

**Université de Montréal**

**Séparation, détection et caractérisation de nanoparticules manufacturées dans  
des eaux naturelles et usées avec la chromatographie hydrodynamique et de  
multiples détecteurs**

**par Kim Proulx**

**Département de Chimie, Faculté des Arts et Sciences**

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de *Maître ès sciences* (M.Sc.) en Chimie

Octobre 2014

© Kim Proulx, 2014

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Séparation, détection et caractérisation de nanoparticules manufacturées dans des  
eaux naturelles et usées avec la chromatographie hydrodynamique et de multiples  
détecteurs

présenté par :

Kim Proulx

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Masson, président-rapporteur

Kevin J. Wilkinson, directeur de recherche

Pierre Chaurand, membre du jury

## Résumé

L'utilisation accrue des nanomatériaux manufacturés (NM) fait en sorte que les différents acteurs de réglementation se questionnent de plus en plus par rapport à leur destin et leurs impacts sur les écosystèmes et la santé humaine suite à leur rejet dans l'environnement. Le développement de techniques analytiques permettant de détecter et de caractériser les NM en matrice environnementale est impératif étant donné la nécessité d'évaluer le risque relié à ces polluants émergents.

Une des approches de plus en plus favorisée est d'utiliser une technique chromatographique et un ou plusieurs détecteurs sensibles dans les buts de réduire les effets de matrice, d'identifier des nanoparticules (NP) selon leurs temps de rétention et de les quantifier à des concentrations représentatives de la réalité environnementale. Une technique analytique utilisant la chromatographie hydrodynamique (HDC) et des détecteurs en ligne ou hors ligne (détecteurs de diffusion statique ou dynamique de la lumière, spectromètre de masse par torche à plasma en mode particule unique (SP-ICPMS), l'ultracentrifugation analytique) a donc été développée.

Le couplage de la colonne HDC avec ces détecteurs a permis de caractériser des NP standards et l'optimisation des conditions de séparation de ces nanoparticules de polystyrène, d'or et d'argent a permis de confirmer que les NP y sont bel et bien séparées seulement selon leur taille, tel que la théorie le prédit. De plus, l'utilisation de la colonne HDC couplée au SP-ICPMS a permis de séparer un mélange de nanoparticules d'argent (nAg) et de les détecter à des concentrations représentatives de celles rencontrées dans l'environnement, soit de l'ordre du  $\mu\text{g L}^{-1}$  au  $\text{ng L}^{-1}$ . Par exemple, dans un échantillon d'eau usée (effluent), un mélange de nAg de 80 et de 40 nm a été séparé et les nAg ont été détectées à l'aide du SP-ICPMS connecté à la colonne HDC (temps de rétention de 25.2 et 25.6 minutes et diamètres déterminés de 71.4 nm et 52.0 nm). Finalement, pour plusieurs échantillons environnementaux auxquels aucun ajout de nanoparticules n'a été fait,

les analyses HDC-SP-ICPMS effectuées ont permis de déterminer qu'ils ne contenaient initialement pas de nAg.

Mots clés: nanoparticules, argent, chromatographie hydrodynamique, eaux usées, diffusion de la lumière, spectrométrie de masse par torche au plasma en mode particule unique

## Abstract

Due to the widespread use of engineered nanoparticles (ENP), regulatory agencies are very concerned about their fate and their impacts on the environment and on human health. The development of analytical techniques, which will allow the detection, characterization and quantification of ENP in environmental matrices, is therefore critical in order to properly evaluate the exposure associated with these emerging pollutants.

One promising approach to detect and quantify the nanoparticles is to couple a chromatographic technique to a sensitive detector in order to: (i) reduce matrix effects; (ii) identify nanoparticles from their retention times and (iii) quantify the ENP at environmentally relevant concentrations. Consequently, the coupling of hydrodynamic chromatography (HDC) was performed with both on-line and off-line detectors (light scattering detectors, inductively coupled plasma mass spectrometer in its single particle mode (SP-ICPMS) and an analytical ultracentrifuge).

HDC was first used for the characterization of ENP standards. Separation conditions were optimized for standard nanoparticle suspensions of polystyrene, gold and silver, which allowed us to confirm that the separation was occurring, based on hydrodynamic size, as predicted by theory. By coupling the HDC column to the ICPMS detector in its “single particle” mode, it was possible to separate an ENP mixture and to detect the nanoparticles at environmental concentrations, i.e., in the  $\mu\text{g L}^{-1}$  to  $\text{ng L}^{-1}$  range. For example, in a wastewater sample (effluent wastewater), a mixture of two silver nanoparticles (nAg) of 40 and 80 nm were separated and the nAg were detected by SP-ICPMS at retention times of 25.2 and 25.6 minutes. Diameters of 71.4 nm and 52.0 nm were found. HDC-SP-ICPMS analysis carried out on different non-spiked wastewater samples allowed us to conclude that nAg was below the detection limit of  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Key words: nanoparticles, silver, hydrodynamic chromatography, wastewaters, light scattering, inductively coupled plasma mass spectrometry in its single particle mode

## Table des matières

RÉSUMÉ .....	III
ABSTRACT .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	XVIII
REMERCIEMENTS .....	XX
<b>CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1. MISE EN CONTEXTE.....	1
1.2. OBJECTIFS DU PROJET .....	4
1.3. THÉORIE: TECHNIQUES ANALYTIQUES UTILISÉES .....	5
1.3.1 Chromatographie hydrodynamique .....	5
1.3.2. Diffusion de la lumière statique et dynamique.....	9
1.3.3. Ultracentrifugation analytique .....	12
1.3.4. Spectrométrie de masse par torche à plasma dans son mode particule unique.....	14
1.3.5. Couplage avec la HDC .....	20
1.4. SOMMAIRE .....	22
<b>CHAPITRE 2. DÉVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE</b>	<b>25</b>
2.1 NANOPARTICULES STANDARDS.....	25
2.1 PROPRIÉTÉS DE L'ÉLUANT.....	27
2.1.1 Influence du pH de l'éluant sur la caractérisation des nanoparticules .....	27
2.1.2 Influence de la force ionique de l'éluant sur la stabilité des nanoparticules.....	34
2.2 ÉLUTION DES NANOPARTICULES SELON LEUR NATURE CHIMIQUE .....	36
2.3 COMPARAISON DES LIMITES DE DÉTECTION DES DÉTECTEURS EN LIGNE ET HORS LIGNE.....	36
2.4 HDC COUPLÉE AUX DÉTECTEURS SLS ET DLS EN LIGNE.....	37
2.4.1 Influence de la taille des nanoparticules sur les limites de détection.....	37
2.4.2 Variation du ratio signal sur bruit selon la concentration des nanoparticules .....	39
2.4.3 Influence du débit sur les résultats expérimentaux .....	40
2.5 SÉPARATION DE MÉLANGES DE NANOPARTICULES .....	42
2.5.1 Co-élution .....	43
2.5.2 Séparation de mélanges de deux types de nanoparticules .....	44
2.5.2.1 Influence des concentrations relatives sur la détection des NP.....	44
2.5.2.2 Influence du débit de l'éluant sur la résolution .....	45
2.5.3 Mélange de trois ou quatre types de nanoparticules .....	47
2.5.3.1 Séparations efficaces .....	47
2.5.3.2 Influence de la concentration des nanoparticules sur la résolution .....	49
2.6 DÉTECTION DE NANOPARTICULES EN MATRICES ENVIRONNEMENTALES .....	53
2.6.1 Eau de rivière.....	53
2.6.2 Eaux usées .....	54
2.7 CONCLUSIONS SUITE À L'OPTIMISATION PRÉLIMINAIRE DE LA MÉTHODE .....	58
<b>CHAPITRE 3. SÉPARATION, DÉTECTION ET CARACTÉRISATION DE NANOPARTICULES MANUFACTURÉES DANS DES EAUX NATURELLES EN UTILISANT LA CHROMATOGRAPHIE HYDRODYNAMIQUE COUPLÉE À DE MULTIPLES DÉTECTEURS (DIFFUSION DE LA LUMIÈRE, L'ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE ET LE MODE PARTIULE UNIQUE DE L'ICPMS).....</b>	<b>59</b>

ENVIRONMENTAL CONTEXT .....	60
ABSTRACT .....	60
3.1 INTRODUCTION .....	61
3.2 EXPERIMENTAL SECTION.....	63
3.2.1 Reagents.....	63
3.2.2 Hydrodynamic chromatography.....	64
3.2.3 Off-line particle characterisation .....	65
3.3 RESULTS AND DISCUSSION .....	66
3.3.1 ENP size determinations .....	66
3.3.2 Chromatographic evaluation of the ENP standards.....	69
3.3.3 Column calibration.....	70
3.3.4 Reproducibility analysis.....	72
3.3.5 Role of sample concentration.....	73
3.3.6 ENP mixtures .....	74
3.3.7 Analysis of a spiked natural river water sample.....	78
3.3.8 Detection of low nAg concentrations using HDC coupled to on-line SP-ICP-MS .....	83
3.4 CONCLUSIONS .....	84
3.5 SUPPLEMENTARY MATERIAL .....	85
3.5.1 Composition of the eluent .....	85
3.5.2 Role of injection volume.....	86
3.5.3 Calibration curves using manufacturers' radii.....	89
3.5.4 ENP mixtures .....	90
3.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	95
<b>CHAPITRE 4. SÉPARATION, DÉTECTION ET CARACTÉRISATION DE NANOMATÉRIAUX DANS DES EAUX USÉES MUNICIPALES EN UTILISANT LA CHROMATOGRAPHIE HYDRODYNAMIQUE COUPLÉE À L'ICPMS ET L'ICPMS EN MODE PARTICULE UNIQUE.....</b>	<b>96</b>
ABSTRACT .....	97
4.1 INTRODUCTION .....	98
4.2 EXPERIMENTAL SECTION.....	99
4.2.1 Reagents.....	99
4.2.2 Hydrodynamic chromatography and on-line detection .....	100
4.2.3 Sample collection and preparation .....	102
4.3 RESULTS AND DISCUSSION .....	103
4.3.1 Influence of experimental parameters on HDC performance.....	103
4.3.2 Characterisation of the natural water samples (influent, effluent, river water) .....	103
4.3.3 Standard ENP spiked into wastewater samples .....	104
4.3.4 ENP mixtures spiked into wastewater samples.....	109
4.3.5 Characterisation of non-spiked environmental samples.....	110
4.4 CONCLUSIONS .....	111
4.5 SUPPLEMENTARY MATERIAL .....	112
4.5.1 Role of the eluent flow rate on HDC separation.....	112
4.5.2 Role of ENP concentrations on HDC separation performance .....	118
4.5.3 Characterisation of wastewater and river samples.....	120
4.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	122
<b>CHAPITRE 5. CONCLUSION .....</b>	<b>123</b>
<b>RÉFÉRENCES... ..</b>	<b>127</b>



