013 und 03.12.2013 (n.n: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017)

Bezeichnung	Fulleren C60	Fulleren C70	NMFP
Einheit	ng/L	ng/L	ng/L
NG	0.4	0.8	0.4
BG	0.8	1.6	0.8
ARA 1 Ablauf	n.n.	n.n.	n.n.
ARA 2 Ablauf	n.n.	n.n.	n.n.
ARA 3 Ablauf	n.n.	n.n.	n.n.
ARA 4 Ablauf	n.n.	n.n.	n.n.
ARA 5 Ablauf, 1.Stufe	n.n.	n.n.	n.n.
ARA 5 Ablauf, 2.Stufe	n.n.	n.n.	n.n.

Mit dieser Methode wurde für C₆₀ und NMFP eine BG von 0,80 ng/L und NG von 0,40 ng/L und für C₇₀ eine BG von 1,60 ng/L und NG von 0,80 ng/L erreicht. In den 12 Abwasserproben fanden wir bei beiden Probenahmen keine der untersuchten Analyten oberhalb der NG.

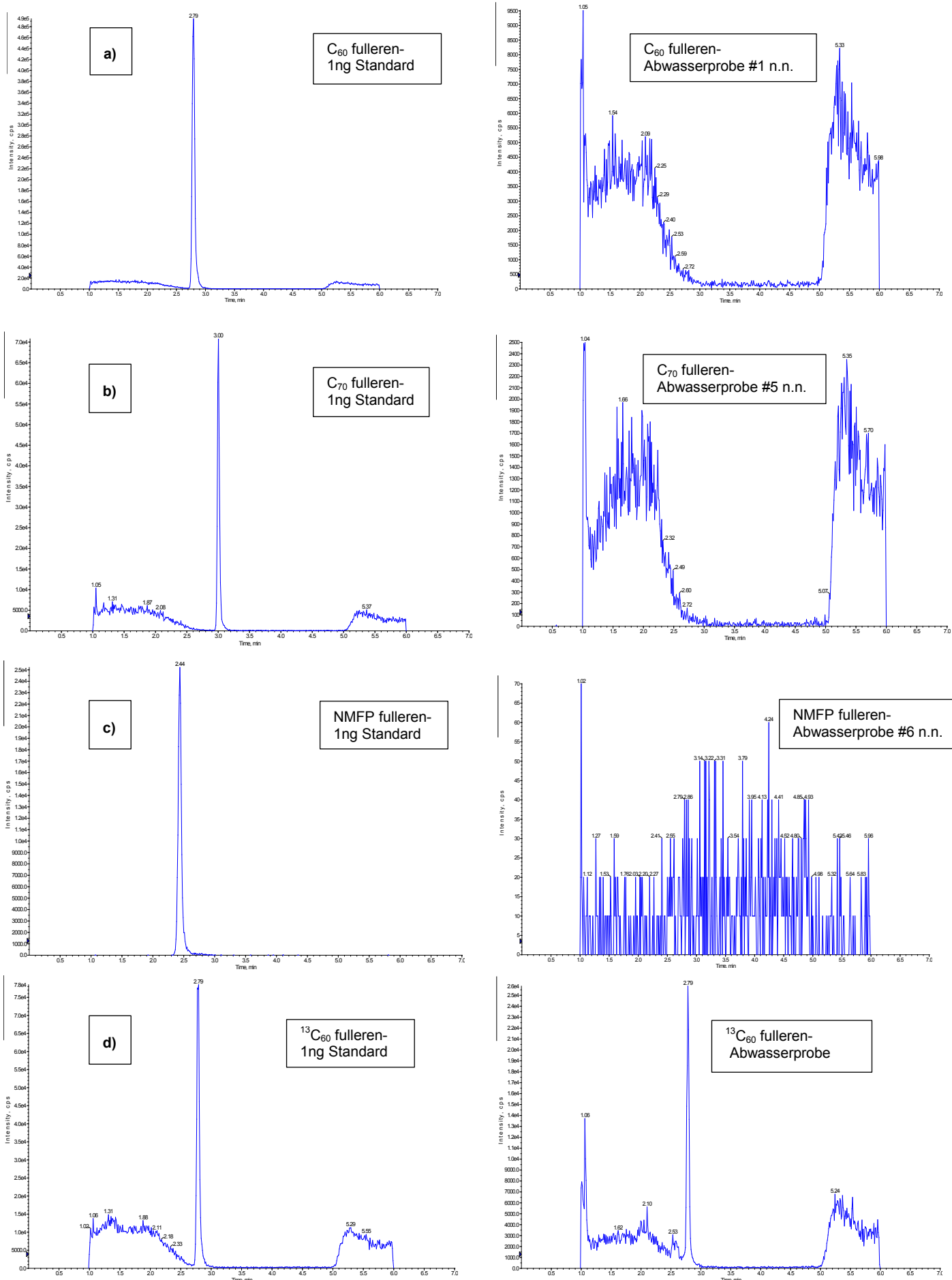


Abbildung 23: Chromatogramme a) Abwasserprobe #1, b) Abwasserprobe #5, c) Abwasserprobe #6 and d) ¹³C₆₀ interner Standard wurden mittels AB Sciex Analyst Version 1.6.1 ausgewertet. 1ng/mL Standards (links) und Abwasserproben (rechts) sind dargestellt. Die Elutionszeit ist auf der x-Achse bei bis zu 7 min angegeben. Die y-Achse zeigt die maximale Intensität jedes Fullerenes in cps an. (n.n.: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017)

Tabelle 25: Ergebnisse der Belebtschlammproben der fünf österreichischen Abwasserreinigungsanlagen (ARA) im Zeitraum von 17.09.2013 und 03.12.2013 (n.n.: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017)

Bezeichnung	Fulleren C₆₀	Fulleren C₇₀	NMFP
Einheit	ng/g TM	ng/g TM	ng/g TM
NG	0.7	1.3	0.7
BG	1.4	2.6	1.4
ARA 1 Belebtschlamm	n.n.	n.n.	n.n.
ARA 2 Belebtschlamm	n.n.	n.n.	n.n.
ARA 3 Belebtschlamm	n.n.	n.n.	n.n.
ARA 4 Belebtschlamm	n.n.	n.n.	n.n.
ARA 5 Belebtschlamm, 1.Stufe	n.n.	n.n.	n.n.
ARA 5 Belebtschlamm, 2.Stufe	n.n.	n.n.	n.n.

Mit dieser Methode wurde für C₆₀ und NMFP eine BG von 1.4 ng/g TM und eine NG von 0.7 ng/g TM und für C₇₀ eine BG von 2.6 ng/g TM und eine NG von 1.3 ng/g TM erzielt. Die Trockenmasse der Belebtschlämme lag zwischen 0,2 und 0,5 % (Median: 0,35 %). In den 12 Klärschlammproben fanden wir keine der untersuchten Analyten oberhalb der NG [146].

3.6 Ergebnisse der Batch- und Adsorptionstests

Batchtest

Zur Bestimmung der Stoffströme von Fullerenen wurden Schlammproben aus einer der bereits beprobten Kläranlagen verwendet und mittels Batchtest wurde das Adsorptionsverhalten von 1mg/L dotierten Fulleren C₆₀ in Belebtschlamm- und Ablaufproben innerhalb einer Woche (Tag 0, 1, 4 und 7) untersucht. Fulleren C₆₀ wurde zum überwiegenden Teil an den Belebtschlamm adsorbiert und war im Ablauf nicht nachweisbar (siehe Tabelle 26 und Abbildung 24).

Tabelle 26: Ergebnisse der Belebtschlamm (BB)- und Ablaufproben mit/ohne C₆₀-Dotierung des Batchtests (n.n.: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

Einheit	ng/g TM	ng/L
NG	2.0	1.3
BG	4.0	2.5
<hr/>		
Belebtschlamm vor C ₆₀ -Dosierung (Tag0 (T0))	n.n.	
Ablauf von BB- T0		n.n.
Belebtschlamm mit 1mg/L C ₆₀ (Tag1 (T1))	750000	
Ablauf von BB-T1		n.n.
Belebtschlamm mit 1mg/L C ₆₀ (Tag4 (T4))	930000	
Ablauf von BB-T4		n.n.
Belebtschlamm mit 1mg/L C ₆₀ (Tag7 (T7))	1000000	
Ablauf von BB-T7		n.n.

Batchtest Belebtschlamm- und Ablaufproben mit/ohne C₆₀-Dotierung

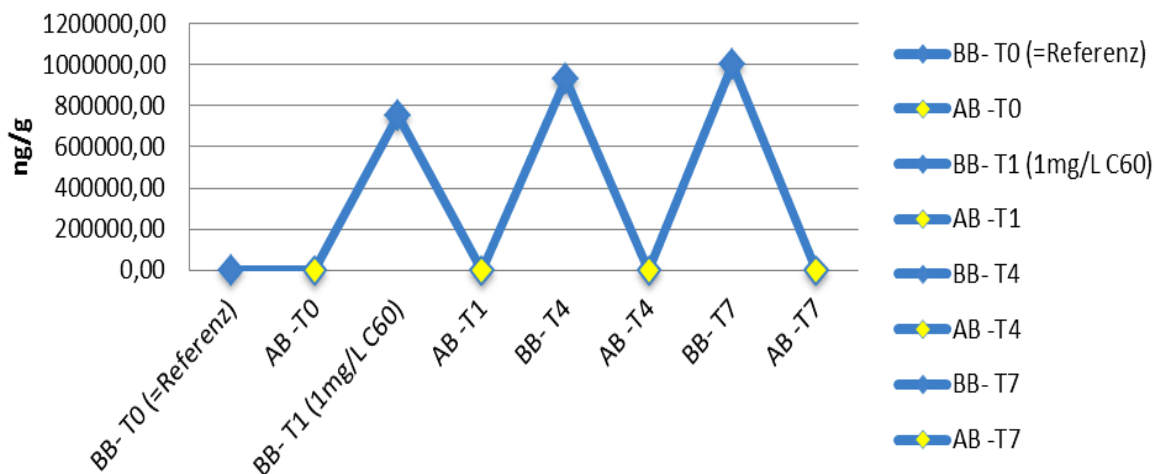


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Batchtests mit 1mg/L C₆₀-Dotierung in Belebtschlamm (BB)- und Ablaufproben (AB) innerhalb von 0, 1, 4 und 7 Tagen mittels Excel 2015 ausgewertet. (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

Adsorptionstest

Um das Adsorptionsverhalten von Fullerenen an Belebtschlamm und Ablauf zu analysieren, wurde der Schlamm einer der beprobten Kläranlagen für diese Untersuchung herangezogen. Unter Berücksichtigung der Adsorptionskinetik bei unterschiedlichen Verhältnissen von Adsorbens und Adsorbanten wurden Ansätze mit unterschiedlichem Trockensubstanzgehalt (TS) der Belebtschlammprobe (BB) untersucht und nachfolgend aufgelistet.

