

---

# Principe des méthodes de caractérisation des NPs

## II.1 Sommaire

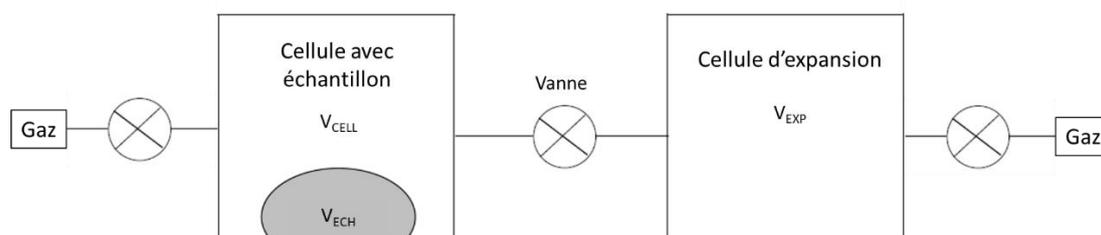
<b>Chapitre II : Principe des méthodes de caractérisation des NPs.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.1 Sommaire .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.2 Détermination de la masse volumique .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.3 Détermination de la surface spécifique .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.4 Détermination de la structure cristalline .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.5 Détermination de la taille, forme et composition des NPs .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.6 Détermination du diamètre hydrodynamique des NPs .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.7 Détermination du potentiel zêta des NPs .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.8 Fractionnement par couplage flux-force (FFF).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.9 Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode « Single particle » (Sp-ICP-MS).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.10 Bilan.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

Dans ce chapitre, les différentes méthodes de caractérisation des NPs de TiO<sub>2</sub> utilisées durant ces travaux de thèse sont présentées, à savoir : la pycnométrie, la méthode Brunauer, Emmett et Teller, la diffraction de rayons-X, la microscopie électronique ou la diffusion dynamique de la lumière. Ces différentes techniques permettent de mesurer différents paramètres physico-chimiques de matériaux comme la masse volumique, la surface spécifique ou encore la structure cristalline. Elles ont été utilisées pour caractériser au mieux les NPs de TiO<sub>2</sub> utilisées pour développer et d'optimiser les méthodes Fractionnement Flux-Force par Flux Asymétrique (AF4, [Chapitre III](#)) et la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode « single particle » (Sp-ICP-MS, [Chapitre IV et V](#)). Les principes de ces deux méthodes seront par conséquent beaucoup plus détaillés.

## II.2 Détermination de la masse volumique

La pycnométrie est une méthode permettant de mesurer la masse volumique d'un matériau ou sa porosité. Cette technique utilise la méthode de déplacement d'un fluide. Le fluide peut être un liquide dans les cas des pycnomètres en verre, mais aussi un gaz dans le cas des pycnomètres hélium. La masse volumique des NPs est notamment utilisée dans les modèles de calcul en Sp-ICP-MS et permet même d'estimer une taille théorique si la surface spécifique des NPs est connue.

Dans cette étude, le pycnomètre hélium a été utilisé car il permet de déterminer de façon plus précise la masse volumique des matériaux. L'hélium est le gaz généralement recommandé par les constructeurs en raison de son faible diamètre atomique. Il est donc susceptible de pénétrer dans les pores inaccessibles à des gaz dont le diamètre atomique/moléculaire est plus élevé. La [Figure 19](#) présente les principaux éléments d'un pycnomètre hélium.



**Figure 19** : Schéma d'un pycnomètre hélium

Ce système permet de mesurer le volume que représente l'échantillon à partir de plusieurs mesures de pression dont le détail se trouve en annexe ([Annexe A](#)).

Dans cette étude, un pycnomètre hélium Accupyc 1330 (Micromeritics Ltd, Hertfordshire, Royaume-Uni) mis à disposition par le C5 du CEA-Grenoble a été utilisé pour mesurer la masse volumique des NPs de  $\text{TiO}_2$  dont les résultats sont présentés dans le [Chapitre 72III](#). L'échantillon de  $\text{TiO}_2$  sous forme de poudre est pesé et déposé dans une cellule calibrée. Le volume de l'échantillon est mesuré après 24 h d'équilibre à un taux de 0,005 psi/min à température ambiante ( $22 \pm 1$  °C) afin d'éliminer toutes les impuretés en surface.

## II.3 Détermination de la surface spécifique

La surface spécifique est utilisée notamment pour estimer la taille des particules et permet de déterminer le potentiel de réaction des particules. La surface spécifique permet aussi de déterminer la surface spécifique volumique (VSSA) qui pourrait remplacer ou compléter les mesures de taille par microscopie électronique (Lecloux et al., 2017 ; Dazon et al., 2019). La technique la plus utilisée pour déterminer la surface spécifique est la méthode Brunauer, Emmett et Teller (BET) qui a été développée en 1938 (Brunauer et al., 1938). Cette technique consiste à modéliser l'adsorption physique (physisorption) de molécules d'un gaz sur une surface solide dans un système fermé. La physisorption est un phénomène qui se produit pour tout système gaz-solide ou gaz-liquide quand les conditions de température et de pression sont adéquates. C'est un phénomène réversible qui entraîne une diminution de la pression du système. La vitesse de désorption dépend de la structure du solide et parfois des propriétés du gaz (Babaa, 2004). Le modèle utilisé initialement pour obtenir les isothermes était celui de la théorie de Langmuir (1918), mais il est maintenant remplacé par celui de Brunauer et al. (1938) dont la théorie est plus détaillée dans l'Annexe A.

Dans cette étude, la surface spécifique des échantillons est calculée par la méthode BET en utilisant un Belsorp Max (MicrotracBEL, Osaka, Japon, Figure 20).



**Figure 20** : Présentation du Belsorp Max (MicrotracBel, Japon)

Environ 700 mg de poudre de TiO<sub>2</sub> sont insérés dans une cellule de BET et subit un dégazage à 150 °C pendant 12h afin d'éliminer les traces d'eau ou les potentielles impuretés à sa surface. Ensuite, la cellule est plongée dans l'azote liquide à environ 77,3 K.

Les résultats de l'isotherme sont ensuite exportés et traités à l'aide d'une feuille de calcul interne. Comme il est expliqué dans l'[Annexe A](#), l'adsorption et la désorption sont évaluées par une isotherme dont les points retenus pour la détermination de la surface spécifique se situent dans la gamme de pression relative (P/P<sub>0</sub>) de 0,05 à 0,3.

A partir de la surface spécifique (S<sub>BET</sub>) et de la masse volumique du matériau (ρ<sub>échantillon</sub>), il est possible de déterminer théoriquement un diamètre moyen en appliquant l'[Équation 1](#).

**Équation 1**

$$d_{théorique} = \frac{6000}{S_{BET} \times \rho_{échantillon}}$$

Avec :

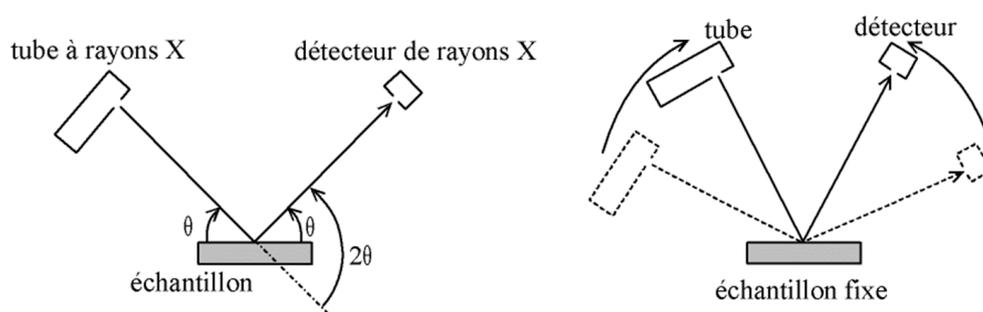
S<sub>BET</sub> : surface spécifique du matériau (m<sup>2</sup>/g)

ρ<sub>échantillon</sub> : masse volumique du matériau (g/cm<sup>3</sup>)

Néanmoins ce calcul ne permet pas d'être précis si le matériau est polydisperse, c'est-à-dire qu'il contient des particules dont la taille varie significativement. Par conséquent, l'estimation de la taille par ce calcul peut servir de valeur de base pour des études de caractérisation ([Lecloux et al., 2017](#)).

## II.4 Détermination de la structure cristalline

La structure cristalline d'un matériau solide donne des informations sur la répartition dans l'espace d'un motif atomique. La répartition ordonnée de ces atomes constitue des plans parallèles et équidistants nommés plans réticulaires. Les distances entre ces plans dépendent du diamètre et de la disposition des atomes dans le réseau cristallin. Ces distances sont constantes et peuvent être calculées généralement grâce à la méthode de diffraction des rayons-X (DRX) dont le principe est décrit brièvement dans l'Annexe A. La Figure 21 présente schématiquement le principe d'un diffractomètre.



**Figure 21** : Schéma du balayage angulaire effectué par le détecteur du diffractomètre

Le diffractomètre permet d'obtenir un spectre de diffraction qui est unique et spécifique selon la phase cristalline. Ainsi des bases de données sont créées et permettent de comparer les spectres connus avec les spectres d'échantillon inconnus afin de déterminer les phases cristallines de celui-ci.

Pour ces travaux de thèse, un diffractomètre Bruker Advance en géométrie  $\theta$ - $2\theta$ , avec une source  $\text{Cu-K}\alpha$  et un détecteur linéaire LynxEye, ont été utilisés pour déterminer la structure cristalline des particules de  $\text{TiO}_2$  par DRX, dont les résultats sont présentés dans le Chapitre 72III. En fonction de la position des pics obtenus, il est possible d'identifier précisément les phases cristallographiques du  $\text{TiO}_2$ . Pour réaliser l'analyse, la poudre de  $\text{TiO}_2$  a été réduite sous forme de pastille plate, puis déposée sur le portoir d'échantillon. Ces analyses ont été réalisées par Olivier Sicardy, ingénieur de recherche au CEA-Grenoble.

## II.5 Détermination de la taille, forme et composition des NPs

Pour déterminer la taille des NPs, la microscopie électronique est généralement utilisée puisque c'est une méthode directe avec une très haute résolution. La microscopie électronique a été développée dans les années 1930 et a permis d'améliorer la résolution, qui était la principale limite des microscopes optiques (Williams and Carter, 2009). Cette nouvelle technologie est survenue suite à la théorie émise par De Broglie (1924) qui pensait que toute matière (dont les électrons) était dotée d'une onde associée. Les microscopes électroniques utilisent donc une source d'électrons dont la longueur d'onde est beaucoup plus faible que les longueurs d'onde du domaine visible, ce qui permet d'avoir une meilleure résolution. Deux catégories de microscope électronique se distinguent, à savoir le Microscope Electronique à Balayage (MEB) et le Microscope Electronique en Transmission (MET). Leur principe est brièvement détaillé dans l'Annexe A.

Ce qui différencie principalement ces deux techniques est que le MEB ne permet d'imager que la surface de l'échantillon étudié alors que le MET peut visualiser la structure interne (Figure 22). De plus la préparation d'échantillon est plus poussée pour le MET puisque le faisceau d'électron doit traverser l'échantillon. Celui-ci doit alors être suffisamment fin pour être analysé.