## Liste des tableaux

Tableau I-1 Caractéristiques et gammes d'application des différentes techniques analytiques présentées.....	23
Tableau II-1 Détecteurs utilisés dans le cadre du développement et de l'optimisation préliminaire de la méthode.....	25
Tableau II-2 Nanoparticules utilisées en tant que standards.....	26
Tableau II -3 Stabilité des nanoparticules standards selon la force ionique de l'éluant. NS: instable, aucun pic discernable avec le DLS en ligne; SLD: sous la limite de détection, ratio signal sur bruit trop faible .....	35
Tableau II-4 Caractérisation de nanoparticules standards de même taille suite à leur élution individuelle dans la colonne HDC .....	36
Tableau II-5 Caractérisation de nAg standards à l'aide de détecteurs DLS couplés ou non couplés à la colonne HDC.....	37
Tableau II-6 Exactitude des rayons hydrodynamiques obtenus en fonction de la taille des nAu et du volume injecté.....	38
Tableau II-7 Exactitude des rayons de giration et hydrodynamiques en fonction du débit de l'éluant utilisé.....	41
Tableau II-8 Caractérisation des nanoparticules détectées suite à l'injection d'un mélange de 250 mg L <sup>-1</sup> de FluoSphères et de 750 mg L <sup>-1</sup> de nPS dans la colonne HDC .....	43
Tableau II-9 Caractérisation à l'aide du DLS des nanoparticules détectées suite à l'injection d'un mélange de 19.2 mg L <sup>-1</sup> de nAu et de 0.8 mg L <sup>-1</sup> de nAg dans la colonne HDC.....	44
Tableau II-10 Caractérisation des nanoparticules détectées suite à l'injection d'un mélange de (A) 180 et 100 mg L <sup>-1</sup> de 24 et 80 nm de FluoSphères et de nPS et de (B) 300 et 60 mg L <sup>-1</sup> de 24 et 50 nm de FluoSphères et de nPS dans la colonne HDC .....	47
Tableau II-11 Caractérisation des nanoparticules détectées suite à l'injection d'un mélange de 800 mg L <sup>-1</sup> de FluoSphères de 24 nm de diamètre, de 60 mg L <sup>-1</sup> de nPS	

de 50 nm de diamètre et de 20 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 80 nm de diamètre dans la colonne HDC .....	48
Tableau II-12 Caractérisation des nanoparticules détectées suite à l'injection d'un mélange de 800 mg L <sup>-1</sup> de FluoSphères de 24 nm de diamètre, de 60 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 50 nm de diamètre, de 20 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 80 nm de diamètre et de 10 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 120 nm de diamètre dans la colonne HDC .....	49
Tableau II-13 Caractérisation des nanoparticules détectées suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de nAg de 20 nm de rayon et de nPS de 40 et 60 nm de rayons à des concentrations décroissantes .....	50
Tableau II-14 Caractérisation des nanoparticules contenues dans chacune des fractions d'éluant collectées suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de nAg de 20 nm de rayon et de nPS de 40 et 60 nm de rayons à des concentrations de 3, 14 et 7 mg L <sup>-1</sup> , respectivement (séparation A de la figure 2.17). Les $R_h$ ont été déterminés avec le détecteur DLS hors ligne (Wyatt Mobius) suite à la collection de 10 fractions de 0.2 mL. ....	52
Tableau II-15 Caractérisation des nanoparticules contenues dans chacune des fractions d'éluant collectées suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de nAg de 20 nm de rayon et de nPS de 40 et 60 nm de rayons à des concentrations de 0.3, 1.4 et 0.7 mg L <sup>-1</sup> , respectivement (séparation B de la figure 2.17). Les $R_h$ ont été déterminés avec le détecteur DLS hors ligne (Wyatt Mobius) suite à la collection de 13 fractions de 0.2 mL. ....	52
Tableau II-16 Caractérisation des nanoparticules contenues dans chacune des fractions d'éluant collectées suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de nAg de 20 nm de rayon et de nPS de 40 et 60 nm de rayons à des concentrations de 0.03, 0.14 et 0.07 mg L <sup>-1</sup> , respectivement (séparation C de la figure 2.17). Les $R_h$ ont été déterminés avec le détecteur DLS hors ligne (Wyatt Mobius) suite à la collection de 13 fractions de 0.2 mL.....	53
Tableau II -17 Caractérisation de particules intrinsèquement présentes dans les eaux usées .....	55
Tableau II-18 Caractérisation de nanoparticules standards dans des eaux usées, soit de l'affluent traité. Tous les échantillons ont été préalablement filtrés sur une membrane de 0.45 µm (Millipore).....	56

Tableau II-19 Caractérisation de nanoparticules standards dans des eaux usées, soit de l'effluent primaire. Tous les échantillons ont été préalablement filtrés sur une membrane de 0.45 $\mu\text{m}$ (Millipore).....	56
Tableau II-20 Caractérisation de nanoparticules standards dans des eaux usées, soit de l'effluent secondaire. Tous les échantillons ont été préalablement filtrés sur une membrane de 0.45 $\mu\text{m}$ (Millipore).....	57
Table III-1 Nanoparticles employed for the optimisation of the hydrodynamic chromatography column.....	64
Table III-2 Engineered nanoparticle (ENP) radii given by the manufacturer (nm) and measured radii obtained from static (SLS) and dynamic light scattering (DLS), analytical ultracentrifugation (AUC) and single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICPMS). ....	68
Table III-3 Polydispersity of the engineered nanoparticles (ENP) standards after elution through the hydrodynamic chromatography column. ....	70
Table III-4 Effect of the sample pH on retention times and hydrodynamic radii ( $R_h$ ) determined for 2 $\text{mg L}^{-1}$ of citrate coated nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm). ....	72
Table III-5 Effects of engineered nanoparticle (ENP) concentration on hydrodynamic chromatography (HDC) retention times and particle radii determined by light scattering. ....	74
Table III-6 Roles of engineered nanoparticle (ENP) concentrations, particle types and particle sizes on the separation and measured radii (determined from retention times, radius of gyration, $R_g$ and radius of hydration $R_h$ ) obtained for a four particle mixture. ....	76
Table III-7 Separation of an engineered nanoparticle (ENP) mixture (composition corresponding to Table III-6b) and fraction characterization using off-line detectors .....	78
Table III-8 Separation of an engineered nanoparticle (ENP) mixture of 10 $\text{mg L}^{-1}$ nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm) and 30 $\text{mg L}^{-1}$ of a nanopolystyrene (nPS, Bangs, nominal radius of 60 nm) (cf. Fig. 2) spiked into a natural water.....	80

Table III-9 Separation of an engineered nanoparticle (ENP) mixture (29 mg L <sup>-1</sup> of 20 nm nAu, 2 mg L <sup>-1</sup> of 20 nm nAg, 40 mg L <sup>-1</sup> of 40 nm nanopolystyrene (nPS) and 6 mg L <sup>-1</sup> of 60 nm nPS) (cf. Table III-6B) spiked into a natural water. ....	81
Table III-10 Dynamic light scattering (DLS) size distributions of 200 µg L <sup>-1</sup> of nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm) spiked in the river water sample: (a) distribution before separation on the hydrodynamic column (HDC) column; (b) size of the sample fraction collected between 12.9-13.1 min. ....	83
Table SIII-1 Hydrodynamic radii obtained for nAg (Sigma) with a nominal radius of 20 nm when analysed with the on-line HDC-DLS. ....	85
Table SIII-2 Separation of an ENP mixture (composition corresponding to the ENP mixture of Fig. 2). ....	90
Table IV-1. Standard nanoparticles employed for validation/optimization experiments .....	100
Table IV-2. Water sample identification.....	102
Table IV-3. SP ICPMS and HDC SP ICPMS measurements of two nAg (nominally 40, 80 nm) measured in Milli-Q water and the Repentigny influent and effluent .....	105
Table IV-4. Detection limits of selected elements analysed by HDC ICPMS .....	111
Table SIV-1. Influence of the eluent flow rate on retention times, gyration diameters ( $D_g$ ), hydrodynamic diameters ( $D_h$ ) and signal intensities determined for a mixture of 6 mg L <sup>-1</sup> nAg (40 nm), 2 mg L <sup>-1</sup> nAu (60 nm) and 15 mg L <sup>-1</sup> nPS (120 nm) spiked in Milli-Q water using HDC DLS/SLS .....	114
Table SIV-2. On-line parameters determined by HDC DLS in order to characterize the influence of the eluent flow rate on the separation of a mixture of 6 mg L <sup>-1</sup> of nAg (40 nm), 2 mg L <sup>-1</sup> of nAu (60 nm) and 15 mg L <sup>-1</sup> of nPS (120 nm). ....	116
Table SIV-3. HDC SP ICPMS retention time differences and resolution between the nAg 40 nm and the nAg 80 nm depending on the eluent flow rate. ....	118
Table SIV-4. Evaluation of the influence of the ENP concentrations on HDC DLS retention times, gyration diameters, hydrodynamic diameters and signal intensities	

determined for a mixture of nAg (40 nm), nAu (60 nm) and nPS (120 nm) spiked into Milli-Q water with an eluent flow rate of 1.50 mL min <sup>-1</sup> .....	118
Table SIV-5. Separation parameters (Fig. S4.2) and resolution from the HDC DLS separation of the mixtures of nAg (40 nm), nAu (60 nm) and nPS (120 nm) spiked into Milli-Q water .....	119
Table SIV-6. HDC SP ICPMS retention time differences between the 40 nm nAg and the 80 nm nAg, depending on their concentrations.....	119
Table SIV-7. Semi-quantitative ICPMS and total organic carbon (DOC) analyses of the river and wastewater samples (LOD: limit of detection) .....	120
Table SIV-8. Recoveries of Ag during HDC ICPMS analysis for nAg spiked into Milli-Q water and wastewater samples .....	121

## Liste des figures

Figure 1.1 Gradient de vitesse de l'éluant s'écoulant entre les sphères de phase stationnaire [24] .....	6
Figure 1.2 Profil de vitesse de l'éluant dans une colonne AF4 et élution des particules selon leur taille [28].....	8
Figure 1.3 Schéma du rotor et du système optique d'un AUC [44].....	13
Figure 1.4 Différents types de signaux observés en SP-ICPMS découlant de la détection d'ions dissous et de nanoparticules [50].....	15
Figure 1.5 Construction d'un histogramme différenciant les signaux des ions dissous et des nanoparticules [50].....	17
Figure 1.6 Illustration des couplages en ligne (flèche pleine) et hors ligne (flèche pointillée) de la HDC avec de multiples détecteurs .....	20
Figure 2.1 Temps de rétention en fonction des rayons des fabricants des nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC à des pH de l'éluant de (A) 6.7, (B) 7.1, (C) 7.4, (D) 7.7 .....	28
Figure 2.2 Temps de rétention en fonction des rayons de giration des nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC à des pH de l'éluant de (A) 6.7, (B) 7.1, (C) 7.4, (D) 7.7 .....	29
Figure 2.3 Temps de rétention en fonction des rayons hydrodynamiques des nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC à des pH de l'éluant de (A) 6.7, (B) 7.1, (C) 7.4, (D) 7.7 .....	30
Figure 2.4 Temps de rétention des nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC en fonction du pH de l'éluant, pour des pH de (A) 6.7, (B) 7.1, (C) 7.4, (D) 7.7.....	31
Figure 2.5 Rayons de giration de nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC en fonction du pH de l'éluant .....	33
Figure 2.6 Rayons hydrodynamiques de nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC en fonction du pH de l'éluant .....	33

Figure 2.7 Rayons de giration et hydrodynamiques de nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC en fonction de leur rayon nominal .....	34
Figure 2.8 Intensité du signal observé au DLS en fonction de la concentration de nAu de 20 nm de diamètre .....	39
Figure 2.9 Intensité du signal observé au DLS en fonction de la concentration de nAg de 40 nm de diamètre .....	39
Figure 2.10 Intensité du signal observé au DLS en fonction de la concentration de nPS de 80 nm de diamètre.....	40
Figure 2.11 Temps de rétention des FluoSphères (concentration de 250 mg L <sup>-1</sup> ) en fonction du débit de l'éluant .....	41
Figure 2.12 Largeur du pic chromatographique des FluoSphères (concentration de 250 mg L <sup>-1</sup> ) en fonction du débit de l'éluant.....	42
Figure 2.13 Intensité du signal en fonction du temps suite à l'injection d'un mélange de 250 mg L <sup>-1</sup> de FluoSphères de 24 nm de diamètre et de 750 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 80 nm de diamètre dans la colonne HDC.....	43
Figure 2.14 Intensité du signal en fonction du temps sur les détecteurs de diffusion de la lumière suite à l'injection d'un mélange de 19.2 mg L <sup>-1</sup> de nau de 20 nm de diamètre et de 0.8 mg L <sup>-1</sup> de nAg de 40 nm de diamètre dans la colonne HDC.....	45
Figure 2.15 Intensité du signal des détecteurs de diffusion de la lumière en fonction du temps suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de (A) 180 mg L <sup>-1</sup> de FluoSphères de 24 nm de diamètre et de 100 mg L <sup>-1</sup> de nPs de 80 nm de diamètre et (B) d'un mélange de 300 mg L <sup>-1</sup> de FluoSphères de 24 nm de diamètre et de 600 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 50 nm de diamètre à différents débits d'éluant .....	46
Figure 2.16 Intensité du signal des détecteurs de diffusion de la lumière en fonction du temps suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de 800 mg L <sup>-1</sup> de FluoSphère de 24 nm de diamètre, de 60 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 50 nm de diamètre, de 20 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 80 nm de diamètre et de 10 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 120 nm de diamètre.....	48
Figure 2.17 Intensité du signal en fonction du temps suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de 800 mg L <sup>-1</sup> de FluoSphère de 24 nm de diamètre, de	