- Nullprobe ohne C_{60} -Dosierung (Belebtschlammprobe mit Original-Trockensubstanz der Kläranlage)
- TS-BB: Original-Trockensubstanz der Kläranlage mit 1mg/L C_{60} Dosierung und Ablaufprobe
- Doppelte TS: Belebtschlamm der TS verdoppelt mit C_{60} Dosierung und Ablaufprobe
- Halbe TS: Belebtschlamm der TS auf die Hälfte verdünnt mit C_{60} Dosierung und Ablaufprobe
- Viertel TS: Belebtschlamm der TS auf 1:4 verdünnt mit C_{60} Dosierung und Ablaufprobe

Das Fulleren C_{60} war zum überwiegenden Teil an den Belebtschlamm akkumuliert und im Ablauf nicht nachweisbar, woraus zu schließen ist, dass nahezu die gesamte zudosierte Stoffmenge an den Belebtschlamm gebunden wurde (siehe Tabelle 27 und Abbildung 25). Die Untersuchungen bei unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten ließen jedoch keinen Rückschluss auf einen Zusammenhang zwischen Trockensubstanz und Adsorptionsverhalten zu, da der Großteil der zudosierten Nanomaterialien immer im Belebtschlamm zu finden war.

Tabelle 27: Ergebnisse der Belebtschlamm- und Ablaufproben mit/ohne C₆₀ Dotierung des Adsorptionstests (n.n: nicht nachweisbar) (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

Einheit	ng/g TM	ng/L
NG	2.0	1.3
BG	4.0	2.5
<hr/>		
Belebtschlamm ohne C ₆₀ -Dotierung	n.n.	
Ablauf von BB-TS ohne C ₆₀		n.n.
Belebtschlamm mit 1mg/L C ₆₀	1000000	
Ablauf von BB-TS		n.n.
Belebtschlamm mit C ₆₀ (doppelte TS)	360000	
Ablauf von BB-TSx2		n.n.
Belebtschlamm mit C ₆₀ (halbe TS)	730000	
Ablauf von BB-TS/2		n.n.
Belebtschlamm mit C ₆₀ (viertel TS)	1300000	
Ablauf von BB-TS/4		n.n.

Adsorptionstest mit/ohne C₆₀-Dotierung in Belebtschlamm- und Ablaufproben

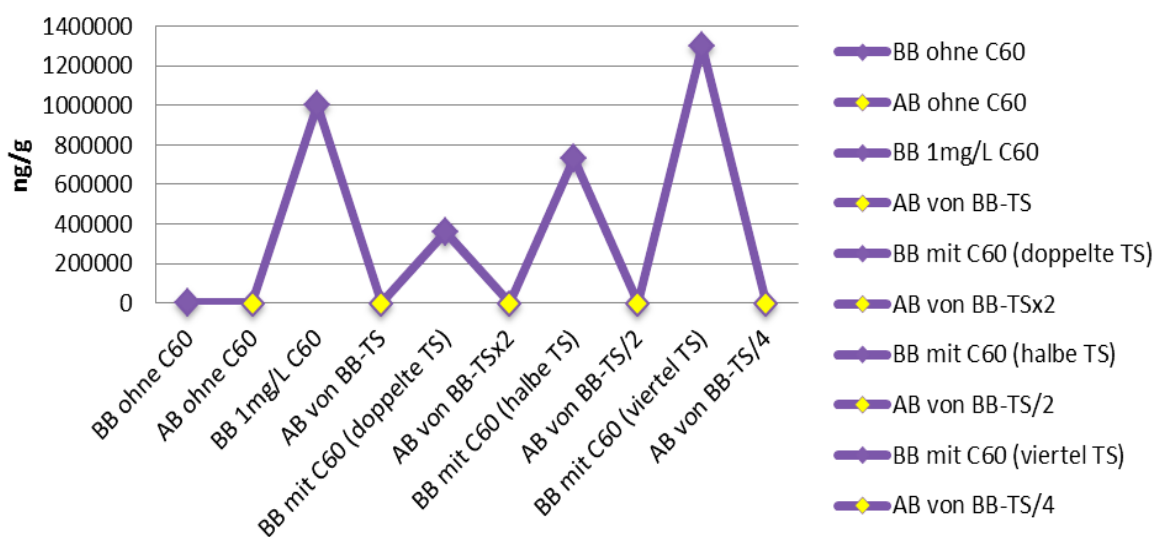


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Adsorptionstests mit 1mg/L C₆₀-Dotierung, doppelte TS, halbe TS und viertel TS in Belebtschlamm (BB)- und Ablaufproben (AB) mittels Excel 2015 ausgewertet. (Zakaria et al. 2017, nicht publizierte Ergebnisse)

Somit zeigen sowohl die Batchtests als auch die Adsorptionstests, dass eine Anreicherung im Klärschlamm erfolgt und der Stoffaustrag bei der Abwasserreinigung über den Klärschlamm den relevanten Entfernungsprozess darstellt. Eine Verlagerung der Nanopartikel über die Klärschlammverwertung (z.B. landwirtschaftliche Klärschlammverwertung, Nutzung von Klärschlammkomposten) in andere Umweltkompartimente (z.B. Böden) ist daher nicht auszuschließen.

3.7 Ergebnisse von Fullerenen in kosmetischen Produkten

Wie bereits in Kapitel 2 erwähnt, konnten nicht alle kosmetischen Produkte mit der herkömmlichen Extraktionsmethode für Festproben aufgearbeitet werden, da der hohe Fettanteil in manchen Cremes zu deutlich schlechteren Wiederfindungen in Kosmetika im Vergleich zu Klärschlammproben führte, dies berichten auch Benn et al. 2011. Sie verwendeten 2011 für ihre Wiederfindungsversuche eine Sonnencreme (SkinCeuticals, Garland, TX), bei der vermerkt war, dass keine Fullerene enthalten waren und fanden bei ihren Extraktionsversuchen 100% wieder. Als Blindwert habe ich eine inhaltlich ähnlich aufgebaute Creme (Diadermine Gesichtsschmierung) ohne Fullerenzusatz verwendet. Unter Verwendung der Extraktion und zusätzlicher Carrez-Klärung wurden viel bessere Ergebnisse erzielt und eine bis zu 80%ige Wiederfindung erreicht [146]. Abbildung 26 zeigt den Vergleich bei Probe 5 mit und ohne Carrez-Klärung und verdeutlicht die Verbesserung der Extraktionsmethode unter Verwendung der Carrez-Klärung.

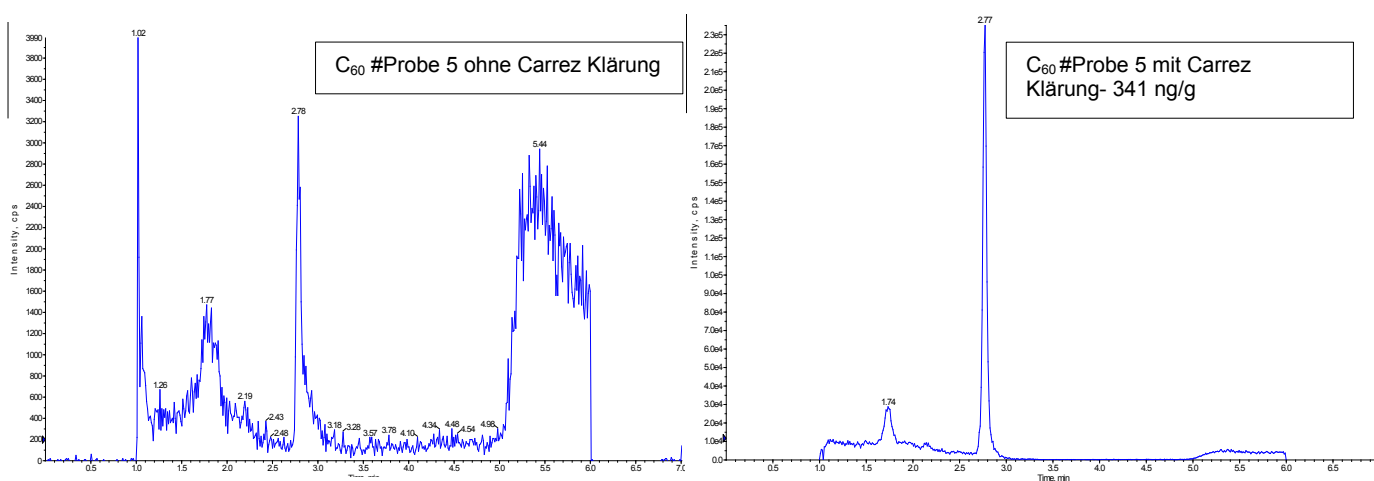


Abbildung 26: Probe 5 ohne Carrez-Klärung (links) und mit Carrez-Klärung (rechts) mittels AB Sciex Analyst Version 1.6.1. dargestellt (Zakaria et al. 2017)

Insgesamt wurden 11 kosmetische Produkte untersucht, von denen die Proben 1, 4, 6, 8 und 9-11 mittels herkömmlicher Extraktionsmethode aufgearbeitet und die Proben 2, 3, 5 und 7 zusätzlich mittels Carrez-Klärung aufgereinigt wurden. Anschließend wurden alle Proben mit den optimierten chromatographischen Bedingungen der etablierten Methode analysiert und folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 28 und Abbildung 27) erzielt.

