
Caractérisation des NPs de
TiO₂ dans les aliments par
Sp-ICP-MS

V.1 Sommaire

V.1	Sommaire.....	Error! Bookmark not defined.
V.2	Optimisation de la méthode Sp-ICP-MS.....	Error! Bookmark not defined.
V.2.1	Données de la littérature.....	Error! Bookmark not defined.
V.2.2	Matériels et méthodes	Error! Bookmark not defined.
V.2.3	Optimisation du temps d'acquisition (Dt)	Error! Bookmark not defined.
V.2.4	Calcul du seuil bruit de fond-particule	Error! Bookmark not defined.
V.2.5	Optimisation de la stabilité des suspensions de NPs en fonction du type de flacon	Error! Bookmark not defined.
V.2.6	Détermination du mode d'introduction de l'échantillon dans l'ICP-MS	Error! Bookmark not defined.
V.2.7	Optimisation du mode d'analyse de l'ICP-MS.....	Error! Bookmark not defined.
V.2.8	Choix du milieu de dispersion pour l'analyse de NPs.....	Error! Bookmark not defined.
V.2.9	Sélection de l'isotope de titane le plus adapté pour l'analyse des NPs	Error! Bookmark not defined.
V.2.10	Détermination du calcul de l'efficacité de transport (TE)	Error! Bookmark not defined.
V.2.11	Bilan	Error! Bookmark not defined.
V.3	Analyse d'échantillons alimentaires.....	Error! Bookmark not defined.
V.3.1	Choix des denrées alimentaires	Error! Bookmark not defined.
V.3.2	Protocole d'extraction des NPs de TiO ₂ des échantillons alimentaires	Error! Bookmark not defined.
V.3.3	Échantillons alimentaires	Error! Bookmark not defined.
V.4	Bilan	Error! Bookmark not defined.

L'additif alimentaire de TiO₂, le E171, est présent dans de nombreux produits de consommation. Bien que la microscopie électronique soit la méthode la plus utilisée pour caractériser cet additif, la méthode « Single particle » ICP-MS (Sp-ICP-MS) se présente comme un complément ou une alternative à celle-ci. L'avantage de la méthode Sp-ICP-MS est de pouvoir analyser rapidement des échantillons tout en fournissant des informations sur la taille et la nature chimique des particules. Une feuille de calcul interne a été développée ([Chapitre IV](#)) pour permettre d'optimiser la méthode Sp-ICP-MS sur

plusieurs paramètres comme le mode et le temps d'acquisition, le choix de l'isotope ou encore le mode de calcul de l'efficacité de transport. Une fois la méthode de caractérisation Sp-ICP-MS optimisée, l'objectif est de l'éprouver sur des échantillons alimentaires contenant du E171, afin de caractériser les NPs de TiO₂ susceptibles d'être présentes.

V.2 Optimisation de la méthode Sp-ICP-MS

V.2.1 Données de la littérature

Le [Tableau 22](#) répertorie de nombreuses études sur la méthode Sp-ICP-MS. Plusieurs paramètres se distinguent à savoir le traitement de données utilisé, la méthode pour calculer l'efficacité de transport (TE), le temps d'acquisition (Dt) ou encore la méthode pour déterminer le seuil bruit de fond-particule. Ces différents paramètres seront étudiés pour pouvoir optimiser la méthode Sp-ICP-MS. Plusieurs éléments du tableau seront repris afin de les comparer avec les différentes optimisations qui vont être menées.

Tableau 22 : Résumé des différents paramètres de la méthode Sp-ICP-MS utilisés dans la dernière décennie

Instrument	Traitement des données	Type de NPs, type d'échantillon	Milieu de dispersion	Méthode TE	Dt (ms)	Durée analyse (s)	Seuil bruit de fond-particule	LDt (nm)	Référence
Agilent 7500	Feuille de calcul interne	Au, Ag Solution simple	Eau ultrapure	Masse : 9% Concentration : 9% Gravimétrique : 14,5%	10	30	3xET	NI	Pace et al. 2011
Agilent 7500	Feuille de calcul interne	Au, Ag, Solution simple, Acides humiques	Eau ultrapure HNO ₃ 0,2%	Concentration : NI	10	30	3xET	NI	Pace et al. 2012
PerkinElmer NexION 300Q	Feuille de calcul interne	Ag, solution simple	Eau ultrapure	NI : 5%	0,1 1 5 10 15 20	80	NI	20	Mitrano et al. 2012
PerkinElmer NexION series	Syngistix™ Nano Application Module	Au, solution simple	NI	NI	0,01 à 10	NI	Manuel	NI	Hineman and Stephan 2014
PerkinElmer NexION 300Q	Syngistix™ Nano Application Module	Ag, Au, CeO ₂ Eau de rivière	Eau ultrapure	Masse : NI Concentration : NI	10 3 0,1	NI	NI	NI	Montaño et al. 2014
Thermo Scientific X-Series II	Feuille de calcul interne	Au, Ag, TiO ₂ Eau de rivière, eau du robinet	Eau ultrapure	Masse : 1,5%-2,1%	10	60	3xET	Au : 13 Ag : 75 TiO ₂ : 91	Lee et al. 2014
PerkinElmer NexION 350D	Syngistix™ Nano Application Module	TiO ₂ , Crème solaire	Eau ultrapure	Concentration : NI	0,1	100	NI	NI	Dan et al. 2015

NI : Non Indiqué

* Communication personnelle

Instrument	Traitement des données	Type de NPs, type d'échantillon	Milieu de dispersion	Méthode TE	Dt (ms)	Durée analyse (s)	Seuil bruit de fond-particule	LDt (nm)	Référence
Thermo Scientific X-Series II, Finnigan Element	Feuille de calcul RIKILT	Au, Ag, TiO ₂ Eau usée, viande, milieu de culture	Eau ultrapure	Concentration : 2%-2,5%	2-3	60	Manuel	Au : 20 Ag : 20 TiO ₂ : 50 SiO ₂ : 200	Peters et al. 2015
Agilent 8800	Feuille de calcul interne	Ag Aliment	Eau ultrapure	NI	3	60	NI	13	Verleysen et al. 2015
Agilent 7500	NI	Au, solution simple	Eau ultrapure	Concentration : 2,1%	10	60	NI	NI	Lee and Chan 2015
Agilent 8900	Single Nanoparticle Application Module	Au, solution simple	L-cysteine 0,01%	Masse : NI	0,1	60	Manuel	3	Nunez et al. 2016
Thermo Scientific iCapQ	Module npQuant	Au, Ag solution simple	NI	NI : 6,8%	3-10	60	NI	NI	Kutscher et al. 2016
Agilent 7700x	Feuille de calcul interne	Ag, Au Eau de surface, Eau usée	Eau ultrapure	Concentration : NI	3	60	5xET	Au : 20 Ag : 19	Yang et al. 2016
Agilent 7900	Feuille de calcul interne	Ag, TiO ₂ Eau de surface	NI	Masse : 5,3%-5,5%	3-10	30-100	3xET	Ag : 37 TiO ₂ : 34	Vidmar et al. 2017
PerkinElmer NexION 300D	Syngistix™ Nano Application Module	Ag, Eau de surface Cosmétique	Eau ultrapure	Masse : 11% Concentration : 7-9% Gravimétrique : 14%	0,05	60	NI	20-30	Aznar et al. 2017
PerkinElmer NexION 300D	Syngistix™ Nano Application Module	TiO ₂ Plante de riz	Eau ultrapure	Masse : NI	0,1	60	Manuel	NI	Deng et al. 2017

NI : Non Indiqué

Instrument	Traitement des données	Type de NPs, type d'échantillon	Milieu de dispersion	Méthode TE	Dt (ms)	Durée analyse (s)	Seuil bruit de fond-particule	LDt (nm)	Référence
Agilent 8800	Feuille de calcul RIKILT modifiée	SiO ₂	Eau ultrapure	Concentration : 7,2%	3	60	3xET	75-290	Bolea-Fernandez et al. 2017
PerkinElmer NexION 300X	Syngistix™ Nano Application Module	Au, TiO ₂ Cosmétiques	Eau ultrapure SDS	Masse : 7-10%	0,1	100	NI	Au : 18 TiO ₂ : 25-30*	de la Calle et al. 2017
Agilent 8800 Thermo Scientific Element II	Logiciel Nanocount	TiO ₂ Matrice enrichie en calcium	Matrice enrichie en Ca Eau ultrapure	Masse : 7%	3 5	NI	3xET	10-133	Tharaud et al. 2017
Thermo Scientific iCapQ	Feuille de calcul interne	Pb Viande de gibier	Solution enzymatique (Proteinase K + SDS + bicarbonate d'ammonium + azoture de sodium)	Concentration : NI	5	60-180	NI	56-80	Kollander et al. 2017
Thermo Scientific X-Series II	NI	TiO ₂ Eau de surface	NI	Masse : NI	10	NI	3xET	148-173	Venkatesan et al. 2018a
Thermo Scientific X-Series II	NI	Sn, Pb, Fe, Cu, Ti, Ag Eau du robinet	NI	Masse : NI	10	180	4xET	Sn : 26 Pb : 11 Fe : 55 Cu : 40 Ti : 75 Ag : 13	Venkatesan et al. 2018b
PerkinElmer NexION 300X Agilent 7900	Syngistix™ Nano Application Module Single Nanoparticle Application Module	TiO ₂ Crème solaire, chocolat	Eau ultrapure	Concentration : 6,7%-10,5%	0,1	60	NI	25-30*	de la Calle et al. 2018a
PerkinElmer NexION 300X	Syngistix™ Nano Application Module	TiO ₂ Aliments	Eau ultrapure	Masse : 8%	0,1	100	NI	25-30*	de la Calle et al. 2018b
Thermo Scientific iCapQ	Feuille de calcul RIKILT	Ag, TiO ₂ , CeO ₂ Eau de surface	NI	Concentration : 2%	3	60	NI	Ag : 14 TiO ₂ : 100 CeO ₂ : 10	Peters et al. 2018

NI : Non Indiqué

* Communication personnelle

Instrument	Traitement des données	Type de NPs, type d'échantillon	Milieu de dispersion	Méthode TE	Dt (ms)	Durée analyse (s)	Seuil bruit de fond-particule	LDt (nm)	Référence
PerkinElmer NexION 350D	NI	TiO ₂ Textile	Triton X-100 (0,0001%)	Masse : 6,5-7,5%	0,1	100-300	NI	27-33	Mackevica et al. 2018
Agilent 8800	NI	TiO ₂ , SiO ₂ ustensile de cuisine	Eau ultrapure	NI	3	180	NI	NI	Addo Ntim et al. 2018
Agilent 7900	Single Nanoparticle Application Module	CuO Tissus végétaux	Eau ultrapure	NI	0,1	60	NI	NI	Keller et al. 2018
PerkinElmer NexION 350D	Feuille de calcul interne	Au, Ag, Sang humain	Eau ultrapure	NI : 6,5%	0,05	60	NI	30	Witzler et al. 2018
Thermo Scientific iCapQ	Feuille de calcul interne	Al ₂ O ₃ , Al ₂ Si ₂ O ₅ Nouilles chinoises	Eau ultrapure	Concentration : NI	3	60-180	Algorithme itératif	68	Loeschner et al. 2018
Thermo Scientific iCAP TQ	Module npQuant	TiO ₂ , Chewing-gum	Eau ultrapure	Concentration : 5,8%	10	180-300	NI	26-107	Candás-Zapico et al. 2018
Agilent 7900	Feuille de calcul interne Single Nanoparticle Application Module	Se Levures	SDS (4% m/v)	Concentration : 3,5%	5 0,1	60	3xET	18-83	Jiménez-Lamana et al. 2018
PerkinElmer NexION 300X	Syngistix™ Nano Application Module	TiO ₂ , Ag Urine	Glycérol (1% v/v)	NI : ≈ 5%	0,1	100	NI	TiO ₂ : 15-18 Ag : 8-9	Badalova et al. 2019
Agilent 7900	Single Nanoparticle Application Module	Ag Eau usée	NI	NI	0,1	60	NI	20	Cervantes-Avilés et al. 2019

NI : Non Indiqué

V.2.2 Matériels et méthodes

V.2.2.1 Réactifs

Les solutions étalons d'or (1000 µg/L), de titane (1000 µg/L) et de calcium ionique (1000 µg/L) proviennent de Astasol (Prague, République Tchèque). Le sulfate d'ammonium (99,999%), le chlorure de magnésium (≥ 98%) et l'hydrogénophosphate de sodium (> 98%) ont été achetés chez Sigma (Steinheim, Allemagne). Les nanoparticules (NPs) d'or proviennent de BBI Solution (Cardiff, Royaume-Uni) et leur diamètre moyen est garanti par le producteur à 51,2 nm (mais ce n'est pas considéré comme un Matériau de Référence Certifié (MRC)) à l'aide de la microscopie électronique. La concentration en particules est aussi garantie à 4,5x10¹⁰ particules/mL. L'acide nitrique (67-69%) provient de NORMATOM (Leuven, Belgique). Le méthanol (≥ 99,9%) a été acheté chez Merck (Darmstadt, Allemagne) tandis que l'acide acétique (NORMApur, > 99,8%) provient de VWR (Louvain, Belgique). L'eau ultra pure utilisée (18,2 mΩ) est obtenue à partir d'un système de purification d'eau Millipore Milli-QTM (Millipore S.A., St Quentin en Yvelines, France).

Pour toutes les optimisations effectuées, le Matériau de Référence (MR) NM-100 sera utilisé. Ce matériau est constitué de NPs de TiO₂ de structure cristallographique *anatase*, avec une surface spécifique de 9-10 m²/g. Le NM-100 a été caractérisé par le Joint Research Center (JRC) de la Commission européenne (Rasmussen et al., 2014). Les particules observées par Microscopie Électronique en Transmission (MET) présentent des diamètres variés allant de 20 à 660 nm, avec un diamètre moyen de 164,2 nm et une fraction nanoparticulaire en nombre de 27,1%. Ces deux valeurs ont servi de valeurs cibles pour les différentes optimisations. Le NM-102 n'a pas pu être utilisé comme pour l'AF4-ICP-MS car le diamètre des NPs est de l'ordre de 20 nm, ce qui est plus faible que la plupart des limites de détection en taille (LDT) obtenues avec la méthode Sp-ICP-MS (Tableau 22).

V.2.2.2 Protocole d'étalonnage de l'ICP-MS

Les analyses ont été effectuées avec un ICP-MS iCapQ de Thermo Scientific (Courtabœuf, France). Plusieurs paramètres de l'appareil sont contrôlés avant chaque analyse et sont présentés dans l'annexe (Annexe D, Tableau D2). Pour chaque optimisation, plusieurs manipulations ont été effectuées et sont détaillées dans les paragraphes suivants.

V.2.2.2.1 *Mesure du débit*

Avant et après la séquence d'analyse, le débit d'introduction est mesuré. Cette mesure se fait à l'aide d'un flacon contenant de l'eau ultrapure dont la masse est mesurée avec une balance de précision XP 504 DR (Mettler-Toledo, Viroflay, France). L'eau est ensuite aspirée pendant 4 à 20 min par le système de nébulisation, puis la masse du flacon est de nouveau mesurée. Le débit est alors déterminé suivant l'Équation 16.

Équation 16

$$Q = \frac{m_1 - m_2}{t}$$

avec :

Q : débit (mL/s),

m₁ : masse du flacon avant le prélèvement (g)

m₂ : masse du flacon après le prélèvement (g)

t : délai du prélèvement (s)

Dans ce cas, il est admis que la masse volumique de la solution prélevée est égale à 1 g/mL. La moyenne du débit est alors utilisée pour le traitement de données concernant les analyses de la journée.

V.2.2.2.1 *Mesure de l'Efficacité de Transport (TE)*

Le TE est déterminé avant chaque analyse. Une gamme d'étalonnage à partir de quatre solutions d'or ionique à 0 ; 0,5 ; 1 et 2 µg/L est préparée dans le même solvant utilisé pour disperser les particules de TiO₂ afin d'avoir des conditions identiques. Une dispersion de NPs d'or de 50 nm à une concentration de 45 000 particules/mL est préparée en triplicata dans le même solvant que l'or ionique. La dispersion mère des NPs d'or est mise dans un bain ultrasons (Modèle 86483, Fisher BioBlock Scientific, Rungis, France) pendant 5 min à 140% de puissance avant de préparer les dispersions. Le TE est calculé à partir de la méthode basée sur la concentration des particules (voir [paragraphe II.9.1.3](#)) et de la méthode basée sur la masse des particules (voir [paragraphe II.9.1.2](#)).

V.2.2.2.2 *Étalonnage du titane*

Pour convertir les intensités mesurées des particules de TiO₂ en diamètre, un étalonnage est réalisé à partir de sept solutions étalons de Ti ionique : 0 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 µg/L. Ces étalons sont préparés dans le même solvant que celui utilisé pour les dispersions de NPs de TiO₂ et d'Au, afin d'avoir des

conditions de milieu identique. Pour vérifier la qualité de l'analyse, un échantillon de NM-100 à 1 µg/L (à partir d'une dispersion mère de 1000 mg/L) est analysé après passage préalable aux ultrasons pendant 15 min. Le diamètre et la fraction nanoparticulaire sont contrôlés et un intervalle de confiance de 30% est arbitrairement fixé pour valider nos résultats par rapport aux valeurs cibles du JRC (164,2 nm et 27,1%).

V.2.2.2.3 *Séquence d'analyse*

Lors de la séquence d'analyse, un rinçage successif à l'acide nitrique (2%, v/v) et à l'eau ultrapure pendant 2 min est effectué après l'analyse de chaque échantillon contenant des particules. Avant injection, chaque échantillon est passé au vortex pendant 5 s afin de maintenir en suspension les particules.

V.2.2.2.4 *Traitement des données*

Le traitement des données est effectué à partir de la feuille de calcul interne précédemment optimisée (Cf. [Chapitre IV](#)).

V.2.3 Optimisation du temps d'acquisition (Dt)

V.2.3.1 *Méthodes*

Afin d'optimiser le temps d'acquisition (Dt), une suspension de NM-100 est préparée à 1 µg/L dans de l'eau ultrapure et analysée pendant 3 min à différents Dt : 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 et 100 ms. Les différentes étapes présentées dans le [paragraphe V.2.2.2](#) ont été réalisées. L'efficacité de transport (TE) utilisée est celle issue de la méthode basée sur la concentration des particules (voir [paragraphe II.9.1.3](#)). Lors de cette expérience, la feuille de calcul interne n'était pas encore finalisée et il n'était pas encore possible d'intégrer les signaux consécutifs ([paragraphe IV.3.2.7](#)). Le diamètre moyen et la fraction nanoparticulaire ont été mesurés et comparés avec les valeurs de référence du JRC ([Rasmussen et al., 2014](#)).

V.2.3.2 Résultats et discussion

La [Figure 77](#) présente pour chaque Dt, la fraction nanoparticulaire et le diamètre moyen du NM-100 mesurés.