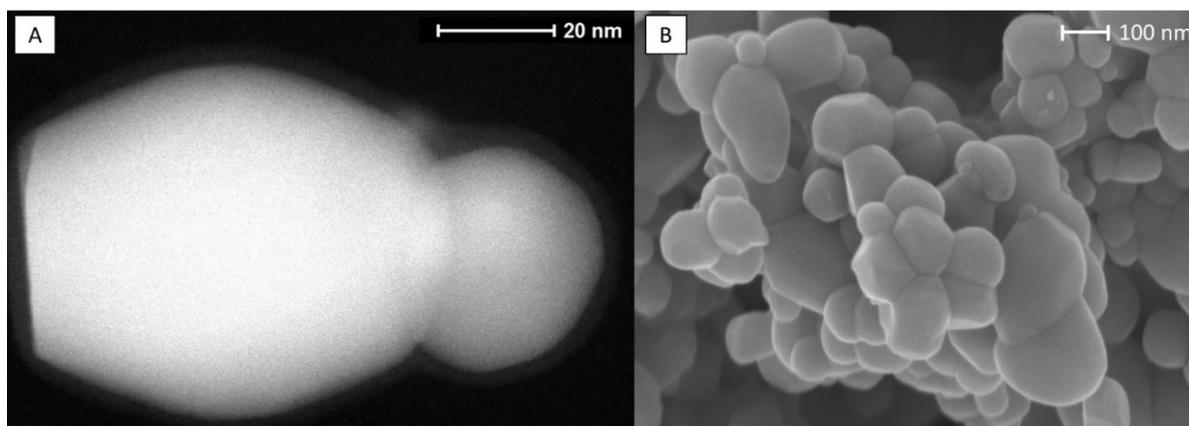


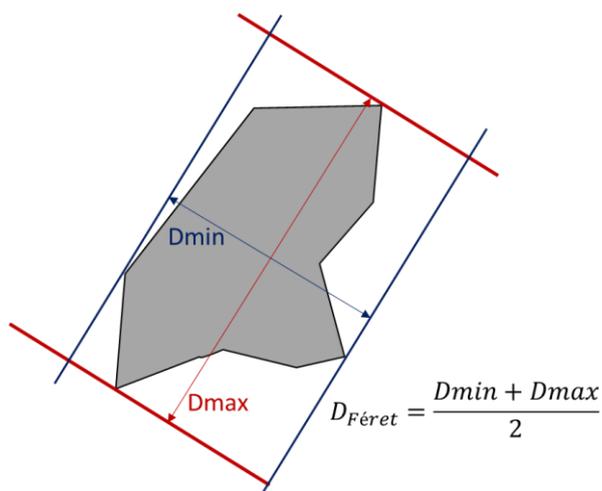
Figure 22 : Image de NPs de  $\text{TiO}_2$  d'un E171 par (A) MET et (B) MEB

La microscopie électronique est la technique la plus couramment employée pour caractériser les NPs de  $\text{TiO}_2$  dans les aliments (Tableau 5). Bien que cette méthode soit l'une des plus résolues à l'heure actuelle, son principal inconvénient porte sur la durée de l'analyse de l'échantillon (préparation + observation). De plus, l'image de la particule obtenue n'est qu'en deux dimensions alors que c'est un

objet à trois dimensions. Une population statistique importante est nécessaire pour obtenir une distribution en taille pertinente (Warheit et al., 2015).

Dans cette étude, pour réaliser les observations de NPs de TiO<sub>2</sub>, une dispersion dans l'eau ultrapure à 1 mg/L est préparée puis passée 15 min dans un bain à ultrasons à température ambiante. Une goutte de la dispersion est ensuite déposée sur une grille en cuivre avec un film de carbone ultrafin. Après séchage de la goutte, l'échantillon est analysé. Les observations microscopiques ont été réalisées avec un MET Tecnai Osiris (Thermo Fisher Scientific), doté d'un canon à électrons à émission de champ haute brillance (XFEG, Field Emission Gun) travaillant à 200 kV. Les analyses ont été effectuées en mode « microscopie électronique à balayage en transmission » (STEM). Ce mode permet de réaliser en parallèle une analyse par spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDS) afin d'évaluer la composition chimique de surface des NPs. Ces travaux ont été réalisés par Nathalie Pelissier, ingénieur de recherche au CEA-Grenoble.

A partir des images du MET des particules de TiO<sub>2</sub>, une distribution en taille a été réalisée en utilisant un logiciel de traitement d'image (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, USA) et les diamètres maximum et minimum de Féret ont été mesurés. Le diamètre de Féret correspond à la plus grande ou plus petite distance entre deux droites parallèles et tangentes à la forme de la particule (voir Figure 23).



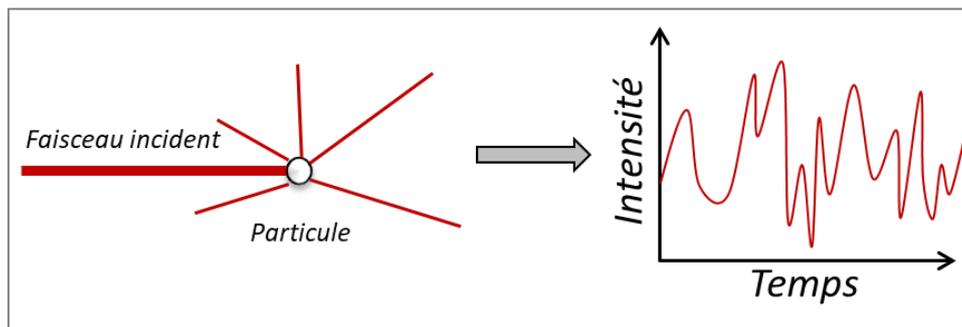
**Figure 23** : Représentation du diamètre de Féret minimum et maximum d'une particule

Les données des diamètres ont été exportées sur Excel et un diamètre de Féret moyen a été calculé à partir des diamètres maximum et minimum (Figure 23), ce qui a permis d'établir une distribution en taille.

## II.6 Détermination du diamètre hydrodynamique des NPs

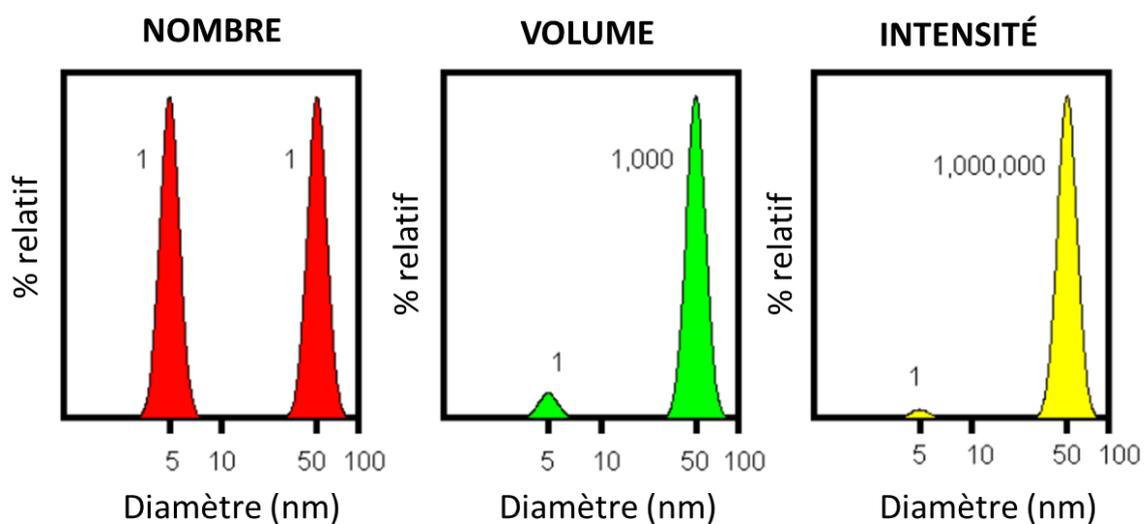
La technique de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) est la méthode qui permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules en suspension. Le rayon hydrodynamique se définit comme le rayon de la sphère équivalente dont le coefficient de diffusion est mesuré par la DLS. Dans le cas de NPs qui présentent des charges électriques à leur surface, la couche de solvatation sera prise en compte, ce qui entraîne une surestimation de la taille des NPs (Kaasalainen et al., 2017).

La technique DLS consiste à envoyer un faisceau de lumière sur des particules en suspension et à mesurer la lumière diffuse qui en résulte. Étant donné que les NPs dispersées dans un solvant subissent un mouvement brownien, elles sont en mouvement en permanence et l'intensité de la lumière diffuse qui est mesurée va évoluer en fonction de leur déplacement (Pecora, 2000 ; Bhattacharjee, 2016). Ainsi, la méthode DLS évalue la fluctuation du signal en fonction du temps (Figure 24).



**Figure 24** : Schéma du principe de la diffusion dynamique de la lumière suite à l'interaction avec une particule

Plus une particule est petite, plus son mouvement brownien augmente et donc plus la variation de l'intensité de la lumière diffuse mesurée sera élevée (Podzimek, 2011). La variation est évaluée grâce à un processus mathématique appelé fonction d'autocorrélation et permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules (voir les détails dans l'Annexe A). La DLS peut aussi fournir une distribution en taille des particules qui peut être représentée selon trois modèles, à savoir : l'intensité, le volume et le nombre (Malvern Instrument, 2017). Ces différentes représentations sont issues d'une même réalité physique mais les distributions en intensité et volume mettent l'accent sur les grosses particules, tandis que la distribution en nombre met en avant les petites particules, comme le montre la Figure 25.



**Figure 25 :** Distributions en taille, en nombre, en volume et en intensité, d'une dispersion de particules de 5 nm et 50 nm de diamètre, présentes en quantité égale, obtenues par DLS (adapté de *Malvern Instrument, 2012*)

Pour ces travaux de thèse, un dispositif ZetaSizer Nano ZS est utilisé pour mesurer le rayon hydrodynamique des particules de TiO<sub>2</sub> à l'aide de la méthode des cumulants dans le but d'évaluer l'impact du pH, de la force ionique et de la présence de tensioactifs sur la dispersion des particules. Cet appareil permet également de mesurer le potentiel zêta des particules (voir [paragraphe II.7](#)).

## II.7 Détermination du potentiel zêta des NPs

La mesure du potentiel zêta permet d'évaluer la stabilité des particules afin de déterminer si les répulsions électrostatiques sont suffisantes pour maintenir les particules bien dispersées (Bhattacharjee, 2016). Le potentiel zêta se définit par la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entoure lorsqu'une particule est en mouvement (Kaszuba et al., 2010). En effet, lorsqu'une particule est en solution et que sa surface est chargée électriquement, des ions s'organisent autour de façon à former plusieurs couches (Figure 26).

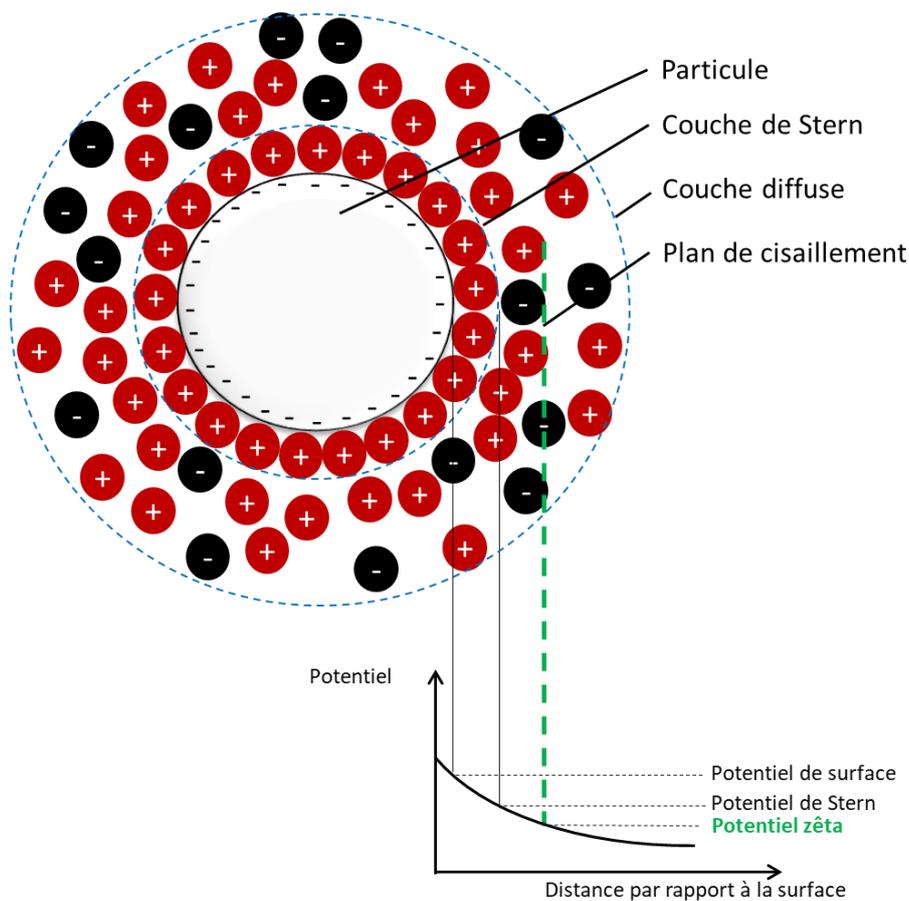
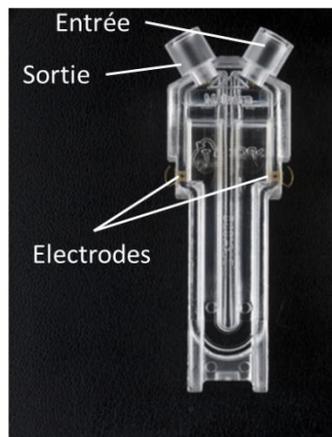


Figure 26 : Schéma du modèle de la double couche électrique

Une particule présentant des fonctions de surface négatives va attirer principalement les cations qui vont former une couche rapprochée autour de la particule : c'est la couche de Stern. Cette couche est immobile et liée avec la surface du matériau, tandis que la deuxième couche, qui est plus éloignée de la surface, peut être mobile : c'est la couche diffuse. Au niveau de cette couche, il existe un plan de cisaillement qui représente la frontière entre la fraction des ions qui restera fixée au solide et la

fraction qui se décrochera en cas de mise en mouvement de la particule. Le potentiel zêta représente la différence de potentiel de la couche diffuse et de la fraction de charge électrique qui reste liée à la particule (Kaszuba et al., 2010). Les appareils utilisant la DLS sont souvent capables de mesurer le potentiel zêta en parallèle, par électrophorèse laser doppler. Il n'est pas possible de le déterminer directement, mais par l'intermédiaire de la mobilité électrophorétique des particules. En effet, les cellules utilisées pour la DLS peuvent être équipées d'électrodes (Figure 27), ce qui permet d'appliquer un champ électrique à la dispersion contenant des NPs. Les particules chargées vont alors se déplacer vers une électrode possédant une charge inverse à la leur.