Tabelle 28: Ergebnisse der 11 kosmetischen Produkte (n.n.: nicht nachweisbar)
(Zakaria et al. 2017)

Bezeichnung	C₆₀	C₇₀	NMFP
Einheit	ng/g	ng/g	ng/g
NG	0.1	0.2	0.1
BG	0.2	0.4	0.2
(1) EviDenS de Beauté- The Brightening Sunscreen (SPF 25) 30ml	9.0	0.5	n.n.
(2) EviDenS de Beauté- The Brightening Regenerating Hand & Nail Cream 75ml	n.n.	n.n.	n.n.
(3) EviDenS de Beauté- The Intensive Brightening Mask 4x30ml	25.0	6.0	n.n.
(4) EviDenS de Beauté- The Brightening Body Lotion 200ml	22	2.0	n.n.
(5) EviDenS de Beauté- The Brightening Cream 30mL	341	11	n.n.
(6) Dr. Brandt- Anti Aging Lineless cream 50g	51	n.n.	n.n.
(7) Dr. Brandt- Laser Lightning Night Cream 50g	127	42	n.n.
(8) Dr. Brandt- Laser Lightning Day Lotion 50g	122	49	n.n.
(9) Shungit Shampoo gegen Haarausfall 300ml	n.n.	n.n.	n.n.
(10) Shungit Haarmaske für fülliges Haar 220ml	0.2	n.n.	n.n.
(11) Shungit Gel für die Gelenke 75ml	n.n.	n.n.	n.n.

Fullerene in kosmetischen Produkten

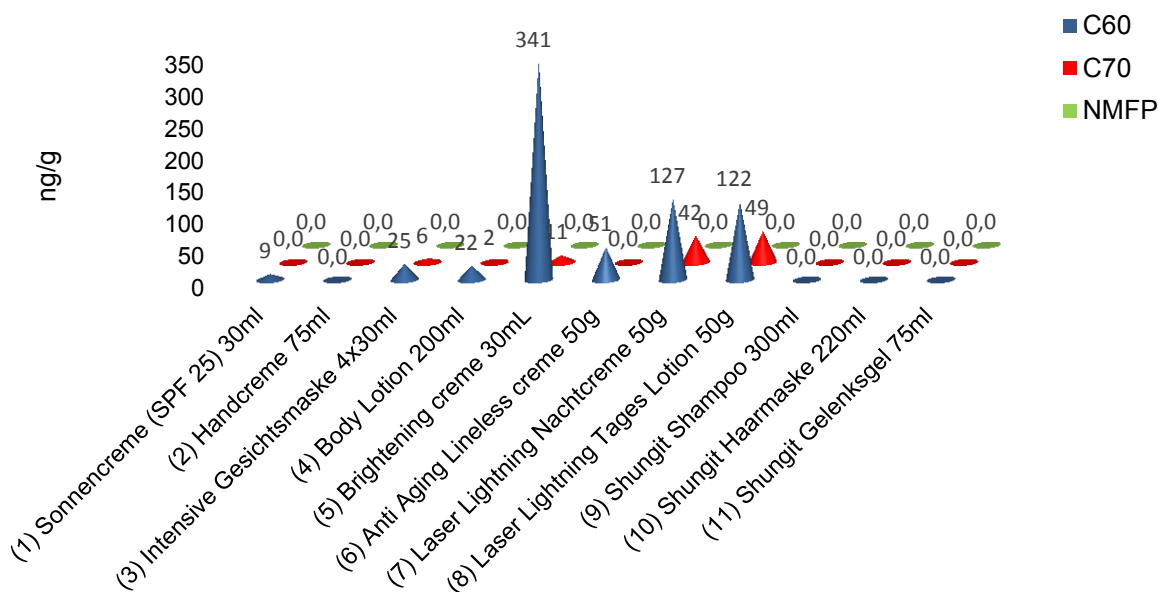


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Ergebnisse der 11 kosmetischen Produkte mittels Excel 2015. C₆₀ Werte sind in blau (erste Zeile), C₇₀ Werte in rot (zweite Zeile) und NMFP Werte in grün (dritte Zeile) angezeigt. Alle Ergebnisse sind in ng/g angegeben. (Zakaria et al. 2017)

Mit dieser Methode wurde für C₆₀ und NMFP eine BG von 0.2 ng/g und eine NG von 0.1 ng/g und für C₇₀ eine BG von 0.4 ng/g und eine NG von 0.2 ng/g erreicht. In 8 von 11 Proben wurden Konzentrationen oberhalb der NG bei C₆₀ und C₇₀ detektiert, in 3 Produkten waren keine Fullerene nachweisbar, wie in Tabelle 28 ersichtlich [146].

4 DISKUSSION

Fullerene gehören zur Klasse der kohlenstoffhaltigen Nanomaterialien [130]. Sie werden aufgrund ihrer Stabilität und breiten Palette an Modifikationsmöglichkeiten vielen Verbraucherprodukten zugesetzt, wie beispielsweise Kosmetikprodukten, Sportartikeln, Solarzellen, etc. [152]. Mit der Zunahme dieses Verbrauches ist auch eine vermehrte Emission und Immission von Nanopartikeln in die Umwelt und damit die Exposition von Lebewesen einschließlich des Menschen gegenüber diesen Teilchen zu erwarten. Leider sind die Exposition gegenüber den verschiedensten Nanopartikeln und das Ausmaß einer möglichen Belastung der Umwelt und des Menschen derzeit weitgehend unbekannt, nicht zuletzt aufgrund fehlender Messverfahren und Datenlage.

Auch ist der toxische Effekt dieser Nanopartikel nicht außer Acht zu lassen, besonders mit dem vermehrten Verbrauch an fullerenhaltigen Produkten. Einige Studien bewiesen einen zytotoxischen Effekt im Mausmodell [140, 49, 120, 63, 114].

Nanomaterialien fließen auch immer mehr in die Gesetzgebung wie z.B. in die Kosmetik- oder Biozid-Verordnung ein und seit Mitte 2013 gibt es in Europa eine Melde- und Kennzeichnungspflicht von Nanomaterialien (EU-Kosmetikverordnung, VO-EG Nr. 1223/2009). Arbeitsgruppen bei der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA) sowie CARACAL befassen sich derzeit mit der verbesserten Integration von Nanomaterialien in die Chemikalien-Verordnung REACH [146].

Dies macht ein besseres Verständnis und eine Prüfung über den Einsatz von Fullerenen immer notwendiger. Nicht zuletzt weil in vielen Studien nennenswerte Messwerte an Fullerenkonzentrationen in Klärschlamm- und Abwasserproben in manchen Teilen Europas bestimmt wurden. Beispielsweise fanden *Farre et al.* (2010) in Spanien 0,5ng/L-67µg/L an C₆₀, C₇₀ und NMFP wieder. Ebenso konnten *Sanchis et al.* (2011) in der Atmosphäre des Mittelmeeres von Barcelona, Istanbul und Alexandria Werte von 0.06-0.48 ng/m³ nachweisen. In Frankreich identifizierten *Bruchet et al.* (2013) in einer

aus fünf untersuchten Kläranlagen Fullerene. *Emke et al.* (2015) bestätigten einen Wert von 20ng/L in spanischen Abwasserproben.

Daher ist die Hauptmotivation dieser Studie, die erstmalige Untersuchung von Fullerenen in Österreich und die Aufklärung, in welchen Umweltmedien diese vorkommen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Fulleren C₆₀, C₇₀ und NMFP entwickelt.

Für die Entwicklung der LC-MS/MS-Methode und unter Verwendung einer negativen Elektrosprayquelle (ESI) waren die Optimierung der substanzabhängigen MS-Parameter mittels Infusion (Declustering Potential, Entrance Potential, Collision Energy, Collision Cell Exit Potential), der chromatographischen Trennparameter (Flussrate, Fließmittelzusammensetzung und Gradient) und der quellenabhängigen MS-Parameter (Curtain Gas flow, Ion Source Gas 1 und Ion Source Gas 2, Ion Spray Transfer Voltage, Interface Heater, Vaporizer Temperature und Collision Gas) mittels Fließinjektionsanalyse notwendig.

Für jedes Fulleren wurden die substanzabhängigen MS-Parameter mittels Infusion optimiert (Ergebnisteil-Tabelle 18), um eine maximale Signalintensität zu erreichen. Aufgrund der chemischen Stabilität der Fullerene konnten diese teilweise nicht fragmentiert werden, weswegen die Vorläufer Ionen (Q1) auch als Fragment Ionen (Q3) dienen (Quasi-MRM-Übergänge), wie auch in der Studie von *Farre et al.* (2010) berichtet. Für Fullerene C₆₀ (720.6->720.6) und C₇₀ (840.1->840.1) wurden keine Massenübergänge bestimmt, da sie nicht fragmentiert werden. Für NMFP wurde ein Massenübergang (777.1->720.1) bestimmt.

Bei der Optimierung der chromatographischen Trennung wurde versucht, die idealste Kombination von Trennsäule und Laufmittelzusammensetzung zu finden. Dabei erwies sich die C18-Säule laut *Farre et al.* (2010) bezüglich Elutionsverhalten, Regenerierbarkeit und Stabilität als beste Wahl und konnte auch in dieser Studie alle gesuchten Substanzen chromatographisch voneinander trennen [27]. Als Elutionsmittel wurde Toluol gewählt, da sich dieses nach *Korobov et al.* (2001) im Vergleich zu Benzol oder Wasser als besseres Elutionsmittel erwies und zwar mit einer Löslichkeit von 3,89mmol/L

für C₆₀ und 1,67mmol/L für C₇₀ [50]. Die zu untersuchenden Substanzen konnten auch hier nahezu vollständig mittels Toluol eluiert werden.

Als Eluenten der mobilen Phase dienten Toluol und Methanol (LC/MS grade) im Verhältnis 40:60. Vergleichsweise verwendeten *Li et al.* (2012) eine Zusammensetzung von 50:50 an Toluol und Methanol in ihrer Arbeit, welche ähnliche Ergebnisse aufwiesen. Obwohl *Farre et al.* (2010) für ihre Analysen eine isokratische Elution verwendeten, zeigte sich, dass die Anwendung eines Gradienten eine vergleichsweise bessere Signalintensität des Peaks bewirkte und man hier von einer Optimierung der LC-Methode sprechen kann.