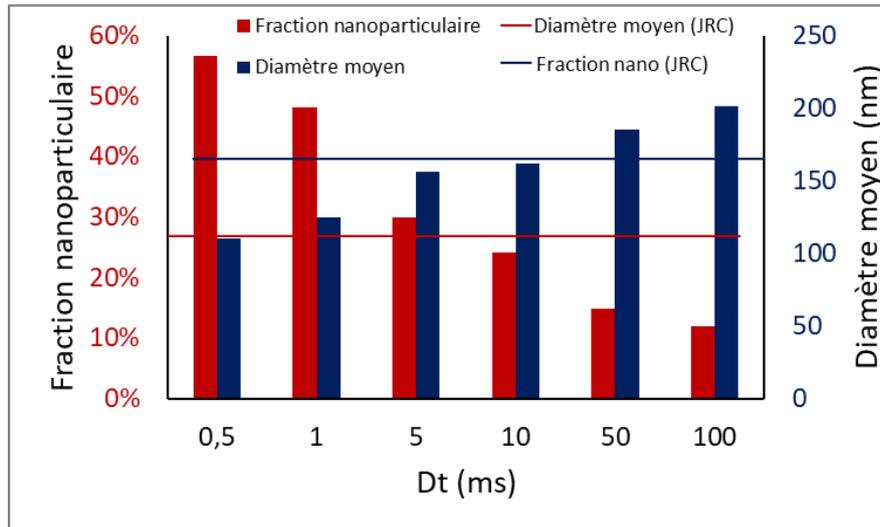


Figure 77 : Diamètre moyen et fraction nanoparticulaire mesurés pour le NM-100 en fonction de plusieurs temps d'acquisition.

Concernant les Dt de 50 et 100 ms, le diamètre moyen est surestimé tandis que la fraction nanoparticulaire est nettement sous-estimée. Cela est probablement dû au fait qu'avec des Dt élevés, la probabilité d'avoir deux particules concomitantes pendant une acquisition est plus élevée. De ce fait, la taille des particules est surestimée ([Figure 60](#)) et la fraction nanoparticulaire sous-estimée.

A l'inverse, pour les Dt de 0,5 et 1 ms, le diamètre est sous-estimé et la fraction nanoparticulaire surestimée ([Figure 60](#)). Cela provient du fait que la probabilité de détecter une fraction de particule augmente et que la feuille de calcul interne utilisée pour cette optimisation n'était pas encore capable d'intégrer des signaux consécutifs liés à une particule ([paragraphe IV.3.2.7](#)).

Les Dt de 5 et 10 ms permettent d'obtenir un diamètre moyen et une fraction nanoparticulaire proche des valeurs de référence fournies par le JRC. Un Dt de 10 ms fournit deux fois moins de données à traiter qu'un Dt de 5 ms pour un temps d'analyse identique. Par conséquent, le Dt de 10 ms est retenu pour la suite. [Mitrano et al. \(2012\)](#) ont aussi évalué différents Dt (0,1 à 20 ms) et ont également considéré qu'un Dt de 10 ms était optimal. Il est important de noter que plusieurs études ont mis en avant l'intérêt d'avoir un Dt de 100 µs pour diminuer la limite de détection en taille ([Montaño et al., 2014](#) ; [Abad-álvaro et al., 2016](#) ; [Jiménez-Lamana et al., 2018](#)). Néanmoins, les Dt compris entre 3 et 10 ms sont encore largement utilisés actuellement ([Tableau 22](#)).

V.2.4 Calcul du seuil bruit de fond-particule

V.2.4.1 Méthode

Le calcul du seuil bruit de fond-particule est déterminé pour chaque échantillon par la méthode itérative proposée par [Pace et al. \(2011\)](#). Ce calcul a été automatisé dans le chapitre précédent avec la nouvelle feuille de calcul interne ([paragraphe IV.3.2.1](#)). Le TE utilisé est issu de la méthode basée sur la concentration des particules ([paragraphe II.9.1.3](#)). Une dispersion de NM-100 a été analysée en respectant les différentes étapes décrites dans le [paragraphe V.2.2.2](#). La distribution en taille est analysée pour déterminer le paramètre n xET à utiliser. La distribution en taille des NPs d'or a aussi été évaluée puisque ces NPs servent à déterminer le TE.

V.2.4.2 Résultats et discussion

Les distributions en taille des NPs d'or obtenues sont présentées dans la [Figure 78](#).

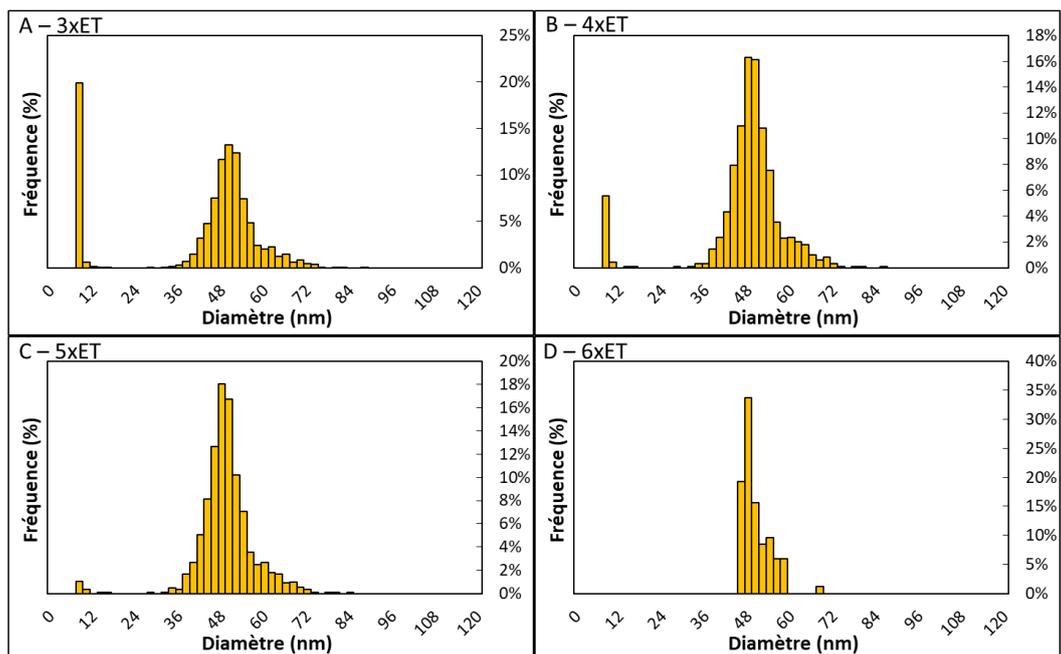


Figure 78 : Distribution en taille des NPs d'or en fonction du paramètre n xET pour calculer le seuil bruit de fond-particule

Pour les paramètres 3xET et 4xET ([Figure 78A-B](#)), l'observation des distributions en taille montre que le bruit de fond est pris en compte comme étant des particules de diamètre \approx 10 nm. En augmentant le nombre d'écart type ([Figure 78C-D](#)) pour le calcul du seuil bruit de fond-particule, on observe une diminution significative du bruit de fond. Cependant, pour le paramètre 6xET ([Figure 78D](#)), la

distribution en taille est nettement moins bien représentée. Par conséquent le paramètre 5xET sera utilisé pour les NPs d'or. Dans la littérature (Tableau 22), ce critère n'est pas systématiquement détaillé (Montaño *et al.*, 2014 ; Lee and Chan, 2015 ; Kutscher *et al.*, 2016) ou bien déterminé manuellement (Hineman and Stephan, 2014 ; Peters *et al.*, 2015 ; Nunez *et al.*, 2016) pour l'analyse de NPs d'Au. Toutefois, le critère 5xET est également utilisé par Yang *et al.* (2016) pour des NPs d'Au et d'Ag.

Concernant les NPs de TiO₂, leurs distributions en taille sont représentées dans la Figure 79.

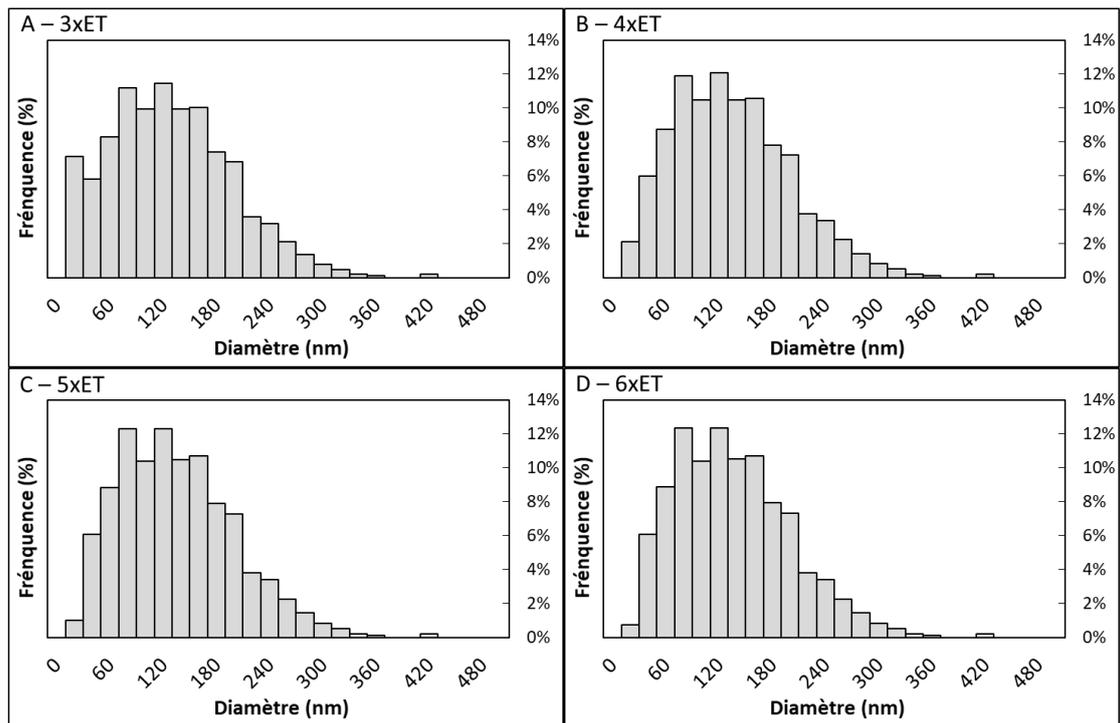


Figure 79 : Distribution en taille des NPs de TiO₂ du NM-100 en fonction de plusieurs paramètres nxET pour calculer le seuil bruit de fond-particule

D'après les observations des distributions en taille, seule celle avec le paramètre 3xET (Figure 79A) semble prendre en compte du bruit de fond aux alentours de 20-40 nm. Les autres distributions n'étant pas significativement différentes, le paramètre 4xET sera retenu pour les analyses des NPs de TiO₂. D'après le Tableau 22, la plupart des études qui portent sur l'analyse du TiO₂ utilisent le paramètre 3xET (Lee *et al.*, 2014 ; Tharaud *et al.*, 2017 ; Vidmar *et al.*, 2017) ce qui diffère du résultat obtenu mais qui peut s'expliquer par l'utilisation de différents ICP-MS. Toutefois, une étude utilise également le paramètre 4xET (Venkatesan *et al.*, 2018b).

V.2.5 Optimisation de la stabilité des suspensions de NPs en fonction du type de flacon

V.2.5.1 Méthode

L'objectif est d'évaluer le type de matériau composant les flacons le plus adapté pour assurer la stabilité des dispersions des particules de TiO₂ afin d'éviter tout biais lié à leur adsorption sur les parois. Trois types de flaconnage ont été étudiés dans ce but : le polypropylène (Perkin Elmer, Courtabœuf, France), le verre (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) et le perfluoroalkoxy (PFA) (Savillex, Eden Prairie, USA). Avant de préparer les dispersions de NPs de TiO₂, chaque flacon subit un protocole de nettoyage identique décrit dans la [Figure 80](#).

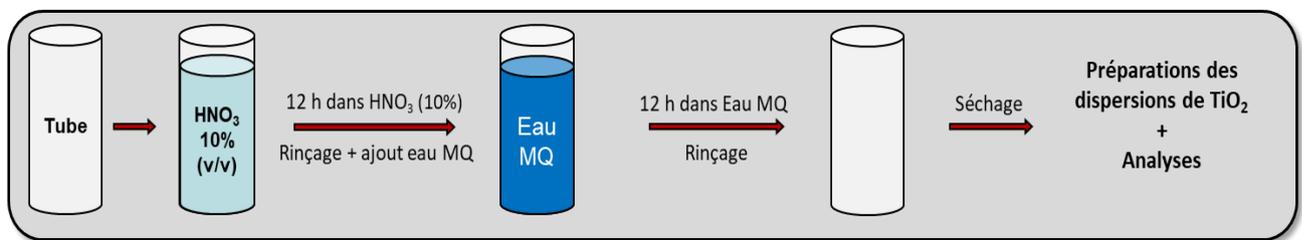


Figure 80 : Protocole de lavage appliqué pour les différents types de flacon

Le NM-100 est alors dispersé dans chaque flacon nettoyé, à une concentration finale de 50 µg/L. Les dispersions sont préparées en triplicata. Toutes les dispersions ont été analysées la même journée pour avoir une sensibilité et un TE identiques. Pour cette optimisation, la quantification a été réalisée en mode conventionnel (analyse de la concentration totale). Les cinq isotopes du titane (⁴⁶Ti, ⁴⁷Ti, ⁴⁸Ti, ⁴⁹Ti, ⁵⁰Ti) ont été analysés avec des temps d'acquisition de 200 ms chacun. Pour la quantification, plusieurs étalons de Ti ionique ont été préparés à des concentrations de 0, 10, 20, 30, 40 et 50 µg/L dans des flacons en polypropylène couramment utilisés au laboratoire.

V.2.5.2 Résultats et discussion

La moyenne de la concentration en TiO₂ calculée pour chaque tube est présentée dans la [Figure 81](#).

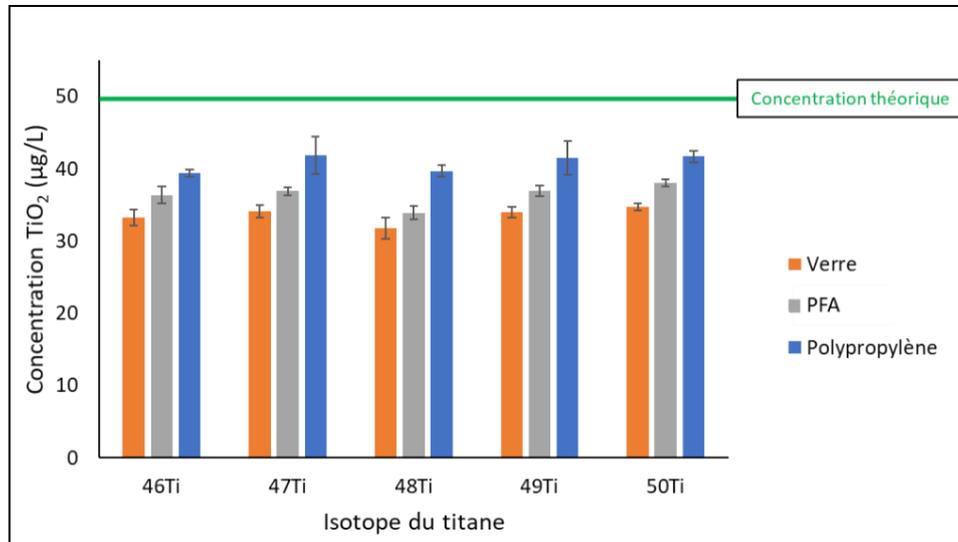


Figure 81 : Concentration moyenne en TiO₂ en fonction des différents types de flacon et isotopes du Ti

Les concentrations de TiO₂ calculées ne montrent pas de différence significative en fonction des différents isotopes de titane. Les résultats obtenus avec les flacons en polypropylène sont les plus proches de la concentration théorique de 50 µg/L. À l'inverse, ceux obtenus avec les flacons en verre sont les plus éloignés de la valeur théorique. Les flacons en PFA permettent d'obtenir des résultats intermédiaires. Il est intéressant de noter qu'aucun résultat n'est égal à la valeur théorique. Cela est probablement dû à l'adsorption des particules sur les parois des flacons et des tubes de prélèvement. Le type de flacon utilisé dans les études n'est pas précisé dans le [Tableau 22](#), mais la plupart utilisent des flacons en polypropylène ou polyéthylène ([Deng et al., 2017](#) ; [Tharaud et al., 2017](#) ; [Vidmar et al., 2017](#) ; [Mackevica et al., 2018](#) ; [Badalova et al., 2019](#)), ce qui conforte les résultats obtenus. Par conséquent, pour la suite des expériences, les dispersions de TiO₂ seront préparées dans des flacons en polypropylène.

V.2.5.3 Influence du lavage des flacons en polypropylène sur la stabilité des NPs

Afin d'améliorer l'efficacité de la préparation des échantillons, l'influence du protocole de lavage des flacons (voir [Figure 80](#)) sur la quantification de la concentration en TiO₂ a été évaluée. Des dispersions de NM-100 à 5 µg/L ont été préparées, ainsi qu'une série d'étalons de Ti ionique allant de 0 à 5 µg/L.

Les échantillons ont été préparés en triplicata et la moyenne de la concentration quantifiée est représentée dans la [Figure 82](#).

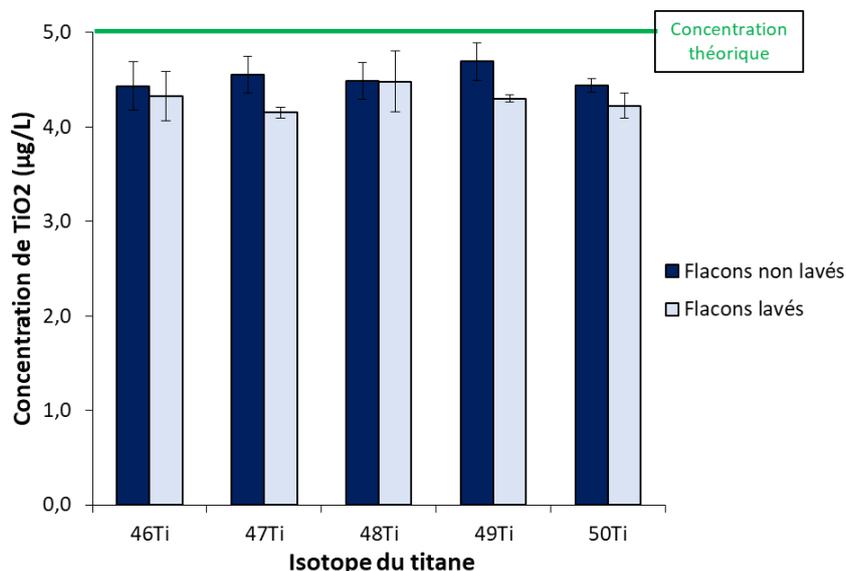


Figure 82 : Concentration des dispersions de TiO₂ dans des flacons de polypropylène ayant subi ou non le protocole de lavage (détaillé dans la [Figure 80](#)) pour les 5 isotopes du titane

D'un point de vue global, il n'y a pas de différence significative entre les résultats des flacons (polypropylène) lavés et non lavés. L'étape supplémentaire du lavage des flacons en polypropylène peut donc être évitée afin de gagner du temps pour la préparation des échantillons. A noter que les concentrations sont toujours inférieures à la concentration théorique, comme pour les dispersions dans les autres flacons ([Figure 81](#)). L'écart relatif moyen à la valeur théorique est de $18 \pm 3\%$ dans la première expérience et de $10 \pm 2\%$ pour celle-ci. Cela pourrait confirmer que la pureté du matériau n'est pas de 100%, ce qui entrainerait un écart systématique par rapport à la concentration théorique.

V.2.6 Détermination du mode d'introduction de l'échantillon dans l'ICP-MS

V.2.6.1 Méthode

Il existe deux modes d'introduction d'échantillon liquide en ICP-MS qui sont (i) le prélèvement via une pompe péristaltique et (ii) le prélèvement par aspiration libre qui déplace l'échantillon grâce à un effet Venturi. Ce dernier mode consiste à plonger le tube de prélèvement directement dans la solution, sans que celui-ci passe par la pompe péristaltique. Le liquide est déplacé grâce au changement de pression

à l'extrémité du nébuliseur. En Sp-ICP-MS, il est recommandé par le constructeur de travailler en mode aspiration libre pour pouvoir s'affranchir du bruit de fond généré par la pompe péristaltique. Cette augmentation du bruit de fond par la pompe, peut entraîner une diminution de la qualité du signal et une augmentation de la LDt. Pour évaluer l'impact de ces deux modes de prélèvement, plusieurs blancs sont analysés en utilisant la pompe péristaltique et en utilisant l'aspiration libre, à un débit d'environ 0,40 mL/min pour ces deux modes d'introduction. Chaque mesure est faite en triplicata.