60 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 50 nm de diamètre, de 20 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 80 nm de diamètre et de 10 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 120 nm de diamètre .....	49
Figure 2.18 Séparation d'un mélange de nAg de 20 nm de rayon et de nPS de 40 et 60 nm de rayons, leurs concentrations étant de (A) 3, 14 et 7 mg L <sup>-1</sup> , (B) 0.3, 1.4 et 0.7 mg L <sup>-1</sup> et de (C) 0.03, 0.14 et 0.07 mg L <sup>-1</sup> , respectivement .....	51
Figure 2.19 Temps de rétention en fonction des rayons hydrodynamiques des nanoparticules standards dans (A) de l'eau Milli-Q et dans (B) de l'eau de rivière.....	54
Figure 2.20 Intensité du signal mesuré au DLS en ligne suite à l'injection dans la colonne HDC d'une solution de 95 mg L <sup>-1</sup> de nPS de 21.5 nm de rayon dans l'affluent primaire .....	57
Fig. 3.1 Calibration curve based on the nanopolystyrene nPS (black points), nAu (red point) and nAg (pink points) standards. The curve was prepared based upon the measured hydrodynamic radii of the standards (solid line: nPS only; dotted line: all engineered nanoparticles (ENPs)).....	71
Fig. 3.2 Chromatogram of a mixture of 10 mg L <sup>-1</sup> nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm) and 30 mg L <sup>-1</sup> of a nanopolystyrene (nPS) (Bangs, nominal radius of 60 nm).....	75
Fig. 3.3 Partial chromatogram of river water sample spiked with 4 µg L <sup>-1</sup> of nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm) following separation by hydrodynamic chromatography (HDC) and detection using single particle inductively coupled plasma mass spectrometer (SP-ICPMS). A particle radius of 20.3 ± 0.6 nm was determined for the Ag signal detected at 24.7 min using SP-ICPMS. The entire chromatogram is presented in Fig.S3.7.....	84
Fig. S3.1. Role of the injected sample volume on: (a) signal intensities; (b) peak widths; and (c) retention times.....	87
Fig. S3.2. Chromatograms of ENP standards obtained using the on-line light scattering signal (DLS) collected at 99°.....	88
Fig. S3.3. Calibration curve based on the nPS (black points), nAu (red point) and nAg (pink points) standards. The curve was prepared using the manufacturers' radii for the particle standards (solid line: nPS only; dotted line: all ENP) .....	89

Fig. S3.4. SP-ICPMS nAg size distributions data of several sample fractions of the ENP mixture detailed in Table III-6B.....	91
Fig. S3.5. SP-ICPMS nAg size distributions data of several sample fractions of the ENP mixture in the natural river water (detailed in Table III-8) .....	92
Fig. S3.6. SP-ICPMS nAg size distributions data of several sample fractions of the ENP mixture in the natural river water (detailed in Table III-9) .....	93
Fig. S3.7. Chromatogram of river water with no added ENP, obtained using the on-line light scattering signal (DLS) collected at 99° .....	94
Fig. S3.8. Chromatogram of a river water sample spiked with 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ of nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm) following separation by HDC and detection using SP-ICPMS. A particle radius of $20.3 \pm 0.6$ nm was determined for the Ag signal detected at 24.7 min using SP-ICPMS. ....	94
Fig. 4.1. Calibration curve based on the nPS standards, at a flow rate of 0.50 mL $\text{min}^{-1}$ . The curve (logarithm fit, $R^2$ of 0.998) was obtained using the measured hydrodynamic radii of the standards .....	103
Fig. 4.2. HDC chromatograms determined from the Ag concentrations measured using ICPMS (HDC ICPMS): (A) 40 nm nAg spiked at a concentration of 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Milli-Q water (black), influent (red) and effluent (blue line), and (B) 80 nm nAg spiked at a concentration of 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Milli-Q water (black), influent (red) and effluent (blue line).....	107
Fig. 4.3. HDC SP ICPMS chromatogram of the 80 nm nAg spiked into Repentigny wastewater effluent at a concentration of 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ : (A) nAg particle concentrations and (B) nAg particle diameters_ .....	108
Fig. 4.4. HDC SP ICPMS chromatograms of 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ of 40 nm nAg spiked into (A) Milli-Q water, (B) wastewater influent and (C) wastewater effluent and of 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ of 80 nm nAg spiked into (D) Milli-Q water, (E) wastewater influent and (F) wastewater effluent. ....	109
Fig. 4.5. HDC SP ICPMS chromatograms of a nAg mixture containing 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ of a 40 nm nAg and 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ of a 80 nm nAg spiked into (A) Milli-Q water, (B) influent water and (C) effluent water .....	110

Fig. 4.6. HDC ICPMS chromatograms of non-spiked water samples with ICPMS detection for Cu (from largest to smallest peaks): influent sample from Repentigny WWTP (red); influent sample of <i>Le Gardeur</i> WWTP (green); effluent sample from Repentigny WWTP (black); effluent sample from Montreal WWTP (purple), effluent sample of <i>Le Gardeur</i> WWTP (pink); freshwater from <i>Des Prairies</i> River (blue line) .....	111
Fig. S4.1. Influence of the eluent flow rate on the HDC separation of a mixture of nanoparticles: 6 mg L <sup>-1</sup> of 40 nm nAg, 2 mg L <sup>-1</sup> of 60 nm nAu and 15 mg L <sup>-1</sup> of 120 nm nPS. Chromatograms were acquired using an eluent flow rate of (A) 1.50 mL min <sup>-1</sup> , (B) 1.25 mL min <sup>-1</sup> , (C) 1.00 mL min <sup>-1</sup> and (D) 0.75 mL min <sup>-1</sup> , using on-line dynamic light scattering .....	114
Fig. S4.2. HDC DLS chromatogram of experimental measurements that were used to evaluate the performance of the HDC separation .....	115
Fig. S4.3. Evaluation of the influence of the eluent flow rate on the separation quality of a mixture of two nAg (40 nm, 80 nm nominal diameters) for flow rates of (A) 0.80 mL min <sup>-1</sup> , (B) 0.70 mL min <sup>-1</sup> , (C) 0.60 mL min <sup>-1</sup> , (D) 0.50 mL min <sup>-1</sup> , (E) 0.40 mL min <sup>-1</sup> and (F) 0.30 mL min <sup>-1</sup> using HDC SP ICPMS.....	117
Fig. S4.4. Evaluation of the influence of the ENP concentrations on the separation quality of a mixture of two nAg (40 nm and 80 nm) for concentrations of (A) 5 and 18 µg L <sup>-1</sup> (B) 1 and 3.6 µg L <sup>-1</sup> (5x dilution) and (C) 0.5 and 1.8 µg L <sup>-1</sup> (10x dilution) using HDC SP ICPMS .....	119
Fig. S4.5. (A) Influent and (B) effluent chromatograms obtained for the Repentigny WWTP using on-line dynamic light scattering detectors .....	121
Fig. S4.6. Chromatogram of 100 mg L <sup>-1</sup> of a fulvic acid standard (Suwannee River standard fulvic acid) spiked with Cu <sup>2+</sup> obtained for Milli-Q water using HDC ICPMS.....	122

## Liste des abréviations, des sigles et des acronymes

La signification des abréviations utilisées est donnée par défaut en français. Lorsque nécessaire, les mots dans la langue anglaise sont indiqués entre parenthèses et en italique.

%	pourcentage
°	degré
°C	degré Celsius
$\lambda$	longueur d'onde
$\mu\text{g}$	microgramme
$\mu\text{L}$	microlitre
$\mu\text{m}$	micromètre
$\eta_o$	indice de réfraction du milieu
$\eta$	viscosité
$\pi$	nombre Pi
$\rho_p$	densité des nanoparticules
$\rho_s$	densité du solvant
$P(\theta)$	variation de l'intensité de la lumière diffusée
$\sigma$	écart-type
$\theta$	angle de détection de la lumière diffusée
$a$	rayon
AF4	fractionnement par couplage flux force-flux asymétrique ( <i>asymmetric flow field-flow fractionation</i> )
AUC	ultracentrifugation analytique ( <i>analytical ultracentrifugation</i> )
D	coefficient de diffusion
DLS	diffusion dynamique de la lumière
$d_p$	diamètre de sédimentation
e.g.	<i>exempli gratia (for example)</i>
ENP	nanoparticules manufacturées ( <i>engineered nanoparticles</i> )
FFF	fractionnement par couplage flux force ( <i>field flow fractionation</i> )
HDC	chromatographie hydrodynamique (hydrodynamic chromatography)
ICPMS	spectrométrie de masse par torche à plasma ( <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
$k_B$	constante de Boltzmann

kg	kilogramme
L	litre
m	mètre
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mM	millimole
<i>m/m</i>	masse/masse ( <i>or w/w, weight/weight</i> )
ms	milliseconde
<i>N</i>	nombre de réplicas
nAg	nanoparticules d'argent
nAu	nanoparticules d'or
NaNO <sub>3</sub>	nitrate de sodium
ng	nanogramme
NM	nanomatériaux manufacturés
nm	nanomètre
NP	nanoparticules
nPS	nanoparticules de polystyrène
nTiO <sub>2</sub>	nanoparticules d'oxyde de titane
nZnO	nanoparticules d'oxyde de zinc
<i>R</i>	rayon
<i>R<sub>g</sub></i>	rayon de giration
<i>R<sub>h</sub></i>	rayon hydrodynamique
rpm	tours par minute ( <i>revolutions per minute</i> )
<i>R</i> <sup>2</sup>	coefficient de détermination
<i>s</i>	coefficient de sédimentation
SDS	dodécylsulfate de sodium
SLS	diffusion statique de la lumière
SP-ICPMS	spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif ( <i>inductively coupled plasma mass spectrometry, ICPMS</i> ) dans son mode particule unique ( <i>single particle</i> )
<i>T</i>	température
V	volt
WW	eaux usées ( <i>wastewater</i> )

## Remerciements

Je remercie le professeur Kevin J. Wilkinson d'avoir cru en moi en m'offrant la chance de faire mon entrée dans son équipe de recherche. De plus, son soutien constant et sa générosité m'ont été extrêmement précieux tout au long de mes études graduées. Je lui suis éternellement reconnaissante de m'avoir partagé autant de ses connaissances et de sa passion pour mon projet, pour la biophysicochimie de l'environnement et pour les sciences en général.

Je remercie également tous les membres de l'équipe de recherche pour leur aide, leur support et leurs conseils : Philippe El-Alk, Sébastien Maillette, Leosveys Alessandra Diaz Lozada, Caroline Peyrot, Elena Nadezhina, Élise Morel, Houda Houdhoud, Francis Duquette-Murphay, Vladimir Merdzan, Zhao Yue, Justine-Anne Rowell et Trevor Théoret. Un merci particulier à Madjid Hadioui qui a été mon principal conseiller tout au long de mon projet.

Je remercie aussi ma famille et mes amis de m'avoir soutenue tout au long de mes études. Je tiens à offrir un remerciement particulier à Marie-France Morissette avec qui j'ai développé une belle complicité et qui m'a permis d'apprécier à leur juste valeur les cours de maîtrise que nous avons eu la chance de suivre ensemble. Finalement, je tiens à remercier mon conjoint, Sébastien, pour m'avoir accompagnée dans les moments plus difficiles comme lors des moments réjouissants, et ma meilleure amie, Élise, pour m'avoir sans cesse rappelée l'importance de mon travail.



# Chapitre 1. Introduction

## 1.1. Mise en contexte

Les nanomatériaux manufacturés (NM) englobent un groupe diversifié de matériaux qui présentent au moins une dimension comprise entre 1 et 100 nm. Dû à leur taille nanométrique, les NM ont un grand nombre d'atomes à leur surface, ce qui résulte en des différences significatives entre leurs propriétés et celles des ions dissous ou du matériel conventionnel correspondant [1]. Dû à leurs propriétés intéressantes et leur haute réactivité, des NM comme des nanoparticules, des nanotubes de carbone, des points quantiques et des oxydes métalliques sont maintenant retrouvés dans des milliers de produits commerciaux [2, 3].

En effet, au cours des vingt dernières années, les NM ont été de plus en plus utilisés dans des champs d'application diversifiés tels qu'en agriculture, en santé, en alimentation, en transport, etc. [4]. Par exemple, les nanoparticules d'argent (nAg), dû à leur propriété antibactérienne, sont déjà introduites dans plus de 100 produits, en passant par des suppléments nutritionnels, des produits de soin personnel, les vêtements, les jouets et dans les machines à laver [3]. D'autres NM comme des nanoparticules d'oxyde de titane (nTiO<sub>2</sub>), d'oxyde de zinc (nZnO) ou d'or (nAu) se retrouvent aussi dans plusieurs types de produits de consommation. En effet, il a été répertorié que plus de 1300 produits contiennent des NM [5].