**Figure 27** : Cellule utilisée en DLS

La longueur d'onde du faisceau diffusé sera décalée par rapport à la longueur d'onde du laser incident puisque les particules sont en mouvement (effet doppler). Ce décalage de longueur d'onde est alors mesuré pour déterminer la vitesse des particules, qui permet à son tour de déterminer le potentiel zêta des particules (voir les détails dans l'Annexe A).

Comme pour la méthode DLS, un dispositif ZetaSizer Nano ZS est utilisé pour mesurer le potentiel zêta des différentes NPs de TiO<sub>2</sub> étudiées.

## II.8 Fractionnement par couplage flux-force (FFF)

La méthode Fractionnement par couplage Flux-Force par Flux Asymétrique (AF4) fait partie de la famille des techniques de « fractionnement par couplage flux-force » (FFF) développées dans les années 70 (Giddings, 1966, 1993). Ces méthodes permettent de séparer des particules ayant des tailles comprises entre quelques nanomètres et une dizaine de micromètres. La différence entre ce type de méthode et la chromatographie en phase liquide est que la séparation ne dépend pas de l'interaction entre les analytes et les phases mobile et stationnaire. Avec les méthodes FFF, la phase mobile entraîne seulement les analytes pendant qu'un champ de force perpendiculaire au canal permet la séparation (Figure 28). Ainsi, la séparation ne repose en théorie que sur des interactions physiques entre l'échantillon et les forces appliquées. De ce fait, il n'y a théoriquement pas de phénomène physico-chimique pouvant modifier et/ou détruire les analytes. Il existe plusieurs sortes de forces comme les forces thermiques, électriques, sédimentaires et fluidiques. La méthode AF4 utilise une force fluidique (FIFFF), ce qui permet de séparer rapidement les analytes et ainsi de diminuer les effets de dilution.

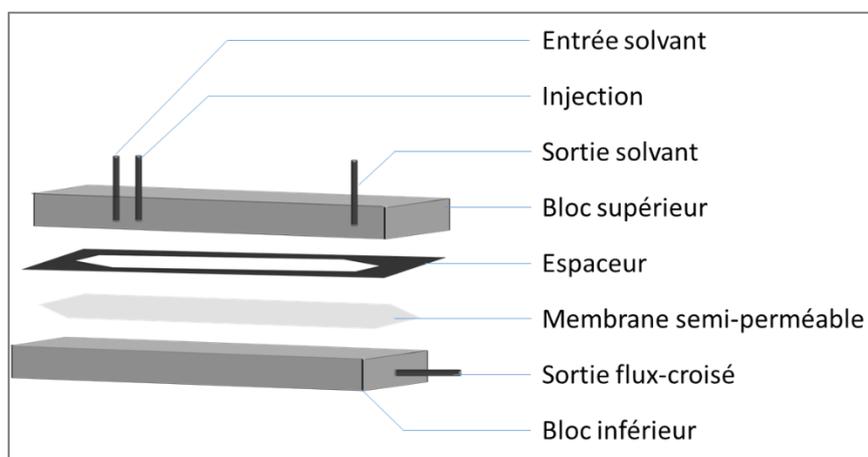
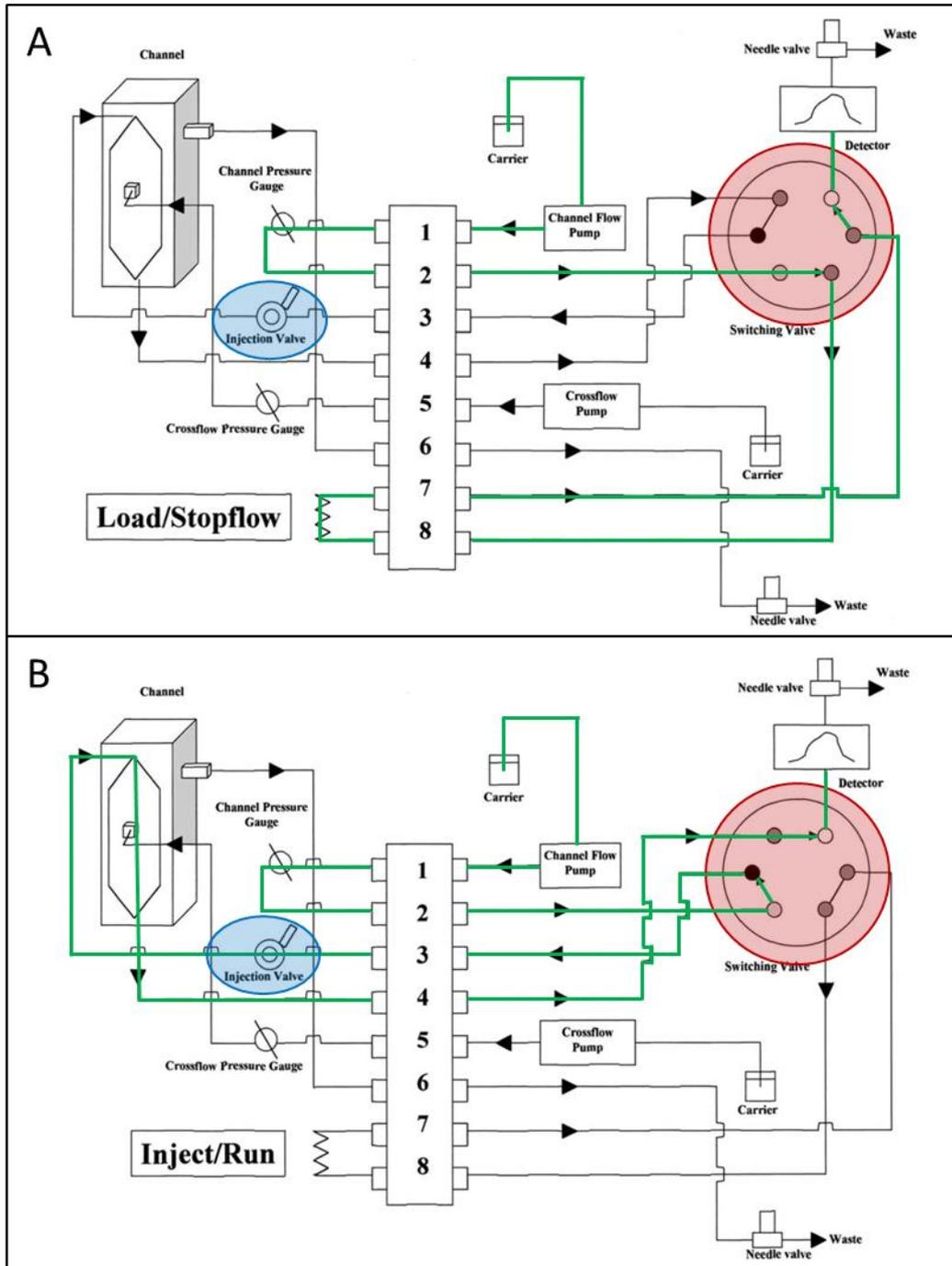


Figure 28 : Schéma d'un système AF4

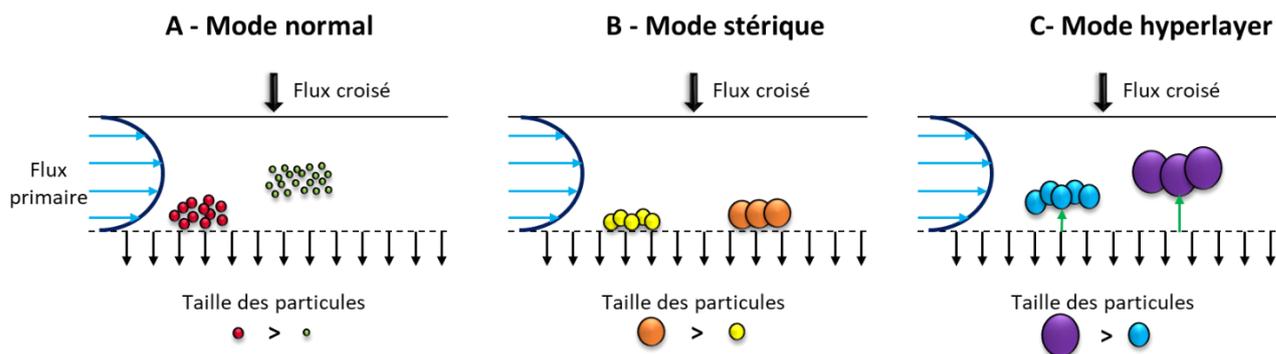
La force perpendiculaire sur la direction du mouvement de la phase mobile, qui est appelée « flux croisé » ou « crossflow » en anglais, est créée à partir d'un deuxième flux de phase mobile. Une différence de pression à travers une paroi semi-perméable au niveau du bloc inférieur permet de générer ce flux croisé. La membrane semi-perméable retient les analytes qui ont une taille supérieure au seuil de coupure de la membrane, tout en laissant passer le solvant ainsi que la phase dissoute. Grâce à la force fluidique, l'AF4 permet d'avoir un impact sur tous les objets non liés à un support fixe

(Wahlund and Giddings, 1987). Cela signifie que cette méthode peut s'appliquer à l'analyse de nombreux analytes. La Figure 29 représente le montage complexe du système FFF mis en place pour générer le flux croisé et qui permet l'élution des analytes.



**Figure 29 :** Représentation d'un système classique AF4 en mode (A) chargement et (B) élution. En vert est représenté le chemin de la phase mobile jusqu'au détecteur, en rouge la vanne à six voies et en bleu là où est injecté l'échantillon (adapté de Gimbert et al., 2003)

Le système utilise une vanne à six voies (en rouge sur la [Figure 29](#)) afin de pouvoir charger l'échantillon ([Figure 29A](#)). Puis en inversant la vanne à six voies ([Figure 29B](#)), la phase mobile passe par la vanne d'injection et par le canal où les analytes sont séparés avant d'atteindre le détecteur. En plus d'avoir un montage de vanne complexe, il existe plusieurs modes d'élution en AF4 qui diffèrent selon la taille des particules : le mode normal, le mode stérique et le mode hyperlayer ([Giddings, 1993 ; Schimpf et al., 2000](#)) ([Figure 30](#)).



**Figure 30** : Schéma des différents modes d'élution pour la méthode AF4

## II.8.1 Utilisation de l'AF4 en mode normal

L'utilisation de ce mode permet de séparer les analytes en fonction de leur capacité à diffuser contre la force fluidique appliquée, faisant intervenir essentiellement leur coefficient de diffusion. Plus ce dernier est élevé, plus les analytes diffusent facilement à contre sens du flux croisé. Etant donné que le flux primaire possède un profil parabolique, la vitesse d'élution sera plus élevée pour les analytes ayant un fort coefficient de diffusion. Concernant les particules pour lesquelles les coefficients de diffusion sont plus élevés lorsque leur taille diminue, les analytes sont élués de la plus petite taille à la plus grosse ([Figure 30A](#)).

## II.8.2 Utilisation de l'AF4 en mode stérique

Le mode stérique s'applique pour des particules plus grosses avec des diamètres compris entre 0,5 et 200  $\mu\text{m}$  ([Giddings, 1993](#)). La diffusion des particules contre la force fluidique est quasi-supprimée, ce qui rend son influence non significative dans le mécanisme de séparation. Ainsi, les analytes avancent grâce au flux primaire et plus la particule est grosse, plus elle est éluee rapidement par le flux primaire. En effet, le flux primaire n'est pas identique sur toute la hauteur du canal, de ce fait, les grosses particules qui atteignent une hauteur plus élevée, sont soumises à un flux primaire supérieur. Par conséquent, les particules les plus grosses seront éluées en premières ([Figure 30B](#)).

### II.8.3 Utilisation de l'AF4 en mode hyperlayer

Pour des vitesses d'élution importantes et lorsque les particules ont des tailles supérieures à 10  $\mu\text{m}$ , il est possible qu'une force de répulsion hydrodynamique repousse la particule de la membrane. Lorsque les particules sont déplacées à une hauteur supérieure à la valeur de leur diamètre, alors le mode de séparation s'appelle *hyperlayer*. Dans ce mode, l'ordre d'élution reste décroissant, avec les grosses particules arrivant en premier au détecteur, puis les plus petites (Figure 30C).