V.2.6.2 Résultats

L'intensité du signal brut en fonction du temps est représentée en [Figure 83](#). Lorsque la pompe péristaltique est utilisée, le signal est beaucoup plus bruité que celui obtenu dans le cas d'une aspiration libre.

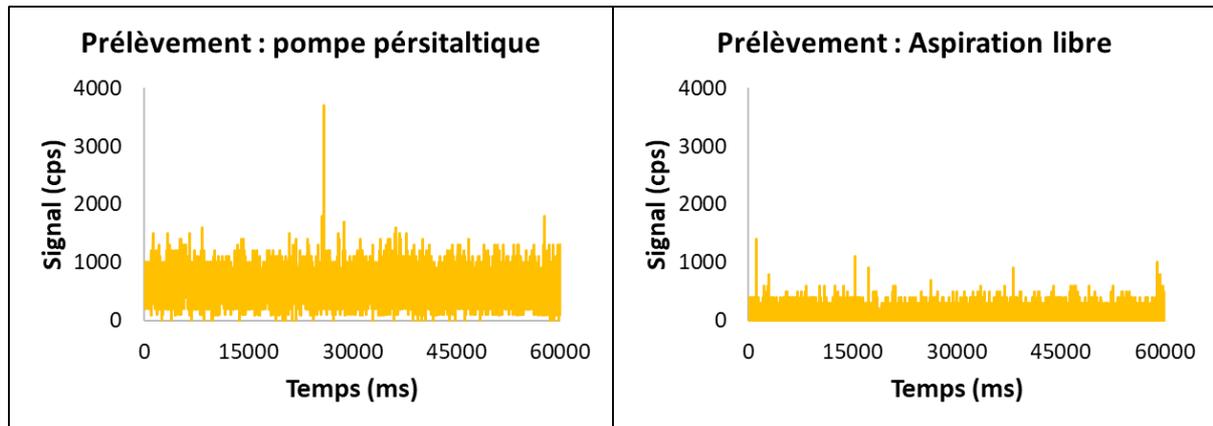


Figure 83 : Comparaison du signal brut d'un blanc en fonction de deux types de prélèvement (avec pompe péristaltique et par aspiration libre)

Les seuils bruit de fond-particule ont été déterminés pour chaque analyse. Il est de 1150 ± 172 cps pour l'analyse avec le prélèvement par pompe péristaltique et de 487 ± 10 cps avec l'aspiration libre. [Venkatesan et al., \(2018b\)](#) ont aussi réussi à diminuer la Limite de Détection en taille (LDt) pour l'analyse de NPs de cuivre en utilisant une introduction d'échantillon par aspiration libre. Par conséquent, pour la suite des expériences, les échantillons seront prélevés par aspiration libre afin de minimiser le seuil bruit de fond-particule.

V.2.7 Optimisation du mode d'analyse de l'ICP-MS

V.2.7.1 Méthode

Pour cette optimisation, deux modes d'analyse de l'ICP-MS sont comparés, à savoir : le mode standard à haute sensibilité (STDS) et le mode discrimination d'énergie cinétique à haute sensibilité (KEDS). Dans le cas de ce dernier, une cellule de collision est utilisée pour diminuer les interférences spectrales polyatomiques, ce qui permet de diminuer le bruit de fond mais diminue également le TE. En mode KEDS, l'hélium est utilisé en tant que gaz de collision. Les étapes décrites dans le [paragraphe V.2.2.2](#) sont réalisées dans les deux modes. Enfin, du NM-100 à 1 µg/L a été analysé en triplicata en STDS et KEDS afin de comparer et choisir le mode le plus adapté. Le TE utilisé est celui dont la méthode de calcul est basée sur la concentration des particules.

V.2.7.2 Résultats

La [Figure 84](#) présente un extrait des données brutes de l'analyse du NM-100 en mode STDS et KEDS. Le mode KEDS a considérablement réduit le bruit de fond et les signaux liés aux particules restent détectables. Les seuils bruit de fond-particule calculés pour les modes STDS et KEDS sont respectivement de 1410 et 102 coups par seconde (cps).

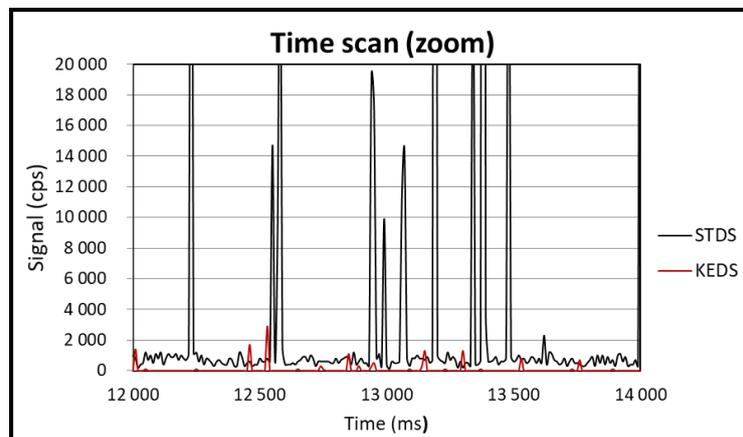


Figure 84 : Extrait des données brutes de l'analyse du NM-100 en mode STDS et KEDS

Bien que le seuil bruit de fond-particule soit plus faible en mode KEDS, sa conversion en LDt (cf. [paragraphe II.9.4.3](#)) présente une valeur de 72,9 nm contre 44,7 nm en STDS. Cela est dû à une diminution de la sensibilité d'un facteur ≈ 40 entre les modes STDS et KEDS. La fraction nanoparticulaire calculée est de 26,4% en mode STDS pour 13,9% en mode KEDS (valeur référence = 27,1%, [Rasmussen et al., 2014](#)). La LDt trop élevée en mode KEDS empêche de détecter

les particules < 70 nm. Par conséquent, le mode d'acquisition KEDS semble moins adapté à l'analyse des NPs de TiO₂ par Sp-ICP-MS, du moins sur le modèle d'ICP-MS utilisé pour cette étude. Le mode STDS est retenu pour la suite de ces travaux.

V.2.8 Choix du milieu de dispersion pour l'analyse de NPs

V.2.8.1 Méthodes

Afin d'évaluer l'impact du solvant de dispersion sur l'analyse Sp-ICP-MS, plusieurs solvants ont été utilisés à savoir : l'eau ultrapure, l'acide nitrique (HNO₃) 0,1% (v/v) et le méthanol (MeOH) 2% (v/v). Lors de la réalisation des différentes étapes décrites dans le [paragraphe V.2.2.2](#), les dispersions étalons de NPs d'or, ainsi que les étalons d'or ioniques, mais aussi les étalons de titane ionique ont tous été préparés avec les trois types de solvants. Toutes les analyses ont été effectuées la même journée et cette expérience a été reproduite une deuxième fois, afin de confirmer les résultats obtenus. En ce qui concerne le traitement de données, la feuille de calcul interne étant en développement en parallèle, la correction concernant les signaux provenant d'une fraction de particule n'avait pas été encore développée. Le TE utilisé est celui basé sur la concentration des particules.

V.2.8.2 Résultats et discussion

Les moyennes des fractions nanoparticulaires et des diamètres du NM-100 sont répertoriées dans la [Figure 85](#).

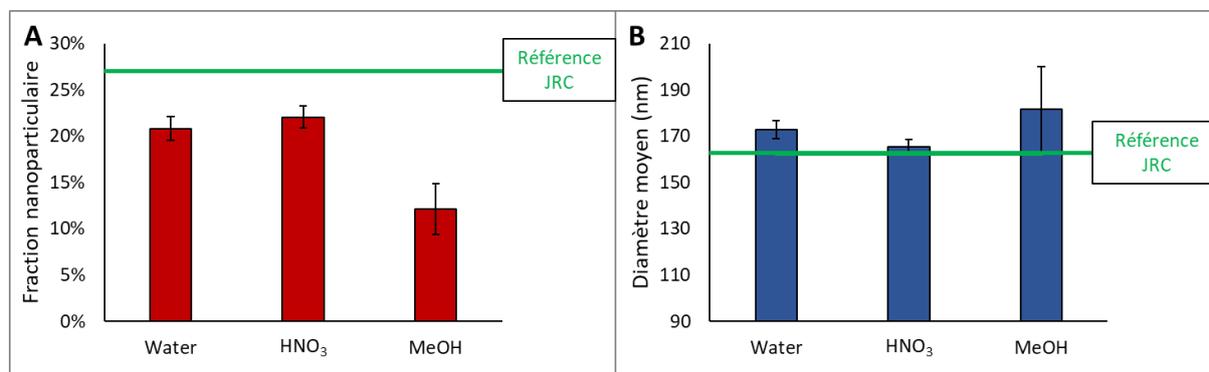


Figure 85 : Fraction nanoparticulaire (A) et diamètre moyen (B) du NM-100 en fonction du solvant de dispersion utilisé. La ligne verte représente la valeur référence du JRC

Concernant la fraction nanoparticulaire du NM-100 (Figure 85A), les résultats obtenus avec l'eau ultrapure et HNO₃ 0,1% ne présentent pas de différence significative puisqu'on obtient respectivement 20,8 ± 1,3% et 22,1 ± 1,2%. La fraction nanoparticulaire obtenue avec MeOH 2% est plus faible avec une valeur de 12,2 ± 2,8% ce qui fait que ce résultat est le plus éloigné de la valeur du JRC qui est de 27,1%.

Concernant les résultats du diamètre moyen (Figure 85B), l'utilisation d'HNO₃ 0,1% permet d'obtenir un diamètre de 165 ± 3 nm contre un diamètre de 164,2 nm déterminé par JRC. C'est le résultat le plus proche de la valeur de référence puisqu'avec l'eau ultrapure, le diamètre obtenu est de 173 ± 4 nm, tandis qu'avec MeOH 2%, le diamètre moyen du NM-100 est égal à 182 ± 18 nm. L'utilisation de HNO₃ 0,1% permet donc d'obtenir des résultats se rapprochant le plus des valeurs de référence du JRC.

De plus, lors de l'étalonnage avec le Ti ionique, le HNO₃ permet d'obtenir des droites avec des coefficients de détermination plus élevés (Tableau 23).

Tableau 23 : Comparaison des coefficients de détermination des droites d'étalonnage avec les différents solvants

	Coefficient de détermination		
	Eau	HNO ₃ 0,1%	MeOH 2%
J1	0,9997	0,9999	0,9997
J2	0,9976	0,9999	0,9965

Ces résultats montrent que HNO₃ permet d'avoir également une meilleure stabilité avec le Ti ionique.

D'après les données des études du Tableau 22, plus de 60% des études répertoriées utilisent de l'eau ultrapure pour disperser les NPs. Concernant le TiO₂ cela correspond même à 75%. De la Calle et al. (2017) ont essayé d'utiliser du SDS pour disperser les NPs de TiO₂, mais leur TE se retrouve trop diminué et les auteurs ont préféré utiliser de l'eau ultrapure. Une seule autre étude utilise un autre milieu de dispersion pour le TiO₂, à savoir du Triton X-100 dans le but d'éviter les agglomérations et la précipitation des particules (Mackevica et al., 2018).

Dans notre cas, les sensibilités obtenues avec l'eau et HNO₃ 0,1% sont significativement différentes d'un facteur de 20-30%. Il est donc nécessaire que le titane ionique et les NPs de TiO₂ soient introduits dans le même milieu pour avoir une sensibilité identique. Par conséquent HNO₃ 0,1% (v/v) sera utilisé comme milieu de dispersion des particules et pour les étalonnages ioniques de l'Au et du Ti.

V.2.9 Sélection de l'isotope de titane le plus adapté pour l'analyse des NPs

V.2.9.1 Méthode

Un des inconvénients de la méthode Sp-ICP-MS est de ne pas pouvoir mesurer plusieurs isotopes simultanément. C'est pourquoi il est important de sélectionner l'isotope le plus adapté pour l'analyse des NPs de TiO₂. Le [Tableau 24](#) indique les abondances respectives de chaque isotope du Ti et leurs principaux interférents.

Tableau 24 : Isotopes et principaux interférents du titane

Isotope	Abondance naturelle	Interférent
⁴⁶ Ti	8,25%	³² S ¹⁴ N ; ⁴⁶ Ca ; ¹⁵ N ₂ ¹⁶ O ⁺ ; ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ⁺ ; ¹² C ¹⁷ O ¹⁷ O
⁴⁷ Ti	7,44%	³² S ¹⁵ N ; ³³ S ¹⁴ N ; ¹² C ³⁵ Cl ; ³¹ P ¹⁶ O ; ³² S ¹⁴ N ¹ H ; ³⁰ Si ¹⁶ O ¹ H ; ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ⁺ ; ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ ; ¹¹ B ³⁶ Ar ; ⁷ Li ⁴⁰ Ar ; ¹² C ¹⁸ O ¹⁶ O ¹ H
⁴⁸ Ti	73,72%	³⁴ S ¹⁴ N ; ³³ S ¹⁵ N ; ³² S ¹⁶ O ; ¹⁴ N ¹⁶ O ¹⁸ O ; ¹⁴ N ¹⁷ N ₂ ⁺ ; ³⁶ Ar ¹² C ; ¹² C ₄ ; ⁴⁸ Ca
⁴⁹ Ti	5,41%	³² S ¹⁷ O ; ³³ S ¹⁶ O ; ³² S ¹⁶ O ¹ H ; ³⁵ Cl ¹⁴ N ; ³⁴ S ¹⁵ N ; ³³ S ¹⁶ O ; ¹⁴ N ¹⁷ O ₂ ¹ H ; ³⁶ Ar ¹³ C ; ³⁶ Ar ¹² C ¹ H ; ⁴⁰ Ar ⁹ Be ; ¹² C ³⁷ Cl ; ³¹ P ¹⁸ O ; ¹⁴ N ¹⁸ O ¹⁶ O ¹ H
⁵⁰ Ti	5,18%	³² S ¹⁸ O ; ³³ S ¹⁷ O ; ³⁴ S ¹⁶ O ; ³² S ¹⁷ O ¹ H ; ³⁴ S ¹⁵ O ¹ H ; ³⁶ Ar ¹⁴ N ; ³⁵ Cl ¹⁵ N ; ³⁶ S ¹⁴ N ; ¹⁴ N ³⁵ Cl ¹ H ; ³⁸ Ar ¹² C ; ⁵⁰ Cr ; ⁵⁰ V

L'isotope ⁴⁸Ti est le plus abondant mais est aussi facilement interféré par le calcium (⁴⁸Ca). Pour évaluer l'isotope le moins interféré, plusieurs solutions de Ti ionique (3 µg/L) sont préparées avec une quantité croissante en interférents. Les différents interférents employés sont le soufre, le chlore, le phosphore, le carbone et le calcium. Le [Tableau 25](#) indique les différents produits chimiques utilisés pour obtenir les différents interférents.

Tableau 25 : Liste des interférents et des différents produits chimiques utilisés pour évaluer l'impact des interférents sur les différents isotopes du titane

Interférents	Produit chimique utilisé	Formule chimique
Soufre	Sulfate d'ammonium	(NH ₄) ₂ SO ₄
Chlore	Chlorure de magnésium	MgCl ₂
Phosphore	Hydrogénophosphate de sodium	Na ₂ HPO ₄
Carbone	Acide acétique	CH ₃ COOH
Calcium	Nitrate de calcium	Ca(NO ₃) ₂

Les solutions de titane sont préparées à six niveaux de concentration d'éléments interférents : 0, 1, 10, 25, 50 et 100 mg/L. L'analyse a été effectuée avec les deux modes STDS et KEDS afin d'évaluer en parallèle l'impact du mode KEDS. Le scandium (⁴⁵Sc) est utilisé comme standard interne pour la quantification. Pour cette optimisation, la quantification a été réalisée en mode conventionnel (analyse de la concentration totale) et non en mode Sp-ICP-MS. Les cinq isotopes du titane (⁴⁶Ti, ⁴⁷Ti, ⁴⁸Ti, ⁴⁹Ti, ⁵⁰Ti) ont été analysés avec des temps d'acquisition de 200 ms chacun.

V.2.9.2 Résultats

Les résultats en mode STDS (Figure 86) montrent qu'à partir de 10 mg/L, tous les résultats sont biaisés à cause des interférences spectrales polyatomiques. L'isotope ⁴⁸Ti est le plus interféré dès la présence de 1 mg/L d'interférents, notamment par son isobare, le ⁴⁸Ca.

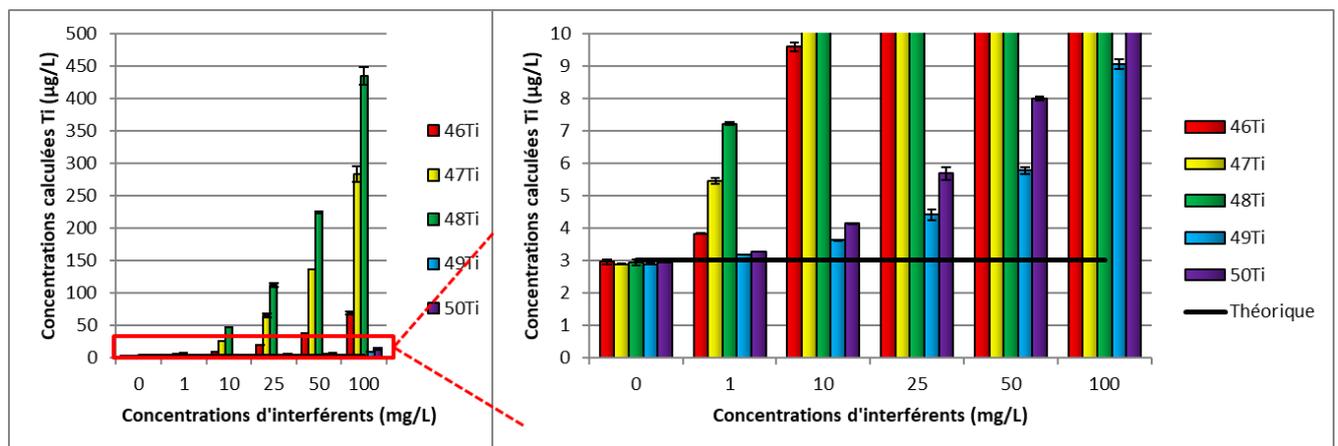


Figure 86 : Concentration de Ti mesurée à partir des différents isotopes en mode STDS en fonction de la concentration en interférents. Le graphique à droite est un agrandissement de celui de gauche.

A l'inverse, le ⁴⁹Ti donnent de meilleurs résultats, avec un écart d'environ 6 µg/L avec l'échantillon le plus concentré en interférents. Par conséquent, en mode STDS, l'ordre des isotopes du plus au moins interféré peut être défini de cette façon : ⁴⁸Ti > ⁴⁷Ti > ⁴⁶Ti > ⁵⁰Ti > ⁴⁹Ti.

Les résultats en mode KEDS (Figure 87) permettent de voir que les concentrations mesurées sont significativement moins biaisées qu'en mode STDS. L'analyse des isotopes ⁴⁹Ti et ⁵⁰Ti permet d'obtenir des concentrations similaires avec la concentration réelle, quelle que soit la concentration en interférent.