Un grand nombre de bénéfices économiques et sociétaux sont attendus des nanotechnologies, mais certains risques d'exposition pour les populations et les écosystèmes sont probables étant donné la grande réactivité et la persistance des NM rejetés dans l'environnement suite à leur fabrication et leur utilisation. Étant donné que les NM sont incorporés dans un bon nombre de produits de consommation, l'intérêt à les détecter et à les caractériser suite à leur rejet dans l'environnement est grandissant. Les scientifiques et les agences de réglementation se questionnent sérieusement sur le destin et les effets des NM sur l'écosystème et la santé humaine. Malgré l'essor des activités de

recherche actuelles sur le sujet, les réponses à ces questions ne sont pas évidentes, car nous ne sommes toujours pas en mesure de détecter et de quantifier les NM dans des matrices environnementales, une tâche que très peu de laboratoires dans le monde peuvent exécuter à l'heure actuelle.

En effet, quelques groupes de recherche ont réussi, avec un succès limité, à détecter des NM dans l'environnement [6-8]. Cependant, des analyses de cycle de vie concluent qu'une bonne quantité de NM atteint certains systèmes aquatiques des États-Unis et en Europe [9-11]. Également, des groupes de recherche ont réalisé des analyses préliminaires régionales et leurs résultats suggèrent que les concentrations actuelles de nAg, de nTiO<sub>2</sub> et de nZnO sont déjà assez élevées pour présenter des risques pour les organismes aquatiques [12]. En conséquent, des techniques robustes et sensibles sont rapidement requises pour détecter, caractériser et quantifier les NM en matrices environnementales dans le but de réaliser des études toxicologiques représentatives de la réalité environnementale et pour par la suite mettre en place des réglementations visant à protéger les écosystèmes et la population [4].

La toxicité des NP peut être reliée à leur présence en tant que telle dans l'environnement, mais elle peut aussi découler de la dissolution d'ions métalliques de leur surface. Actuellement, beaucoup de projets de recherche tentent de déterminer si les nanoparticules présentent en tant que telle une toxicité et n'agissent pas seulement en tant que fournisseurs d'ions métalliques (qui sont quant à eux connus pour leur toxicité). En effet, le risque lié à la présence de NM dans l'environnement dépend de leur toxicité mais aussi leur concentration dans l'environnement [13]. Plus spécifiquement, des techniques analytiques sont requises pour prioritairement déterminer la nature chimique, la concentration et la taille des NM détectés [14]; leur taille devant être connue étant donné que c'est ce qui distingue les NM des autres matériaux [15]. Aussi, il est soupçonné que plus une nanoparticule (NP) est petite, plus sa toxicité est élevée, car il lui est plus facile de pénétrer la membrane cellulaire. Les mesures expérimentales de détection et de caractérisation des NM ne doivent pas modifier l'état des NM (notamment leur taille via des processus de dissolution ou d'agglomération par exemples), de façon à ce que les

résultats obtenus représentent au maximum la réalité environnementale [3]. Aussi, une méthode idéale doit maintenir son exactitude, sa précision, sa reproductibilité et sa robustesse lorsqu'elle est appliquée à la différenciation des NM des colloïdes naturels également présents dans un échantillon [12].

Les principaux défis sont que les NM sont présents en très faibles concentrations (de l'ordre du  $\mu\text{g L}^{-1}$  au  $\text{ng L}^{-1}$ ) dans des matrices environnementales complexes qui comprennent des nanoparticules naturelles et d'autres particules pouvant interférer avec le signal des NM [16, 17]. En effet, la différenciation des NM des autres constituants de la matrice tels que les particules naturelles, les substances humiques et les débris est en soi un énorme défi analytique. Un autre problème est que les limites de détection des techniques analytiques actuellement développées et utilisées ne sont pas assez basses pour permettre de mesurer les concentrations des NM estimées [14]. La méthode développée doit présenter une haute sensibilité, ce qui n'est pas le cas avec la plupart des techniques présentement utilisées [18]. En résumé, la méthode développée doit surpasser les embûches découlant des faibles concentrations, de la petite taille des NM, des signaux interférents provenant des autres particules de l'échantillon, en plus de ne pas modifier l'état des NM pendant l'analyse [12].

Pour tenter d'isoler le signal des NM des signaux des autres formes du matériel (e.g. produits de dissolution, agglomérats, etc.) ou des autres particules, une stratégie consiste à séparer les composantes de l'échantillon selon leur taille en utilisant des techniques telles que le fractionnement par couplage flux force (FFF), l'ultracentrifugation tangentielle ou la chromatographie par exclusion de taille couplée à différents systèmes de détection (diffusion de la lumière, UV-Vis, spectrométrie de masse par torche à plasma, etc.). Parmi les travaux les plus prometteurs, Tiede *et al.* (2009) ont employé la chromatographie hydrodynamique (HDC) couplée à un détecteur de type spectrométrie de masse par torche à plasma (ICPMS) pour séparer et détecter des nAu avec des seuils de détection de l'ordre des  $\mu\text{g L}^{-1}$  [19]. Même si la technique semble très prometteuse, il leur est difficile de déterminer le taux de dissolution de ces nAu en se basant uniquement sur leurs temps de rétention, car il est impossible d'exclure leur

agglomération, leur dissolution ou leur adsorption par la colonne. De plus, la majorité des études de Tiede portent sur la stabilité des nAu et il n'est pourtant toujours pas certain si ces effets de matrice se manifestent ou non pour d'autres types de particules. C'est donc dans cette optique que nous proposons de coupler une technique chromatographique à de multiples détecteurs pour ainsi poursuivre le développement d'une technique analytique permettant de séparer, détecter, caractériser et quantifier des NM en matrice environnementale.

## 1.2. Objectifs du projet

Le principal objectif est de développer une technique analytique permettant de séparer, détecter, caractériser et quantifier les NP en matrice environnementale, et ce en s'assurant de différencier les nanoparticules des particules naturellement présentes dans l'eau, en s'assurant que les seuils de détection des appareils utilisés, autant en termes de taille que de concentration, sont suffisamment bas et en s'assurant que les manipulations effectuées n'engendrent pas de dissolution, d'agrégation ou d'agglomération des nanoparticules détectées.

Nous proposons d'utiliser dans un premier temps la HDC pour séparer des nanoparticules selon leur taille et ainsi gagner en résolution. Par la suite, la colonne HDC est utilisée en ligne ou hors ligne avec de multiples détecteurs comme une ultracentrifugeuse analytique, des détecteurs de diffusion statique et dynamique de la lumière et un spectromètre de masse à plasma à couplage inductif dans son mode particule unique (SP ICPMS). L'utilisation de ces détecteurs permettra d'obtenir des informations autant sur les propriétés physicochimiques des nanoparticules détectées que sur la qualité de la séparation ayant eu lieu dans la colonne HDC. De plus, des mesures indépendantes peuvent être obtenues à partir de ces détecteurs. Par exemple, le mode "*single particle*" de l'ICPMS est particulièrement intéressant (mode de l'ICPMS où le temps total d'acquisition est subdivisé en milliers de laps de temps de quelques millisecondes, et si le débit et la concentration en nanoparticules sont assez faibles, chaque pulse d'ions détecté provient de l'atomisation et l'ionisation d'une seule

nanoparticule), car le signal peut être décomposé pour obtenir les concentrations des métaux dissous et les différentes classes de taille des nanoparticules détectées et leurs concentrations respectives.

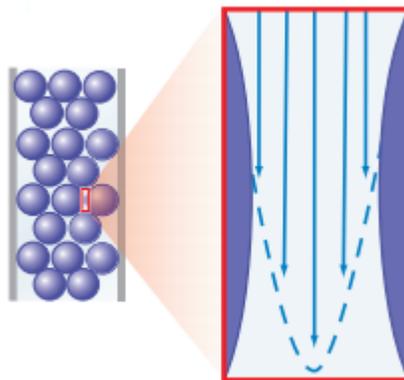
Les nAg étant dorénavant le NM le plus répandu dans une multitude de produits de consommation, l'accent sera mis sur la détection de ce type de NM. De plus, les nAg sont souvent incorporées dans des produits qui peuvent être lavés ou disposés dans les égouts. En conséquent, il est attendu de rencontrer de fortes concentrations en nAg dans les eaux usées qui sont donc une matrice environnementale intéressante pour le développement d'une technique analytique [13].

### **1.3. Théorie: techniques analytiques utilisées**

#### **1.3.1 Chromatographie hydrodynamique**

Le principal objectif de l'utilisation d'une technique chromatographique est de non seulement pouvoir séparer les différentes nanoparticules présentes dans un même échantillon, faisant ainsi des gains en termes de résolution, mais aussi, avec des méthodes de détection appropriées, d'évaluer la distribution en tailles des nanoparticules [20]. La chromatographie hydrodynamique est une technique de chromatographie liquide par exclusion de tailles [21] ici utilisée dans les buts de séparer des nanoparticules selon leurs rayons hydrodynamiques et de déterminer leurs tailles selon leurs temps de rétention [12]. En effet, avec la HDC, la séparation des particules dépend de leur coefficient de diffusion ( $D$ ) et non pas de leur nature chimique, de leur densité, de leur recouvrement ou de leur charge de surface (à noter que la densité et le recouvrement peuvent par contre, dans certains cas, avoir un certain effet sur le coefficient de diffusion) [19]. Des solutions aqueuses comprenant des sels et des surfactants sont typiquement utilisées en tant qu'éluant. La phase stationnaire est quant à elle constituée de sphères de polymère non-poreuses et non-enrobées [22]. Ce type de sphères réduit considérablement le risque qu'il y ait des interactions entre la phase stationnaire et les analytes [23].

La séparation est réalisée lors de l'éluion des nanoparticules dans le volume interstitiel entre les sphères de phase stationnaire [22]. Le volume interstitiel dans la colonne HDC peut être vu comme un réseau de canaux d'écoulement ou de capillaires dans lesquels les particules sont séparées grâce au gradient de vitesse de l'éluant s'y écoulant. En effet, comme représenté à la figure 1-1, dans chacun de ces canaux d'écoulement, l'éluant y présente un profil parabolique de vitesse.



**Figure 1.1** Gradient de vitesse de l'éluant s'écoulant entre les sphères de phase stationnaire [24]

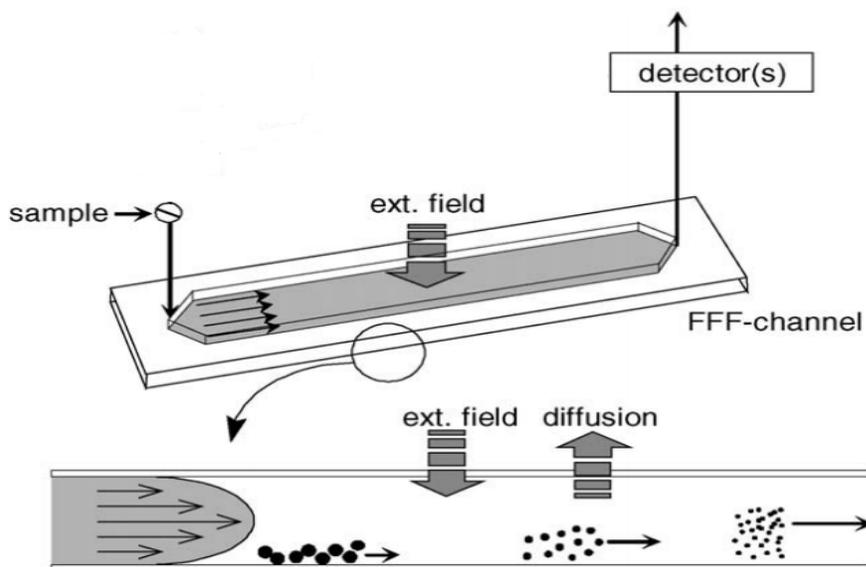
En effet, près de la surface des sphères de polymère et des parois de la colonne, le flux de l'éluant est plus faible que dans la région centrale de chacun des canaux d'écoulement. Les plus grosses particules éluent donc plus rapidement dans la colonne, car elles ne sont pas en mesure d'atteindre la surface des sphères de phase stationnaire et des parois de la colonne comme le peuvent les plus petites particules [21]. En conséquence, les plus grosses particules ont des temps de rétention plus faibles que les plus petites particules qui sont davantage retenues dans la colonne [19]. Dû au profil parabolique de vitesse de l'éluant impliqué dans le mécanisme de séparation, les courbes d'étalonnage obtenues en portant les temps de rétention en fonction de la taille des nanoparticules détectées ne sont pas linéaires [19]. Une relation linéaire peut être obtenue en portant les temps de rétention en fonction de la racine carrée des tailles des particules [12].