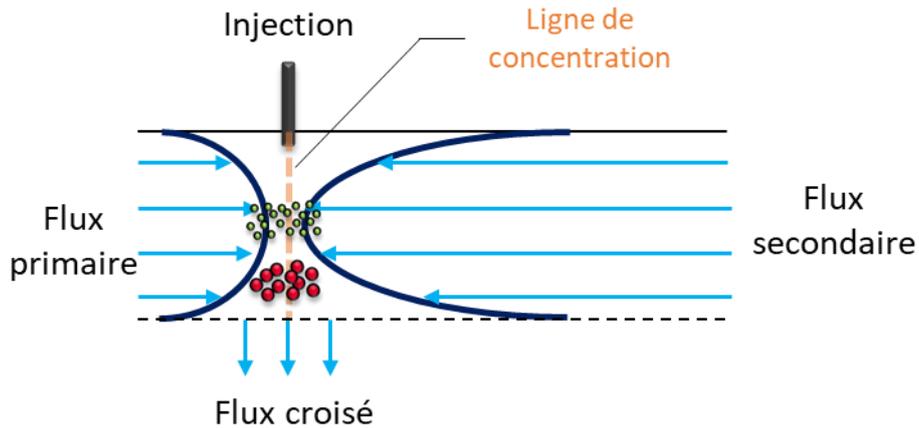
Dans le cas de ces travaux de thèse, la taille des particules primaires étant inférieure à 100 nm, le mode normal sera donc appliqué.

### II.8.4 Etapes de la séparation

En AF4, la séparation se déroule en trois étapes à savoir (i) l'étape d'injection-concentration, (ii) l'étape de concentration-relaxation et (iii) l'étape d'élution. Chacune nécessite d'être optimisée afin d'avoir une séparation optimale des NPs avec un temps d'analyse raisonnable.

#### *II.8.4.1 Etape d'injection-concentration*

Cette première étape est aussi appelée étape « Focus ». Elle consiste à introduire l'échantillon dans le canal à l'aide d'un injecteur délivrant usuellement entre 1 et 100  $\mu\text{L}$  d'analyte. Le flux injecté s'ajoute au flux principal de la phase mobile. Afin d'éviter la dispersion des analytes dans le canal lors de cette étape, le système est placé en mode « focus ». Il met un autre flux en opposition au flux principal, venant en sens inverse et avec un débit plus fort. L'échantillon est alors préconcentré à l'interface de ces deux flux sur la ligne de concentration (Figure 31).



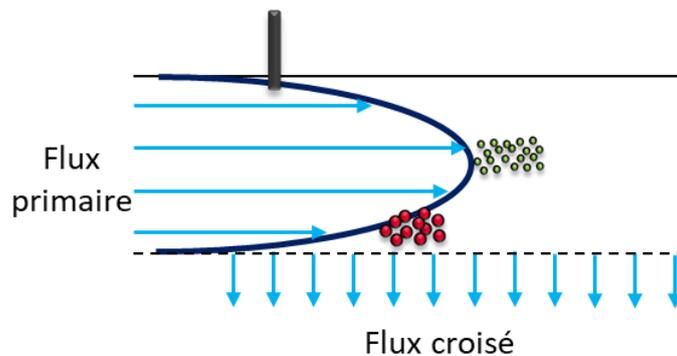
**Figure 31** : Représentation des étapes d'injection-concentration et de concentration-relaxation au niveau du canal AF4

#### II.8.4.2 Etape de concentration-relaxation

Cette étape maintient localement l'échantillon pendant un temps bien défini (1-20 min). Durant ce laps de temps, les analytes se relaxent, c'est-à-dire qu'ils trouvent leur position d'équilibre dans la hauteur du canal par rapport au flux croisé appliqué et à leur capacité à diffuser à contre-flux. Il y a donc une première séparation des particules lors de cette étape. Ainsi, seul le flux croisé influence l'analyte dans cette étape (Figure 31).

#### II.8.4.3 Etape d'élution

Lors de cette étape, le flux opposé est stoppé, ce qui initie l'élution des analytes. Le flux croisé est conservé de façon à maintenir la distribution verticale des particules dans la hauteur du canal (Figure 32).



**Figure 32** : Représentation de l'étape d'élution au niveau du canal AF4

## II.8.5 Les principaux paramètres influençant la séparation par AF4

Il existe plusieurs paramètres qui ont un impact significatif sur la qualité de la séparation d'un des analytes en AF4 à savoir : (i) la membrane, (ii) la quantité injectée, (iii) le temps et les débits pour les différentes étapes ou encore (iv) la nature de la phase mobile. Les différents paramètres permettant l'analyse des NPs de  $\text{TiO}_2$  par AF4 sont répertoriés dans le [Tableau 6](#). Les parties suivantes reprendront des éléments de ce tableau pour mettre en avant les influences de chaque paramètre sur la séparation des particules.

**Tableau 6** : Résumé des paramètres utilisés pour la caractérisation de NPs de TiO<sub>2</sub> par AF4. Les paramètres retenus/recommandés par les auteurs de l'étude sont en vert.

Modèle AF4	Echantillon	Phase mobile	Membrane	Volume d'injection (μL)	Temps de concentration et flux croisé utilisé	Flux croisé (mL/min)	Flux primaire (mL/min)	Référence
F-1000 (Postnova)	P25 TiO <sub>2</sub> rutile Crème solaire	FL-70 0,1% (v/v) + NaN <sub>3</sub> 0,02% (w/v)	RC 10 kDa	20	2-3 min Flux croisé NI	0,5-2,5	0,5-2,5	(Contado and Pagnoni, 2008)
Eclipse 2 (Wyatt Technology)	NPs inorganiques	<b>Sels :</b> NaNO <sub>3</sub> - CH <sub>3</sub> COONa <b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b> - CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> <b>pH :</b> <b>8 - 10</b> <b>Tensioactif :</b> <b>SDS 9.10<sup>-4</sup> M</b> - Tween 20	RC 10 kDa	NI	NI 0,15 mL/min	0,3 <b>0,5</b> 0,8	1	(Dubascoux et al., 2008)
AF2000 MT (Postnova)	NM-104 Crème solaire	Eau ultrapure	RC 10 kDa	20	4 min 1,5 mL/min	1 → 0	0,5	(Nischwitz and Goenaga-Infante, 2012)
Eclipse 3 (Wyatt Technology)	P25 TiO <sub>2</sub>	Eau ultrapure SDS 0,01% SDS 0,1mM + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1mM Triton X-100 0,01% Hexametaphosphate de sodium 1mM Diphosphate de sodium 1 mM MEAA 0,1%	RC 10 kDa RC 30 kDa PES 10 kDa PVDF 30 kDa	20	<b>4 min</b> 1,5 mL/min	1,5 → 0	1,5	(Bendixen et al., 2014)
Eclipse Dualtec (Wyatt Technology)	Aliment (n=24)	BSA (0,5 mg/L)	RC 10 kDa	10	7 min NI	0,1 → 0	0,5	(Peters et al., 2014b)
AF2000 (Postnova)	TiO <sub>2</sub> rutile Aliments (n=2)	SDS 0,2%(m/v) + MeOH 6%(v/v) à pH 8,7	RC 10 kDa	200	4 min 1,3 mL/min	0,5 → 0	1	(López-Heras et al., 2014)

NI : Non Indiqué

Modèle AF4	Echantillon	Phase mobile	Membrane	Volume d'injection (µL)	Temps de concentration et flux croisé utilisé	Flux croisé (mL/min)	Flux primaire (mL/min)	Référence
Eclipse Dualtec et Eclipse 3+ (Wyatt Technology)	NM-103 NM-104 E171 (n=7)	FL-70 (200 mg/L) + NaN <sub>3</sub> (3,08 mM)	RC 10 kDa PES 10 kDa	10 et 50	4 min 1,5 mL/min	0,1 → 0	0,5	(Helsper et al., 2016)
AF2000 MT (Postnova)	NM-104	Eau ultrapure FL-70 0,2% (m/m) BSA 0,05% (m/m) NaPP 0,1% (m/m)	RC 10 kDa	20	5 min NI	1,6 → 0,6	0,4	(Omar et al., 2016)
AF2000 (Postnova)	TiO <sub>2</sub> (mélange rutile-anatase) Encre (n=4)	Eau ultrapure	RC 10 kDa	20	3 min 1 mL/min	1 → 0	1	(Bocca et al., 2017)
Eclipse® (Wyatt Technology)	Crème solaire (n=1) Chocolat (n=1)	Eau ultrapure SDS 0,1% (m/v)	RC 10 kDa	5-100	10 min 1,5 ml/min	0,5 → 0	0,5	(de la Calle et al., 2018a)
Eclipse Dualtec (Wyatt Technology)	NM-100 Crème solaire (n=5)	FL-70 0,05%	RC 10 kDa	25	4 min 1 mL/min	0,3 → 0	0,7	(Bocca et al., 2018)
Eclipse 3 (Wyatt Technology)	Dentifrice (n=1)	SDS 0,05% SDS 0,025% FL-70 0,025%	PES 10 kDa RC 10 kDa	10 50	15 min 0,5 mL/min	0,5 → 0	1	(Correia et al., 2018)

NI : Non Indiqué

### *II.8.5.1 La membrane*

Les membranes sont généralement composées de cellulose régénérée (RC), de polyéthersulfone (PES) ou de polyvinylidène fluorure (PVDF) (Tableau 6). Elles sont caractérisées par leur nature et par leur seuil de coupure (Molecular Weight Cut Off – MWCO).

Concernant l'analyse des NPs de TiO<sub>2</sub>, les membranes RC sont les plus utilisées (Tableau 6), bien que récemment [Correia et al. \(2018\)](#) obtiennent une meilleure reproductibilité avec une membrane en PES. Dans une étude de [Helsper et al. \(2016\)](#), les auteurs ont comparé des membranes en PES et RC et obtiennent des pics plus fins avec ces dernières. Les membranes PVDF sont plus utilisées pour d'autres types de NPs comme l'or et l'argent ([Hagendorfer et al., 2011, 2012](#) ; [Helsper et al., 2016](#)). Il a été montré que les membranes peuvent avoir des interactions électrostatiques avec les particules, dues à leur charge de surface ou potentiel zêta, pouvant donc avoir un impact sur la séparation des particules en AF4 ([Ulrich et al., 2012](#) ; [Bendixen et al., 2014](#) ; [Helsper et al., 2016](#)). En effet, lorsque la particule et la membrane présentent des charges de surface de signes opposés, les attractions électrostatiques sont alors favorisées. [Bendixen et al. \(2014\)](#) ont pu observer une diminution du taux de récupération des particules avec des seuils de coupures plus faibles. Ils ont ainsi supposé que plus ces seuils sont faibles, moins la surface de la membrane est chargée négativement, ce qui entraîne une diminution des répulsions électrostatiques, comme observé par [Fievet et al. \(2000\)](#).

### *II.8.5.2 La quantité injectée*

Dans un système asymétrique, il est recommandé d'injecter de petits volumes, d'une centaine de microlitres, pour conserver l'efficacité de l'étape de concentration et donc de la séparation ([Gigault, 2011](#)). Ainsi, il a pu être mis en avant que si la concentration des échantillons injectés augmente, cela peut alors diminuer la rétention des analytes et ainsi entraîner une détérioration de la séparation ([Martin and Feuillebois, 2003](#) ; [Bendixen et al., 2014](#)). En ce qui concerne la caractérisation des NPs de TiO<sub>2</sub>, le volume d'injection varie entre 5 et 200 µL (Tableau 6).

### *II.8.5.3 Le temps de l'étape de relaxation*

Le temps de l'étape de relaxation varie généralement entre 2 et 15 min ([Tableau 6](#)). [Bendixen et al. \(2014\)](#) ont optimisé le temps de cette étape pour l'analyse de NPs de TiO<sub>2</sub>. Il s'avère que plus le temps de relaxation est élevé, plus le pic obtenu est fin. Mais les auteurs ont aussi remarqué que le rendement diminue également car il y a plus d'interactions entre les NPs et la membrane. De ce fait, ils ont retenu un temps de relaxation optimal de 4 min.