Für die Einstellung der quellenabhängigen MS-Parameter wurden mittels Fließinjektion verschiedene Varianten aller Quellparameter ausgetestet und die optimalsten Bedingungen festgelegt, siehe im Ergebnisteil-Tabelle 19. Verglichen mit *Farre et al.* (2010), arbeiteten sie teilweise unter ähnlichen Bedingungen.

Die Validierungsparameter (Spezifität, Sensitivität, Linearität, Genauigkeit, Präzision, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze, Wiederfindung und Stabilität) der entwickelten Methode erfüllten alle von einer Basisvalidierung geforderten Gütekriterien und wurden nach DIN 32645 ermittelt. Bei der Bestimmung der Präzision (wird durch die Standardabweichung der Messwerte angegeben (Pum J. 2008)) lag die Standardabweichung (STABW%) unter 10%. Die Linearität wurde durch den Determinationskoeffizienten (R^2), welcher sich im Idealfall dem Wert 1.0 annähert, zwischen 0.99904 und 0.99960 bestimmt. Die Methode hat sich bei der Anwendung in der Routine bewährt. Sie war stabil und lieferte zuverlässige Werte.

Für die Extraktion von Fullerenen aus Wasser- und Abwasserproben wurde die Flüssig-Flüssig-Extraktion gewählt, da nach Studien von *Benn et al.* (2010, 2011) und *Astefanei et al.* (2012) zufolge diese Methode eine deutlich effizientere Extraktion von Fullerenen aus Wasser darstellt als die mit Festphasenextraktion. Zudem hat die Flüssig-Flüssig-Extraktion den Vorteil, dass stark partikelhaltige Abwässer ohne vorige Filtration extrahiert und mögliche an den Partikeln adsorbierte Zielsubstanzen mit herausgelöst werden können. Vergleicht man beide Methoden, so zeigte die SPE eine Wiederfindungsrate von $43 \pm 4\%$ und LLE $80 \pm 6\%$ für C₆₀.

Für die Prozesskontrolle und zuverlässige Reproduzierbarkeit der Methode wurde der isotopenmarkierte Surrogatstandard $^{13}\text{C}_{60}$ Fulleren eingesetzt, der auch schon bei den Analysen von *Farré et al. (2010)* und *Sanchis et al. (2011)* erfolgreich angewendet wurde.

In den LLE-Extraktionsversuchen mit gespikten C_{60} , C_{70} und NMFP Wasserproben wurde eine rund 80% Wiederfindung berechnet [146]. *Kolkman und Emke (2013)* beschrieben die Wiederfindungen in Wasser in einer ähnlichen Größenordnung. Auch die NG und BG sind verglichen mit *Kolkman et al. (2013)* für C_{60} in Wasser etwa in der gleichen Größenordnung wie dort beschrieben (NG 0.28 ng/L und BG 0,57 ng/L). Die Substanzen zeigten bei 1:10 Verdünnungen deutlich bessere Wiederfindungsraten als im unverdünnten Zustand. Dies deutet auf einen starken Matrixeinfluss bei der Messung hin.

Es wurde ebenfalls kontrolliert, ob die Lagerung und das Auftauen und wieder Einfrieren Auswirkungen auf die Stabilität der Fullerene und auf die Ergebnisse haben. Über einen Zeitraum von drei Wochen wurden diese Stabilitätstests (Leitungswasser mit 1ng/mL C_{60} -Dotierung in Alu- und Glasflaschen) gemacht. Die Resultate zeigten, dass bei den Wiederfindungen zwischen Glas- und Alufaschen ein signifikanter Unterschied besteht, wobei in Alufaschen höhere Konzentrationen wiedergefunden wurden als in den Glasflaschen. Zunächst wurde nach der ersten Woche der Lagerung ein Abfall der Konzentrationen gemessen. Darauf folgende Messungen in den Wochen danach zeigten immer konstante Werte (siehe Ergebnisteil-Tabelle 23) was auf eine Aggregation der Fullerene hindeutet. Die Methode erwies sich als stabil.

Nach Entwicklung und Optimierung der MS-Methode wurden für den Zweck der Untersuchung ausgewählter Fullerene (C_{60} , C_{70} und NMFP) aus fünf österreichischen Kläranlagen, 24 Abwasser- und Klärschlammproben in Zusammenarbeit mit dem NanoDESTINARA Projekt 2015, analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Konzentrationen an Fullerenen in den geprüften Abwasser- und Klärschlammproben unterhalb der Nachweisgrenze lagen (siehe Ergebnisteil-Tabellen 24 und 25) [146], was darauf schließen lässt, dass der Einsatz dieser Nanopartikel für die österreichische Bevölkerung noch kein Risiko darstellt. Im Abwasser waren BG und NG für alle Fullerene erwartungsgemäß niedriger als im Klärschlamm.

Warum in Ländern wie Spanien, Frankreich, etc. bedeutende Fullerenkonzentrationen gemessen werden konnten, liegt womöglich dem höheren Verbrauch von Fullerenen in diesen Ländern zugrunde oder ist auch von der Reinigungsqualität der Kläranlagen abhängig.

Eine relative Abschätzung, wie eine menschliche Exposition von Fullerenen in die Umwelt durch das Abwassersystem aussieht, haben Benn und Westerhoff 2008 in einem Modell (Transport von Fullerenen in einer Kläranlage unter Berücksichtigung des Steady-State-Massenbilanzmodells und nicht linearer Adsorption) mit folgender Formel beschrieben.

$$C = C_0 - \left(\frac{X\tau KC^{1/n}}{\theta} \right)$$

C...Ablaufkonzentration von Fullerenen

C₀...einfließende Fulleren-Konzentration

K und 1/n...Freundlich-Adsorptionsparameter

X, τ und θ...variable Betriebsparameter einer Kläranlage

Angenommen, 10000 Menschen verbrauchen je ~0.3µg/g C₆₀ (höchste Konzentration in getesteten kosmetischen Produkten, siehe Tabelle 31) pro Tag (Zustrom von C₆₀ 1,6 ng/L nach Benn et al. 2013) unter Berücksichtigung des Steady-State-Massenbilanzmodells mit einer Kapazität von 3,79 Millionen L/Tag in einer Kläranlage und geschätzten Mittelwerten aus bisherigen Studien für Betriebs- und Freundlichadsorptionsparametern (X=2000mg/L τ=720Minuten, θ=7200 Minuten, K=0,17 und 1/n= 0,5) würde die theoretisch vorhersagbare Ablaufkonzentration von C₆₀ bei ~6×10⁻⁸ ng/L liegen.

Neben der Analyse von Abwasser- und Klärschlammproben wurden auch gemeinsam mit dem NanoDESTINARA Projekt 2015 Batch- und Adsorptionstests mit Fulleren C₆₀ durchgeführt und bestätigten die Vermutung, dass Fullerene zum überwiegenden Teil an den Belebtschlamm akkumulieren und deshalb im Ablauf nicht nachweisbar sind. *Kaegi (2011), Maier et al. (2012) und Wang et al. (2012)* kommen zum gleichen Schluss bei der relativen Verteilung zwischen Belebtschlamm und Ablauf. Bei der Abwasserreinigung werden Nanopartikel hauptsächlich im Belebtschlamm gebunden. Aufgrund

dieser beobachteten Anreicherung der Nanomaterialien im Belebtschlamm kann dieser als die relevante Stoffsenke identifiziert werden. Über die Klärschlammverwertung (landwirtschaftliche Klärschlammverwertung, Verwendung von Klärschlammkompost) kann man vermuten, dass in weiterer Folge ein Transfer von Fullerenen in andere Umweltkompartimente erfolgen könnte und müsste daher weiter erforscht werden.

Ziel dieser Studie war es auch, die Konzentrationen von elf kosmetischen Produkten aus Österreich, die laut Firmenangaben Fullerene enthalten, mit der optimierten Methode zu analysieren. Jedoch konnten nicht alle dieser Proben mit der herkömmlichen LLE-Extraktionsmethode für Festproben aufgearbeitet werden. Der hohe Fettanteil in vier Cremes führte zu deutlich schlechteren Wiederfindungen im Vergleich zu Klärschlammproben. Dies berichteten auch *Benn et al.* (2011). Sie konnten 2011 bei ihren Extraktionsversuchen 100% Wiederfindung zeigen. Ähnliche Wiederfindungsraten konnten bei Extraktionen in hydrophilen Kosmetikprodukten erzielt werden. Eine Verbesserung der Extraktionsmethode konnte unter zusätzlicher Verwendung der Carrez-Klärung ausschließlich bei hydrophoben Kosmetika, mit bis zu 80% Wiederfindung, erreicht werden. Eine weitere wichtige Komponente für die Extraktion von Fullerenen, besonders aus sehr fettreichen Kosmetika, stellte der Einsatz von Eisessigsäure unter vollständiger Verdampfung des Extrakts mittels Stickstoff dar. Laut *Benn et al.* (2011) wird bei dieser Anwendung die Bildung einer Emulsion verhindert und eine Phasentrennung, sowie die Signalintensität der Analyten deutlich verbessert. Dies konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden.

Mit der optimierten Methode wurden in 8 der 11 Proben Konzentrationen oberhalb der NG für C₆₀ und C₇₀ zwischen 10ng/g und 340ng/g detektiert, in 3 Produkten waren keine Fullerene nachweisbar [146]. *Benn et al.* (2011) fanden ebenfalls Fullerene in einer ähnlichen Größenordnung wie in den getesteten Cremes wieder. Mit dieser Methode wurde für C₆₀ und NMFP eine BG von 0.2 ng/g und NG von 0.1 ng/g und für C₇₀ eine BG von 0.4 ng/g und NG von 0.2 ng/g erreicht. *Benn et al.* (2011) berechneten für C₆₀ und C₇₀ eine BG von 12.0 ng/g und NG von 3.0 ng/g. Verglichen mit der vorliegenden Literatur konnte die Nachweisgrenze für die getesteten Substanzen unterschritten werden.