Dans le cas qui nous concerne, les principaux avantages de la HDC sont que les temps d'analyse sont rapides (environ 10-20 minutes), qu'un intervalle étendu de tailles de particules peut être séparé (nanoparticules de diamètres allant de 5 à 300 nm) et que la préparation des échantillons est simple, voir non nécessaire. En effet, la HDC est souvent suffisamment robuste pour ne pas requérir d'étapes de préparation d'échantillons, et ce même pour des échantillons environnementaux comme des eaux usées. Les possibles altérations dues aux manipulations sont ainsi minimisées [25]. Aussi, étant donné que la séparation ne dépend que de la taille des particules et non pas de leur densité, un seul type d'étalon en taille, comme des nAu par exemple, peut être utilisé en tant qu'étalon universel, peu importe la nature des nanoparticules à séparer et caractériser par la suite [19]. De plus, il a déjà été montré que la HDC est une technique performante pour les échantillons contenant des particules naturelles et une haute concentration de matière organique [25]. Par contre, certaines précautions doivent être prises. Par exemple, même si une large gamme d'éluants peut être utilisée, il est souvent difficile de reproduire exactement le milieu dans lequel se trouvent les nanoparticules, ce qui peut possiblement engendrer des altérations de l'état des NP (par exemple, de l'agglomération) ou des interactions avec l'éluant [23].

Une autre technique, soit le fractionnement par couplage flux force (FFF) est actuellement la technique la plus utilisée pour séparer des nanoparticules en milieu aqueux dû à sa haute versatilité [14]. La FFF peut être vue comme étant une combinaison de la chromatographie liquide et d'une méthode basée sur l'utilisation d'un champ comme la centrifugation, un champ électrique ou un deuxième flux [26]. Dans une colonne FFF, la séparation est réalisée seulement grâce à un mécanisme physique, car il n'y a aucune phase stationnaire dans le capillaire. Les particules sont séparées selon leurs coefficients de diffusion et donc, comme pour la HDC, selon leur rayon hydrodynamique/coefficient de diffusion [23].

Plus particulièrement, dans une colonne de FFF asymétrique (AF4, "*asymmetric flow field-flow fractionation*"), l'éluant présente un profil parabolique de vitesse, comme représenté à la figure 1.2. La séparation est effectuée dans un mince capillaire

dans lequel l'éluant est soumis à une force perpendiculaire (soit un deuxième flux, l'ext. field sur la Fig. 1-2) [27]. La distribution parabolique de vitesse de l'éluant et le champ appliqué perpendiculairement par rapport à l'axe de la colonne sont à la base de la séparation des NP [8]. Dans le cas de l'AF4, le champ perpendiculaire est créé par un flux transversal et la paroi inférieure d'accumulation de la colonne est une membrane semi-perméable placée sur une plaque de céramique poreuse qui permet au flux perpendiculaire de traverser la colonne [7].



**Figure 1.2** Profil de vitesse de l'éluant dans une colonne AF4 et élution des particules selon leur taille [28]

L'amplitude du champ perpendiculaire influence donc la vitesse d'élution des particules en les positionnant à des endroits différents dans le profil parabolique de vitesse de l'éluant selon leurs coefficients de diffusion [23]. En effet, dû au flux perpendiculaire, les particules sont accumulées sur la paroi inférieure de la colonne, mais lorsqu'elles diffusent, elles se dirigent vers le centre de la colonne; les plus petites particules ayant des coefficients de diffusion plus élevés que les plus grosses particules, elles sont davantage en mesure de contrer le champ perpendiculaire et de diffuser vers le centre de la colonne où le débit de l'éluant est plus élevé. Les plus petites nanoparticules voyagent donc plus rapidement et ont des temps de rétention plus faibles que les plus

grosses nanoparticules qui sont davantage retenues dans la colonne. Le temps de rétention d'une nanoparticule est inversement proportionnel à son coefficient de diffusion, c'est-à-dire qu'il est proportionnel à sa taille [21].

En tant que techniques chromatographiques, la HDC et l'AF4 sont donc de bonnes candidates pour ce qui est de la séparation de NP selon leurs tailles. Aussi, il est possible de coupler ces colonnes à un bon nombre de détecteurs dû au fait que ce ne sont pas des techniques qui occasionnent une perturbation de l'intégrité physique des analytes des échantillons injectés [21]. Même si l'utilisation de l'AF4 est présentement plus répandue, la HDC a été ici choisie comme technique de séparation. En effet, l'AF4 est limitée par les possibles artefacts découlant des interactions entre les substrats environnementaux et la membrane de la colonne, en plus des conséquences qui en découlent lors de l'interprétation des distributions de tailles obtenues [21, 29]. De plus, l'AF4 requiert davantage d'expertise technique, l'optimisation devant couvrir une multitude de paramètres expérimentaux comme la composition et le débit de l'éluant, le choix de la membrane et de ses propriétés de surface, les dimensions de la colonne et la nature et la force du champ perpendiculaire [30]. Aussi, certaines études [21, 25], ont confirmé que les principaux avantages de la HDC sont que, dû au fait que la colonne est remplie de sphères non-poreuses et non-enrobées, les potentielles interactions entre les NP et la phase stationnaire sont très limitées, le rendement de récupération des NP injectées est élevé et qu'il est possible de séparer les ions des NP (ce qui n'est pas possible avec la FFF). Par contre, la HDC présente souvent une faible résolution entre les pics chromatographiques. La résolution de la HDC n'est souvent pas suffisante pour séparer complètement des nanoparticules de tailles différentes comme des nAu de 30 et de 200 nm par exemple [3].

### **1.3.2. Diffusion de la lumière statique et dynamique**

Des détecteurs de diffusion de la lumière ont été combinés à la FFF ou à la HDC avec succès pour la détection et la caractérisation de NM [20, 27, 28, 31-33]. Effectivement, les détecteurs de diffusion dynamique (DLS) et statique (SLS) de la

lumière permettent de déterminer les rayons hydrodynamiques et de giration des particules détectées. Étant donné que les nanoparticules sont en suspension dans la phase mobile suite à leur séparation avec la HDC ou avec la FFF, en plus de la facilité d'interprétation des résultats obtenus avec ce type de détecteurs, ces appareils de diffusion de la lumière peuvent détecter les nanoparticules et donc nous renseigner sur l'efficacité de la séparation de la colonne.

Avec le SLS, la détermination de la taille des nanoparticules détectées repose sur la dépendance angulaire de la lumière diffusée. Effectivement, selon l'équation (1), la variation de l'intensité de la lumière diffusée ( $P(\theta)$ ) dépend entre autres de la taille des particules (de leur rayon de giration,  $R_g$ ) et de l'angle de détection de la lumière ( $\theta$ ) (les autres paramètres étant des constantes, soit la longueur d'onde du faisceau lumineux ( $\lambda_0$ , nm), le nombre Pi ( $\pi$ ) et l'indice de réfraction du milieu ( $n_0$ )).

$$P(\theta) = 1 - \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \langle R_g^2 \rangle \quad (1)$$

C'est donc le rayon de giration d'une particule qui est obtenu avec le SLS, ce rayon correspondant à la distance moyenne de chacun des éléments de masse de la particule par rapport à son centre de gravité [31]. Étant donné la longueur d'onde de 660 nm employée, une particule doit avoir un  $R_g$  d'environ 15 nm et plus pour anisotropiquement diffuser la lumière (i.e. diamètre plus grand qu'environ 1/20 de la longueur d'onde). En effet, lorsqu'irradiée, une particule génère des interférences constructives ou destructives selon l'angle d'observation [34], l'intensité de la lumière étant ici mesurée à 18 différents angles. En conséquent, le  $R_g$  des nanoparticules se trouvant dans l'éluant et traversant le détecteur à un instant précis peut être obtenu à partir de la dépendance angulaire de la lumière diffusée [35]. Si la forme de la particule est connue, alors le  $R_g$  peut être relié à la dimension de la particule détectée. Dans le cas présent, les nanoparticules sont considérées comme étant des sphères de densité uniforme, c'est-à-dire des sphères avec des rayons  $a$ , de façon à ce que :

$$R_g^2 = (3/5)a^2 \quad (2)$$

Par contre, la différence entre l'indice de réfraction de nanoparticules métalliques (comme les nAg et les nAu) et celui de leur éluant (solution aqueuse) est trop élevée pour que la dépendance angulaire de la lumière diffusée puisse être utilisée pour déterminer le  $R_g$  des particules détectées. Pour ce type de nanoparticules (et d'autres), leur rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) peut être obtenu à l'aide d'un détecteur DLS.

Avec un DLS, les tailles déterminées des nanoparticules détectées découlent de mesures indirectes de leurs coefficients de diffusion. Le rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) obtenu correspond au rayon d'une sphère ayant le même coefficient de diffusion que celui de la particule détectée par le DLS à cet instant, c'est-à-dire que le  $R_h$  dépend seulement de la taille physique de la particule et non pas de sa densité (valable en assimilant les particules à des sphères dures). Pour des particules en solution, l'intensité de la lumière diffusée à un angle fixe varie avec le temps selon l'amplitude du mouvement Brownien des particules [36]. Les changements d'intensité sont mesurés pendant une succession de courts laps de temps et il est alors possible de comparer l'intensité de la lumière diffusée à un temps zéro à celles de temps plus élevés. Les plus petites particules perdent la corrélation de leur fluctuation de diffusion de la lumière dans le temps plus rapidement que les plus grosses particules, c'est-à-dire que la plus grande diffusion des plus petites particules mène à une diminution plus rapide de leur fonction d'autocorrélation (qui peut être imagée comme une perte de mémoire plus rapide de leur position préalable) [34]. La diminution exponentielle de la fonction d'autocorrélation est utilisée pour déterminer le coefficient de diffusion des NP dans l'éluant traversant le détecteur [36]. En connaissant dorénavant le coefficient de diffusion des nanoparticules détectées, leur rayon hydrodynamique peut être déterminé à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein (3) :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (3)$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $T$  est la température absolue et  $\eta$  est la viscosité du solvant [37]. Par contre, certaines précautions doivent être prises pour minimiser les risques de diffusion multiple de la lumière, en analysant par exemple des solutions de faibles concentrations et en minimisant la longueur du trajet optique. En effet si, par

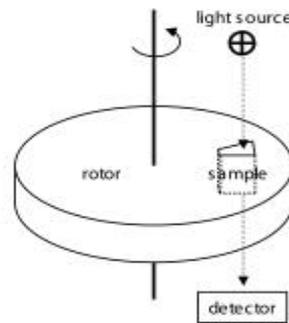
exemple, la solution est trop concentrée et qu'un photon est diffusé à plus d'une reprise avant d'être détecté, la fonction d'autocorrélation diminuera plus rapidement dans le temps versus si le photon n'avait été diffusé qu'une seule fois, ce qui a pour conséquence une sous-estimation de la taille des nanoparticules [37].

Les avantages de ces détecteurs de diffusion de la lumière sont que leur opération est simple et rapide et que l'échantillon est minimalement perturbé étant donné le peu de préparation que les analyses requièrent [34]. Par contre, ces détecteurs sont très sensibles à la présence de faibles concentrations de plus grandes particules, d'agrégats ou d'autres sources de contamination, car de plus grosses particules diffusent beaucoup plus de lumière que de plus petites particules (dans le domaine d'approximation de Rayleigh, i.e.  $d \ll \lambda$ , l'intensité de la lumière diffusée est proportionnelle au diamètre des particules à la puissance 6) [32]. La présence de grosses particules ou la formation d'agrégats ou d'agglomérats aura comme effet de déplacer la taille obtenue vers des valeurs plus élevées [38].

### **1.3.3. Ultracentrifugation analytique**

L'ultracentrifugation analytique (AUC) est une autre technique analytique qui peut être utilisée pour déterminer la distribution en tailles de nanoparticules via des mesures de vitesse de sédimentation [39]. Avec l'AUC, l'utilisation d'un champ gravitationnel force la sédimentation des particules en solution [40]. En effet, lorsqu'une solution est placée dans une ultracentrifugeuse, la rotation du rotor crée une accélération qui va pousser les particules à sédimenter jusqu'à ce qu'elles rencontrent une résistance en mesure d'arrêter leur mouvement. La vitesse de sédimentation d'une nanoparticule dépend de la force gravitationnelle à laquelle elle est soumise, de sa densité, de sa taille et de sa forme (la taille et la forme dictant la force de friction entre la nanoparticule et son milieu) [41]. Une nanoparticule donnée aura donc une vitesse de sédimentation qui lui est propre, la vitesse de sédimentation étant souvent exprimée sous forme de coefficient de sédimentation ( $s$ ) [39]. Plus une nanoparticule a une taille élevée ou plus elle est dense, plus son coefficient de sédimentation est élevé [42].