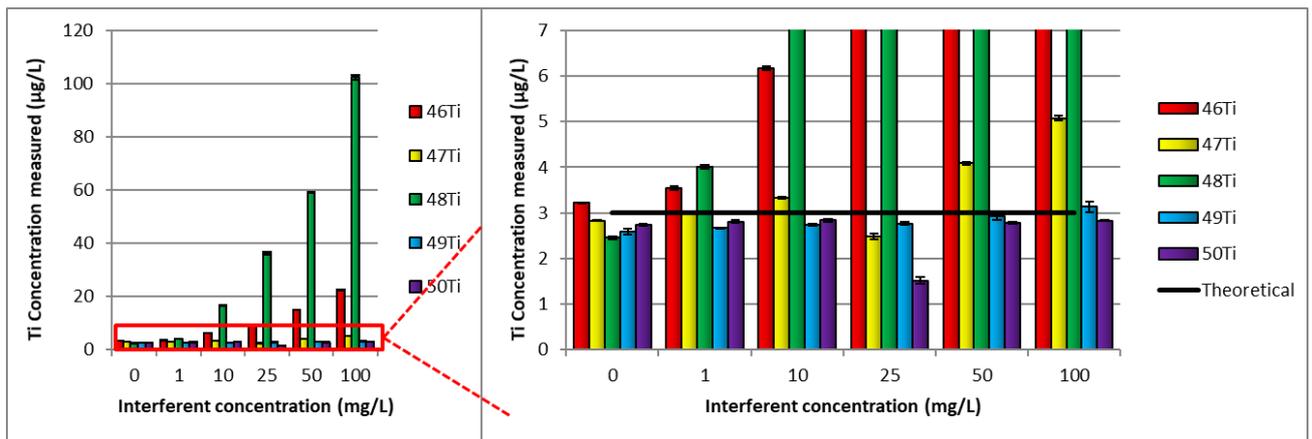


Figure 87 : Concentration de Ti mesurée à partir des différents isotopes en mode KEDS en fonction de la concentration en interférents. Le graphique à droite est un agrandissement de celui de gauche.

Cependant, les isotopes ⁴⁶Ti et ⁴⁸Ti restent interférés à cause de la présence du calcium qui possède des isotopes aux mêmes masses (⁴⁶Ca – 0,004% et ⁴⁸Ca – 0,187%) et qui ne peuvent être éliminés via le mode KEDS. Un nouveau classement des isotopes interférés peut donc être déterminé : ⁴⁸Ti > ⁴⁶Ti > ⁴⁷Ti > ⁵⁰Ti = ⁴⁹Ti.

En conclusion, en présence d'interférents, l'isotope ⁴⁹Ti est préférable pour l'analyse en Sp-ICP-MS. Toutefois, il pourrait s'avérer intéressant d'analyser également le ⁴⁸Ti, qui est l'isotope le plus abondant (Tableau 24). Si aucune interférence n'est détectable, cela nous permettra d'améliorer nos limites de détection. En ce qui concerne le mode, il a été vu dans le paragraphe V.2.7 que le mode KEDS augmentait la Limite de Détection en taille (LDt), de ce fait le mode STDS sera favorisé.

V.2.10 Détermination du calcul de l'efficacité de transport (TE)

V.2.10.1 *Etudes du TE pour la Sp-ICP-MS dans la littérature*

Comme expliqué dans le [paragraphe II.9.1](#), il existe plusieurs méthodes pour déterminer le TE : la méthode gravimétrique, la méthode basée sur la masse des particules et celle basée sur la concentration des particules. Dans la publication de [Pace et al. \(2011\)](#), les trois méthodes ont été étudiées. Ils concluent que la méthode gravimétrique n'est pas précise et préconisent les deux autres méthodes qui sont dites « directes ». Si dans l'étude de [Pace et al. \(2011\)](#) aucune différence significative n'avait été mise en avant entre les méthodes basées sur la concentration et la masse des particules, d'autres études ont à l'inverse noté des écarts entre les valeurs de TE ([Tuoriniemi et al., 2014](#) ; [Aznar et al., 2017](#) ; [Geertsen et al., 2018](#)). Concernant l'étude de [Tuoriniemi et al. \(2014\)](#), ils ne concluent pas sur une méthode plus adaptée que l'autre. Cependant, les distributions en taille des particules obtenues avec le TE issu de la méthode basée sur la masse des particules sont les plus proches de celles obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB). [Aznar et al. \(2017\)](#) ont comparé les valeurs obtenues par les méthodes basées sur la masse et sur la concentration des particules avec plusieurs matériaux de référence, notamment d'Ag et d'Au. Ils ont remarqué que le TE pouvait varier suivant la méthode de calcul (10% d'écart) mais aussi suivant l'élément utilisé (8% d'écart). Ils ont finalement retenu la méthode qui présentait la meilleure répétabilité sur 4 jours d'expérience à savoir, le TE calculé avec la méthode basée sur la concentration. Une autre étude récente de [Geertsen et al. \(2018\)](#) a aussi observé des différences entre les deux méthodes, avec des écarts pouvant aller jusqu'à 39%. A l'inverse, ils ont finalement retenu la méthode basée sur la masse des particules car elle avait une meilleure répétabilité. Il est intéressant de noter que sur les 34 publications répertoriées dans le [Tableau 22](#), la méthode basée sur la concentration est utilisée 15 fois contre 13 fois pour la méthode basée sur la masse, le reste ne mentionnant pas la méthode utilisée. Cela permet de voir qu'il n'y a pas de méthode plus utilisée actuellement. Dans cette étude, seuls les TE issus des méthodes basées sur la masse et la concentration en particules seront étudiés. Les valeurs des TE ont été suivies sur plusieurs semaines, en utilisant le protocole détaillé du [paragraphe V.2.2.2](#).

V.2.10.2 *Comparaison directe des valeurs de TE*

Le TE a été calculé en réalisant le protocole détaillé dans le [paragraphe V.2.2.2.1](#) et en utilisant les deux méthodes directes (masse et concentration) sur 15 jours d'analyses. Les résultats sont présentés dans la [Figure 88](#).

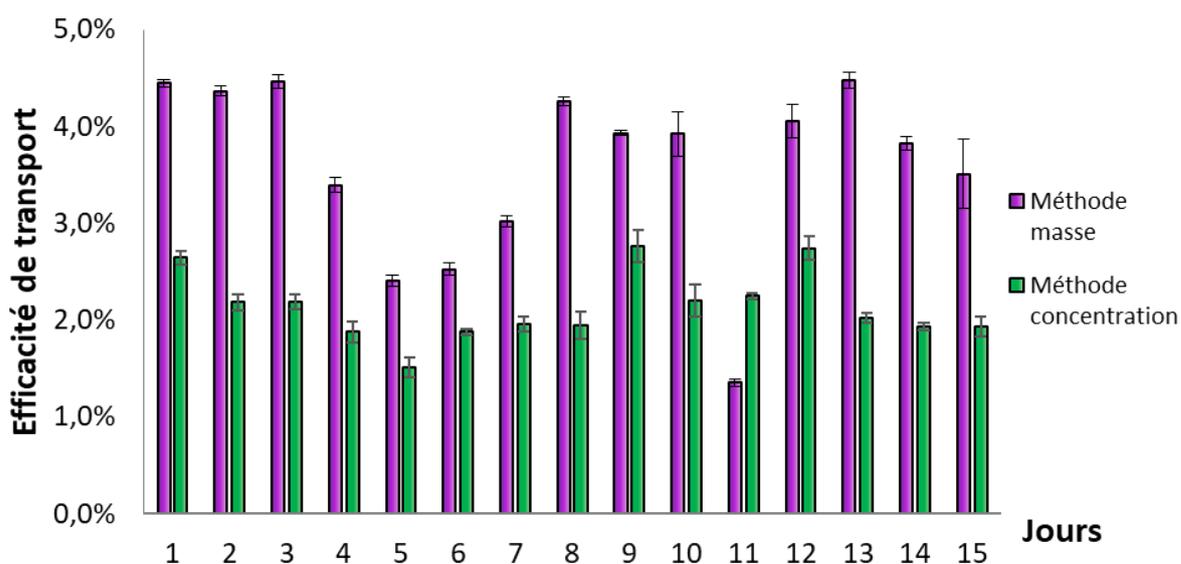


Figure 88 : Suivi de l'efficacité de transport (TE) sur plusieurs jours d'analyse, calculée à partir de la méthode masse et de la méthode concentration

Les valeurs de TE sont significativement différentes, avec un écart pouvant aller jusqu'à 55%. Le Coefficient de Variation (CV) sur l'ensemble des 15 jours est de 16% pour la méthode basée sur la concentration, contre 25% pour la méthode basée sur la masse.

Les écarts obtenus entre les deux méthodes corroborent les résultats obtenus par [Geertsen et al. \(2018\)](#) au niveau des écarts retrouvés entre les deux méthodes. Concernant la répétabilité, nos résultats confirment ceux d'[Aznar et al. \(2017\)](#) qui concluent que la méthode basée sur la concentration des particules est plus répétable. Etant donné qu'un nombre limité de publications s'attarde sur l'optimisation de la détermination du TE et que leurs résultats diffèrent, la suite de cette étude approfondira l'évaluation du TE afin de retenir le plus pertinent. Pour cela, plusieurs échantillons de référence ont été analysés en Sp-ICP-MS et leur diamètre et fraction nanoparticulaire comparés avec les valeurs de référence ou avec les résultats retrouvés dans la littérature. Trois approches sont donc distinguées : l'analyse de plusieurs suspensions de NPs d'or, l'analyse du NM-100 et l'analyse d'un E171, qui est le plus cité dans la littérature.

V.2.10.3 Analyse du NM-100

V.2.10.3.1 Méthodes

Le NM-100 a été analysé et les TE ont été suivis sur plusieurs semaines en utilisant le protocole détaillé en [paragraphe V.2.2.2](#). Pour rappel, le JRC a estimé que le NM-100 possède une fraction nanoparticulaire de 27,1% et un diamètre de 162,4 nm (déterminé par MEB).

V.2.10.3.2 Résultats

Le matériau NM-100 a été analysé à plusieurs reprises et sa fraction nanoparticulaire a été mesurée à partir des deux modes de calcul du TE sélectionnés ([Figure 89](#)).

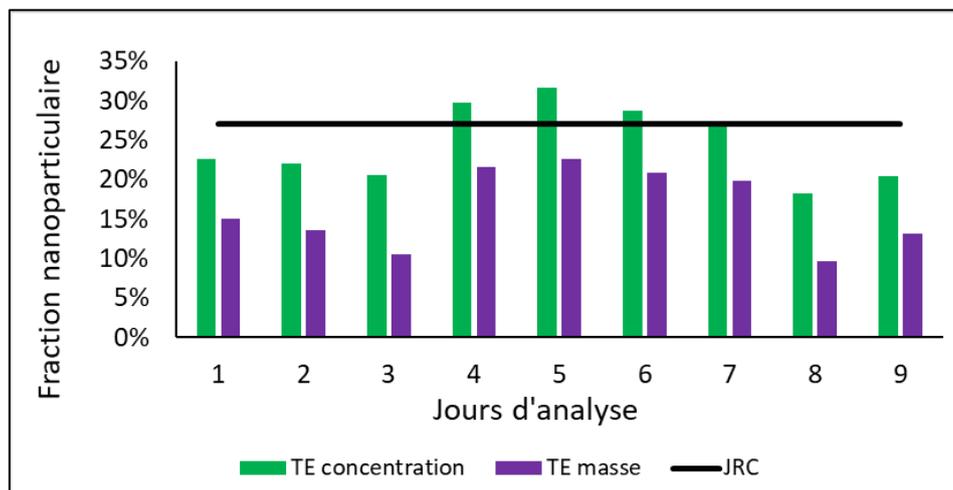


Figure 89 : Comparaison de la fraction nanoparticulaire du NM-100 calculée à partir des deux TE avec la valeur référence obtenue par le JRC

La moyenne des écarts relatifs par rapport à la valeur du JRC est plus faible pour les résultats utilisant le TE calculé avec la méthode basée sur la concentration des particules (17% contre 40%). Cette méthode paraît plus juste que celle basée sur la masse des particules.

Concernant le diamètre moyen des particules mesuré ([Figure 90](#)), les résultats les plus proches du diamètre déterminé par le JRC (164,2 nm) sont aussi obtenus avec le TE calculé via la méthode basée sur la concentration des particules.

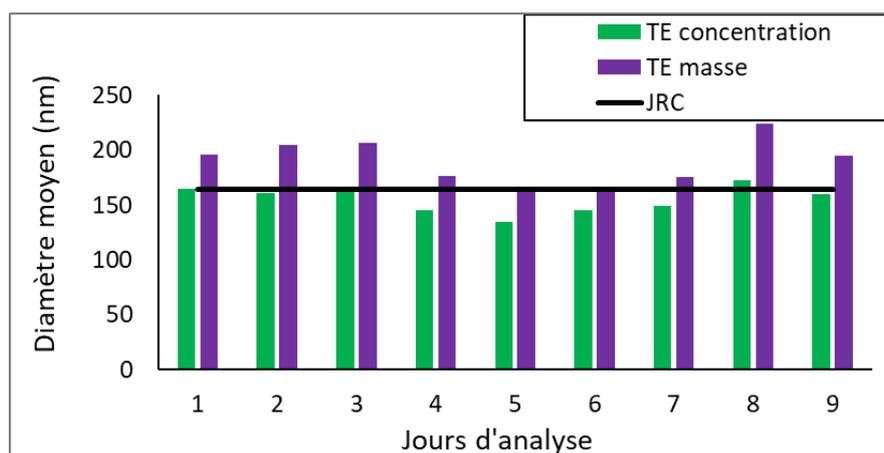


Figure 90 : Comparaison du diamètre moyen du NM-100 mesuré à partir des deux méthodes de calcul du TE et de la valeur estimée par le JRC

L'écart relatif moyen est de 7% avec le TE calculé sur la base de la concentration et de 16% avec le TE calculé sur la base de la masse des particules. Par conséquent, concernant le NM-100, le TE issu de la méthode basée sur la concentration en particules semble être plus pertinent.

V.2.10.3.3 Analyse d'un échantillon de E171

V.2.10.3.4 Méthodes

Dans la littérature, plusieurs E171 ont déjà été analysés mais la provenance de ces échantillons n'est pas toujours précisée. Le E171 produit par Fiorio Colori Spa (Milan, Italie) est cependant le plus cité (Weir et al., 2012 ; Yang et al., 2014 ; Jovanović et al., 2016). Une analyse respectant le protocole complet, décrit en [paragraphe V.2.2.2](#), a été effectuée sur cet échantillon afin de comparer les fractions nanoparticulaires et tailles moyennes obtenues avec les deux méthodes, avec les valeurs de la littérature.

V.2.10.3.1 Résultats

Parmi les études qui ont mesuré le diamètre moyen ainsi que la fraction nanoparticulaire de cet échantillon de E171 produit par Fiorio Colori Spa (Milan, Italie), deux d'entre elles ont utilisé la microscopie électronique à balayage (MET) (Weir et al., 2012 ; Yang et al., 2014) et une a utilisé l'AFM (diamètre) et la DLS (fraction nanoparticulaire) (Jovanović et al., 2016). Le diamètre moyen et la fraction nanoparticulaire déterminés au cours de notre étude à partir des deux TE, ont été comparés avec les valeurs des études précédentes (Figure 91).

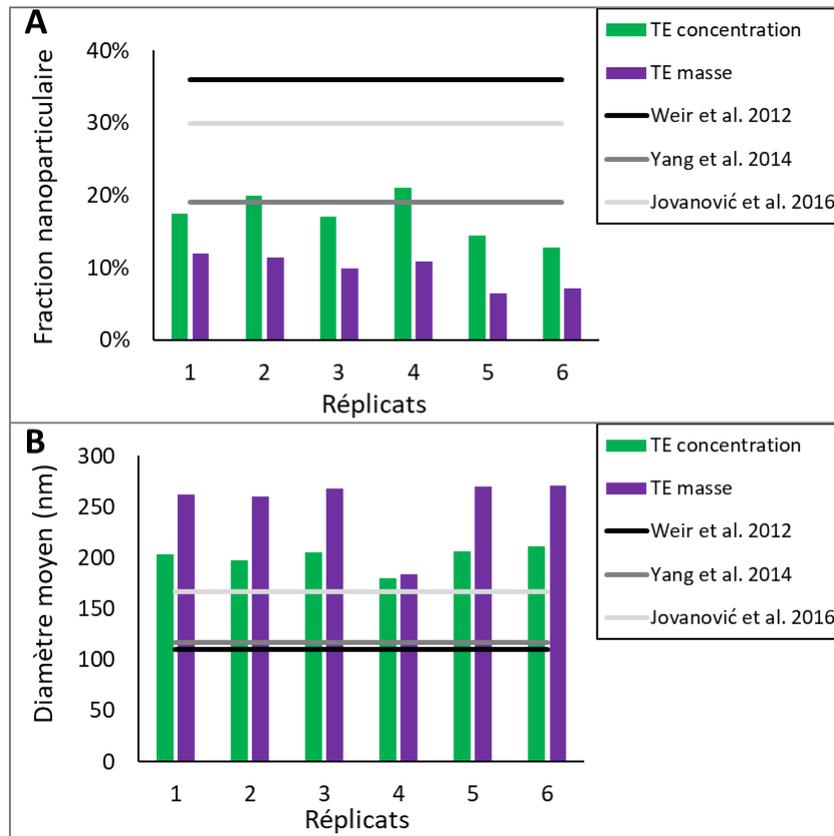


Figure 91 : Comparaison avec la littérature de la fraction nanoparticulaire (A) et de la taille moyenne (B) obtenues avec les TE issus des méthodes basées sur la masse ou la concentration des particules.

Concernant la fraction nanoparticulaire (Figure 91A), les résultats les plus proches des valeurs répertoriées dans la littérature sont obtenus avec le TE calculé par la méthode basée sur la concentration des particules. En effet, le résultat est similaire à celui déterminé par Yang et al. (2014) tandis que les résultats avec le TE calculé avec la méthode basée sur la masse des particules présente un écart significatif de 50%. Concernant la taille moyenne (Figure 91B), les résultats sont proches de ceux obtenus par Jovanović et al. (2016) avec le TE basé sur la concentration en particules. Dans l'étude de Jovanović et al. (2016), ils précisent qu'ils sont assez différents des deux autres études (Weir et al., 2012 ; Yang et al., 2014) mais que cela peut provenir de la différence entre les lots. Toutefois, les valeurs obtenues avec le TE basé sur la masse semblent surestimer le diamètre moyen par rapport aux autres résultats de la littérature. Enfin, il est important de noter que l'écart de diamètre obtenu avec les deux types de TE peut atteindre 50 nm, ce qui est très significatif par rapport aux ordres de grandeurs des diamètres. Par conséquent, avec l'analyse de cet échantillon de E171, la méthode la plus pertinente pour calculer l'efficacité de transport semble être également la méthode basée sur la concentration en particules. Étant donné que les résultats de la Figure 91 sont issues de techniques différentes, il est délicat de tirer des conclusions pertinentes. Ces travaux seront donc considérés

comme une aide à la décision concernant le type de calcul du TE, mais des études plus poussées sont nécessaires à cette optimisation.

V.2.10.3.2 Analyses de nanoparticules d'or de référence

V.2.10.3.3 Méthodes

Dans les théories de la méthode Sp-ICP-MS, le TE est le même pour n'importe quel élément et pour n'importe quel type de taille de NPs. C'est pourquoi le protocole de détermination du TE décrit dans le [paragraphe V.2.2.2.1](#) ne s'effectue qu'avec une seule population de NPs d'or (50 nm). Dans le cadre de l'étude sur le TE, ce protocole a été appliqué à d'autres suspensions de NPs d'or ayant des diamètres différents (20, 40, 50, 60 et 80 nm) provenant de BBI Solutions (Cardiff, UK) afin de déterminer si le diamètre des NPs peut influencer les résultats du TE. De même, leur diamètre sera calculé à partir des deux TE puis comparé aux valeurs fournies par le producteur. Cela permettra de comparer la justesse des deux méthodes.