### *II.8.5.4 Les débits des différents flux*

Comme cela a été présenté ([Figure 31](#)), plusieurs flux entrent en jeu pour séparer les particules. Ces différents flux doivent donc être optimisés afin d'obtenir une séparation optimale. Pendant l'étape de concentration, le flux croisé doit être maîtrisé afin d'obtenir une ligne de concentration ([Figure 31](#)) correcte. Cela correspond à une bonne rétention des analytes sur une zone fine de la membrane pour éviter la diffusion ou l'élution d'une partie de l'échantillon injecté. Dans le cas de l'analyse de TiO<sub>2</sub>, le flux croisé varie entre 0,15 et 1,5 mL/min ([Tableau 6](#)). Pendant l'élution, si le flux croisé est trop élevé, cela peut entraîner une perte des analytes via l'adsorption sur la membrane ou la perméation à travers la membrane des particules ([Manh Thang et al., 2001](#) ; [Heroult et al., 2014](#)). Comme en chromatographie, la vitesse du flux d'élution permet de faire sortir plus ou moins rapidement les analytes et donc d'améliorer ou non la séparation. Dans la plupart des cas, le flux croisé démarre à un débit maximal puis diminue progressivement jusqu'à 0 mL/min afin d'éluer les particules résiduelles du canal ([Tableau 6](#)). En ce qui concerne le flux primaire, il varie selon les études de 0,4 à 2,5 mL/min ([Tableau 6](#)).

### *II.8.5.5 La nature de l'éluant*

Etant donné que les interactions électrostatiques qui ont lieu entre la membrane et les particules entraînent des problèmes de séparation, des études se sont intéressées à la composition de la phase mobile afin d'améliorer la séparation et augmenter le taux de récupération ([Delay et al., 2011](#) ; [Ulrich et al., 2012](#) ; [Bendixen et al., 2014](#)). Les paramètres de la phase mobile pouvant impacter la séparation sont nombreux, citons entre autres le pH ([Dubascoux et al., 2008](#)), la force ionique ([Delay et al., 2011](#)), le type de sel ([Dubascoux et al., 2008](#)) ainsi que la présence de différents tensioactifs ([Bendixen et al., 2014](#); [Omar et al., 2016](#); [Correia et al., 2018](#)). Dans le cas du TiO<sub>2</sub>, la nature du sel semble avoir un impact sur le taux de récupération des particules dans le système ([Dubascoux et al., 2008](#)). En effet, l'augmentation de la force ionique diminue l'épaisseur de la double couche électrique ([Figure 26](#)), ce

qui favorise les interactions entre la membrane et les particules (Dubascoux et al., 2008). L'ajout d'un tensioactif tel que le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) peut permettre d'augmenter les répulsions électrostatiques en fournissant une charge de surface négative de la particule, ce qui permet d'avoir une dispersion plus stable (Dubascoux et al., 2008 ; López-heras et al., 2014 ; Correia et al., 2018). Néanmoins, dans l'étude de Bendixen et al. (2014), l'hexametaphosphate de sodium est préféré au SDS car il permet d'obtenir des potentiels zêta des NPs et de la membrane négatifs ( $< -30$  mV), augmentant le taux de récupération des NPs. Par conséquent, dans cette étude, les paramètres liés à la nature de l'éluant seront étudiés pour l'analyse des NPs de  $\text{TiO}_2$  par AF4-ICP-MS.

## II.8.6 Couplage avec un détecteur de diffusion de la lumière multi angles

Le système AF4, peut être couplé avec un détecteur de diffusion de la lumière multi angles (MALS). Ce type de détecteur repose sur le même principe que la DLS mais permet d'être plus résolu puisqu'il possède plusieurs détecteurs disposés à différents angles de l'échantillon (Figure 33).

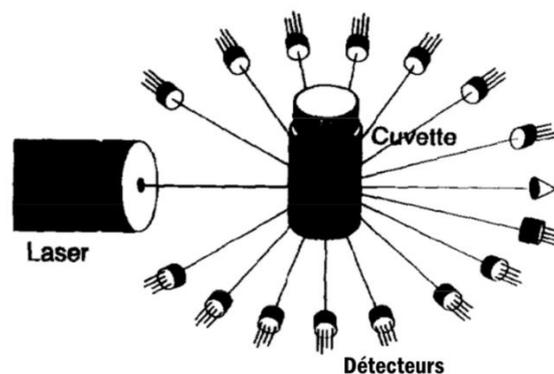
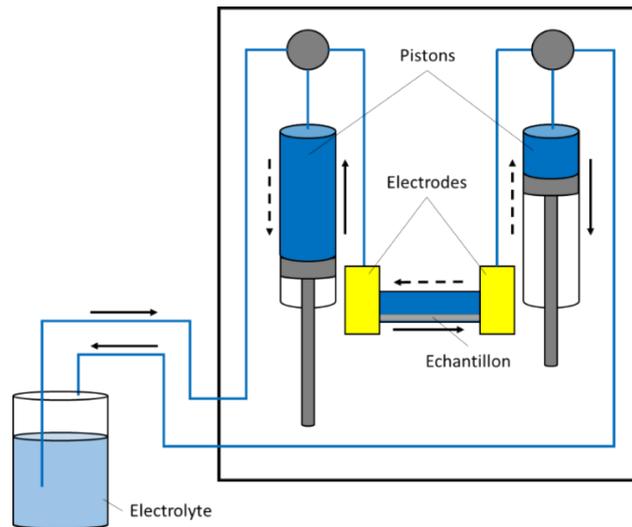


Figure 33 : Représentation d'un détecteur MALS (adapté de Zimm, 1948)

L'avantage d'avoir une mesure de la diffusion de la lumière sur plusieurs angles est que cela permet de s'affranchir de la dépendance angulaire que l'on peut retrouver en DLS (Annexe A, Figure A4). En utilisant des modèles qui corrélient l'intensité de la lumière diffusée et l'angle à laquelle elle est mesurée, le rayon de giration peut être mesuré (Zimm, 1948 ; Wyatt, 1993). Le rayon de giration peut être considéré comme le rayon de la particule moyen, dépendant de la distribution en masse interne de la particule. Il est différent du rayon hydrodynamique qui lui dépend de la géométrie externe de la particule (Wyatt, 1993). Dans ces travaux, un MALS Dawn Heleos II (Wyatt Technology, Goleta, USA) est couplé à l'AF4 et permet de mesurer la taille des particules.

## II.8.7 Détermination du potentiel zêta des membranes

Etant donné que les interactions particule-membrane jouent un rôle dans la séparation des NPs par AF4, il est alors important de mesurer le potentiel zêta des membranes utilisées en AF4. Ce potentiel peut être déterminé par la mesure du potentiel d'écoulement ou du courant d'écoulement avec des analyseurs électrocinétiques (Figure 34) dont le principe est détaillé en Annexe A.



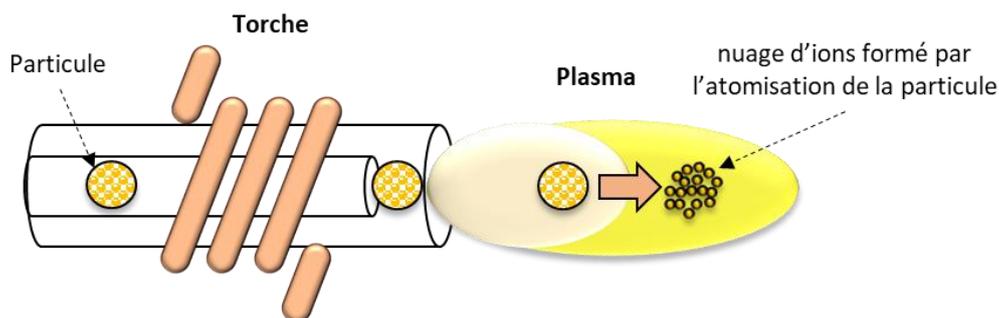
**Figure 34** : Schéma d'un analyseur électrocinétique utilisé pour mesurer le potentiel zêta d'un échantillon solide

L'échantillon est placé dans une cellule adaptée selon la forme de l'échantillon (grain, membrane, plaque...). Un système de pistons permet de créer un flux tangentiel de l'électrolyte par rapport à l'échantillon. Il est possible de diriger le flux d'électrolyte dans les deux sens pour obtenir une valeur plus précise du potentiel zêta. En effet, une asymétrie au niveau de la surface peut entraîner une erreur systématique dans un sens d'écoulement. C'est pourquoi diriger le flux dans les deux sens permet de réduire les biais. Deux électrodes sont placées aux extrémités de la cellule pour mesurer le potentiel et le courant d'écoulement qui sont générés grâce au déplacement des charges à la surface de l'échantillon. Dans le cadre de ces travaux, un analyseur électrocinétique SurPASS (Anton Paar GmbH, Vienne, Autriche) a été utilisé pour mesurer le potentiel zêta des membranes AF4.

## II.9 Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode « Single particle » (Sp-ICP-MS)

L'approche « single particle » a été proposée pour la première fois dans les années 2000 (Degueldre and Favarger, 2003, 2004 ; Degueldre et al., 2004, 2006) et la théorie a été améliorée dans des publications plus récentes (Laborda et al., 2011 ; Pace et al., 2011).

Le principe de la méthode utilise la grande sensibilité de l'ICP-MS avec une résolution temporelle très élevée. En effet, lorsqu'un échantillon est introduit dans l'ICP-MS, celui-ci est atomisé puis ionisé. Dans le cas d'une particule, lors de son passage dans le plasma, celle-ci va produire un nuage d'ions de l'élément qui la compose (Figure 35).



*Figure 35 : Atomisation et ionisation d'une particule dans le plasma*

Lorsque ce nuage d'ions arrive au détecteur, sa densité ionique élevée fait que le signal obtenu est plus intense qu'un signal provenant d'un analyte ionique. C'est pourquoi la méthode Sp-ICP-MS s'appuie sur une résolution temporelle élevée afin de pouvoir distinguer des signaux issus des éléments sous formes particulaire et ionique (Figure 36).

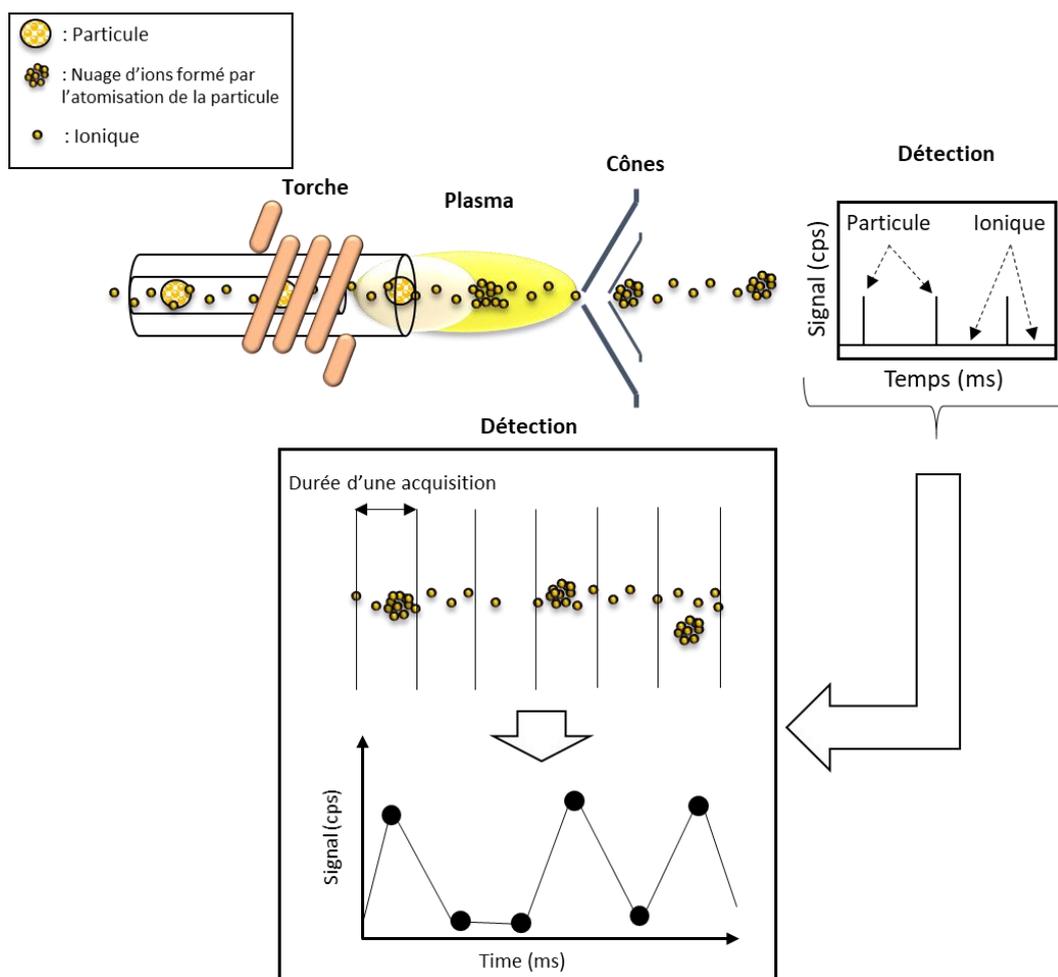


Figure 36 : Schéma du principe de la méthode Sp-ICP-MS

La succession d'acquisitions très rapides permet de distinguer les particules de façon unitaire avec des signaux très intenses, tout en s'affranchissant des signaux beaucoup plus faibles liés à la fraction ionique. Afin de pouvoir déterminer la taille des particules à partir des signaux obtenus, plusieurs étapes sont nécessaires en Sp-ICP-MS, à savoir :

- (i) Mesure de l'Efficacité de Transport (TE). C'est l'un des paramètres les plus critiques de cette méthode. Les équations de conversion signal-diamètre dépendent de ce paramètre et il est aussi utilisé pour calculer la concentration particulaire.
- (ii) Réalisation d'un étalonnage à partir de l'élément ciblé en utilisant une solution étalon dont l'analyte est sous forme ionique. Dans le cas des NPs de  $\text{TiO}_2$ , l'étalonnage est effectué avec du Ti ionique.
- (iii) Dilution des échantillons à analyser. Cette étape est nécessaire afin d'éviter l'analyse simultanée de plusieurs particules qui induirait un biais sur la distribution en taille.