Comme représenté à la figure 1.3, un AUC contient un système optique servant à déterminer les gradients de concentrations des particules en balayant la cellule de l'échantillon en temps réel tout au long de l'analyse. Des détecteurs d'interférence, d'absorbance et de fluorescence peuvent être utilisés selon les propriétés des matériaux à analyser. Des séries de balayage, c'est-à-dire de mesures de la concentration de l'échantillon en fonction de la distance radiale, sont enregistrés à des intervalles réguliers pour déterminer les fluctuations du mouvement des particules détectées [43].



**Figure 1.3** Schéma du rotor et du système optique d'un AUC [44]

La distribution en tailles d'un mélange de nanoparticules est donc estimée en détectant les nanoparticules en fonction de leur distance par rapport à l'axe de rotation et par rapport au temps, les profils de concentrations en fonction du temps à une force centrifuge donnée permettant de déterminer leurs coefficients de sédimentation [40]. Les tailles déterminées à l'aide de l'AUC sont des diamètres de sédimentation ( $d_p$ ) obtenus à partir de coefficients de sédimentation et de la loi de Stokes (équation 4) qui prend en compte la densité des nanoparticules ( $\rho_p$ ), la densité du solvant ( $\rho_s$ ) et sa viscosité ( $\eta_s$ ) [39].

$$d_p = \sqrt{\frac{18 \eta_s s}{(\rho_p - \rho_s)}} \quad (4)$$

L'AUC est une technique de caractérisation très versatile. Grâce à l'utilisation d'une force centrifuge, les différentes espèces de nanoparticules d'un mélange complexe peuvent être distinguées, et ce jusqu'à une polydispersité initiale en tailles assez élevée. Par exemple, étant donné que la sédimentation dépend davantage de la taille des particules que la diffusion n'en dépend, la résolution de l'AUC est significativement plus élevée que celle d'un DLS [45]. En effet, la résolution de l'AUC est dans la gamme des Angströms [39]. De plus, étant donné qu'aucune phase stationnaire n'est requise comme c'est le cas pour les techniques chromatographiques, des interactions avec la phase stationnaire sont ici exclues [39]. Par contre, l'AUC requiert des temps de préparation d'échantillons et de mesures assez longs (quelques heures de préparation et quelques heures d'acquisition de données) [41].

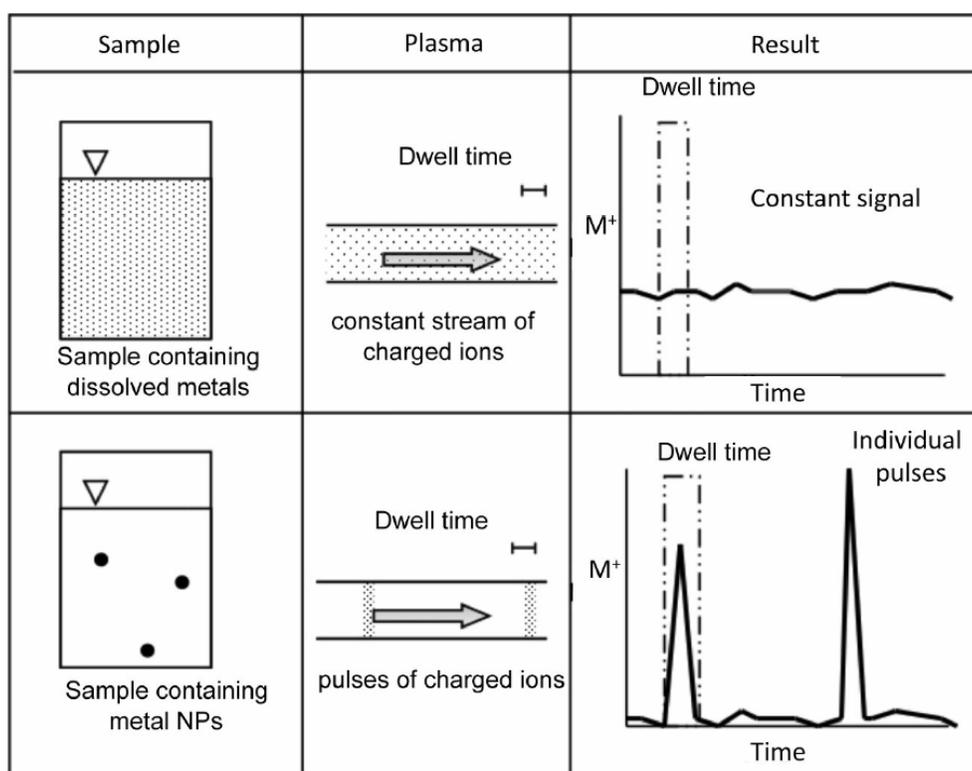
#### **1.3.4. Spectrométrie de masse par torche à plasma dans son mode particule unique**

Le mode “*single particle*” de l'ICPMS (SP-ICPMS) a été développé par Degueldre *et al.* [46, 47] pour la détection et la caractérisation de colloïdes métalliques et par Laborda *et al.* [48] pour différencier les ions des nanoparticules métalliques. Malgré le fait que le SP-ICPMS ait été employé pour la détection de colloïdes, de microparticules et de cellules, c'est définitivement la rapide croissance du taux d'utilisation des NM qui a fait en sorte que, dans les dernières années, le SP-ICPMS ait autant gagné en popularité [4].

Le SP-ICPMS s'appuie sur le même appareillage qu'un ICPMS conventionnel et prend donc avantage de la sélectivité de l'ICPMS découlant de sa capacité à identifier un métal selon son ratio masse sur charge. Avec un ICPMS, plusieurs lectures d'intensité sont intégrées sur un long laps de temps (environ 0.3 à 1 seconde) et à l'aide d'une courbe d'étalonnage, la moyenne de ces lectures donne accès à la concentration d'un métal d'un échantillon acidifié [17]. C'est ce qui distingue le SP-ICPMS de l'ICPMS, car contrairement à la méthode traditionnelle, en mode particule unique, des milliers de lectures d'intensité (de “*counts*”) sont acquisitionnées en fonction du temps, chacune des

lectures d'intensité du signal étant généralement acquisitionnée pendant un très court laps de temps d'entre 0.1 à 20 ms [49]. En effet, en analysant une solution de NP non acidifiée, au lieu de mesurer la concentration totale d'un élément, des lectures d'intensité en fonction du temps permettent d'individuellement détecter les NP atteignant le plasma [14]. La concentration et la taille des nanoparticules peuvent donc être dérivées des signaux acquisitionnés [16].

Étant donné que les ions dissous sont répartis de façon homogène dans les gouttes nébulisées, la détection de ces ions mène à un signal d'intensité constante dont l'amplitude est proportionnelle à leur concentration dans l'échantillon [49]. Lorsqu'une NP traverse le plasma et s'y fait atomisée et ionisée, étant donné qu'une NP contient une bonne quantité d'atomes métalliques, une plus grande quantité d'ions est soudainement formée par rapport au bruit de fond initial provenant des ions dissous uniformément présents dans la solution, comme représenté à la Figure 1.4.



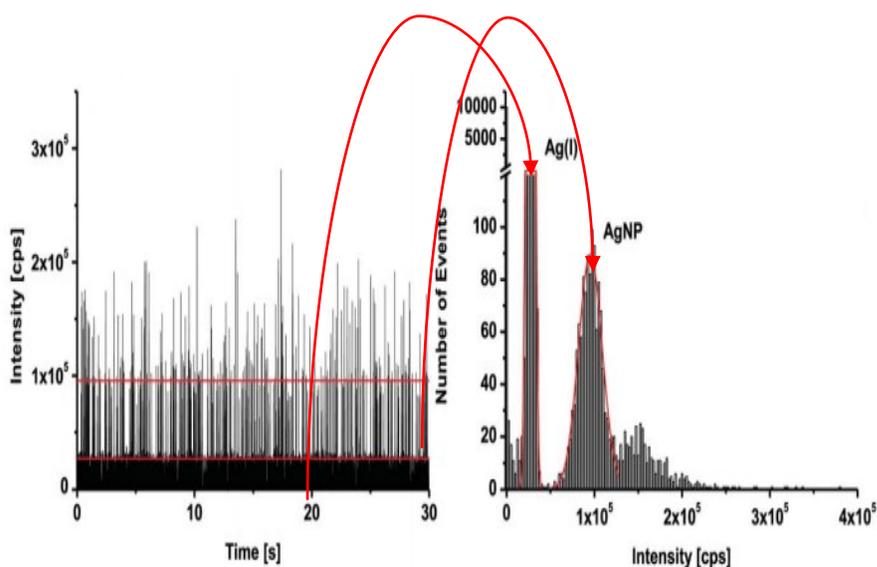
**Figure 1.4** Différents types de signaux observés en SP-ICPMS découlant de la détection d'ions dissous et de nanoparticules [50]

Chaque pulse d'ions provenant de l'atomisation d'une NP entre dans le spectromètre de masse pendant une période d'environ 0.5 ms. C'est donc pour individuellement capturer et enregistrer le signal correspondant à un seul pulse d'ions qu'il est nécessaire d'utiliser de très courts laps de temps d'acquisition. Souvent, des temps d'acquisition de 10 ms sont utilisés, car ce sont les plus courts laps de temps que la plupart des appareils ICPMS peut supporter. De plus, il a été démontré, que pour des nanoparticules d'or de 60 nm, qu'un temps d'acquisition de 10 ms permet de minimiser les possibilités de capture partielle d'un pulse tout en minimisant le risque de détecter plus d'une nanoparticule pendant un laps de temps [51]. En conséquence, chaque pulse d'ions provenant de l'atomisation et de l'ionisation d'une nanoparticule donne lieu à une augmentation momentanée du signal enregistré, l'intensité de ce pic étant proportionnel à la taille de la nanoparticule détectée. En effet, plus une nanoparticule est grosse, plus d'ions sont formés dans le plasma et donc plus l'intensité du signal sera élevée. Il est attendu que plus les laps d'acquisition sont courts, plus les chances qu'un pulse provienne de la détection de plus d'une nanoparticule sont faibles [3]. Deux paramètres expérimentaux requièrent donc une attention particulière : la solution doit présenter une concentration en nanoparticules suffisamment faible et les laps de temps d'acquisition (*dwel time*) doivent être suffisamment courts [4] pour qu'un maximum d'une seule nanoparticule soit détectée pendant cette période. Ceci est possible en injectant des échantillons suffisamment dilués, de façon à ce qu'une seule nanoparticule atteigne le détecteur pendant un laps de temps d'acquisition de signal. Une bonne optimisation des intervalles de temps d'acquisition utilisés doit aussi être réalisée dans le but de minimiser la détection de plus d'une NP dans un laps de temps d'acquisition (ce qui mène à une surestimation des tailles déterminées), mais en s'assurant aussi qu'assez de NP soient détectées pour obtenir une distribution fiable de leurs tailles (la solution ne doit donc pas être non plus trop diluée) [18].

Une limite correspondant à l'intensité du signal du bruit de fond additionnée de trois fois son écart-type ( $3\sigma$ ) est le plus souvent fixée pour discriminer les ions provenant de l'ionisation d'une nanoparticule des ions déjà libres en solution avant leur entrée dans le plasma [16]. La figure 1.5 peut servir d'exemple où les signaux correspondant aux ions

libres (signal d'intensité constante) et aux nanoparticules (pulses) sont clairement différenciables.

Par la suite, les données sont souvent rapportées sous la forme du nombre de pulses en fonction de leur intensité, créant ainsi un histogramme d'intensité (voir la Figure 1.5). Les ions dissous étant uniformément répartis dans la solution, leur détection mène à un signal de faible intensité constante dans le temps [17]. L'intensité de ce signal est proportionnelle à la concentration d'ions dissous et est donc soustraite de l'intensité des pulses, l'intensité de chacun des pulses étant alors proportionnelle à la taille des nanoparticules détectées [13].