V.2.10.3.4 Résultats

Les TE sont comparés dans la [Figure 92](#) et les résultats montrent qu'il y a bien une différence significative entre les deux types de méthode de calcul du TE pour les particules de 40, 50 et 60 nm de diamètre. Pour les NPs de 20 et 80 nm de diamètre, les deux méthodes fournissent un TE similaire.

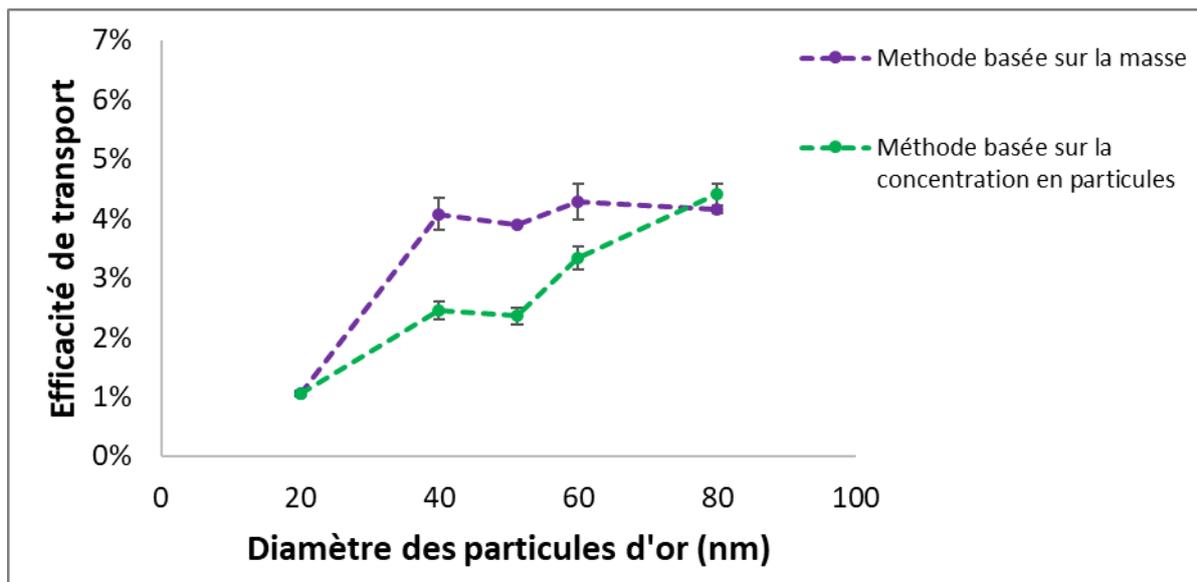


Figure 92 : Efficacité de transport déterminée par les méthodes basées sur la masse et sur la concentration en particules pour différentes tailles de NPs d'or

Concernant la méthode basée sur la concentration en particules, les résultats indiquent clairement qu'il y a une corrélation entre le diamètre des particules et le TE. Par conséquent, le taux de nébulisation serait plus efficace pour des particules de plus grande taille. Si ce comportement se transpose aux particules de TiO₂, alors il faudrait appliquer un facteur correctif pour établir la distribution en taille, ce qui remettrait en cause les traitements de données utilisés en Sp-ICP-MS. Dans la théorie de la méthode Sp-ICP-MS (Pace *et al.*, 2011), le TE est utilisé pour la conversion du signal des particules en masse. Il est aussi utilisé pour calculer la concentration totale massique ou en nombre. Or, comme les résultats le montrent (Figure 92), il est possible qu'il faille distinguer plusieurs corrections liées au TE plutôt que d'utiliser une seule valeur. Les valeurs de TE de la méthode basée sur la concentration ont été comparées avec les résultats de Geertsen *et al.* (2018) dans la Figure 93.

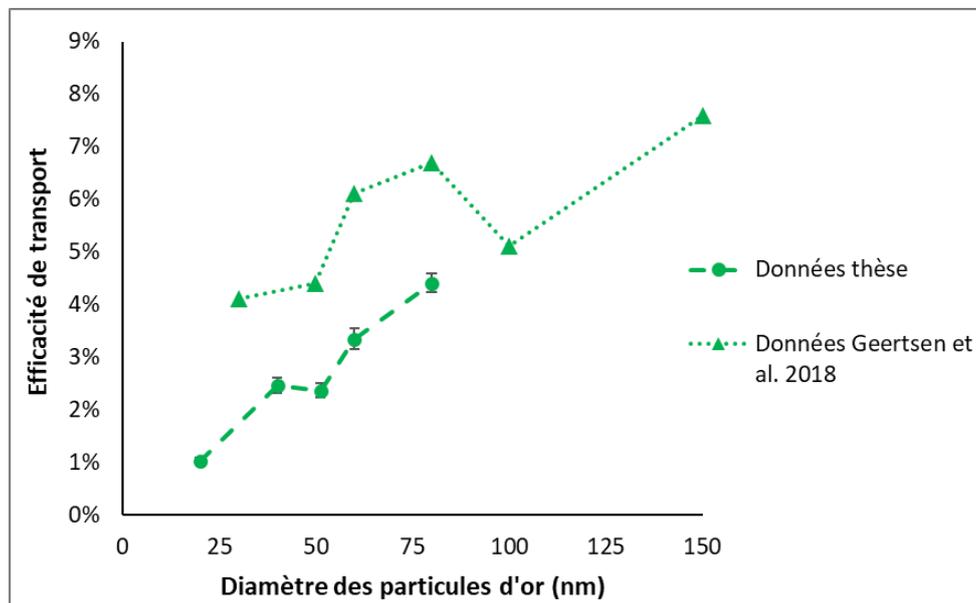


Figure 93 : Comparaison du TE (concentration) avec celui obtenu par Geertsen *et al.* (2018) en fonction du diamètre des NPs d'or

Dans leur étude, les auteurs travaillent avec le même modèle d'ICP-MS (iCapQ). La corrélation entre le TE et la taille des NPs est moins mise en avant, mais il est intéressant d'observer que les plus petites particules fournissent le plus petit TE, tandis que les plus grosses particules obtiennent le TE le plus élevé. Si cette tendance venait à se vérifier avec d'autres études sur différents ICP-MS, alors, il faudrait envisager de nouveaux calculs pour corriger la concentration de NPs ainsi que la distribution en taille.

Concernant la méthode basée sur la masse (Figure 92), le TE obtenu semble être stable ($\approx 4\%$) sauf pour les NPs de 20 nm. Pour cette dernière méthode, les résultats liés aux différentes tailles de NPs

d'or ont aussi été rassemblés (Figure 94) afin de vérifier la pertinence du point concernant les particules de 20 nm de diamètre, de la Figure 92.

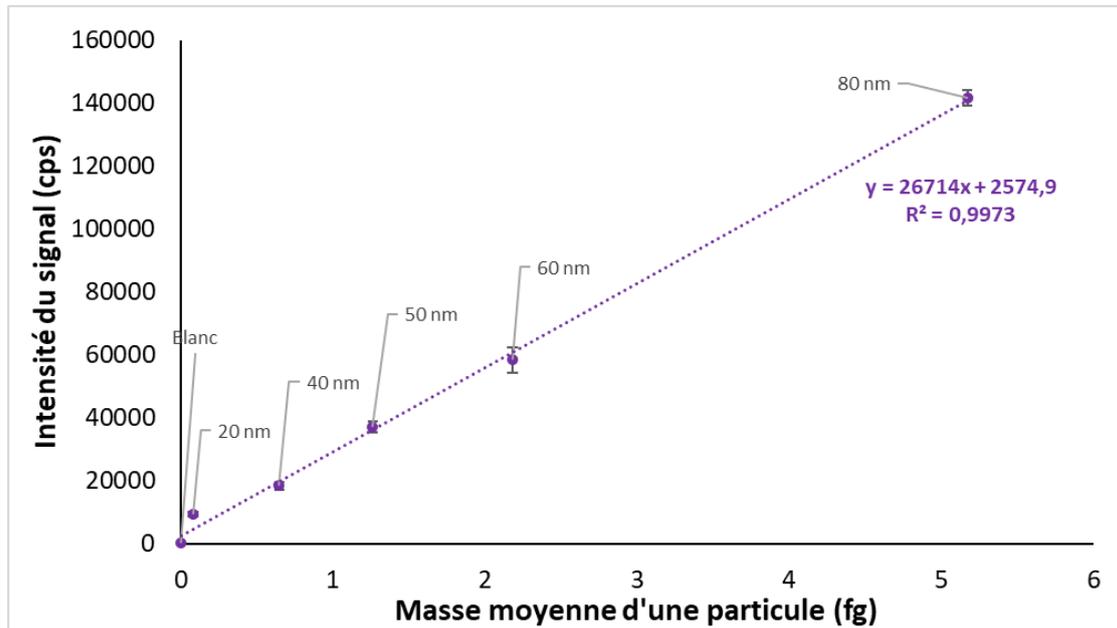


Figure 94 : Etalonnage à partir de différentes tailles de NPs d'or (indiquées pour chaque point) pour la détermination du TE avec la méthode basée sur la masse des NPs

Pour rappel, la droite de la Figure 94 est obtenue grâce à la méthode basée sur la masse décrite dans le paragraphe II.9.1.2. Les résultats mettent en évidence que le point concernant les NPs de 20 nm est le moins bien corrélé par rapport au reste des points. Par conséquent, les NPs d'or de 20 nm ne sont probablement pas adaptées pour la mesure du TE. Ces résultats (Figure 92) sont similaires à ceux de Fuchs et al. (2018) et Geertsen et al. (2018) qui trouvent un signal plus faible à partir de 100 nm de diamètre. Cela permet aussi de confirmer que le TE obtenu par la méthode basée sur la masse ne varie pas selon la taille de la particule jusqu'à un diamètre de 80 nm (Figure 92).

Enfin, les diamètres des différentes NPs d'or (20-40-50-60-80 nm) ont été calculés à partir des deux TE et ces diamètres ont été comparés au diamètre de référence fourni par le producteur (Figure 95).

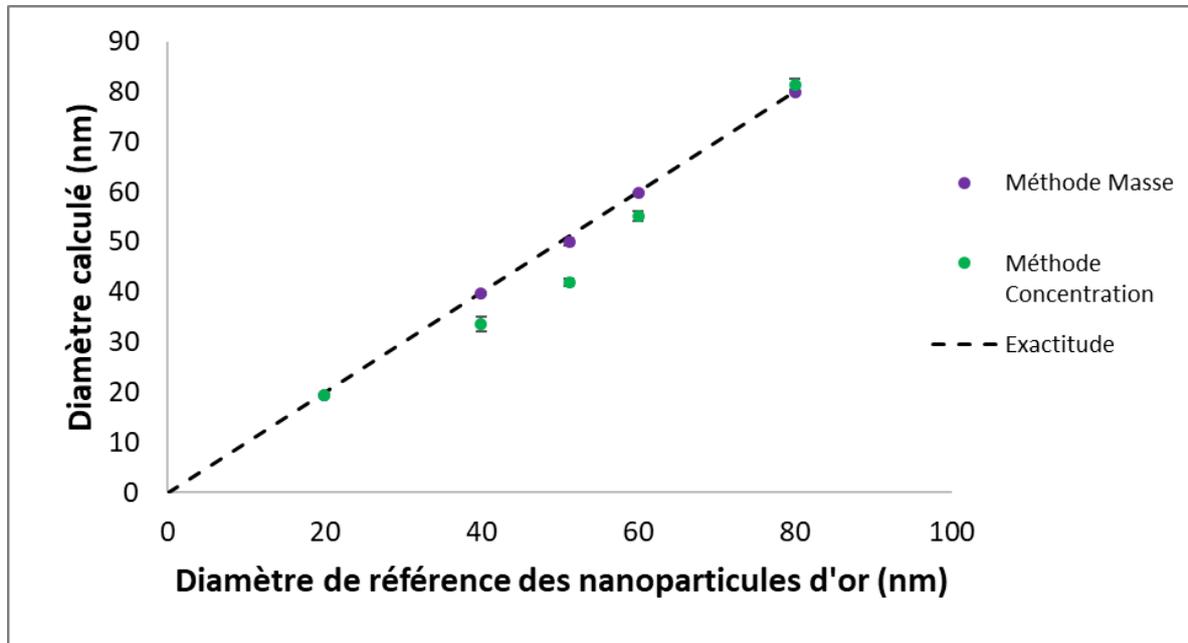


Figure 95 : Comparaison des diamètres des NPs d'or de référence avec les diamètres calculés à partir des TE basés sur la méthode de la masse et sur la méthode de la concentration

La méthode basée sur la masse des particules permet d'avoir un résultat similaire pour toutes les tailles de NPs d'or, même avec celles de 20 nm (points confondus à 20 nm). Ce qui montre que pour des NPs d'or, la différence de calcul du TE n'a pas de réel impact sur la mesure du diamètre des petites NPs. Pour la méthode basée sur la concentration, celle-ci entraîne des biais qui peuvent être significatifs pour les NPs de diamètre 40, 50 et 60 nm. Cependant, comme attendu pour les NPs de 80 nm, le résultat est similaire au résultat de la méthode de la masse car les TE sont similaires (Figure 92). A partir de ces données obtenues sur les NPs d'or, il est donc plus pertinent d'utiliser la méthode basée sur la masse des particules plutôt que celle basée sur leur concentration.

V.2.10.4 Conclusion concernant la mesure du TE

Trois approches ont été comparées afin d'évaluer la méthode la plus pertinente pour calculer le TE. Néanmoins, la conclusion diffère selon les différentes expériences menées (Tableau 26).

Tableau 26 : Choix retenu pour la méthode de calcul du TE en fonction des analyses effectuées

	Méthode basée sur la masse des particules	Méthode basée sur la concentration des particules
NM-100		X
E171		X
NPs d'or	X	

La méthode de calcul du TE basée sur la masse des particules semble plus adaptée pour l'analyse des NPs d'or, tandis que la méthode basée sur la concentration en particules semble plus adaptée pour le TiO₂ (NM-100 et E171) (Tableau 26). Les échantillons alimentaires seront analysés en utilisant les deux méthodes de calcul du TE, afin de comparer les écarts de résultats que cela peut engendrer. Toutefois, en tenant compte que le but principal de ces travaux de thèse est la caractérisation de NPs de TiO₂, c'est la méthode basée sur la concentration qui sera favorisée pour exploiter les résultats obtenus.

Il est important de noter que ces observations mettent en avant une limite actuelle de la méthode Sp-ICP-MS sur la justesse des analyses à cause du manque de MRC en NPs de TiO₂ qui permettrait de réaliser une meilleure optimisation de la méthode Sp-ICP-MS.

Actuellement, dans la littérature, les distributions en taille obtenues par Sp-ICP-MS ne prennent pas en compte le fait que des particules de tailles différentes puissent avoir des efficacités de transport différentes alors que les résultats de la Figure 93 (méthode basée sur la concentration) laisse envisager cette possibilité. Si tel est bien le cas, alors il sera difficile de généraliser une méthode de traitement de données en Sp-ICP-MS, ce qui limiterait considérablement l'utilisation de cette technique. C'est pourquoi il est nécessaire de poursuivre les études sur le TE, afin de mieux comprendre le comportement des NPs, l'influence sur la justesse du résultat et d'adapter le traitement de données en conséquence et en toute connaissance.

V.2.11 Bilan

Cette première partie a présenté les différentes optimisations de la méthode Sp-ICP-MS qui ont été réalisées. Pour caractériser les particules de TiO₂ contenues dans des échantillons alimentaires, les paramètres analytiques utilisés sont décrits dans le [Tableau 27](#).

Tableau 27 : Liste des paramètres optimisés pour la méthode Sp-ICP-MS

Optimisation	Paramètre retenu
Temps d'acquisition	10 ms
Critère calcul seuil bruit de fond-particule	Au : 6xET TiO ₂ : 4xET
Type de flacon	Polypropylène sans lavage
Mode d'introduction de l'échantillon	Aspiration libre
Mode d'analyse	STDS
Milieu de dispersion	HNO ₃ 0,1% v/v
Isotope de Ti analysé	⁴⁹ Ti, ⁴⁸ Ti
Mode de calcul du TE	Méthode basée sur la concentration des particules

V.3 Analyse d'échantillons alimentaires

V.3.1 Choix des denrées alimentaires

La première étude parue concernant l'analyse des NPs de TiO₂ dans les aliments a été réalisée par [Weir et al. \(2012\)](#). Cette étude s'est focalisée sur l'analyse de produits du marché américain comprenant de nombreux produits de confiserie (chewing-gum, chocolats), une crème de noix de coco et une crème de café ([Figure 96](#)).

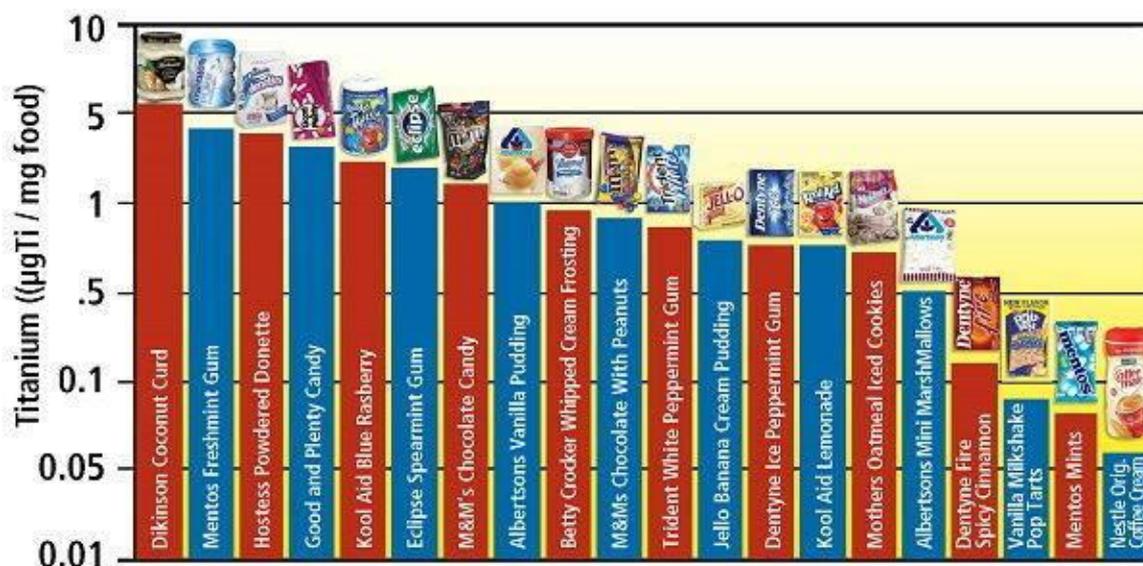


Figure 96 : Concentration de titane (forme non précisée) dans les aliments analysés par [Weir et al. \(2012\)](#) – (figure provenant de Tg 5 Stelle (média italien))

La grande majorité des produits analysés par [Weir et al. \(2012\)](#) ne se trouve pas sur le marché français. Malgré l'absence de base de données officielle sur les denrées alimentaires contenant du E171, il existe des bases de données mises en place par différentes associations de consommateurs. C'est le cas d'« Open Food Facts » ([Open Food Facts](#)) qui met à disposition une base de données en accès libre qui répertorie les ingrédients de produits alimentaires, dont le E171. L'association « Agir pour l'Environnement » ([Agir pour l'Environnement](#)) propose aussi une liste de produits contenant potentiellement des nanoparticules, dont l'additif E171 mais aussi E172 et E551. Par conséquent, le choix des aliments analysés s'est appuyé sur ces deux bases de données. Cependant, suite à la parution d'études sur la toxicité des NPs de TiO₂ ([Bettini et al., 2017](#)), ainsi qu'à des communications d'associations de consommateurs ([VeilleNano, 2010](#)), certains produits se sont vus retirés du marché durant ces travaux de thèse. Les aliments choisis et achetés dans plusieurs supermarchés français en 2018 sont donc présentés dans le [Tableau 28](#). Nous avons sélectionné une dizaine d'échantillons parmi ceux analysés par [Weir et al. \(2012\)](#) comme les chewing-gums, dragées et chocolats. Les autres

échantillons n'ont jamais été analysés mais sont susceptibles d'en contenir (selon [Agir pour l'Environnement](#)). Enfin, un échantillon a été sélectionné après avoir eu connaissance que le E171 ait été retiré de ce produit, afin de le vérifier.