(iv) Traitement des données de l'échantillon. Cette étape peut se faire automatiquement selon le type d'appareil et des logiciels fournis mais il est aussi possible de traiter les échantillons en développant des feuilles de calculs adaptées.

### II.9.1 Détermination de l'efficacité de transport (TE)

Le TE est l'un des paramètres les plus cruciaux pour l'analyse des NPs par la méthode Sp-ICP-MS. Il permet de déterminer la fraction de particules prélevées qui atteindront réellement le plasma. De plus, le TE est aussi utilisé pour convertir les signaux des particules en masse à partir de l'étalonnage. Dans l'étude de [Pace et al. \(2011\)](#), trois méthodes sont présentées pour le calculer, à savoir : la méthode gravimétrique, la méthode basée sur la masse des particules et la méthode basée sur la concentration des particules. Ces méthodes vont être détaillées dans les parties suivantes et sont résumées dans la [Figure 37](#).

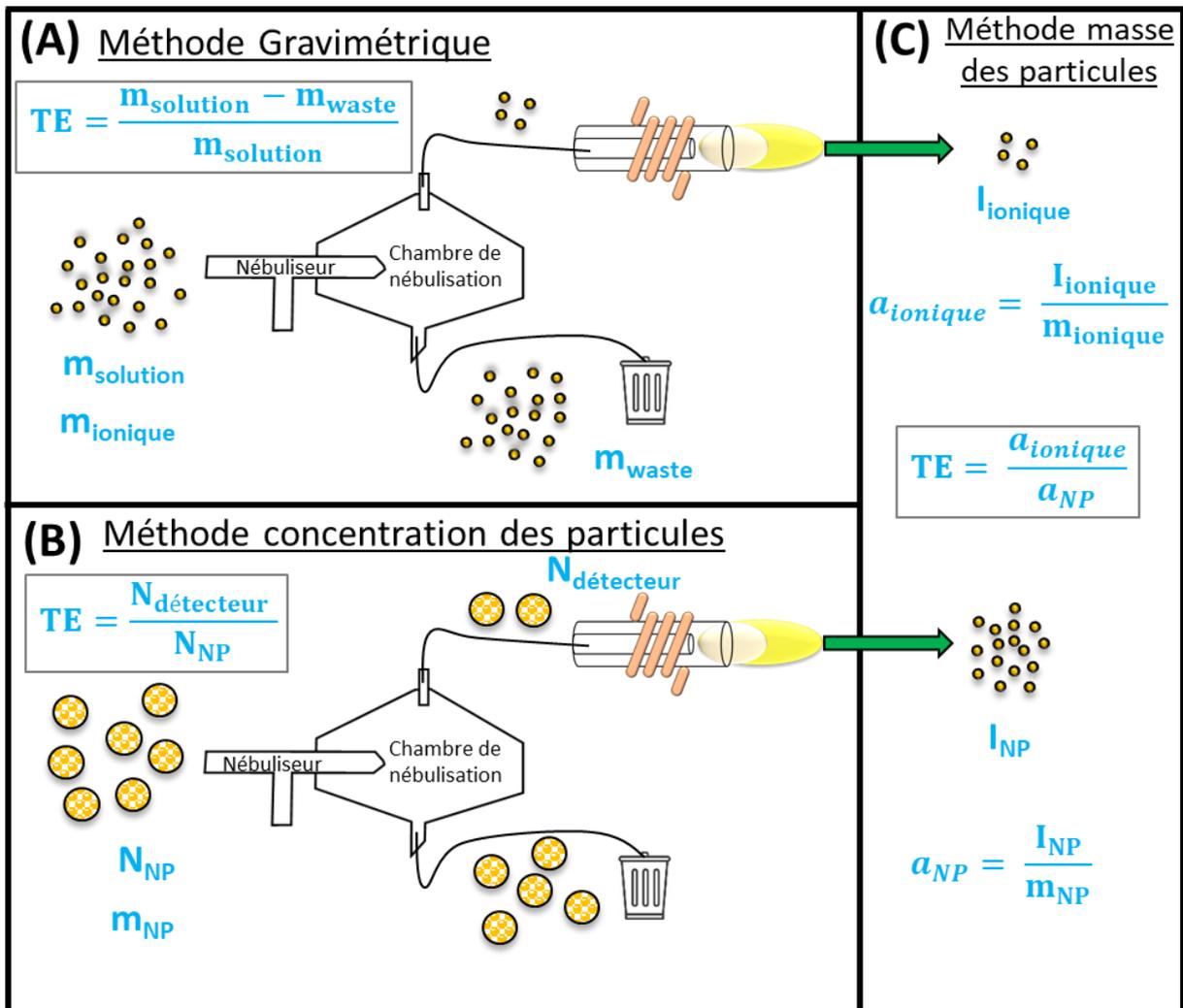


Figure 37 : Schéma des différentes méthodes pour déterminer l'efficacité de transport (TE)

### II.9.1.1 Méthode gravimétrique

Cette méthode est la plus ancienne et a été mise en place par [Gustavsson \(1984\)](#). C'est une mesure indirecte qui consiste à peser un volume connu d'une solution qui sera envoyé dans le système d'introduction de l'ICP-MS. La fraction récupérée dans la poubelle, c'est à dire qui n'a pas été introduite dans le plasma au niveau de la chambre de nébulisation, est récoltée et pesée ([Figure 37A](#)). Ainsi, l'efficacité de transport peut être déterminée à partir de l'[Équation 2](#) :

**Équation 2**

$$TE = \frac{m_{std} - m_{waste}}{m_{std}}$$

avec :

$m_{std}$  : masse initiale de la solution (g)

$m_{waste}$  : masse récupérée en sortie de la chambre de nébulisation dans la poubelle (g)

Cette équation permet de mesurer le TE sans connaître le débit de prélèvement de l'échantillon. Selon [Pace et al. \(2011\)](#), elle est la moins précise des trois méthodes et surestime le TE, ce qui conduit à une sous-estimation de la concentration en particules. C'est pourquoi [Pace et al. \(2011\)](#) recommandent d'utiliser une des deux autres méthodes proposées.

### II.9.1.2 Méthode basée sur la masse des particules

L'approche directe basée sur la masse des particules est comparable à celle employée dans les travaux de [Smith and Browner \(1982\)](#). [Pace et al. \(2011\)](#) proposent dans leur étude une nouvelle façon de calculer le TE, plus simple, ne nécessitant pas d'éteindre le plasma ni d'ajouter une collecte après la chambre de nébulisation. Cette méthode repose sur l'hypothèse que l'intensité mesurée pour un temps d'acquisition donné correspond à une seule particule. De plus, il est considéré que l'élément en question s'ionise de la même façon dans le plasma, qu'il soit d'origine ionique ou particulaire.

Pour la détermination du TE, il faut utiliser une suspension monodisperse de NPs. Le but étant d'obtenir un étalonnage basé sur l'intensité produite par une particule en fonction de sa masse. Il existe actuellement plusieurs Matériaux de Référence (MR), composés d'une population de NPs monodisperses en taille, permettant de déterminer le TE (voir [Tableau 7](#)). Si la masse de la particule n'est pas référencée, elle peut être déterminée en connaissant le diamètre et la masse volumique de la particule. En admettant que la particule soit de forme sphérique, la masse peut alors être estimée suivant l'[Équation 3](#).

**Équation 3**

$$m_{NP} = \frac{\pi d^3}{6} \rho$$

avec :

$m_{NP}$  : masse de la particule (g)

$d$  : diamètre de la particule (cm)

$\rho$  : masse volumique de la particule (g/cm<sup>3</sup>)

Suite à l'analyse de cette suspension de NPs monodisperses, l'intensité moyenne est assimilée à la masse calculée de la particule. Plusieurs suspensions de différentes tailles peuvent être utilisées (de la Calle et al., 2017) pour construire une droite d'étalonnage avec plus de points, mais certaines études n'utilisent qu'un seul matériau de référence (Pace et al., 2011 ; Addo Ntim et al., 2018 ; Mackevica et al., 2018). Dans ce dernier cas, il est nécessaire d'analyser un blanc, qui est considéré comme ayant une masse nulle, pour pouvoir faire la droite d'étalonnage. La pente de la droite obtenue (sensibilité) est alors notée  $a_{NP}$ . Dans un même temps, un étalonnage doit être effectué à partir du même élément mais sous forme ionique. Puisqu'il faut obtenir une corrélation entre la masse et l'intensité mesurée (comme pour les particules), la concentration des solutions doit être convertie en masse. Pour cela, le débit d'introduction et le temps d'acquisition sont nécessaires au calcul (Équation 4). La Figure 37 et la Figure 38 permettent de comprendre comment est calculé le TE avec cette méthode.

**Équation 4**

$$m_{ionique} = \frac{[ionique] \times Q}{Dt}$$

avec :

$m_{ionique}$  : masse d'analyte détectée (µg)

[ionique] : concentration massique des ions dans la solution analysée (µg/L)

$Q$  : débit d'introduction de l'échantillon (L/s)

$Dt$  : temps d'acquisition (s)

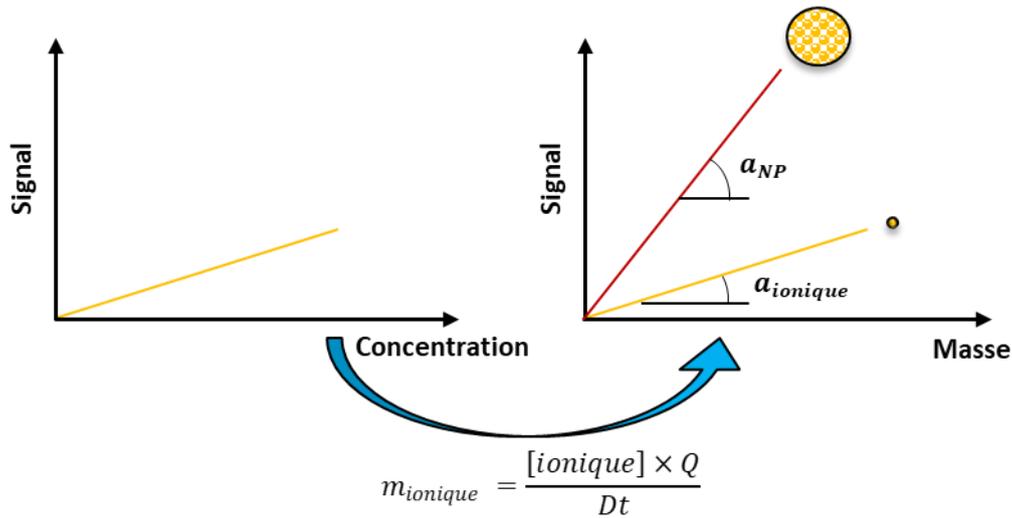
La nouvelle droite d'étalonnage peut être obtenue et sa pente est notée  $a_{ionique}$ . Le TE est alors calculé en faisant le rapport des deux pentes d'étalonnage (Équation 5).

$$TE = \frac{a_{ionique}}{a_{NP}}$$

avec :

$a_{ionique}$  : pente de la droite d'étalonnage liée à l'élément ionique (cps/( $\mu\text{g/L}$ ))

$a_{NP}$  : pente de la droite d'étalonnage liée à l'élément particulaire (cps/( $\mu\text{g/L}$ ))



**Figure 38** : Représentation complémentaire de la méthode de calcul du TE basée sur la masse des particules

En effet, lorsqu'une particule atteint le plasma, le nuage d'ions qu'elle génère après avoir été atomisée représente la totalité de sa masse. Concernant les espèces ioniques entrant dans le système d'introduction, une partie n'atteindra pas le plasma lors de la nébulisation. Le TE peut alors être déterminé en comparant l'étalonnage ionique avec l'étalonnage particulaire. Cette méthode n'est valable que si l'efficacité d'ionisation est de 100%, ce qui est généralement admis notamment pour le titane.