**Figure 1.5** Construction d'un histogramme différenciant les signaux SP-ICPMS des ions dissous et des nanoparticules [50]

Somme toute, sous ces conditions, la fréquence des pulses est proportionnelle à la concentration en nombre de nanoparticules, tandis que l'intensité de chacun des pulses est proportionnelle à la taille de la nanoparticule détectée et que l'intensité du bruit de fond est proportionnelle à la concentration des ions dissous [4]. Il est ici à noter que le terme "ions dissous" réfère autant aux ions dissous ainsi qu'aux NP de petite taille, dont l'intensité du signal ne peut être différenciée de celle du bruit de fond [13].

Par contre, la conversion de la fréquence des pulses en terme de concentration de nanoparticules requiert premièrement que l'efficacité de nébulisation soit déterminée, c'est-à-dire que le pourcentage de nanoparticules détectées versus le nombre théorique de nanoparticules qui devrait être détecté par le spectromètre de masse soit déterminé en comparant la fréquence des pulses observées à celle théoriquement attendue. Ceci peut être réalisé à un débit fixe et à l'aide d'une solution de nanoparticules standard de taille, de concentration et de densité connues [14], le nombre de NP aspirées pouvant être ainsi calculé. Par la suite, le nombre de particules ayant bel et bien atteint le plasma est déterminé à partir de la fréquence des pulses, le ratio du nombre de particules nébulisées sur le nombre de particules aspirées donnant accès à l'efficacité de nébulisation [52].

Par la suite, l'utilisation d'une courbe d'étalonnage est de mise, c'est-à-dire une courbe portant l'intensité du signal en fonction de la concentration en ions métalliques de solutions d'ions libres standards. Les concentrations relatives d'ions et de NP dans un échantillon sont donc déterminées à l'aide de cette courbe d'étalonnage et de la distribution statistique d'intensités des pulses [49]. Cette courbe d'étalonnage est en effet aussi utilisée pour convertir l'intensité des pulses en terme de taille de nanoparticules, en assumant que celles-ci soient sphériques et en connaissant la densité du métal les formant [14]. Cette méthode de calcul repose sur le fait qu'une fois que les ions se trouvent dans le plasma, peu importe s'ils proviennent d'ions dissous ou de l'atomisation et l'ionisation de NP, ils se comportent de la même manière dans le spectromètre de masse (car ils possèdent le même ratio masse sur charge) [17]. Toutes les autres sources d'erreurs sont en effet comprises dans la courbe d'étalonnage [17], la concentration des ions dissous n'étant donc pas corrigé par le coefficient d'efficacité de nébulisation par exemple.

Aussi, il est attendu qu'une quantité non négligeable d'ions dissous de même nature que les NP soit présente dans les échantillons, ce qui veut donc dire que les échantillons doivent être dilués le plus possible pour tenter de minimiser l'intensité du bruit de fond provenant de la détection de ces ions dissous, d'où la nécessité de présenter de basse limite de détection en terme de concentrations en NP [15]. En effet, il est nécessaire que la concentration en ions dissous soit faible de façon à ce que le ratio des

intensités du signal d'une nanoparticule et du signal provenant de la détection d'ions (ratio signal sur bruit) soit assez élevé pour permettre la détection des pulses découlant de l'atomisation et l'ionisation de nanoparticules.

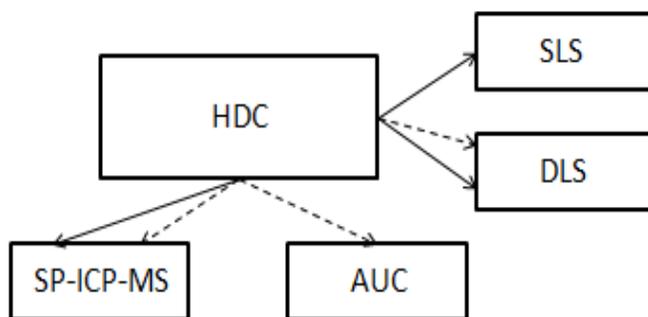
La limite de détection en termes de taille dépend grandement du ratio signal sur bruit de l'appareil utilisé, ce qui peut rapidement entraver la détection de plus petites nanoparticules. Étant donné que l'intensité d'un pulse dépend de la taille d'une NP, la différenciation entre deux nanoparticules de masses similaires repose sur la sensibilité de l'ICPMS. Aussi, c'est actuellement la capacité du SP-ICPMS à ségréger des NP de petites tailles des ions dissous qui fait plafonner la limite de détection à un diamètre d'environ 20 nm [14] pour les nAg. D'autres limites de la technique sont qu'il faut connaître la nature des NP à caractériser et qu'on prend pour acquis que les nanoparticules sont sphériques pour calculer leur taille [17]. Également, le SP-ICPMS ne permet pas de différencier des NP de particules auxquelles des ions dissous de même nature que les NP se sont adsorbés, ces deux espèces menant à l'observation de pulses dans les signaux récoltés.

En résumé, les deux particularités du SP-ICPMS versus le mode normal de l'ICPMS sont que les NP peuvent être intégralement caractérisées (détermination de leur distribution de taille et de leur concentration) et que les ions dissous peuvent être différenciés des NP de même nature [16, 19, 49, 53]. Les avantages d'utiliser un SP-ICPMS dans le but de caractériser des NP sont donc nombreux, pour ne nommer qu'il n'y a généralement pas d'étape de préparation d'échantillon requise, et ce même pour des échantillons complexes, qu'il procure une spécificité pour l'élément métallique d'intérêt et que les mesures sont rapides [12]. Par exemple, Mitrano *et al.* [14] ont démontré que la concentration de NM dans les eaux usées ("wastewater", WW) peut être obtenue via l'utilisation d'un SP-ICPMS. De plus, le SP-ICPMS ne requiert que peu de développement de méthode si un ICPMS est déjà utilisé au laboratoire [14]. Il présente aussi une haute sensibilité, c'est-à-dire ses basses limites de détection de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  en termes de concentration et de 20 nm de diamètre en termes de taille sont assez faibles versus d'autres appareils comme le DLS par exemple qui requiert quant à lui des

concentrations minimales de l'ordre du  $\text{mg L}^{-1}$  [15]. Le SP-ICPMS procure donc des résultats robustes pour des échantillons complexes et à de faibles concentrations en NP, ce qui en fait une des seules techniques appropriées à la détection de NP à des concentrations représentatives de la réalité environnementale qui sont de l'ordre du  $\mu\text{g L}^{-1}$  au  $\text{ng L}^{-1}$  [15].

### 1.3.5. Couplage avec la HDC

Étant donné qu'une colonne chromatographique peut facilement être connectée à une panoplie de puissants détecteurs, la HDC est une technique prometteuse en ce qui a trait à la détection et à la caractérisation de nanoparticules. En effet, étant donné que la rétention dans la colonne peut être modifiée par de variables facteurs, il est essentiel de déterminer non seulement la taille des NP détectées à partir de leurs temps de rétention, mais aussi à l'aide d'autres techniques de caractérisation indépendantes [28]. La HDC étant une technique non-destructive, les analytes sont disponibles pour des analyses subséquentes [23]. La figure 1.6 résume tous les couplages en ligne et hors ligne de détecteurs avec la colonne HDC qui ont été réalisés pendant cette étude.



**Figure 1.6** Illustration des couplages en ligne (flèche pleine) et hors ligne (flèche pointillée) de la HDC avec de multiples détecteurs

Il a été montré que l'utilisation de, par exemple, une technique chromatographique couplée avec un détecteur de diffusion de la lumière est plus robuste comparativement à la caractérisation directe des nanoparticules avec un DLS ou en se

basant uniquement sur les temps de rétention des nanoparticules dans la colonne [26]. En effet, la variation du  $R_g$  et du  $R_h$  en fonction du volume d'élution fournit des informations sur la polydispersité des particules détectées, informations que l'on ne peut obtenir seulement à partir de temps de rétention [20]. Par contre, dans le cas d'échantillons polydisperses, l'exactitude des détecteurs de diffusion de la lumière diminue drastiquement, d'où l'importance d'utiliser la HDC en amont [31]. En effet, un des avantages de la HDC couplée avec le DLS ou le SLS est sa capacité à séparer les contaminants de plus grandes tailles des nanoparticules, permettant ainsi une caractérisation spécifique des nanoparticules [20].

Malgré la faible résolution de la HDC, un niveau de résolution adéquat peut être obtenu en couplant la colonne HDC avec un SP-ICPMS, étant donné que des NP individuelles peuvent alors être détectées. Pergantis [3] a déjà démontré que l'utilisation préliminaire de la HDC permet d'augmenter la qualité des résultats obtenus avec un SP-ICPMS. Il peut donc être attendu qu'énormément d'avantages découlent du couplage de la HDC avec le SP-ICPMS. En effet, des résultats obtenus à l'aide d'un SP-ICPMS permettent de déterminer si l'efficacité de la séparation des NM via la colonne HDC a été assez élevée pour séparer les nanoparticules de même nature (nAg par exemple) mais non pas de même taille (de 40 nm et de 80 nm de diamètres par exemple). Même si l'élution dans la colonne HDC occasionne une dilution des NP, cela n'engendre que peu de problèmes lors de l'utilisation du SP-ICPMS étant donné que de faibles concentrations sont justement un prérequis au bon fonctionnement des analyses SP-ICPMS [14]. Finalement, la HDC permet de séparer les nanoparticules de grosses particules sur lesquelles des ions peuvent s'être adsorbés, le tout dans le but que les particules où des ions se sont adsorbés ne soient pas erronément identifiées comme des NP par le SP-ICPMS [17].

## **1.4. Sommaire**

Dans le but de caractériser des nanoparticules en matrice environnementale, des détecteurs doivent être utilisés en aval de la colonne HDC, la HDC permettant de séparer des nanoparticules selon leur taille et donc de gagner en résolution. Dans le cadre de cet objectif, le tableau I-1 relate les particularités de chacune des techniques analytiques utilisées dans le cadre de ce projet.

**Tableau I-1** Caractéristiques et gammes d'application des différentes techniques analytiques présentées [54, 55]

<b>Technique</b>	<b>Gamme de tailles</b>	<b>Caractéristiques</b>
FFF	2 nm – 2 µm	Séparation basée sur un mécanisme physique, particules séparées selon leur coefficient de diffusion. Bonne résolution et versatilité, doit être combinée à un détecteur pour obtenir des informations sur la taille et la concentration des particules, requiert une bonne expertise technique et interactions possibles entre les particules et la membrane.
HDC	5 nm – 2 µm	Technique de chromatographie liquide par exclusion de tailles, sépare les particules selon leur rayon hydrodynamique. Robuste, interactions entre les particules et la phase stationnaire très limitées, requiert un bon étalonnage pour déterminer la taille des particules selon leur temps de rétention.
SLS/DLS	0.7 nm – 7 µm	SLS : détermination de la taille selon la dépendance angulaire de la lumière diffusée, rayon de giration obtenu; DLS : détermination de la taille selon l'amplitude du mouvement Brownien des particules, rayon hydrodynamique obtenu. Interprétation facile, hautes concentrations requises ( $\approx \text{mg L}^{-1}$ ), excellents pour de petites distributions en tailles, biaisée par la présence de contaminants (surtout des agrégats ou des particules de taille élevée).
AUC	< 1 nm – 50 nm	Diamètre de sédimentation obtenu. Versatile, caractérisation de mélanges de haute polydispersité possible. Très faible limite de détection, dépend de la densité des particules. Long temps d'analyse, impossible de coupler ce détecteur à une colonne chromatographique et l'analyse des données peut être complexe.
ICPMS	–	Donne accès à la concentration totale d'un élément. Faible limite de détection en termes de concentration : de 1 ppt à 1 ppb (selon l'élément). Analyse d'échantillons complexes possible car haute sélectivité. Ne procure pas d'informations sur la taille et la concentration des nanoparticules.
SP-ICPMS	20 nm – 1 µm	Faible limites de détection : en taille, d'environ 20 nm selon le type de particules, et en concentration, de l'ordre du ppb. Seule technique qui procure la taille et la concentration des nanoparticules métalliques détectées. Analyse d'échantillons complexes possible car haute sélectivité. Peut être difficile de différencier le signal découlant de la présence d'ions dissous des signaux des plus petites nanoparticules et doit prendre pour acquis que les particules sont de formes sphériques.