Der Einsatz von C₆₀ und C₇₀ Fullerenen in Kosmetikprodukten stellt somit eine mögliche Eintrittsstelle in die Umwelt dar. Nun stellt sich die Frage der Anreicherung im Menschen bzw. in der Umwelt, besonders da Fullerene nicht biologisch abbaubar sind.

4.1. Relevanz der gefundenen Konzentrationen

Abschließend wurden auch der derzeitige Stand der toxikologischen Datenlage, sowie die Bewertung einer toxikologischen Gefahr für Mensch und Umwelt, die von fullerenhaltigen Produkten ausgeht, diskutiert. Die Abschätzung des toxikologischen Risikos wird aufgrund der uneinheitlichen Studienergebnisse und mangelnden Übersicht zur Freisetzung dieser Nanopartikel aus Produkten erschwert. Allgemein kommen für die Aufnahme von toxischen Fullerenen in den Organismus der Atemtrakt, die Haut und der Magen-Darm-Trakt in Betracht und können zu verschiedenen Dosis-Wirkungs-Effekten führen.

Bei den gemessenen Werten von 10-340ng/g kann man von keiner zytotoxischen Wirkung ausgehen, da vergleichsweise in verschiedenen anderen Studien die Effekte bei höheren Konzentrationen gefunden wurden. Auch *Gottschalk et al.* (2009) meinten, dass die Fullerenwerte in der Umwelt als derzeit so niedrig einzustufen sind, dass von keinem Umweltrisiko zu sprechen sei.

Beispielsweise bewiesen *Tsuchiya et al.* (1996) bei ihrer Zytotoxizitätstestung, dass nach intraperitonealer Verabreichung von 50mg/kg Fullerenen in trächtige Mäuse, toxische Effekte auf die Embryonen ausgelöst wurden [120]. *Levi et al.* (2006) zeigten jedoch in ihrer Studie, dass unbehandeltes C₆₀ für Zellen nicht toxisch ist [63]. *Snyder et al.* (2015) zeigten wiederum in ihrer Studie mit trächtigen und säugenden Ratten, die ¹⁴C₆₀ (0,2mg/kg) markierten Fullerenen ausgesetzt wurden, dass die Föten nach 24 Stunden bzw. höchstens 8 Tage nach der Injektion verstarben.

Zu bedenken ist jedoch, dass Fullerene in einer Matrix eingebettet sind, während in der Zytotoxizitätstestung die reinen Partikel getestet werden. Aus diesen Gründen scheint eine zytotoxische Wirkung bei den gemessenen Mengen sehr unwahrscheinlich.

Bei den gemessenen Werten stellt sich vielmehr die Frage, ob diese Mengen antioxidative Wirkungen besitzen können. *Kong und Zepp* (2012) haben eine Radikalfänger Aktivität in Konzentrationen von (8.3µM) 6µg/g festgestellt, immer noch höhere Konzentrationen, als in den kosmetischen Proben gemessen wurde [49]. Auch *Yin, Lao, Fu et al.* (2009) stellten einen signifikanten Schutz von A549 Zellen und Ratten-Hirnkapillarendothelzellen vor H₂O₂ Belastung erst ab (50µM) 40µg/g fest. Daher ist zu vermuten, dass die gemessenen Konzentrationen an Fullerenen möglicherweise überhaupt keine Wirkung entfalten.

Auch bei der Wirkung auf die Umwelt ist von keiner Gefahr zu sprechen. Nach Toxizitätstestungen von *Zhu und Oberdörster et al.* (2006) wurden 800 ng/g als LD₅₀ in *Daphnia magna* bestimmt [139]. Oberdörster zeigte schon 2004, dass 500ng/g oxidativen Stress in den Hirnen von Forellenbarschen verursachen können [87]. Da die Tiere aber nicht direkt mit den Cremes in Kontakt kommen, sind diese Werte höchstwahrscheinlich unbedenklich.

In Zukunft müssten Überlegungen angestellt werden, wie Materialien und Testverfahren standardisiert und normiert werden können, damit zukünftige Daten vergleichbar werden. Daher ist die Entwicklung standardisierter, charakterisierter Referenzpartikel für toxikologische Versuchszwecke, sowie die Identifizierung der Partikeleigenschaften und deren Messmethoden von großer Bedeutung [23, 88, 123].

Um eine korrekte Dosisabschätzung zu ermöglichen und auch um Experimente mit realistischen Dosen durchführen zu können, müssen passende Dosis-Maßeinheiten bestimmt werden (Lison et al. 2008; Wahrheit et al. 2007; Rushton et al. 2010). Beispielsweise wird für die Dosis-Wirkungs-Beziehung im Bereich der Nanotoxikologie, laut *Borm et al.* (2006) die Fläche- und Oberflächenreaktivität als wichtigste Maße für die Dosisberechnung in der Toxizität von Nanopartikeln vorgeschlagen [13]. Allerdings stellt sich derzeit auch die Frage, ob neben diesen Parametern ebenfalls die Form, die physikalischen und die chemischen Eigenschaften, die Toxizität von Nanopartikeln und somit ihre Dosiswirkung beeinflussen können.

Daher sollten im Mittelpunkt zukünftiger Testverfahren toxikologische Studien zur Ermittlung konkreter Effekte von Fullerenen auf Zell- und Gewebetypen in

der Lunge, dem kardiovaskulären System, dem Gehirn, der Leber und auf Plazenta/Fötus stehen. Dazu ist die Durchführung von in vivo- und in vitro-Studien mit direkter Verabreichung von Nanopartikeln in einem weiten Dosisbereich, inklusive zu erwartender realistischer Exposition notwendig, um auch eine Dosis-Wirkungsbeziehung erstellen zu können.

Ebenso wichtig ist auch die Abschätzung der Rolle des oxidativen Stresses ausgelöst durch Fullerene als Verursacher von Entzündungen, Genotoxizität und Auswirkungen auf andere Zielorgane als der Lunge.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Adelmann P, Armbruster JF, Roth M, Romberg HA, Sing M, Schmidt M, Schweiss P, Golden MS, Fink J, Michel RH, Rockenberger J, Hennrich F, Kappes MM. Electron energy-loss and photoemission studies of solid C84. *Phys Rev B Condens Matter*. 1994 Aug 15;50(7):4933-4936. PubMed PMID: 9976815.
- (2) Astefanei A, Núñez O, Galceran MT. Non-aqueous capillary electrophoresis separation of fullerenes and C60 fullerene derivatives. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Aug;404(2):307-13. doi: 10.1007/s00216-012-6041-4. Epub 2012 Apr 24. PubMed PMID: 22526671.
- (3) Babynin EV, Nuretdinov IA, Gubskaia VP, Barabanshchikov BI. [Study of mutagenic activity of fullerene and some of its derivatives using His+ reversions of *Salmonella typhimurium* as an example]. *Genetika*. 2002 Apr;38(4):453-7. Russian. PubMed PMID: 12018160.
- (4) Baenitz, Michael (1999). "Supraleitung in Fulleren Verbindungen". *Physik in unserer Zeit* 30(4): 167(172)
- (5) Baierl T, Seidel A, Drosselmeyer E, Hippeli S. Comparison of immunological effects of Fullerene C60 and raw soot from Fullerene production on alveolar macrophages and macrophage like cells in vitro. *Exp Toxicol Pathol*. 1996 Nov;48(6):508-11. PubMed PMID: 8954334.
- (6) Baun A, Sørensen SN, Rasmussen RF, Hartmann NB, Koch CB. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C(60). *Aquat Toxicol*. 2008 Feb 18;86(3):379-87. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.11.019. PubMed PMID: 18190976.
- (7) Benn TM, Pycke BF, Herckes P, Westerhoff P, Halden RU. Evaluation of extraction methods for quantification of aqueous fullerenes in urine. Epub 2010 Dec 12. PubMed PMID: 21153587; PubMed Central PMCID: PMC3711233.
- (8) Benn TM, Westerhoff P, Herckes P. Detection of fullerenes (C60 and C70) in commercial cosmetics. *Environ Pollut*. 2011 May;159(5):1334-42. doi:10.1016/j.envpol.2011.01.018. PubMed PMID: 21300421; PubMed Central PMCID: PMC3725139.
- (9) Bezmel'nitsyn, V.N.; Elets'kii, A.V.; Okun', M.V. (1998). "Fullerenes in solutions". *Physics-Uspekhi* 41 (11): 1091.
- (10) Blickley TM, McClellan-Green P. Toxicity of aqueous fullerene in adult and larval *Fundulus heteroclitus*. *Environ Toxicol Chem*. 2008 Sep;27(9):1964-71. PubMed PMID: 19086320.
- (11) Bobyl'ev AG, Okuneva AD, Bobyl'eva LG, Fadeeva IS, Fadeev RS, Salmov NN, Poddubnaia ZA. [Study of cytotoxicity of fullerene C60 derivatives]. *Biofizika*. 2012 Sep-Oct;57(5):746-50. Russian. PubMed PMID: 23136765.