Tableau 28 : Liste des produits alimentaires retenus pour l'analyse des NPs de TiO₂ par Sp-ICP-MS

Code	Produit	E171 indiqué sur l'étiquette	Mention [nano] présente	Justification du choix
E1	 Chewing-gum , menthe verte - Freudent	Oui	Non	Matrices déjà analysées (Tableau 5)
E2	 Chocolat , m&m's Peanut, m&m's	Oui	Non	
E3	 Chewing-gum , Hollywood MAX, Fraise-citron - Hollywood	Oui	Non	
E4	 Dragée , Skittles Original, Skittles	Oui	Non	
E5	 Dessert glacé , Création citron agrumes - Lenôtre	Oui	Non	Produits suspectés de contenir des NPs de TiO ₂ d'après la base de données Agir pour l'Environnement
E6	 Décoration , Disque de gâteau comestible - Dekora	Oui	Non	
E7	 Décoration , Crayon pâtissier décoratif goût vanille - Vahiné	Oui	Non	
E8	 Gâteau , Napolitain signature chocolat poire - LU	Oui	Non	
E9	 Dessert glacé , Assortiment de mignardises – Marque repère	Oui	Non	
E10	 Gâteau , Assortiment de doonys - Auchan	Oui	Non	
E11	 Garniture , Garniture pour bouchées à la reine – Petitjean	Non	Non	Produit dont le E171 a été retiré et confirmé sur l'étiquette

V.3.2 Protocole d'extraction des NPs de TiO₂ des échantillons alimentaires

Il existe plusieurs protocoles d'extraction développés pour extraire des NPs de TiO₂ contenues dans des matrices alimentaires. La plupart sont basés sur des extractions enzymatique (Loeschner *et al.*, 2018), acide (Peters *et al.*, 2014b) ou par solvant et centrifugation (Chen *et al.*, 2013). Cette étape peut s'avérer complexe car le rendement de l'extraction doit être répétable quelle que soit la matrice, tout en préservant la forme et la taille des NPs.

Malgré tout, nous avons décidé de tester en première intention une approche simple et pragmatique, basée sur le début du protocole de Chen *et al.* (2013) qui consiste à diluer une fraction d'aliment dans de l'eau sans étape de centrifugation. Alors que Chen *et al.* (2013) effectuent ensuite plusieurs lavages du culot, qui contient plus de 95% des particules, par centrifugations successives avec plusieurs solvants (eau, acétone, éthanol) afin d'éliminer les autres additifs alimentaires comme l'aspartame, le maltitol et le xylitol. Le protocole testé est détaillé dans la Figure 97.

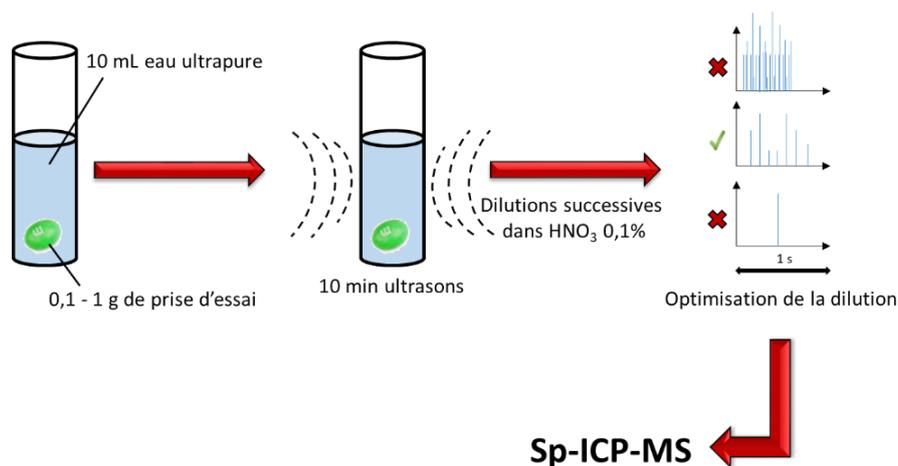


Figure 97 : Protocole d'extraction des NPs de TiO₂ testé sur des aliments

La fraction d'échantillon prélevée varie suivant le type d'échantillon. Pour les échantillons de E1 à E4, une unité complète est utilisée ; tandis que pour les échantillons E5, E8, E9 et E10, une fraction non représentative de la totalité de l'échantillon a été prélevée pour l'extraction. Pour les échantillons restants, E6, E7 et E11, une prise d'essai entre 0,1 et 1 g a été réalisée. Le Tableau 29 résume les fractions prélevées pour chaque échantillon.

Tableau 29 : Fraction du produit alimentaire prélevée pour l'analyse des NPs de TiO₂ par Sp-ICP-MS

Code	Produit	Fraction prélevée	Représentativité de l'aliment entier
E1	 Chewing-gum , menthe verte - Freudent	Un chewing-gum	Oui
E2	 Chocolat , m&m's Peanut, m&m's	Un m&m's	Oui
E3	 Chewing-gum , Hollywood MAX, Fraise-citron - Hollywood	Un chewing-gum	Oui
E4	 Dragée , Skittles Original, Skittles	Un Skittles	Oui
E5	 Dessert glacé , Création citron agrumes - Lenôte	Ecritures sur la plaquette en chocolat	Non
E6	 Décoration , Disque de gâteau comestible - Dekora	Plusieurs morceaux du disque	Oui
E7	 Décoration , Crayon pâtissier décoratif gout vanille - Vahiné	Pâte	Oui
E8	 Gâteau , Napolitain signature chocolat poire - LU	Ecriture sur le chocolat	Non
E9	 Dessert glacé , Assortiment de mignardises – Marque repère	Dorures sur le chocolat	Non
E10	 Gâteau , Assortiment de doonys - Auchan	Glaçage	Non
E11	 Garniture , Garniture pour bouchées à la reine – Petitjean	Sauce et garniture	Oui

Les ultrasons ont été utilisés pour accélérer l'extraction des particules. Seul E2 est passé moins de 10 min aux ultrasons (3 min) pour éviter que le chocolat ne fonde et ne se mélange à la solution. Les dilutions ont été faites dans l'acide nitrique à 0,1% (v/v) et adaptées en fonction de la concentration en particules. En effet, comme expliqué dans le [paragraphe II.9.3](#), la concentration en particules nécessite d'être optimisée afin de minimiser la détection de coïncidence. Pour ce faire, tous les échantillons sont dilués dans un premier temps à un facteur 100 000 en réalisant deux dilutions successives d'un facteur 100 (100 µL prélevés et dilués dans 10 mL de HNO₃ 0,1%). La solution est une première fois analysée puis, suivant la concentration en particules calculée, la dilution de l'échantillon est adaptée pour obtenir une concentration en particules comprise entre 25 000 et 100 000 particules/mL pour correspondre à un taux de signaux recommandé par [Montaño et al., \(2014\)](#) et [Huynh et al., \(2016\)](#). Finalement, Les facteurs de dilution peuvent varier entre 1 500 et 500 000 suivant les échantillons.

Aucune étape de filtration n'a été effectuée, considérant que le facteur de dilution était suffisamment important pour éviter la présence de résidus solides dans la solution finale.

V.3.3 Échantillons alimentaires

V.3.3.1 Méthode

Tous les échantillons ont été préparés en triplicata comme indiqué dans le [paragraphe V.3.2](#) et le protocole d'analyse par Sp-ICP-MS a été appliqué comme le décrit le [paragraphe V.2.2.2](#). Chaque triplicata d'extraction a été analysé en double, ce qui fait un total de 6 mesures par produit alimentaire. Les isotopes analysés sont le ⁴⁸Ti, le plus abondant naturellement et le ⁴⁹Ti, qui est le moins interféré.

V.3.3.2 Résultats et discussion

Pour chaque réplique, le nombre de particules détectées allait de 600 à 1 600 particules, ce qui correspond bien à la concentration en particules dans la solution (25 000-100 000 particules/mL) avec un TE ≈ 2%. Ainsi, chaque paramètre obtenu est issu d'une analyse de 3 600 particules minimum (600 x 6 répétitions). Les [Tableaux 30 et 31](#) résument toutes les données obtenues concernant les différents produits alimentaires analysés avec les isotopes ⁴⁸Ti et ⁴⁹Ti, en se basant sur les deux méthodes de calcul du TE. Pour les échantillons E5, E8, E9 et E10, une fraction spécifique a été prélevée pour l'extraction (ex : écritures à la surface pour le gâteau Napolitain (E8) ou glaçage pour le gâteau doonys (E10)). Ainsi, les concentrations particulières mesurées ne sont pas représentatives de l'aliment dans sa globalité. C'est pourquoi il est indiqué NR pour ces échantillons.

Tableau 30 : Résultats obtenus sur différents produits alimentaires avec un TE calculé via la méthode basée sur la masse des particules

TE de la méthode basée sur la masse des particules																						
Echantillon	1 - 		2 - 		3 - 		4 - 		5 - 		6 - 		7 - 		8 - 		9 - 		10 - 		11 - 	
Isotopes	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti								
Diamètre moyen (nm)	180 ± 3	176 ± 4	146 ± 3	127 ± 4	157 ± 6	147 ± 5	185 ± 5	167 ± 5	157 ± 2	139 ± 3	247 ± 12	231 ± 8	198 ± 6	195 ± 4	169 ± 5	158 ± 7	142 ± 4	130 ± 4	115 ± 5	101 ± 4	ND	ND
Diamètre le plus fréquent (nm)	139 ± 5	136 ± 3	106 ± 2	92 ± 2	111 ± 3	105 ± 2	140 ± 6	121 ± 5	118 ± 2	102 ± 1	210 ± 19	191 ± 17	155 ± 6	158 ± 4	125 ± 5	115 ± 5	109 ± 2	99 ± 3	93 ± 4	80 ± 4	ND	ND
Fraction nanoparticulaire (%)	19 ± 2	17 ± 2	32 ± 3	45 ± 2	29 ± 3	32 ± 2	15 ± 3	25 ± 3	20 ± 3	35 ± 2	9 ± 2	15 ± 2	11 ± 2	12 ± 1	20 ± 3	26 ± 3	28 ± 2	37 ± 3	49 ± 5	58 ± 4	ND	ND
Concentration nanoparticulaire (x10 ⁹ NPs/g)	16 ± 2	19 ± 2	12 ± 1	18 ± 1	7 ± 1	8 ± 1	0,033 ± 0,005	0,056 ± 0,007	NR	NR	10 ± 1	16 ± 1	20 ± 2	21 ± 4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	ND	ND
LDt (nm)	54 ± 1	39 ± 1	61 ± 3	38 ± 1	53 ± 1	44 ± 1	68 ± 3	44 ± 2	65 ± 2	39 ± 1	68 ± 1	47 ± 1	57 ± 1	37 ± 1	58 ± 1	41 ± 4	58 ± 1	36 ± 1	54 ± 3	33 ± 2	ND	ND

Tableau 31 : Résultats obtenus sur différents produits alimentaires avec un TE calculé via la méthode basée sur la concentration des particules

TE de la méthode basée sur la concentration des particules																						
Echantillon	1 - 		2 - 		3 - 		4 - 		5 - 		6 - 		7 - 		8 - 		9 - 		10 - 		11 - 	
Isotopes	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁴⁸ Ti								
Diamètre moyen (nm)	152 ± 2	148 ± 3	115 ± 2	100 ± 3	144 ± 4	133 ± 5	151 ± 4	137 ± 4	133 ± 2	120 ± 2	203 ± 10	186 ± 6	169 ± 5	167 ± 3	134 ± 4	126 ± 5	128 ± 3	118 ± 4	101 ± 2	84 ± 2	ND	ND
Diamètre le plus fréquent (nm)	115 ± 3	113 ± 2	92 ± 2	76 ± 2	104 ± 2	98 ± 2	113 ± 2	102 ± 3	104 ± 1	92 ± 2	165 ± 17	148 ± 12	127 ± 4	127 ± 3	103 ± 3	96 ± 3	102 ± 2	93 ± 2	87 ± 2	65 ± 3	ND	ND
Fraction nanoparticulaire (%)	25 ± 2	27 ± 2	49 ± 3	59 ± 2	34 ± 3	38 ± 2	33 ± 2	44 ± 3	33 ± 2	44 ± 2	15 ± 2	22 ± 3	17 ± 2	18 ± 2	33 ± 4	39 ± 3	35 ± 2	44 ± 3	58 ± 4	68 ± 3	ND	ND
Concentration nanoparticulaire (x10 ⁹ NPs/g)	45 ± 2	44 ± 4	39 ± 2	49 ± 1	10 ± 1	12 ± 1	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,02	NR	NR	29 ± 2	46 ± 3	49 ± 6	49 ± 9	NR	NR	NR	NR	NR	NR	ND	ND
LDt (nm)	46 ± 1	33 ± 1	48 ± 3	29 ± 1	55 ± 1	36 ± 0,3	52 ± 1	33 ± 1	52 ± 1	33 ± 1	56 ± 1	36 ± 1	49 ± 1	32 ± 1	46 ± 1	32 ± 2	53 ± 1	33 ± 1	47 ± 1	27 ± 0,1	ND	ND

ND : Non détecté
NR : Non représentatif

Pour tous les aliments, excepté l'échantillon E11 (garniture), des nanoparticules de TiO₂ ont bien été identifiées malgré l'absence de la mention [nano] sur l'étiquetage. Dans l'échantillon E11, les analyses ont bien confirmé qu'il n'y a plus de présence de particules de TiO₂ dans ce produit, et donc que le E171 a bien été retiré.

V.3.3.2.1 Influence de l'isotope analysé

Selon les résultats présentés dans les [Tableaux 30 et 31](#), on observe que le diamètre moyen et le diamètre le plus fréquent sont toujours égaux ou supérieurs pour l'isotope ⁴⁹Ti comparés aux résultats obtenus avec l'isotope ⁴⁸Ti. En effet, l'isotope ⁴⁹Ti étant moins abondant, moins de petites particules sont détectées qu'avec l'isotope ⁴⁸Ti, et on observe donc systématiquement une LDt plus élevée qu'avec l'isotope ⁴⁸Ti, ce qui entraîne une augmentation du diamètre moyen et du diamètre le plus fréquent. En ce qui concerne la concentration nanoparticulaire, c'est aussi le cas, puisque plus de NPs sont détectées avec le ⁴⁸Ti qu'avec le ⁴⁹Ti. Pour les échantillons E1, E7 et E8, les résultats sont similaires avec l'analyse des deux isotopes. Cela s'explique par le fait que la grande majorité des particules possèdent une taille supérieure à la LDt du ⁴⁹Ti. Ainsi, toutes les particules sont détectées aussi bien avec le ⁴⁹Ti que le ⁴⁸Ti. Cela se confirme en analysant les distributions en taille ([Figure 99](#)), où la forme de distribution est similaire pour les deux isotopes. Par conséquent, les résultats obtenus avec l'isotope ⁴⁸Ti sont utilisés pour les autres exploitations de résultats.

V.3.3.2.2 Comparaison diamètre moyen – diamètre le plus fréquent

Dans les [Tableaux 30 et 31](#), le diamètre moyen est également significativement supérieur au diamètre le plus fréquent car les distributions en taille ne sont pas symétriques, mais semblent être de type log-normale ([Figure 99](#)). Ce type de distribution est aussi observé dans d'autres études ([Chen et al., 2013](#) ; [Song et al., 2015](#) ; [de la Calle et al., 2018a](#)). Cela indique que le diamètre moyen n'est pas systématiquement le paramètre le plus représentatif de la distribution en taille dans le cadre de l'analyse du E171. Il est intéressant de noter que cinq échantillons (E2, E3, E5, E8 et E9) présentent un diamètre moyen > 100 nm, tandis que leur diamètre le plus fréquent est < 100 nm. Cela met en avant l'importance de bien caractériser ces matériaux avant toute évaluation des risques.

V.3.3.2.3 Impact du choix du TE

En comparant le [Tableau 30](#) et le [Tableau 31](#), les résultats sont significativement différents. En effet, les écarts concernant les diamètres moyens, les diamètres les plus fréquents et les fractions

nanoparticulaires, varient respectivement entre 9 et 21%, 7 et 22% et 14 et 35%. Ces écarts mettent en avant le fait que le choix du mode de calcul du TE a un impact significatif sur le résultat en Sp-ICP-MS dans notre cas. La Figure 98 représente les écarts observés pour les diamètres moyens en fonction des écarts des deux types de TE mesurés pour chaque analyse.

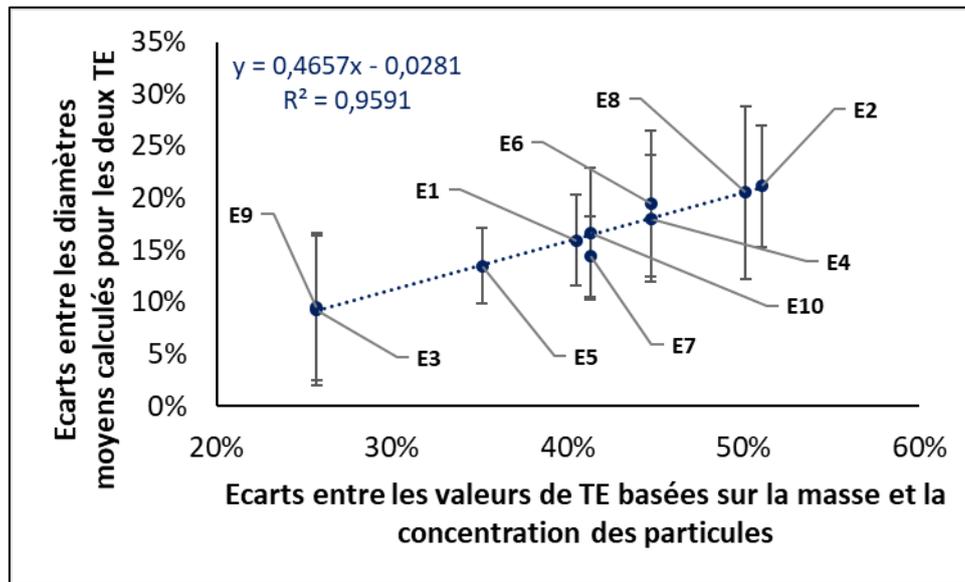


Figure 98 : Ecart des diamètres obtenus en fonction des écarts entre les valeurs de TE mesurées via les deux méthodes (masse et concentration)

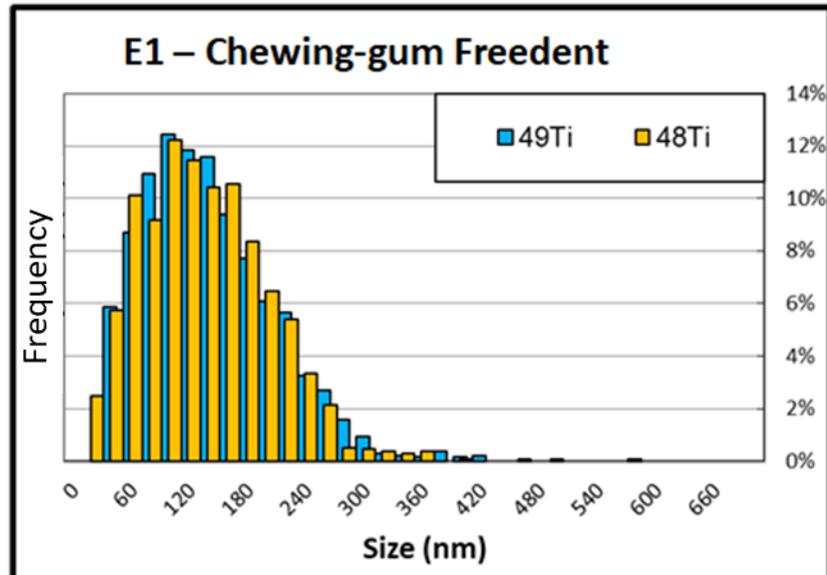
Dans cette figure, les écarts des diamètres obtenus avec chaque TE sont calculés pour tous les échantillons (ordonnées). Cet écart est comparé en fonction de l'écart calculé entre les TE de la méthode basée sur la masse et la concentration des particules, le jour d'analyse de chaque échantillon (abscisse). Cette corrélation confirmerait qu'il y a bien une influence statistiquement significative du TE sur l'estimation du diamètre des NPs. Selon ces résultats, les différences entre les TE calculés auront un impact d'un facteur $\approx 0,5$ sur le diamètre moyen mesuré d'après le coefficient de la pente, ce qui équivaut à plusieurs dizaines de nm dans notre étude. En prenant l'exemple de l'échantillon E2, l'écart entre les deux valeurs de TE représente $\approx 50\%$. Par conséquent, l'écart observé sur le diamètre moyen sera de $\approx 25\%$ ce qui représente ≈ 25 nm d'écart en fonction de la valeur de TE utilisée.