### II.9.1.3 Méthode basée sur la concentration des particules

Cette méthode présente l'avantage de nécessiter moins d'étapes d'étalonnage par rapport à la précédente. Comme pour la méthode basée sur la masse des particules, c'est une méthode directe. Dans ce cas, il est nécessaire de connaître la concentration en particules du matériau de référence. Il suffit alors de mesurer le nombre de particules détectées et de le comparer avec le nombre théorique de particules qu'il aurait fallu détecter (Équation 6).

$$TE = \frac{N_{d\acute{e}tecte\grave{u}r}}{Q \times [Part.]}$$

avec :

$N_{d\acute{e}tecte\grave{u}r}$  : nombre de particules détectées/s

Q : débit d'introduction (mL/s).

[Part.] : nombre de particules/mL dans la suspension

Dans l'équation du TE de la [Figure 37B](#), le dénominateur représente le nombre théorique de particules détectées ( $N_{NP}$ ) qui est égal au débit multiplié par la concentration en particule du MR.

Cette méthode semble donner des résultats de TE équivalents ([Pace et al. 2011](#)). Le [Tableau 7](#) présente les principaux matériaux de référence qui ont été utilisés pour déterminer le TE.

**Tableau 7** : Synthèse des matériaux de référence utilisés pour calculer le TE

Elément	MR	Diamètre (nm)	Référence
Au	BBI Solutions	60/100	Lee et al., 2014 Montaño et al., 2014 Yang et al., 2016
	NanoComposix	50/80/100	Dan et al., 2015 Keller et al., 2018 Cervantes-Avilés et al., 2019
	NIST - RM 8012	30	Kutscher et al., 2016 Vidmar et al., 2017 Candás-Zapico et al., 2018
	NIST-RM 8013	60	Pace et al., 2011 Hineman and Stephan, 2014 Peters et al., 2015 Huynh et al., 2016 Nunez et al., 2016 Deng et al., 2017 Venkatesan et al., 2018b Witzler et al., 2018
	Perkin Elmer	30/50/60/100	de la Calle et al., 2017 Mackevica et al., 2018
Ag	NanoComposix	100	Mitrano et al., 2012

Dans la majorité des cas, le matériau utilisé est une suspension de NPs d'or. Mais il est possible d'utiliser des NPs d'argent comme dans l'étude de [Mitrano et al. \(2012\)](#). Dans le cas des NPs de TiO<sub>2</sub>, il n'existe pas de matériau monodisperse permettant de mesurer correctement le TE.

## II.9.2 Etalonnage à partir d'étalons sous forme ionique

L'étape d'étalonnage est nécessaire pour pouvoir convertir les signaux des particules en diamètre. En raison de l'absence ou de la faible présence de MR sous forme particulaire avec une population monodisperse, les étalonnages de la méthode Sp-ICP-MS nécessitent d'utiliser des étalons sous forme ionique. L'utilisation de ces étalons oblige à tenir compte de paramètres supplémentaires comme le TE, le débit... Ainsi, une gamme d'étalonnage doit être réalisée afin de déterminer la corrélation entre la masse et l'intensité. La masse des étalons est déterminée à l'aide de l'Équation 4. Grâce à cette corrélation, le diamètre des particules peut être déterminé à partir des intensités en utilisant aussi leur masse volumique. Les conversions signaux-diamètres sont détaillées dans le [paragraphe II.9.4.2](#).

## II.9.3 Dilution des échantillons

Cette étape est nécessaire afin d'éviter les coïncidences, c'est-à-dire la détection simultanée de deux particules dans une même acquisition. En effet, lors du traitement des résultats, le signal résultant de plusieurs particules sera considéré comme une particule de taille plus élevée que les particules réellement présentes dans l'échantillon. Pour cela, la concentration particulaire de l'échantillon analysé doit être optimisée car si les particules sont trop nombreuses, cela augmentera la probabilité de mesurer des coïncidences. A l'inverse, si la concentration en particules est trop faible, ces dernières ne seront pas détectées en assez grand nombre et les statistiques pour établir une distribution représentative seront insuffisantes. L'impact de la concentration en particules sur les signaux détectés est schématisé dans la [Figure 39](#).

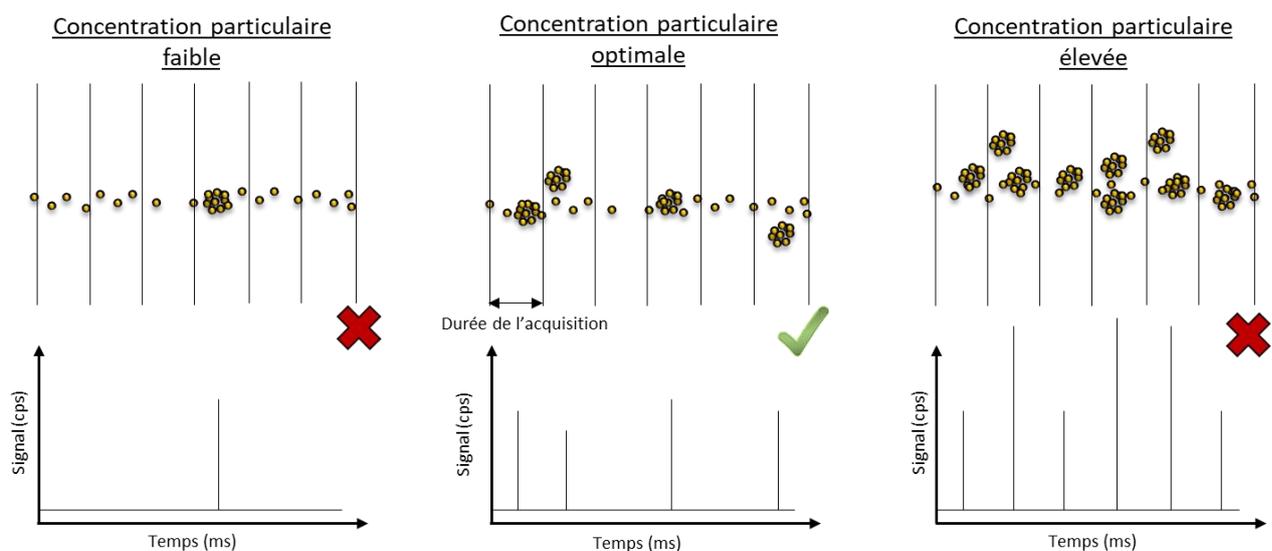


Figure 39 : Schéma de l'impact de la concentration en particules sur le signal obtenu

Dans le cas des analyses avec un temps d'acquisition en Sp-ICP-MS de 10 ms, il est recommandé d'avoir entre 5 et 10% de signaux provenant de particules par rapport au total de signaux acquis pendant l'analyse, afin que la probabilité d'avoir des coïncidences soit négligeable ([Montaño et al., 2014](#) ; [Huynh et al., 2016](#)).

### II.9.4 Traitement des données

Le traitement de données d'acquisition est actuellement l'un des plus gros défis de la méthode Sp-ICP-MS. Bien que la publication de [Pace et al. \(2011\)](#) ait permis d'accroître l'intérêt pour cette méthode, il est nécessaire d'approfondir et d'améliorer certains points comme le calcul du seuil bruit de fond-particule ou encore la détermination du TE. L'évolution du traitement de données en Sp-ICP-MS est détaillée au [paragraphe Error! Reference source not found.](#)

#### *II.9.4.1 Détermination du seuil bruit de fond – particule*

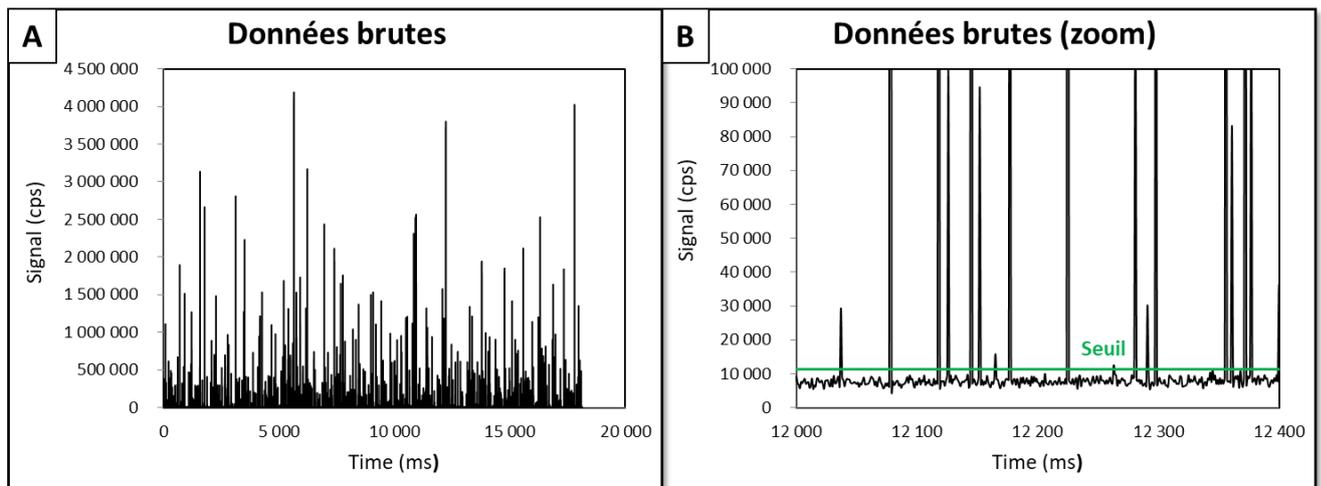
Lors d'une analyse en mode Sp-ICP-MS, le premier paramètre à déterminer est le seuil bruit de fond-particule. Ce paramètre correspond à la valeur d'intensité limite pour laquelle le signal est considéré comme issu d'une particule. Le seuil bruit de fond-particule permet donc de discriminer le bruit de fond des signaux provenant de particules. Il est déterminé en utilisant une méthode itérative. Tous les signaux supérieurs à 3 fois l'Ecart Type (3xET) de la moyenne de l'ensemble des données brutes sont considérés comme provenant de particules et exclus des données. Les données restantes sont à nouveau moyennées et l'opération est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de valeur exclue au-delà de 3xET de la moyenne finale. La valeur de 3xET est nominale et est communément utilisée pour le calcul de la Limite de Détection en taille (LDt). C'est la valeur qu'utilise l'équipe de [Pace et al. \(2011\)](#). Dans une étude de [Tuoriniemi et al. \(2012\)](#), le calcul du seuil bruit de fond-particule se fait avec 3, 5 ou 8 fois l'écart-type (3xET, 5xET et 8xET). Il est observé que l'application de 8xET est plus pertinente et permet d'éliminer des signaux de bruit de fond qui pouvaient être considérés comme provenant de particules. Le calcul du seuil bruit de fond-particule n'est pas souvent détaillé dans les différentes publications mais la plupart des articles font référence à [Pace et al. \(2011\)](#) et semblent par conséquent utiliser 3xET.

Récemment, une autre approche a été proposée par plusieurs études qui ont modélisé le bruit de fond obtenu à l'aide de modèles statistiques. Ce bruit de fond modélisé est ensuite soustrait aux données brutes de l'analyse Sp-ICP-MS, permettant ainsi de récupérer uniquement les signaux provenant des particules ([Bolea-Fernandez et al., 2017](#) ; [Gundlach-Graham et al., 2018](#)). Cette méthode n'utilise donc

pas de valeur de seuil bruit de fond-particule mais nécessite d'être améliorée quant à son automatisation pour des analyses de routine.

#### II.9.4.2 Détermination du diamètre des NPs à partir des données brutes

L'analyse d'un échantillon contenant des NPs fournit un fractogramme contenant de nombreux pics liés aux particules, comme représenté sur la [Figure 40A](#).



**Figure 40** : Exemple de signal classique obtenu par Sp-ICP-MS (A) ainsi que son échelle agrandie avec la représentation graphique du seuil bruit de fond-particule (B)

La [Figure 40B](#), qui est un agrandissement de la [Figure 40A](#), permet de bien visualiser les signaux liés aux particules qui se traduisent par de fortes intensités. Elle permet aussi de représenter graphiquement la valeur du seuil bruit de fond-particule qui va aider à éliminer tous les signaux de faibles intensités considérés comme du bruit de fond. Les signaux restants attribués aux particules sont ensuite classés en fonction de leur fréquence, comme le montre la [Figure 41](#).