- (12) Borm PJ, Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles—potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol*. 2004 May;4(5):521-31.Review. PubMed PMID: 15503438.
- (13) Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhl-Busch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krut-Mann J, Warheit D, Oberdörster E.: „The potential risks of nano-materials: A review carried out for ECETOC”, Part. Fibre Toxicol. 3, 1-35 (2006)
- (14) Bruchet, A., P. Charles, M.-L. Janex Habibi and K. Glucina (2013). "Monitoring and treatment of selected nanoparticles." *Water Science and Technology* **68**(7): 1454-1460.
- (15) Budzikiewicz H.: Massenspektrometrie, 4. Auflage Wiley-VCH Weinheim New York Chichester Singapore, 1998 S. 28–30, ISBN 3-527-29381-7.
- (16) Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007 Dec;2(4):MR17-71. PubMed PMID: 20419892.
- (17) Canesi L, Ciacci C, Vallotto D, Gallo G, Marcomini A, Pojana G. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. *Aquat Toxicol*. 2010 Jan 31;96(2):151-8. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.017. PubMed PMID: 19900724.
- (18) Catalado F., P. Milani, T. Da Ros. "Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes
- (19) Chao CC, Hsu CM, Cui Y, Prinz FB. Improved solid oxide fuel cell performance with nanostructured electrolytes. *ACS Nano*. 2011 Jul 26;5(7):5692-6. doi: 10.1021/nn201354p. PubMed PMID: 21657222.
- (20) Chen YW, Hwang KC, Yen CC, Lai YL. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Jul;287(1):R21-6. PubMed PMID: 15191925.
- (21) Clara, M., Kreuzinger, N., Kulcsar, S., Liebmann, B., Mühlegger, S., Schaar, H., Vallant, B., Weiß, S.:Endbericht NanoDestinara 2015. FFG-Projekt: Intelligente Produktion und in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Wien
- (22) Curl, RF (1997), Nobel-Vortrag. *Angewandte Chemie*, 109(15): 1636-1647.
- (23) Dhawan A, Taurozzi JS, Pandey AK. 2006. Stable colloidal dispersion of C60 fullerenes in water: evidence for genotoxicity. *Environ Sci Technol* 40:7394–7401.
- (24) Dolan J.W., L.R. Snyder, *Troubleshooting LC Systems*, Humana Press Inc. 1989
- (25) Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJ. *Nanotoxicology. Occup Environ Med*. 2004 Sep;61(9):727-8. PubMed PMID: 15317911; PubMed Central PMCID: PMC1763673.
- (26) Elder ACP, Gelein R, Finkelstein JN, Cox C, Oberdörster G (2000) Pulmonary inflammatory response to inhaled ultrafine particles is modified by age, ozone exposure, and bacteria toxin. *Inhal Toxicol* 12:227–246

- (27) EPA: „Nanotechnology”, White Paper, US Environmental Protection Agency 100/B-07/001, Washington, DC (2007); www.epa.gov/osa/nanotech.htm
- (28) Fang J, Lyon DY, Wiesner MR, Dong J, Alvarez PJ. Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Environ Sci Technol*. 2007 Apr 1;41(7):2636-42. PubMed PMID: 17438827.
- (29) Farré M., Sandra Pérez a, Krisztina Gajda-Schrantz b, Victoria Osorio a, Lina Kantiani a, Antoni Ginebreda a, Damià Barceló a,c First determination of C60 and C70 fullerenes and N-methylfulleropyrrolidine C60 on the suspended material of wastewater effluents by liquid chromatography hybrid quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Hydrology* 383 (2010) 44–51
- (30) Fent K , Christen V, Capelle M. Silver nanoparticles induce endoplasmatic reticulum stress response in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Oct 15;272(2):519-28. doi: 10.1016/j.taap.2013.06.011. PubMed PMID: 23800688.
- (31) Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Togna A, Togna G. Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006 Mar;6(3):591-9. Review. PubMed PMID: 16573109.
- (32) Foley S, Crowley C, Smaïhi M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, Larroque C. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 31;294(1):116-9. PubMed PMID: 12054749.
- (33) Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM, Alemany LB, Tao YJ, Guo W, Ausman KD, Colvin VL, Hughes JB. C60 in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol*. 2005 Jun 1;39(11):4307-16. PubMed PMID: 15984814.
- (34) Förstner U. *Umweltschutztechnik*, Seite:225. (2008) ISBN: 978-3-540-77883-7
- (35) Frampton MW, Utell MJ, Zarebra W, Oberdörster G, Cox C, Huang LS, Morrow PE, Lee FE, Chalupa D, Frasier LM, Speers DM, Stewart J (2004) Effects of exposure to ultrafine carbon particles in healthy subjects and subjects with asthma. *Res Rep Health Eff Inst* 126:1–4
- (36) Dettmann J. *Fullerene: Die Bucky-Balls erobern die Chemie* (1994) S.51
- (37) Emke E, Herrero P, Bäuerlein PS, Emke E, Marcé RM, de Voogt P. Size and concentration determination of (functionalised) fullerenes in surface and sewage water matrices using field flow fractionation coupled to an online accurate mass spectrometer: method development and validation. *Anal Chim Acta*. 2015 Apr 29;871:77-84. doi: 10.1016/j.aca.2015.02.042. PubMed PMID: 25847164.
- (38) Frede W., *Handbuch für Lebensmittelchemiker: Lebensmittel Bedarfsgegenstände- Kosmetika- Futtermittel*. Springer Verlag, 08.01.2010-1281 Seiten (278)
- (39) Gamer AO, Leibold E, van Ravenzwaay E: „The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium oxide through porcine skin”, *Toxicol. In Vitro* 20(3), 301-307 (2006)

- (40) Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:2.
- (41) Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW, Nowack B. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environ Sci Technol.* 2009 Dec 15;43(24):9216-22. doi:10.1021/es9015553. PubMed PMID: 20000512.
- (42) Härtter S, Hiemke C. Column switching and high-performance liquid chromatography in the analysis of amitriptyline, nortriptyline and hydroxylated metabolites in human plasma or serum. *J Chromatogr B* 1992; 578: 273-282
- (43) Henry TB, Menn FM, Fleming JT, Wilgus J, Compton RN, Saylor GS. Attributing effects of aqueous C60 nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environ Health Perspect.* 2007 Jul;115(7):1059-65. PubMed PMID: 17637923; PubMed Central PMCID: PMC1913576.
- (44) Holčapek, M., Jirásko, R., Lísa, M., 2012. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A.* 1259: 3-15, URL: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2012.167.01.0001.01.DEU (Stand: 22.07.2014)
- (45) Huczko E, Conetta B, Bonner D, Valera L, Stickle T, Macko A, Fung-Tomc J. Susceptibility of bacterial isolates to gatifloxacin and ciprofloxacin from clinical trials 1997-1998. *Int J Antimicrob Agents.* 2000 Dec;16(4):401-5. PubMed PMID: 11118848.
- (46) Isaacson CW, Usenko CY, Tanguay RL, Field JA. Quantification of fullerenes by LC/ESI-MS and its application to in vivo toxicity assays. *Anal Chem.* 2007 Dec;79(23):9091-7. PubMed PMID: 17963360.
- (47) Isaacson CW, Kleber M, Field JA. Quantitative analysis of fullerene nanomaterials in environmental systems: a critical review. *Environ Sci Technol.* 2009 Sep 1;43(17):6463-74. Review. PubMed PMID: 19764203; PubMed Central PMCID: PMC2749266.
- (48) Jander-Blasius, Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie, 8. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 1969.
- (49) Jia L. Nanoparticle Formulation Increases Oral Bioavailability of Poorly Soluble Drugs: Approaches Experimental Evidences and Theory. *Curr Nanosci.* 2005 Nov 1;1(3):237-243. PubMed PMID: 19865587; PubMed Central PMCID: PMC2768293.
- (50) Johansen A, Pedersen AL, Jensen KA, Karlson U, Hansen BM, Scott-Fordsmand JJ, Winding A. Effects of C60 fullerene nanoparticles on soil bacteria and protozoans. *Environ Toxicol Chem.* 2008 Sep;27(9):1895-903. PubMed PMID: 19086316.
- (51) Kamat JP, Devasagayam TP, Priyadarsini KI, Mohan H, Mittal JP. Oxidative damage induced by the fullerene C60 on photosensitization in rat liver microsomes. *Chem Biol Interact.* 1998 Jul 24;114(3):145-59. PubMed PMID: 9839628.

- (52) Klaine SJ, Alvarez PJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem.* 2008 Sep;27(9):1825-51. Review. Erratum in: *Environ Toxicol Chem.* 2012 Dec;31(12):2893. PubMed PMID:19086204.
- (53) Kloefer A, Quintana JB, Reemtsma T. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J Chromatogr A.* 2005 Mar 4;1067(1-2):153-60. PubMed PMID: 15844520.
- (54) Kolb M., A. Bahr, S. Hippich und W. Schulz. Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 mit Hilfe eines Programms Calculation of Detection Limit, Identification Limit and Determination Limit according to DIN 32645 with the Aid of a Computer Programs. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 18 DEC 2006
- (55) Kolkman A, Emke E, Bäuerlein PS, Carboni A, Tran DT, ter Laak TL, van Wezel AP, de Voogt P. Analysis of (functionalized) fullerenes in water samples by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Anal Chem.* 2013 Jun 18;85(12):5867-74. doi: 10.1021/ac400619g. PubMed PMID: 23705858
- (56) Kong L, Zepp RG. Production and consumption of reactive oxygen species by fullerenes. *Environ Toxicol Chem.* 2012 Jan;31(1):136-43. doi: 10.1002/etc.711. PubMed PMID: 21994164.
- (57) Korobov, A. L., Yizhak Marcus, Allan L. Smith, M. V., Mirakyan, N. V. Avramenko, and E. B. Stukalin. *The Journal of Physical Chemistry B* 2001 105 (13), 2499-2506 DOI: 10.1021/jp0023720
- (58) Kostianen R, Kotiaho T, Kuuranne T, Auriola S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *J Mass Spectrom.* 2003 Apr;38(4):357-72. Review. PubMed PMID: 12717747. Copyright 2003 John Wiley & Sons, Ltd.
- (59) Krätschmer W.: *The story of making fullerenes*. In: *Nanoscale* 3, 2011, S. 2485–2489
- (60) Kreuter J, Gelperina S.: „Use of nanoparticles for cerebral cancer”, *Tumori* 94, 271-277 (2008)
- (61) Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A (2002) Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health* 65:1513–1530
- (62) Kromidas S., *Handbuch Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH Verlag, 2011 ISBN:978-3-527-32938-0
- (63) Kroto, HW et al. (1985), *Nature*, 318(6042): 162-163.
- (64) Krug HF (2005) Wirkung von synthetischen Nanopartikeln in Arbeits- und Umweltbereichen. unter <http://dialog-nanopartikel.de/06%20Krug.pdf>
- (65) Krug HF, Spohn P, Hirsch C, Hasler F, Bruinink A, Wick P. C60 fullerene: a powerful antioxidant or a damaging agent? The importance of an in-depth