Toutefois, comme il a été expliqué dans le [paragraphe V.2.10](#), les valeurs obtenues avec le TE calculé par la méthode basée sur la concentration, sont préférées pour les NPs de TiO₂. Par conséquent, ce sont les valeurs obtenues avec cette méthode qui seront utilisées pour l'exploitation des résultats ([Tableau 31](#)).

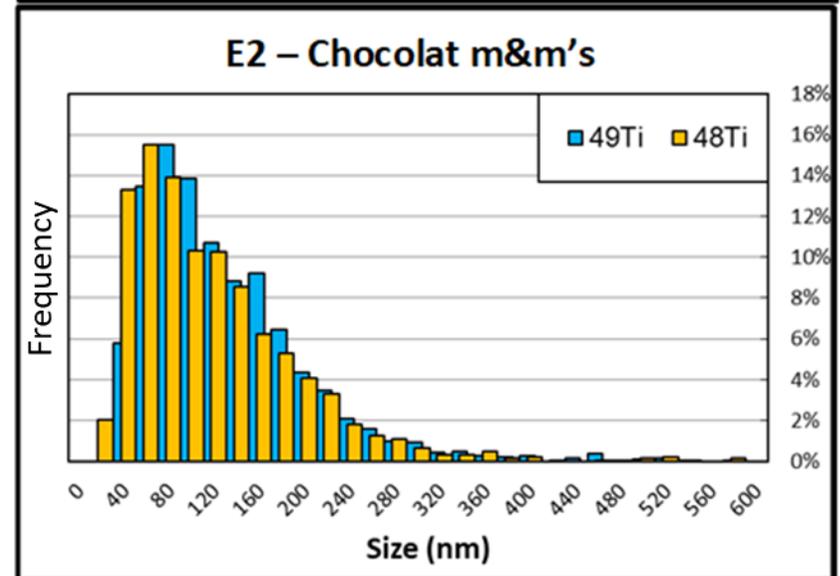
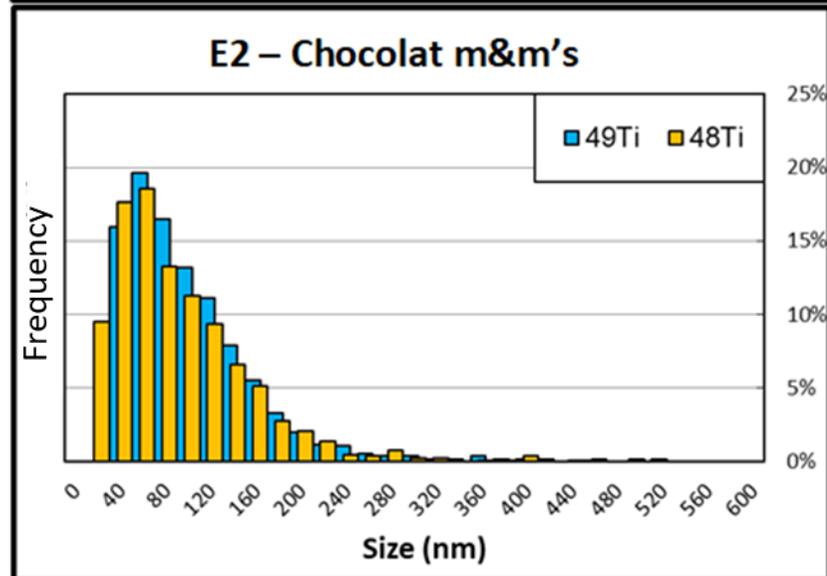
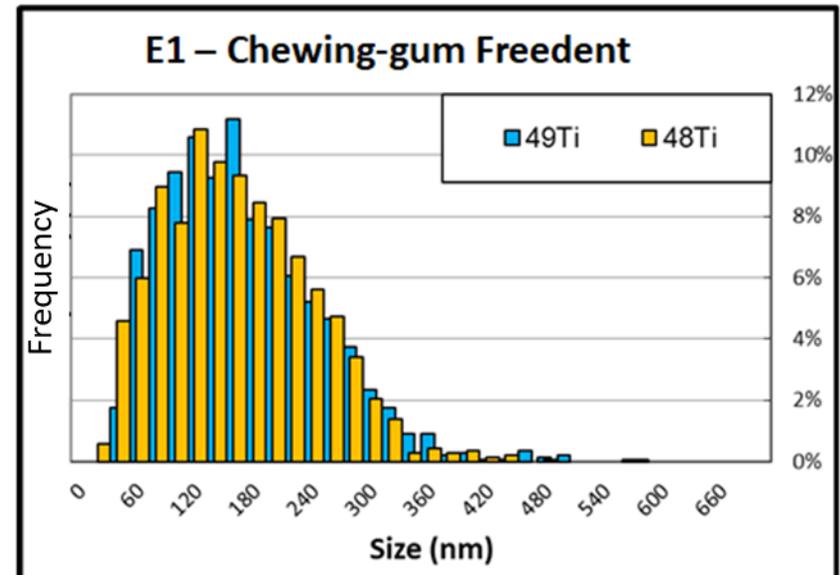
V.3.3.2.4 Comparaison avec la littérature

Concernant les chewing-gums (échantillons E1 et E3), les diamètres moyens sont respectivement de 148 nm contre 133 nm et donc relativement proches. Ces valeurs sont cohérentes avec celles trouvées dans la littérature sur ce même type de matrice (Faust *et al.*, 2016 ; Dufey *et al.*, 2018). C'est aussi le cas pour le diamètre le plus récurrent (Chen *et al.*, 2013 ; Candás-Zapico *et al.*, 2018). Pour le chocolat (échantillon E2), les diamètres sont comparables à ceux obtenus par de la Calle *et al.* (2018a) qui observent également un décalage entre le diamètre moyen et le diamètre le plus récurrent, du fait d'une distribution en taille non symétrique. En général, les valeurs de diamètre moyen varient entre 86 et 184 nm (Tableau 31), ce qui est cohérent avec la littérature (Tableau 5). Au niveau des fractions nanoparticulaires, elles sont comprises entre 19% et 68% dans l'additif, ce qui confirme la variabilité des tailles des particules de TiO₂ (Tableau 5). Les plus faibles fractions nanoparticulaires sont retrouvées dans les décorations alimentaires (E6 et E7), avec une valeur de 15 à 17%. En revanche, ce sont les échantillons les plus concentrés en nanoparticules car l'additif est l'un des principaux ingrédients de l'aliment. Enfin, concernant les concentrations en nanoparticules (< 100 nm), la dragée (E4) est le produit qui contient le moins de nanoparticules (120 millions par gramme). Pour les chewing-gums (E1 et E3), le nombre de particules par unité a aussi pu être déterminé, respectivement 250 ± 20 et 700 ± 40 milliards de particules/g. Ces valeurs sont comparables avec celles trouvées par Candás-Zapico *et al.* (2018) qui ont aussi analysé le TiO₂ contenu dans des chewing-gums par Sp-ICP-MS. En revanche, ces concentrations sont nettement inférieures à celles trouvées par Dufey *et al.* (2018). Etant donné que le rendement d'extraction n'a pas été vérifié (l'objectif n'étant pas de tout extraire mais d'extraire une partie significative de NPs présentes dans les échantillons avant de les diluer), il est possible que les concentrations mesurées soient sous-estimées.

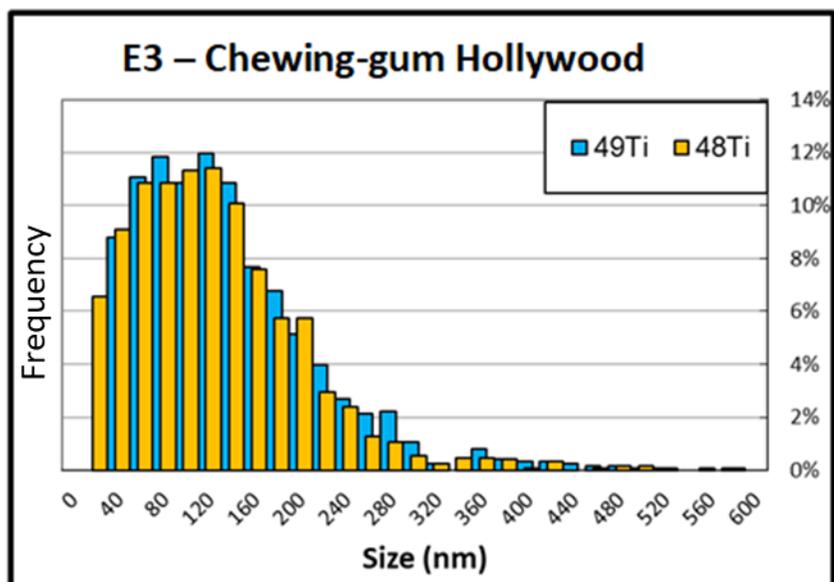
Efficacité de transport (Concentration en particules)



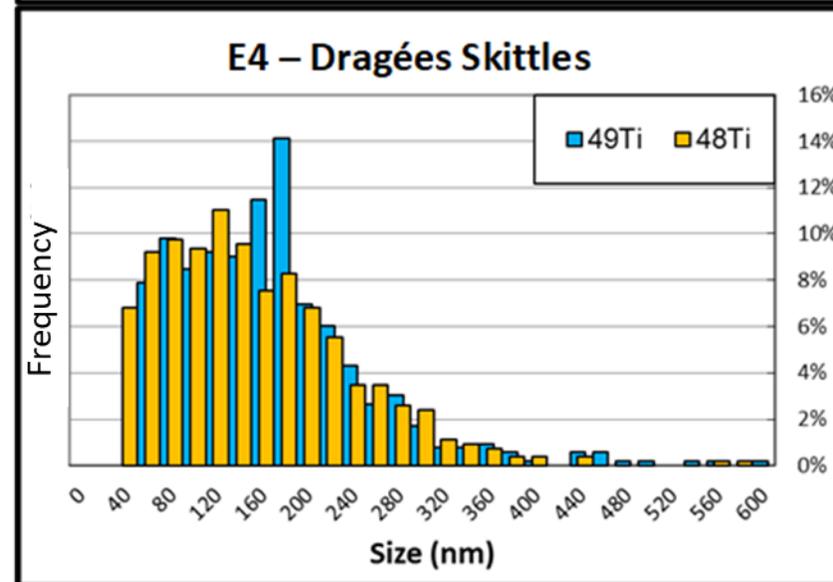
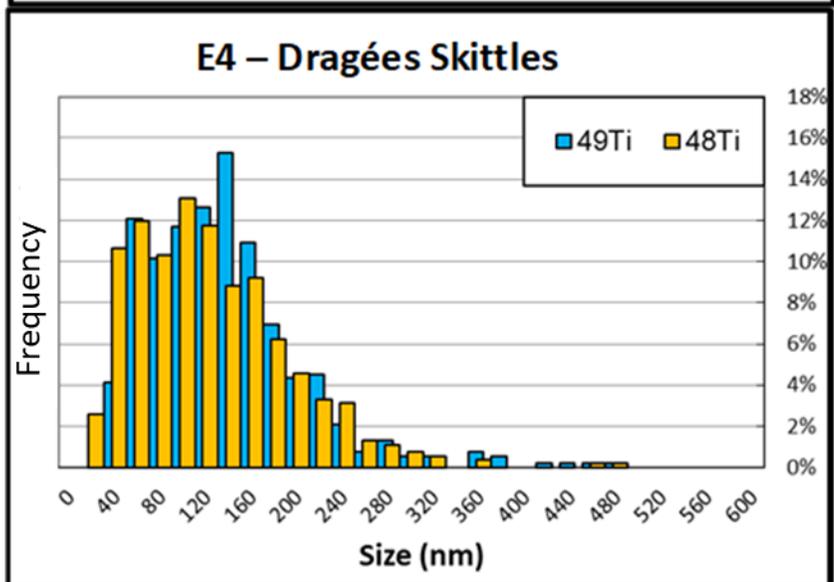
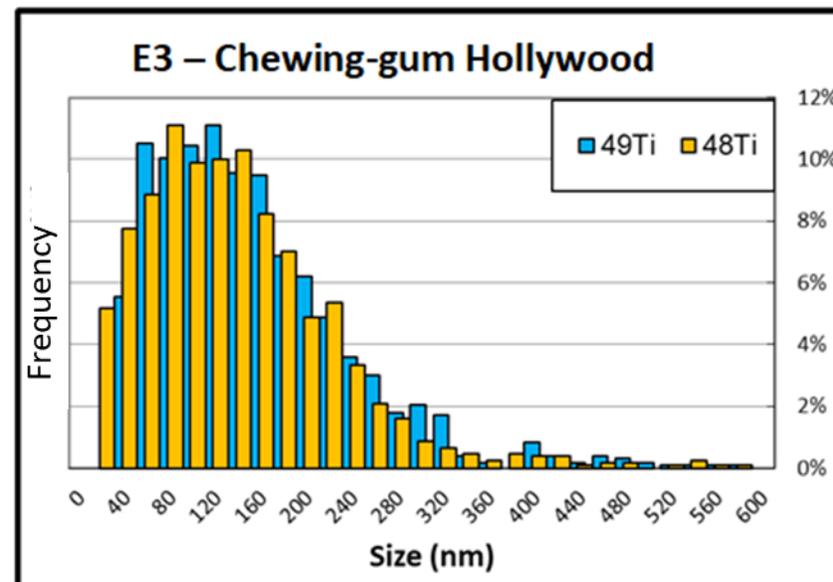
Efficacité de transport (Masse des particules)



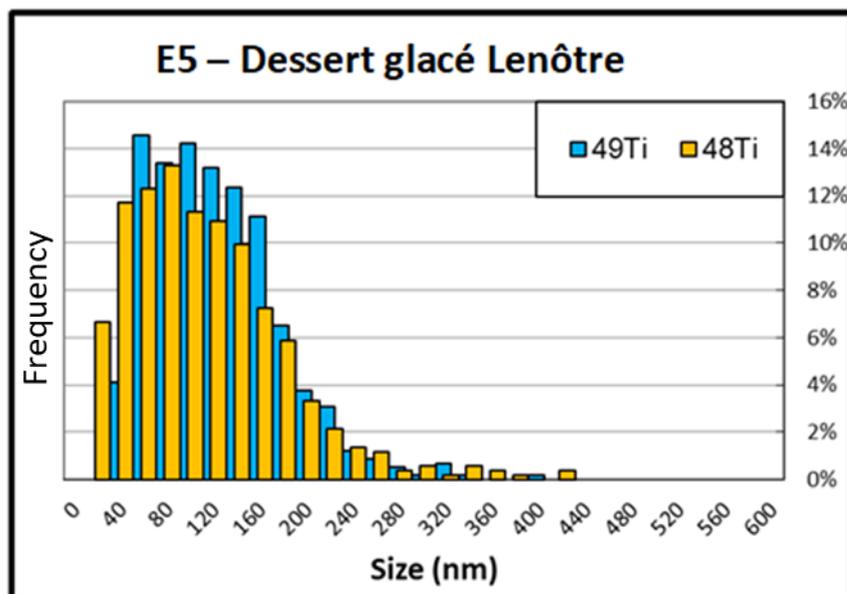
Efficacité de transport (Concentration en particules)