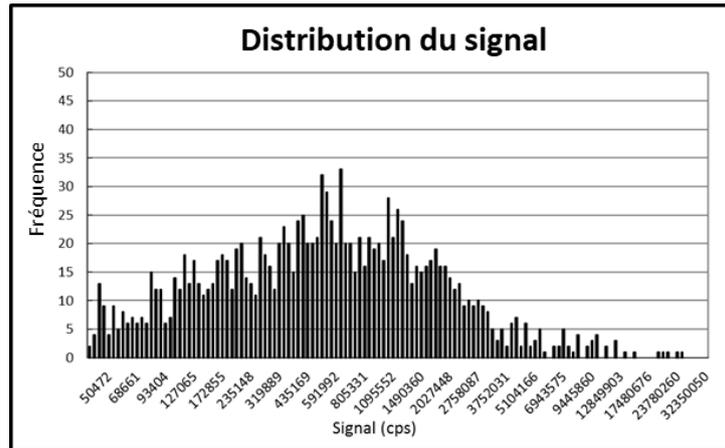


Figure 41 : Exemple de distribution des signaux ICP-MS en fonction de leur fréquence

L'étape de l'étalonnage décrite précédemment (paragraphe II.9.2), utilise l'élément d'intérêt sous forme ionique ce qui permet de déterminer la sensibilité du détecteur lié à cet élément. Par exemple, pour les particules de  $TiO_2$ , c'est le titane sous forme ionique qui servira d'étalon. Cette sensibilité permet ainsi de calculer la masse d'une particule à partir de l'intensité de son signal en utilisant l'Équation 7.

Équation 7

$$m_{NP} = \left[ \frac{(I_{part.} - I_{bdf}) \times IE \times TE}{\left( \frac{a \times 60}{Dt \times Q \times 1000} \right)} \right] f_{part.}$$

avec :

$m_{NP}$  : masse de la particule (fg)

$I_{part.}$  : intensité de l'impulsion (cps)

$I_{bdf}$  : intensité moyenne du bruit de fond (cps)

IE : efficacité d'ionisation

TE : efficacité de transport

a : sensibilité (cps/( $\mu$ g/L))

Dt : temps acquisition (Dwell time) (ms)

Q : débit (mL/min)

$f_{part.}$  : fraction massique de l'élément dans la particule

Le numérateur de l'Équation 7 représente le signal de la particule (en cps) corrigé par le bruit de fond et les efficacités d'ionisation et de transport. Par ailleurs, l'efficacité d'ionisation est toujours

considérée égale à 100% dans les études, bien qu'elle ne soit pas vérifiée. Le dénominateur correspond à la pente de la droite d'étalonnage convertie en cps/fg.

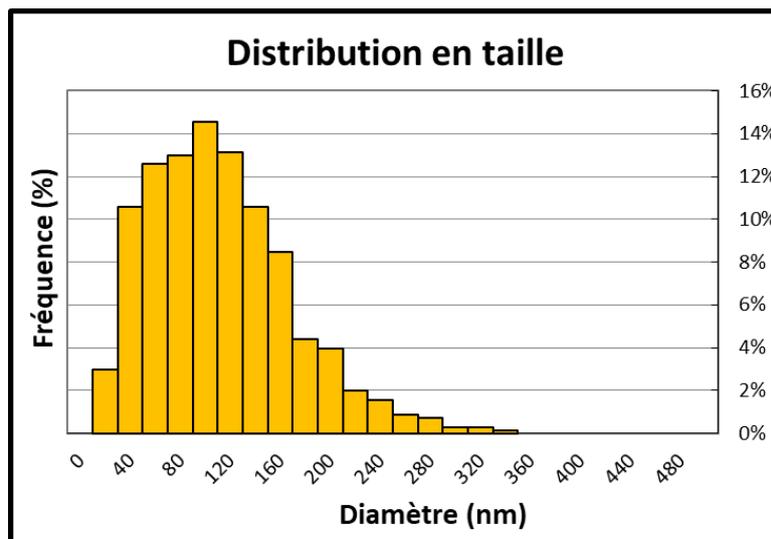
A partir de la masse de la particule obtenue selon l'Équation 7, son diamètre peut être déterminé en admettant que la particule est de forme sphérique, en utilisant l'Équation 8.

**Équation 8**

$$d = \sqrt[3]{\frac{6 \times m_{NP}}{\rho \times \pi}}$$

Cette équation est l'équivalent de l'Équation 3 remaniée et utilise la masse volumique ( $\rho$ ) de la particule qui nécessite d'être connue.

Une fois le diamètre calculé pour tous les signaux des particules, une distribution des diamètres en fonction de leur fréquence peut être établie, comme le montre la Figure 42.

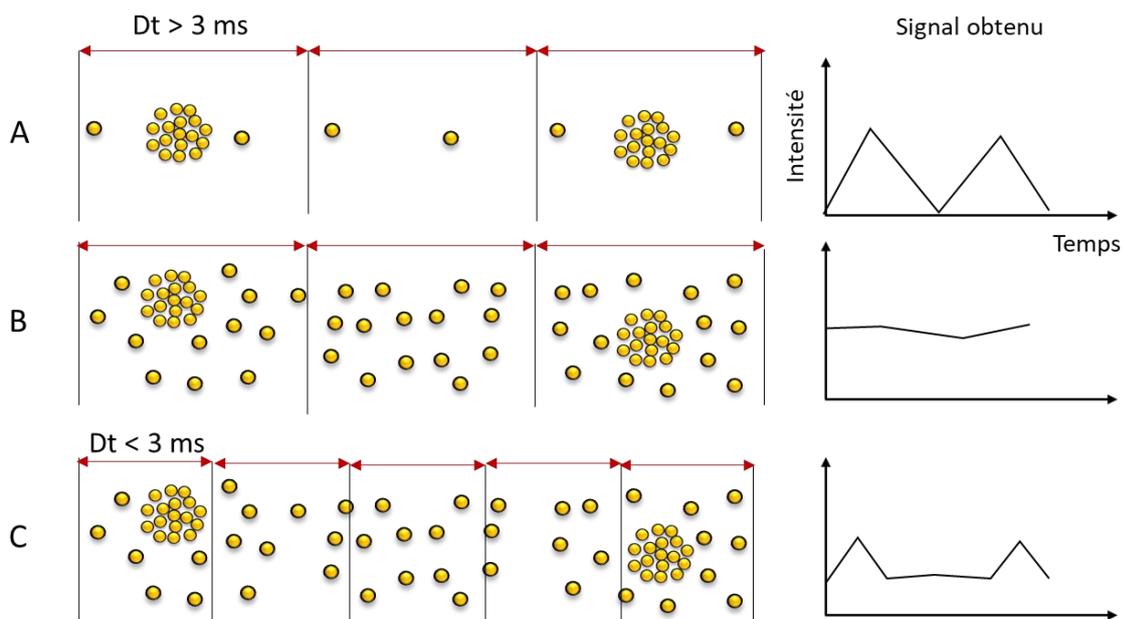


**Figure 42** : Exemple d'une distribution en taille obtenue par Sp-ICP-MS

Ce type de résultat est appelé plus communément « distribution en taille » et permet ainsi d'évaluer les différents diamètres observés (abscisse) en fonction de leur récurrence (ordonnée). C'est un paramètre important susceptible d'être utilisé au niveau législatif et pour les études d'évaluation des risques.

### II.9.4.3 Limite de détection en taille

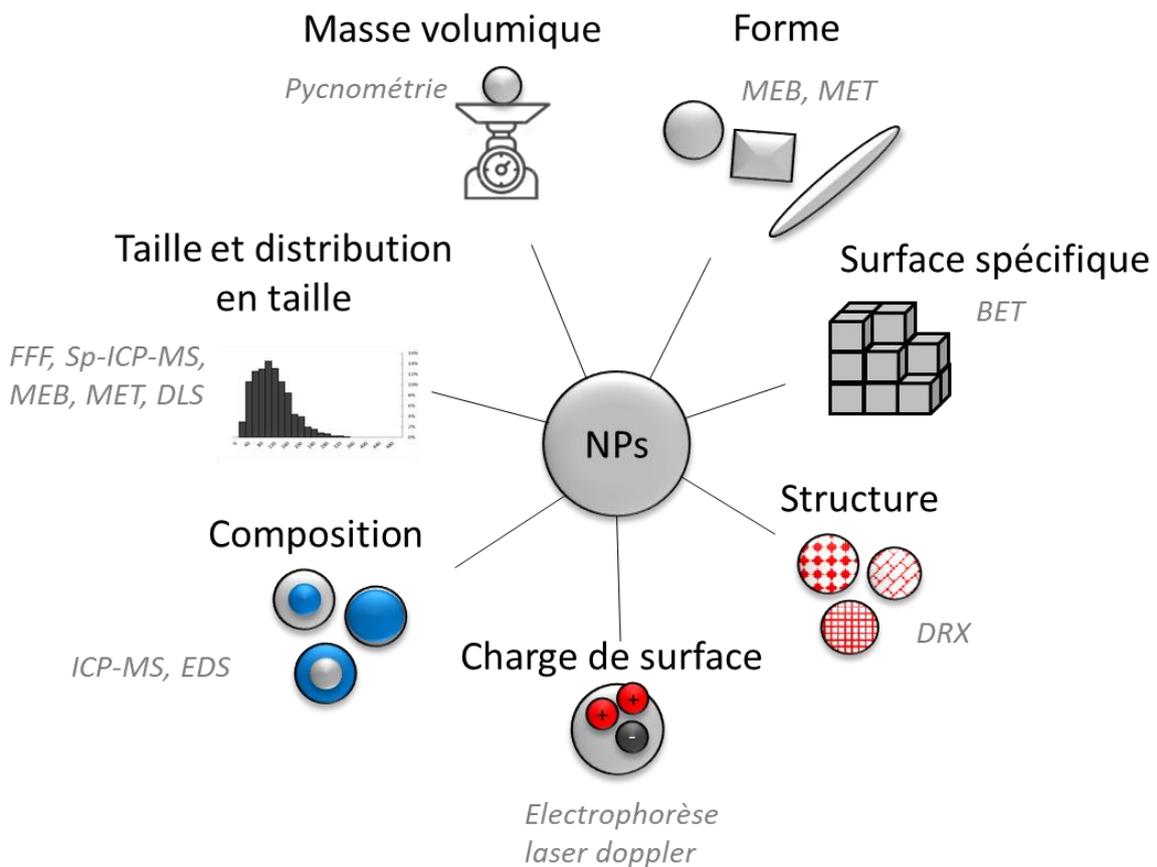
La Limite de Détection en taille (LDt) représente le plus petit diamètre de particule pouvant être détecté par la méthode Sp-ICP-MS. Son calcul dépend du seuil bruit de fond-particule déterminé au préalable (c.f. [paragraphe II.9.4.1](#)). Le seuil bruit de fond-particule étant la limite d'intensité pour qu'une particule soit détectée, il représente alors la limite de détection. Il faut le convertir en masse puis en taille en utilisant respectivement l'[Équation 7](#) et l'[Équation 8](#). Cette LDt varie suivant le type d'échantillon puisque le bruit de fond dépend de la matrice. En effet, si l'échantillon contient l'analyte d'intérêt sous forme particulaire et ionique, le bruit de fond peut être fortement augmenté par la présence de la forme ionique. L'utilisation des temps d'acquisition (Dt) plus faibles (< 3ms) permet toutefois de minimiser le bruit de fond ([Figure 43](#)). En effet lorsque le Dt est diminué, la fraction ionique détectée dans ce laps est aussi diminuée, ce qui abaisse le bruit de fond et permet de détecter plus de particules.



**Figure 43** : Analyses Sp-ICP-MS (A) d'un échantillon contenant peu d'analyte sous forme ionique avec un Dt élevé, (B) d'un échantillon contenant une concentration élevée d'analyte ionique avec un Dt élevé et (C) d'un échantillon contenant une concentration élevée d'analyte ionique avec un Dt faible

## II.10 Bilan

Ce chapitre a présenté les différentes méthodes de caractérisation des NPs de TiO<sub>2</sub> utilisées dans ces travaux. Ces différentes techniques sont complémentaires et permettent d'obtenir différentes informations telles que la masse volumique, la surface spécifique, la taille ou encore le potentiel zêta des NPs. La [Figure 44](#) résume les différentes techniques qui ont été présentées ainsi que les paramètres de caractérisation qu'elles peuvent fournir.



**Figure 44** : Synthèse des méthodes de caractérisation des NPs utilisées et des paramètres évalués

En ce qui concerne la caractérisation de NPs de TiO<sub>2</sub> dans les aliments, la microscopie électronique est la méthode la plus utilisée ([paragraphe I.3.2.1](#)). L'objectif étant de développer les méthodes AF4-ICP-MS et Sp-ICP-MS comme alternative ou complément à la microscopie électronique ; ces méthodes seront donc étudiées dans les chapitres suivants.