- material characterization prior to toxicity assays. *Environ Pollut.* 2009 Apr;157(4):1134-9. doi: 10.1016/j.envpol.2008.08.013. PubMed PMID: 18824284.
- (66) Krüger A., *Neue Kohlenstoffmaterialien- Eine Einführung.* Seiten: 33-123 B.G. Verlag Springer
- (67) Lademann, J et al. (1999), *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12 (5): 247-56
- (68) Langa F., Nierengarten Jean- Francois, *Fullerenes: Principiles and Applications* (2011)
- (69) Lens M. Use of fullerenes in cosmetics. *Recent Pat Biotechnol.* 2009;3(2):118-23. Review. PubMed PMID: 19519567.
- (70) Levi N, Hantgan RR, Lively MO, Carroll DL, Prasad GL. C60-fullerenes: detection of intracellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects. *J Nanobiotechnology.* 2006 Dec 14;4:14. PubMed PMID: 17169152; PubMed Central PMCID:PMC1764419.
- (71) Li D, Lyon DY, Li Q, Alvarez PJ. Effect of soil sorption and aquatic natural organic matter on the antibacterial activity of a fullerene water suspension. *Environ Toxicol Chem.* 2008 Sep;27(9):1888-94. PubMed PMID: 19086207.
- (72) Li L., Huhtala S, Sillanpää M, Sainio P. Liquid chromatography-mass spectrometry for C60 fullerene analysis: optimisation and comparison of three ionisation techniques. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Jun; 403(7):1931-8. doi: 10.1007/s00216-012-6005-8. Epub 2012 Apr 24. PubMed PMID: 22526668.
- (73) Liang XJ, Chen C. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials.* 2009 Feb;30(4):611-21. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.061. PubMed PMID: 18986699.
- (74) Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ (2002) Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc* 61:123–130
- (75) Lovern SB, Strickler JR, Klaper R. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environ Sci Technol.* 2007 Jun 15;41(12):4465-70. PubMed PMID: 17626453; PubMed Central PMCID: PMC2556055.
- (76) Lucena R., M. Cruz-Vera, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Bioanalysis*, 2009, 1, 135-149.
- (77) Lucafò M, Gerdol M, Pallavicini A, Pacor S, Zorzet S, Da Ros T, Prato M, Sava G. Profiling the molecular mechanism of fullerene cytotoxicity on tumor cells by RNA-seq. *Toxicology.* 2013 Dec 6;314(1):183-92. doi: 10.1016/j.tox.2013.10.001. PubMed PMID: 24125657.
- (78) Lyon DY, Adams LK, Falkner JC, Alvarez PJ. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: effects of preparation method and particle size. *Environ Sci Technol.* 2006 Jul 15;40(14):4360-6. PubMed PMID: 16903271.
- (79) Marquardt, Siegfried G. Schäfer. *Lehrbuch der Toxikologie Gebundene Ausgabe – 1. Oktober 2003*

- (80) Mashino T, Okuda K, Hirota T, Hirobe M, Nagano T, Mochizuki M. Inhibition of *E. coli* growth by fullerene derivatives and inhibition mechanism. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999 Oct 18;9(20):2959-62. PubMed PMID: 10571155.
- (81) Mashino T, Nishikawa D, Takahashi K, Usui N, Yamori T, Seki M, Endo T, Mochizuki M. Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003 Dec 15;13(24):4395-7. PubMed PMID:14643333.
- (82) Matyshevska OP, Prylutska SV, Scharff P, Ritter U, Grynyuk II, Golub AA, Prylutsky YI, Burlaka AP. Therapeutic reactive oxygen generation. *Tumori*. 2008 Mar-Apr;94(2):278-83. PubMed PMID: 18564617.
- (83) Meili, C.; Widmer, M.; Husmann, F.; Gehr, P.; Blank, F.; Riediker, M.; Schmid, K.; Stark, W.; Limbach, L.: „Synthetische Nanomaterialien. Risikobeurteilung und Risikomanagement. Grundlagenbericht zum Aktionsplan“, Umwelt-Wissen Nr. 721, Bundesamt für Umwelt (BAFU) und Bundesamt für Gesundheit (BAG), Bern, 284 S. (2007); www.umwelt-schweiz.ch/uw-0721-d
- (84) Meyer V.R. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie Aktualisierte, 9. Auflage WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim 2004
- (85) Mikkelsen L, Sheykhzade M, Jensen KA, Saber AT, Jacobsen NR, Vogel U, Wallin H, Loft S, Møller P. Modest effect on plaque progression and vasodilatory function in atherosclerosis-prone mice exposed to nanosized TiO₂. *Part Fibre Toxicol*. 2011 Nov 10;8:32. doi: 10.1186/1743-8977-8-32. PubMed PMID: 22074227; PubMed Central PMCID: PMC3245428.
- (86) Moller, M., Gros, R., Moch, K., Prakash, S., Hermann, A., Pistner, C., Koppers, P., Spieth-Achtnich-Spieth, A., 2012. Analysis and Strategic Management of Nanoproducts with Regard to Their Sustainability Potential. Nano-sustainability Check. Oko-Institut
- (87) Nakagawa Y, Suzuki T, Nakajima K, Inomata A, Ogata A, Nakae D. Effects of N-acetyl-L-cysteine on target sites of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol*. 2014 Jan;88(1):115-26. doi: 10.1007/s00204-013-1096-3. PubMed PMID: 23877122.
- (88) Nakagawa Y, Inomata A, Ogata A, Nakae D. Comparative effects of sulfhydryl compounds on target organelles, nuclei and mitochondria, of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *J Appl Toxicol*. 2015 Dec;35(12):1465-72. doi: 10.1002/jat.3137. PubMed PMID: 25809591.
- (89) Nakamura Y, Ohgashi H, Tokuyama H, Yamago S, Nakamura E, Irie K. Photocytotoxicity of water-soluble fullerene derivatives. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1996 Aug;60(8):1359-61. PubMed PMID: 8987557.
- (90) Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B (2001) Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1665–1668
- (91) Nemmar A (2002) Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105:411–414
- (92) Núñez O, Gallart-Ayala H, Martins CP, Moyano E, Galceran MT. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of fullerenes. *Anal Chem*. 2012 Jun 19;84(12):5316-26. doi: 10.1021/ac300659h. PubMed PMID: 22594299.

- (93) Nyberg L, Turco RF, Nies L. Assessing the impact of nanomaterials on anaerobic microbial communities. *Environ Sci Technol.* 2008 Mar 15;42(6):1938-43. PubMed: 18409617
- (94) Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C (2002) Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health* 65:1531–1543
- (95) Oberdörster E.: „Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass”, *Environ. Health Perspect.* 112, 1058-1062 (2004)
- (96) Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part *Fibre Toxicol.* 2005 Oct 6;2:8. PubMed PMID: 16209704
- (97) Oberdörster E, McClellan-Green P, Haasch M.: „Ecotoxicity of engineered nanomaterials”, *Nanotechnologies for the Life Science, Vol. 5: Nanomaterials - Toxicity, Health and Environmental Issues*, 35-39, Hrsg.: Ch. S. S. R. Kumar, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2006)
- (98) Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J.: „Concepts of nanoparticle dose metric and response metric”, *Environ. Health Perspect.* 115(6), A290 (2007)
- (99) Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, et al.: „CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions”, *Immunity* 2, 279–288 (2004)
- (100) Ohtsuki S, Uchida Y, Kubo Y, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics-based ADME research as a new path to drug discovery and development: methodology, advantages, strategy, and prospects. *J Pharm Sci.* 2011 Sep;100(9):3547-59. doi: 10.1002/jps.22612. Epub 2011 May 10. Review. PubMed PMID: 21560129.
- (101) Ōsawa E. (2002). *Perspectives of fullerene nanotechnology.* Springer. pp. 275-ISBN 978-0-7923-7174-8.
- (102) Peters A, Schulz H, Kreyling WG, Wichmann H-E: „Staub und Staubinhaltsstoffe/Feine und ultrafeine Partikel“, in H.E. Wichmann, H.W. Schlipkötter, G. Fülgraff (Hrsg.): „Handbuch der Umweltmedizin“ VI-2, 14. Erg. Lfg. 10/98, ecomed-Verlag, Landsberg (1998)
- (103) Porter AE, Gass M, Muller K, Skepper JN, Midgley P, Welland M. Visualizing the uptake of C60 to the cytoplasm and nucleus of human monocyte-derived macrophage cells using energy-filtered transmission electron microscopy and electron tomography. *Environ Sci Technol.* 2007 Apr 15;41(8):3012-7. PubMed PMID: 17533872. PMID: 18409617.
- (104) Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, Radomski MW. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol.* 2005 Nov;146(6):882-93. PubMed PMID: 16158070; PubMed Central PMCID: PMC1751219.

- (105) Rancan F, Rosan S, Boehm F, Cantrell A, Brellreich M, Schoenberger H, Hirsch A, Moussa F. Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C(60) mono-adduct and a malonic acid C(60) tris-adduct on Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B*. 2002 Jul;67(3):157-62. PubMed PMID: 12167314.
- (106) Rao C.N.R., Ram Seshadri, A. Govindaraj, Rahul Sen (1995) "Fullerenes, nanotubes, onions and related carbon structures". *Materials Science and Engineering: R* 15 (6): 209–262.
- (107) Ringwood AH, Levi-Polyachenko N, Carroll DL. Fullerene exposures with oysters: embryonic, adult, and cellular responses. *Environ Sci Technol*. 2009 Sep 15;43(18):7136-41. PubMed PMID: 19806754.
- (108) Rohner Tatiana C., Niels Lion and Hubert H. Girault *Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation*, 2004
- (109) Rouse JG, Yang J, Ryman-Rasmussen JP, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano Lett*. 2007 Jan;7(1):155-60. PubMed PMID:17212456.
- (110) Royal Commission, 2008 „Novel materials in the environment: The case of nanotechnology”, 27th report of the Royal Commission on Environmental Pollution, presented to Parliament by command of Her Majesty, November 2008.
- (111) Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiriviere NA: „Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties”, *Toxicol. Sci.*91(1), 159–65 (2006)
- (112) Salomon M.: „Dialog zur Bewertung von synthetischen Nanopartikeln in Arbeits- und Umweltbereichen“, *Umweltmed. Forsch. Prax.* 11(1), 51-52 (2006)
- (113) Sadek P.C., *The HPLC Solvent Guide*, John Wiley and Sons, 2002
- (114) Sanchís J, Berrojalbiz N, Caballero G, Dachs J, Farré M, Barceló D. Occurrence of aerosol-bound fullerenes in the Mediterranean Sea atmosphere. *Environ Sci Technol*. 2012 Feb 7;46(3):1335-43. doi: 10.1021/es200758m. Epub 2011 Aug 3. PubMed PMID: 21766848.
- (115) Sato K, Imai Y, Irimura RT: „Contribution of dermal macrophage trafficking in the sensitization phase of contact hypersensitivity”, *J. Immunol*. 161, 6835–6844 (1998)
- (116) Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Colvin VL (2004) The differential cytotoxicity of watersoluble fullerenes. *Nano Letters* 4:1881–1887
- (117) Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West JL, Colvin VL. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials*. 2005 Dec;26(36):7587-95. PubMed PMID: 16005959.
- (118) Scherzberg und Wendorff, *Nanotechnologie: Grundlagen, Anwendungen, Risiken, Regulierung*. 2009 De Gruyter Recht
- (119) Schulz, C.: 69. und 70. Sitzung der vorläufigen Kommission für kosmetische Mittel am 18. November 2004 und 28. April 2005 in Berlin; *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch.– Gesundheitsschutz* 7, 687-692 (2006)