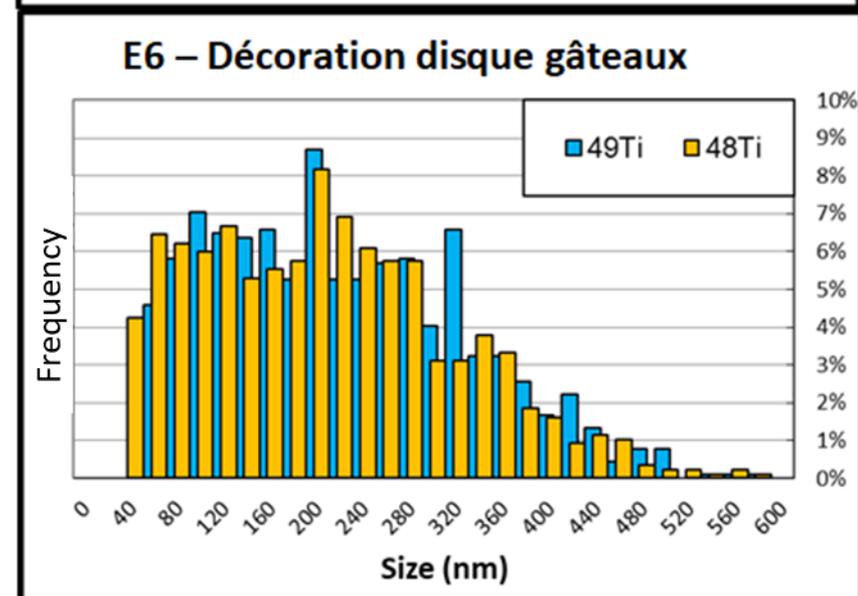
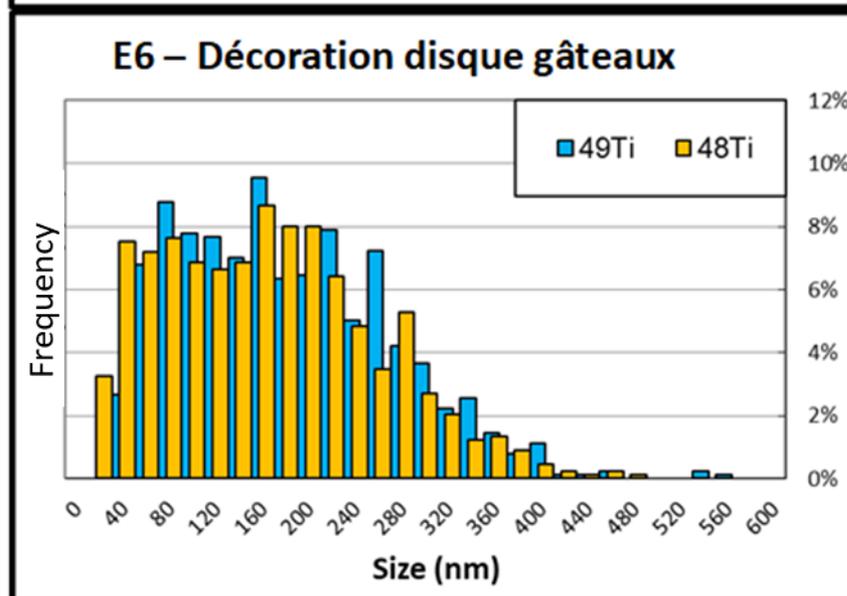
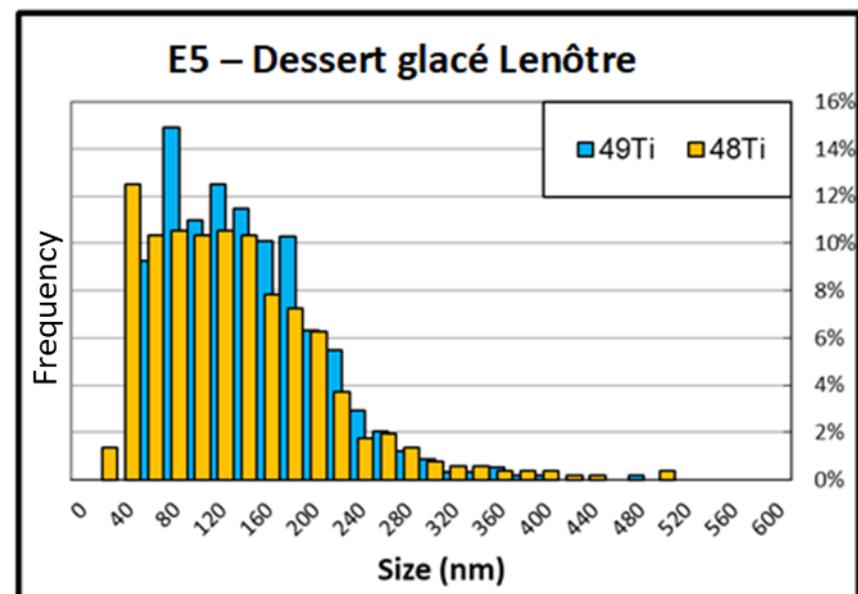
Efficacité de transport (Masse des particules)



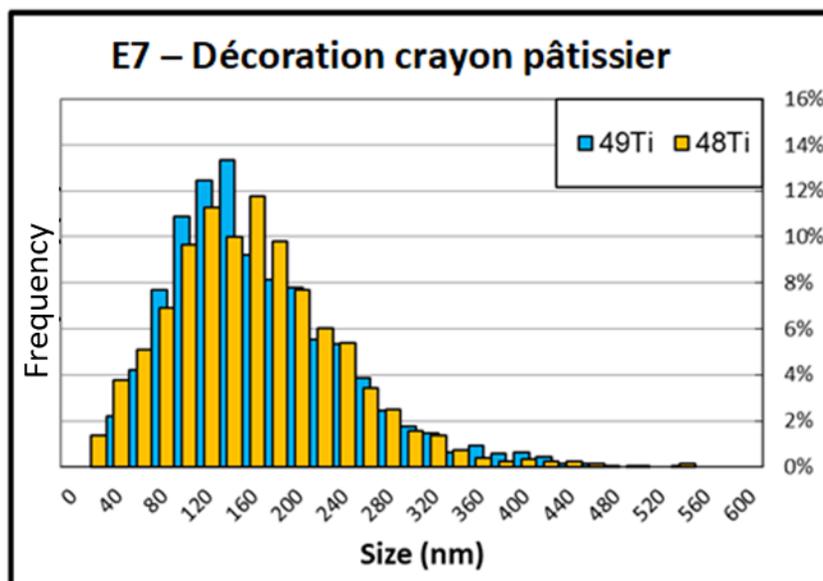
Efficacité de transport (Concentration en particules)



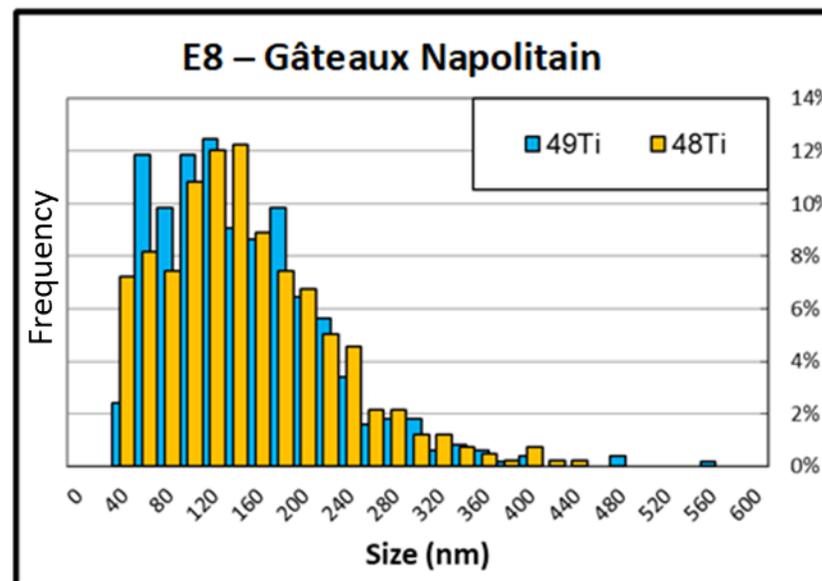
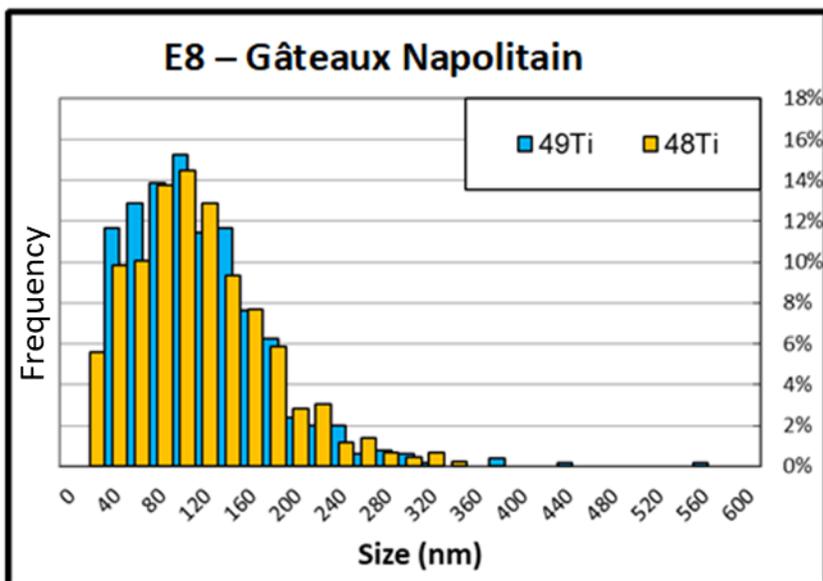
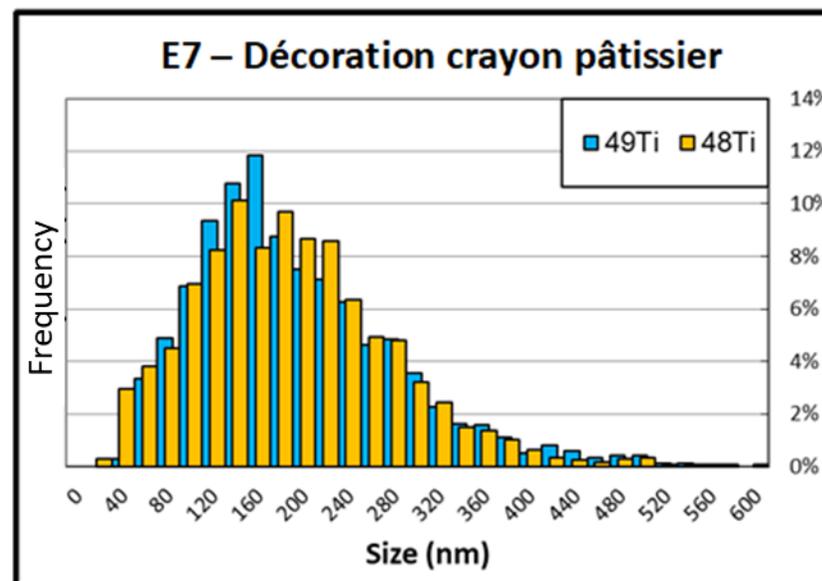
Efficacité de transport (Masse des particules)



Efficacité de transport (Concentration en particules)



Efficacité de transport (Masse des particules)



Efficacité de transport (Concentration en particules)

Efficacité de transport (Masse des particules)

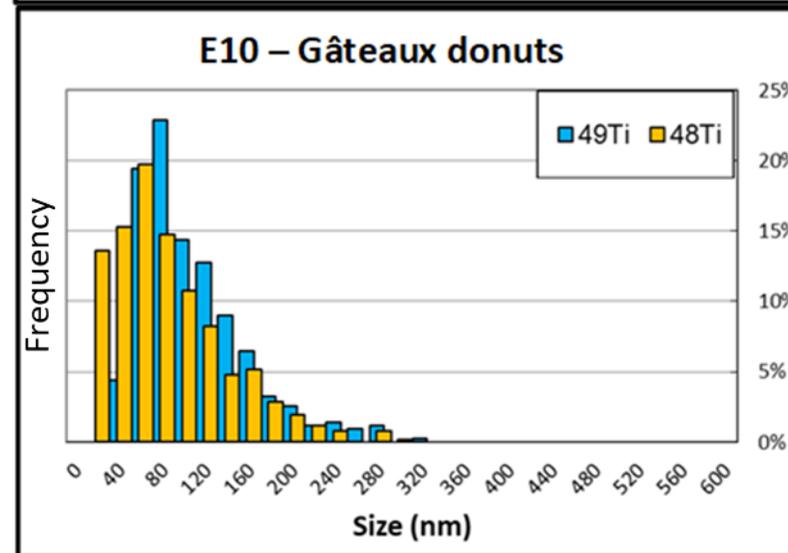
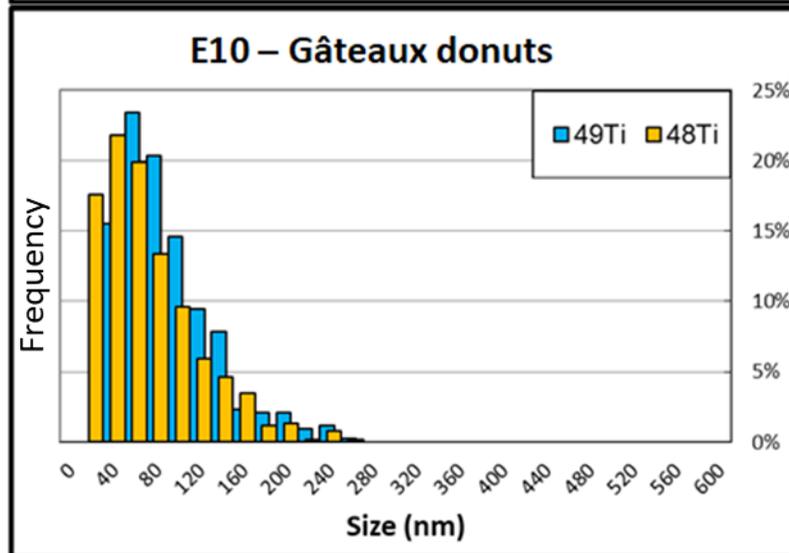
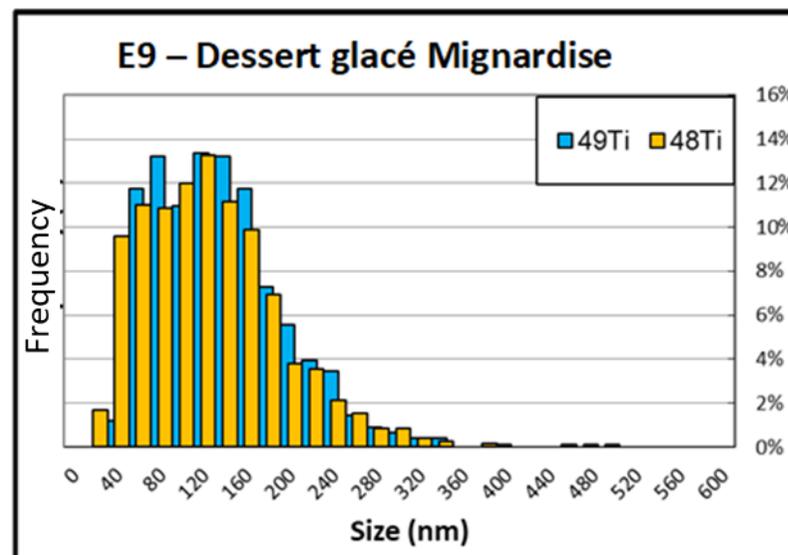
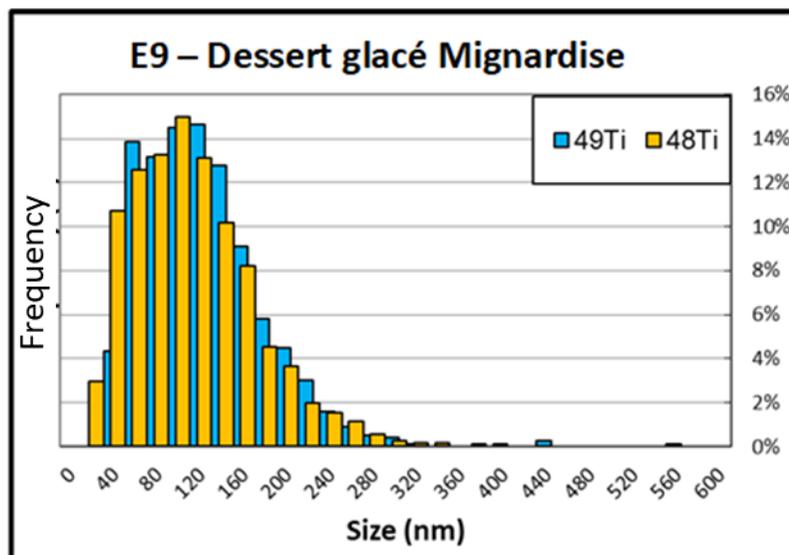


Figure 99 : Distribution en taille des particules des échantillons alimentaires déterminée par la méthode Sp-ICP-MS

En analysant les distributions en taille ([Figure 99](#)), il est possible de voir les décalages vers les particules de diamètre supérieur lorsque le TE de la méthode basée sur la masse des particules notamment avec les échantillons E7, E8 et E9.

Il est aussi possible de visualiser facilement la LDt pour les échantillons E2 et E10. En effet, pour ces échantillons, la partie gauche de la distribution semble incomplète car il n'est pas possible de voir les particules de taille inférieure à la LDt. A l'inverse, les distributions des échantillons E1, E3 et E7 semblent « complètes » pour les deux isotopes, et cela se confirme avec les données du [Tableau 31](#) qui montrent des résultats similaires entre les deux isotopes ⁴⁸Ti et ⁴⁹Ti. Sachant que les chewing-gums peuvent contenir une quantité significative de calcium ([Lorenzetti et al., 2017](#) ; [Candás-Zapico et al., 2018](#)), il est appréciable de voir que l'analyse sur l'isotope ⁴⁸Ti n'a pas été impactée. Le facteur de dilution était probablement suffisamment important ($1-5 \cdot 10^5$) pour réduire l'impact du calcium ionique potentiellement présent.

De façon générale, la forme de la distribution est de type log-normale et renforce l'idée d'utiliser le diamètre le plus fréquent plutôt que le diamètre moyen pour exprimer une taille représentative des NPs du E171.

V.3.3.3 Conclusion

Le protocole d'extraction basé sur une simple extraction à l'eau, suivi d'ultrasons et de plusieurs dilutions successives, testé dans cette étude, s'est avéré efficient pour extraire les NPs de TiO₂ présentes dans les aliments. De plus, les résultats obtenus sur plusieurs échantillons alimentaires sont cohérents avec la littérature. La variation des résultats met en avant la variabilité des lots de E171 pouvant être utilisés dans l'agroalimentaire et confirme les observations de certaines études ([Chen et al., 2013](#) ; [Yang et al., 2014](#)). Il reste toutefois à éprouver ce protocole sur des matrices plus complexes, susceptibles de contenir aussi du E171. La méthode d'analyse optimisée sur un ICP-MS ICapQ permet d'atteindre une limite de détection moyenne de 31 ± 2 nm en utilisant l'isotope ⁴⁸Ti, qui est l'isotope le plus adapté pour ce type d'analyse, si la concentration d'espèce ionique n'est pas significative. Cette LDt permet généralement d'obtenir des distributions en taille représentatives ([Figure 99](#)). Certains additifs ont des fractions nanoparticulaires élevées, comme ceux utilisés pour le gâteau doonys (E10) (68%). La méthode de calcul du TE retenue a aussi une influence qui peut s'avérer significative sur les résultats.

V.4 Bilan

Ce dernier chapitre vient conclure les volets concernant la méthode Sp-ICP-MS. Une optimisation de plusieurs paramètres de la méthode Sp-ICP-MS a été effectuée et a notamment permis d'identifier le TE comme l'un des plus critiques. Les NPs ont été dispersées dans des flacons en polypropylène contenant du HNO₃ 0,1% (v/v). Les conditions d'analyse retenues sont l'introduction de l'échantillon par aspiration libre, un Dt de 10 ms et une détermination du TE basée sur la concentration des particules. Nous avons porté beaucoup d'attention à ce dernier paramètre car une corrélation avec le diamètre des NPs a été mise en évidence.

Enfin, la méthode Sp-ICP-MS a pu être appliquée avec succès à l'analyse de plusieurs échantillons alimentaires. Sur les onze produits, dix contiennent des NPs de TiO₂. La fraction nanoparticulaire varie de 18 à 68% mettant en avant la variabilité des lots de E171 utilisés. Il a aussi été montré que le choix du mode de calcul du TE pouvait avoir un impact significatif sur les résultats. En effet les résultats peuvent différer jusqu'à 21% pour les diamètres moyens, 22% pour les diamètres les plus fréquents et 40% pour la fraction nanoparticulaire.

C'est pourquoi, en termes de perspectives, il est nécessaire de poursuivre les études sur le TE en utilisant par exemple de nouveaux matériaux de référence nanoparticulaires, comme l'argent dont des MRC sont commercialisés. Il pourrait également être possible de travailler à différentes concentrations en particules ou de faire des mélanges de populations de taille de NPs. Aussi, l'aspiration libre a montré une amélioration des résultats concernant le seuil bruit de fond-particule. Il pourrait alors être intéressant de mener des travaux supplémentaires sur la comparaison avec la pompe péristaltique en utilisant différentes matrices, afin de confirmer cette amélioration de LDt avec l'aspiration libre. Enfin, pour diminuer la LDt, il pourrait être aussi envisagé de comparer les résultats d'analyses obtenus dans ces travaux avec des résultats issus de mesures utilisant un Dt plus faible (100-500 μ s) avec la feuille de calcul interne développée. Cela permettrait d'obtenir une distribution en taille plus complète, comme pour les échantillons E2 et E10 dont la distribution en taille est limitée par la LDt.