- (120) Schuster DI, Jensen AW, Wilson SR. Biological applications of fullerenes. *Bioorg Med Chem.* 1996 Jun;4(6):767-79. Review. PubMed PMID: 8818226.
- (121) Scott-Fordsmand JJ, Krogh PH, Schaefer M, Johansen A. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008 Nov;71(3):616-9. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.04.011. PubMed PMID: 18514310.
- (122) Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G, Kreyling WG (2004) Longterm clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol* 16:453–459
- (123) Snyder RW, Fennell TR, Wingard CJ, Mortensen NP, Holland NA, Shannahan JH, Pathmasiri W, Lewin AH, Sumner SC. Distribution and biomarker of carbon-14 labeled fullerene C60 ($^{14}\text{C}(\text{U})\text{C}_{60}$) in pregnant and lactating rats and their offspring after maternal intravenous exposure. *J Appl Toxicol.* 2015 Dec;35(12):1438-51. doi: 10.1002/jat.3177. PubMed PMID: 26081520; PubMed Central PMCID: PMC4922648.
- (124) Spohn, P., Hirsch, C., Hasler, F., Bruinink, A., Krug, H.F., Wick, P., 2009. C60 fullerene: a powerful antioxidant or a damaging agent? The importance of an in-depth material characterization prior to toxicity assays. *Environ. Pollut.* 157, 1134–1139.
- (125) Stöger T, Reinhard C, Takenaka S, Schröppel A, Karg E, Ritter B, Heyder J; SCHULZ, H.: „Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice”, *Environ. Health Perspect.* 114(3), 328-333 (2006)
- (126) Thilgen C., Fullerene: Fussballförmige Moleküle mit erfolversprechenden Eigenschaften. ETH Zürich, 2001
- (127) Thirunavukkuarasu K., V. C. Long, J. L. Musfeldt, F. Borondics, G. Klupp, K. Kamarás, and C. A. Kuntscher "Rotational Dynamics in C70: Temperature- and Pressure-Dependent Infrared Studies". *J. Phys. Chem. C* 115 (9): 3646–3653. (2011)
- (128) Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Roberts JR, Salmen R, DePree K, Adkins EJ. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 2003 Jul;111(9):1202-8. PubMed PMID: 12842774; PubMed Central PMCID: PMC1241575.
- (129) Thompson A, Schäfer J, Kuhn K et al.: *Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS.* In: *Anal. Chem.* 75, Nr. 8, 2003, S. 1895–904.
- (130) Tsuchiya T, Oguri I, Yamakoshi YN, Miyata N. Novel harmful effects of C60 fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 1996 Sep 9;393(1):139-45. PubMed PMID: 8804443.
- (131) Tong Z, Bischoff M, Nies L, Applegate B, Turco RF. Impact of fullerene (C60) on a soil microbial community. *Environ Sci Technol.* 2007 Apr 15;41(8):2985-91. PubMed PMID: 17533868.
- (132) Tsao N, Kanakamma PP, Luh TY, Chou CK, Lei HY. Inhibition of *Escherichia coli*-induced meningitis by carboxyfullerene. *Antimicrob Agents*

- Chemother. 1999 Sep;43(9):2273-7. PubMed PMID: 10471578; PubMed Central PMCID: PMC89460.
- (133) Tran CD, Grishko VI, Challa S. Near-infrared spectrophotometric determination of compositions of fullerene samples. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2005 Nov;62(1-3):38-41. PubMed PMID: 16257690.
- (134) Usenko, Crystal Y. /Stacey L. Harper/Robert L. Tanguay (2007): In vivo evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. *Carbon*, 45: 1891 –1898
- (135) Usenko CY, Harper SL, Tanguay RL. Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 May 15;229(1):44-55. doi: 10.1016/j.taap.2007.12.030. PubMed PMID: 18299140; PubMed Central PMCID: PMC2421009.
- (136) Velzeboer I, Hendriks AJ, Ragas AM, Van de Meent D. Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials. *Environ Toxicol Chem.* 2008 Sep;27(9):1942-7. PubMed PMID: 19086210.
- (137) Wachter H, Hausen A. (1996) *Chemie für Mediziner*. 7. Auflage. Berlin, New York: Walter de Gruyter
- (138) Waissi-Leinonen GC, Petersen EJ, Pakarinen K, Akkanen J, Leppänen MT, Kukkonen JV. Toxicity of fullerene (C60) to sediment-dwelling invertebrate *Chironomus riparius* larvae. *Environ Toxicol Chem.* 2012 Sep;31(9):2108-16. doi:10.1002/etc.1926. PubMed PMID: 22740114.
- (139) Wang C, Shang C, Westerhoff P. Quantification of fullerene aggregate nC60 in wastewater by high-performance liquid chromatography with UV-vis spectroscopic and mass spectrometric detection. *Chemosphere.* 2010 Jun;80(3):334-9. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.03.052. Epub 2010 Apr 24. PubMed PMID: 20417954.
- (140) Xia XR, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Trace analysis of fullerenes in biological samples by simplified liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2006 Oct 6;1129(2):216-22. PubMed PMID:16879833.
- (141) Xu X, Wang X, Li Y, Wang Y, Yang L. A large-scale association study for nanoparticle C60 uncovers mechanisms of nanotoxicity disrupting the native conformations of DNA/RNA. *Nucleic Acids Res.* 2012 Sep;40(16):7622-32. doi:10.1093/nar/gks517. PubMed PMID: 22661584; PubMed Central PMCID: PMC3439907.
- (142) Yamago S, Tokuyama H, Nakamura E, Kikuchi K, Kananishi S, Sueki K, Nakahara H, Enomoto S and Ambe F 1995 In vivo biological behavior of a water miscible fullerene:14C labeling,absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem. Biol.*2 385-9
- (143) Yamawaki H, Iwai N. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Jun;290(6):C1495-502. PubMed PMID: 16407415.
- (144) Yang LY, Gao JL, Gao T, Dong P, Ma L, Jiang FL, Liu Y. Toxicity of polyhydroxylated fullerene to mitochondria. *J Hazard Mater.* 2016 Jan 15;301:119-26. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.08.046. PubMed PMID: 26348144.

- (145) Yin JJ, Lao F, Fu PP, Wamer WG, Zhao Y, Wang PC, Qiu Y, Sun B, Xing G, Dong J, Liang XJ, Chen C. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(4):611-21. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.061. PubMed PMID: 18986699.
- (146) Zakaria S, Fröhlich E, Fauler G, Gries A, Scharf S, Weiß S. First determination of fullerenes in the Austrian market and environment: Quantitative analysis and assessment. *Journal Environmental Science and Pollution Research* 2017 Sep. DOI: 10.1007/s11356-017-0213-x (in press)
- (147) Zhao X, Striolo A, Cummings PT. C₆₀ binds to and deforms nucleotides. *Biophys J*. 2005 Dec;89(6):3856-62. PubMed PMID: 16183879; PubMed Central PMCID: PMC1366952.
- (148) Zhao B, He YY, Bilski PJ, Chignell CF. Pristine (C₆₀) and hydroxylated C₆₀(OH)₂₄ fullerene phototoxicity towards HaCaT keratinocytes: type I vs type II mechanisms. *Chem Res Toxicol*. 2008 May;21(5):1056-63. doi: 10.1021/tx800056w. PubMed PMID: 18422350; PubMed Central PMCID: PMC2637457.
- (149) Zhou B., J. F. Xiao, L. Tuli, H. W. Ransom: LC-MS-based metabolomics. In: *Molecular bioSystems*. Band 8, Nummer 2, Februar 2012, S. 470–481
- (150) Zhu S, Oberdörster E, Haasch ML. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C₆₀) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow. *Mar Environ Res*. 2006 Jul;62 Suppl:S5-9. PubMed PMID: 16709433.
- (151) Zhu X, Zhu L, Li Y, Duan Z, Chen W, Alvarez PJ. Developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: buckminsterfullerene aggregates (nC₆₀) and fullerol. *Environ Toxicol Chem*. 2007 May;26(5):976-9. PubMed PMID: 17521145.
- (152) www.bmlfuw.gv.at/wasser/wasserqualitaet/abwasserreinigung/klaeranlage.html
- (153) www.ces.karlsruhe.de/culm (Kalibrierung nach DIN 32645 bzw. DIN 38402)
- (154) www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/kalibrierung.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/datenauswertung/quantitativ/innererstandard/innerstandardm80ht0801.vscml.html
- (155) www.chemie.boku.ac.at/Einheit_2__Bewertung_von_Analysenergebnissen
- (156) www.enzyklo.de/Begriff/Carrezklaerung
- (157) www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/Fulleren?lang=de&language=german
- (158) www.nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/fullerene/uebersicht-fullerene
- (159) www.wikibooks.org/wiki/Praktikum_Organische_Chemie
- (160) www.wikipedia.org/wiki/Interner_Standard