L'AUC peut seulement être utilisée pour analyser des solutions étalons de nanoparticules, car il est impossible d'utiliser l'AUC en ligne avec la colonne HDC. De plus, les détecteurs de diffusion de la lumière peuvent seulement être utilisés pour des mélanges de nanoparticules et des matrices environnementales simples étant donné que les résultats obtenus par cette technique sont facilement biaisés par la présence de contaminants. Par contre, les nanoparticules non métalliques (nPS) doivent être caractérisées à l'aide du SLS et/ou DLS. L'ICPMS permet d'atteindre de faibles limites de détection, le tout dans des matrices complexes, mais son mode particule unique (SP-ICPMS) présente le grand avantage de fournir la concentration et la taille des nanoparticules détectées. Le but premier est donc de développer une méthode analytique couplant la colonne HDC à un détecteur de type SP-ICPMS.

## Chapitre 2. Développement et optimisation de la méthode analytique

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre a été obtenu lors d'expériences préliminaires réalisées dans les buts d'étudier le comportement des nanoparticules lors de leur élution et d'évaluer la performance de la colonne de chromatographie hydrodynamique et des détecteurs utilisés. Étant donné ces objectifs, les détecteurs de diffusion de la lumière ont été les plus utiles, car ce sont les détecteurs qui permettent d'obtenir des résultats le plus rapidement possible, en plus du fait que les résultats obtenus sont faciles à interpréter. Les caractéristiques des détecteurs utilisés pour développer la méthode analytique sont rapportées au tableau II-1.

**Tableau II-1** Détecteurs utilisés dans le cadre du développement et de l'optimisation préliminaire de la méthode

Détecteurs	Fournisseur, nom de l'appareil	Mode	Caractéristiques
DLS	Wyatt Technologies, Dawn Heleos II	En ligne	Longueur d'onde de 662 nm, angle de détection de 99°
SLS	Wyatt Technologies, Dawn Heleos II	En ligne	Longueur d'onde de 662 nm, 18 angles de détection
DLS	Wyatt Technologies, Mobius	Hors ligne	Longueur d'onde de 532 nm, angle de détection de 171.5°
AUC	Beckman Coulter, ProteomeLab XL-1	Hors ligne	Longueur d'onde de 655 nm, 100 à 150 balayages d'interférence, vitesse de centrifugation de 5 000 à 10 000 rpm à 20°C

### 2.1 Nanoparticules standards

Dans le but de s'assurer de la robustesse et de la reproductibilité de la technique analytique développée, des solutions de nanoparticules standards ont été analysées pour optimiser la méthode, pour construire des courbes d'étalonnage et en tant que contrôles (Tableau II-2).

**Tableau II-2** Nanoparticules utilisées en tant que standards

Nanoparticule	Fournisseur	Diamètre fourni par le manufacturier	Concentration de la solution mère	Concentration des solutions standards (mg L <sup>-1</sup> )	Information additionnelle
<b>nAu</b>	TedPella	20	50 mg L <sup>-1</sup>	50	Recouvrement d'acide tannique, eau Milli-Q comme solvant
	NanoComposix	40	20 mg L <sup>-1</sup>	20	Recouvrement de citrate, particules dans un tampon de 2mM de citrate de sodium
<b>nAg</b>	Sigma-Aldrich	40	20 mg L <sup>-1</sup>	20	Stabilisées au citrate
	Ted Pella	20	20 mg L <sup>-1</sup>	20	Recouvrement de citrate, solvant aqueux de 2mM de citrate
		40			
		60			
		80			
		100			
<b>Nanoparticules de polystyrène (nPS)</b>	FluoSpheres® Life Technologies™	24	2% solides	100	Fluorescence ( $\lambda_{ex}=505$ nm, $\lambda_{em}=515$ nm), recouvrement d'aldéhyde-sulfate, contient 2 mM d'azide de sodium.
	Bangs Laboratories Inc.	40	1% solides	100	Particules standards NIST (en taille)
		43		100	
		54		200	
		80		100	
		120		100	
		50	1% solides	100	Fluorescence confocale ( $\lambda_{ex}=525$ nm, $\lambda_{em}=565$ nm).

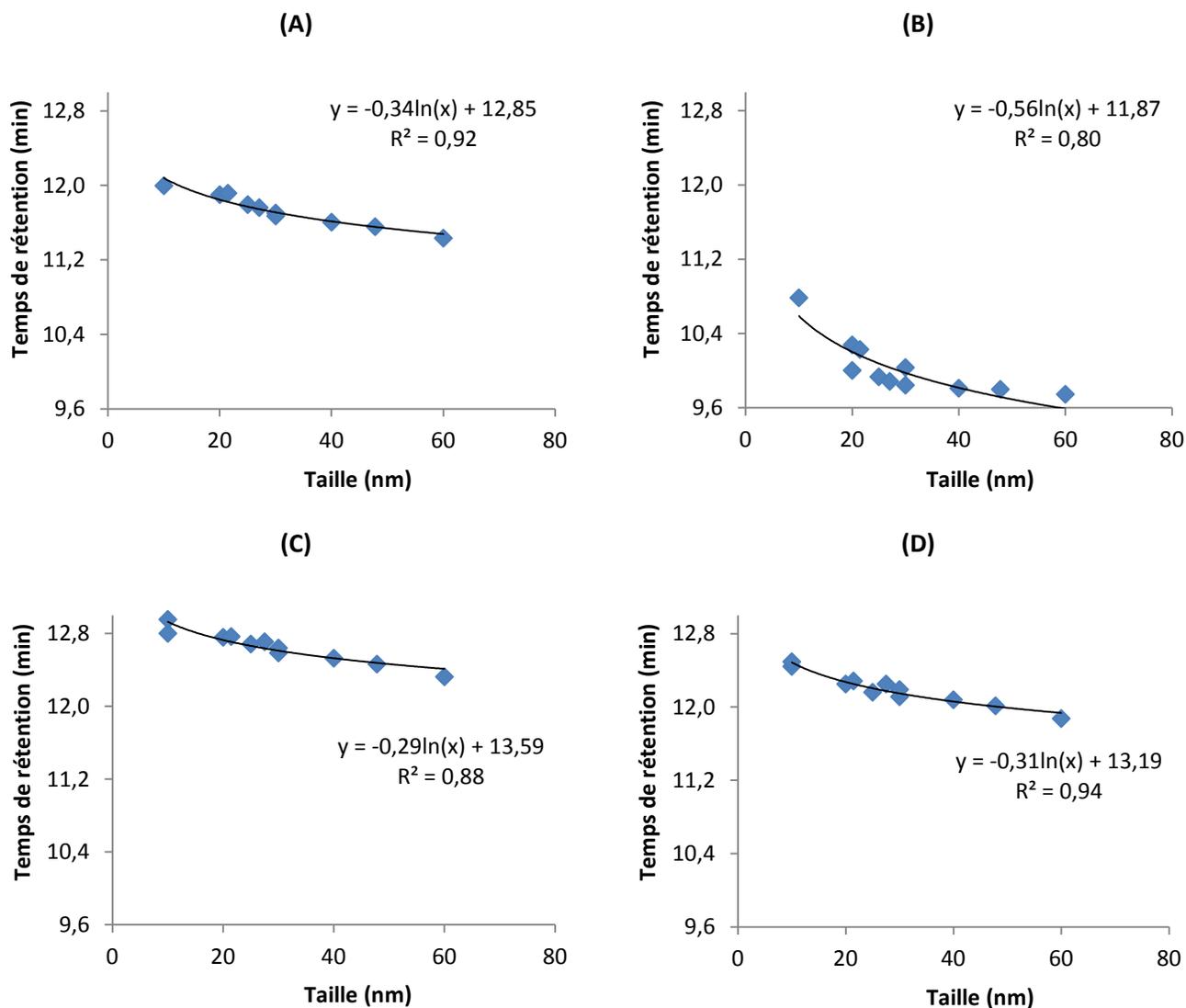
## 2.1 Propriétés de l'éluant

Il est aussi à noter que lorsque non spécifié, la phase mobile utilisée pour l'éluion dans la colonne HDC est une solution aqueuse de pH de 7.5 ( $\pm 0.2$ ) et de 0.1 mM de  $\text{NaNO}_3$ , le débit est de  $1.00 \text{ mL min}^{-1}$  et le volume injecté de l'échantillon est de  $20 \mu\text{L}$ . De plus, les chromatogrammes rapportés ont été obtenus en mesurant l'intensité de la lumière diffusée à un angle de  $99^\circ$  (DLS en ligne avec la colonne HDC).

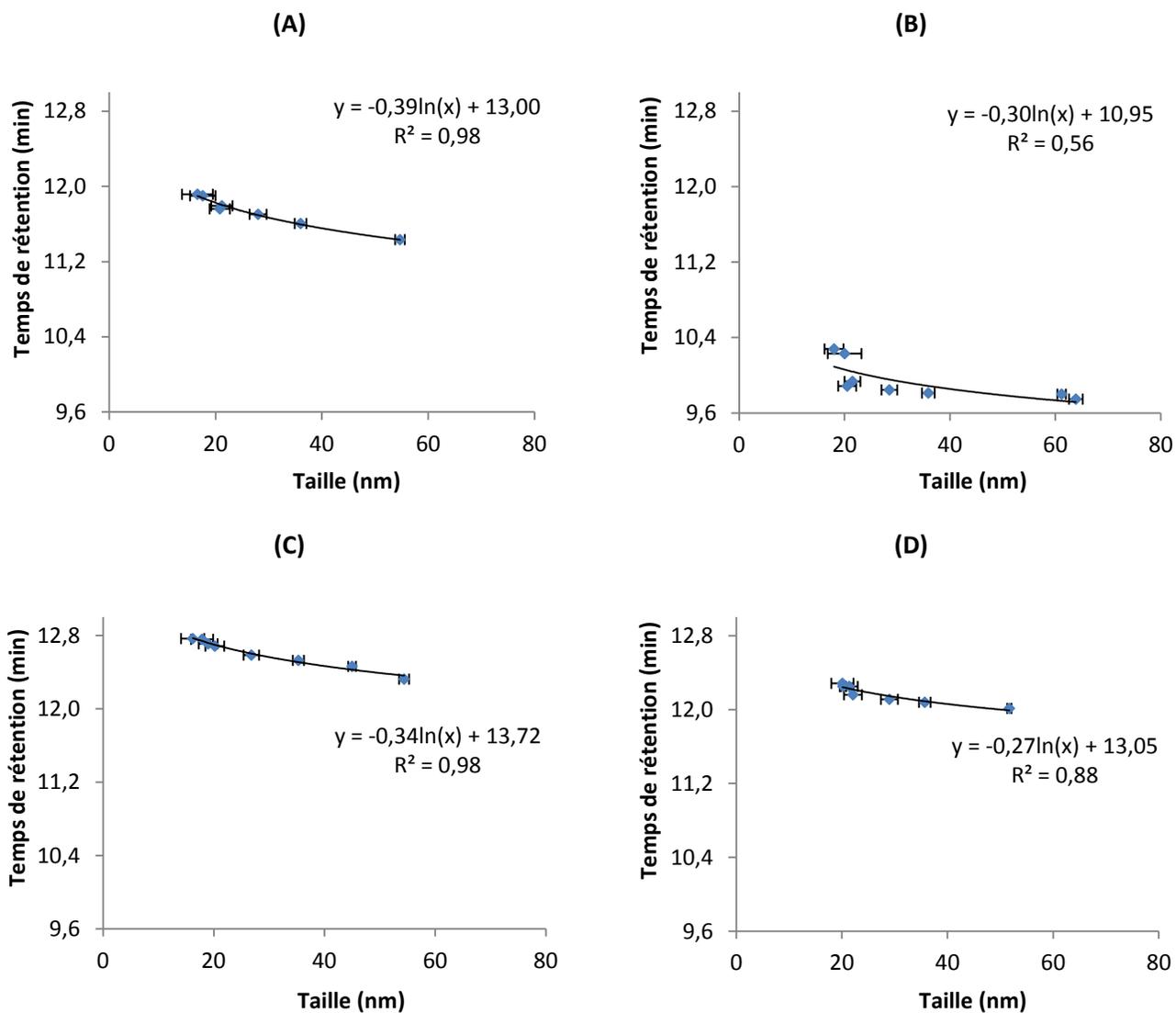
### 2.1.1 Influence du pH de l'éluant sur la caractérisation des nanoparticules

Tout d'abord, l'influence du pH de l'éluant sur l'éluion des nanoparticules dans la colonne HDC a été étudiée en construisant des courbes d'étalonnage, c'est-à-dire en portant en graphique les temps de rétention des nanoparticules en fonction de leurs tailles, et ce à quatre différents pH. Pour ce faire, des nanoparticules standards ont été individuellement injectées dans la colonne HDC à des concentrations rapportées dans le tableau II-2.

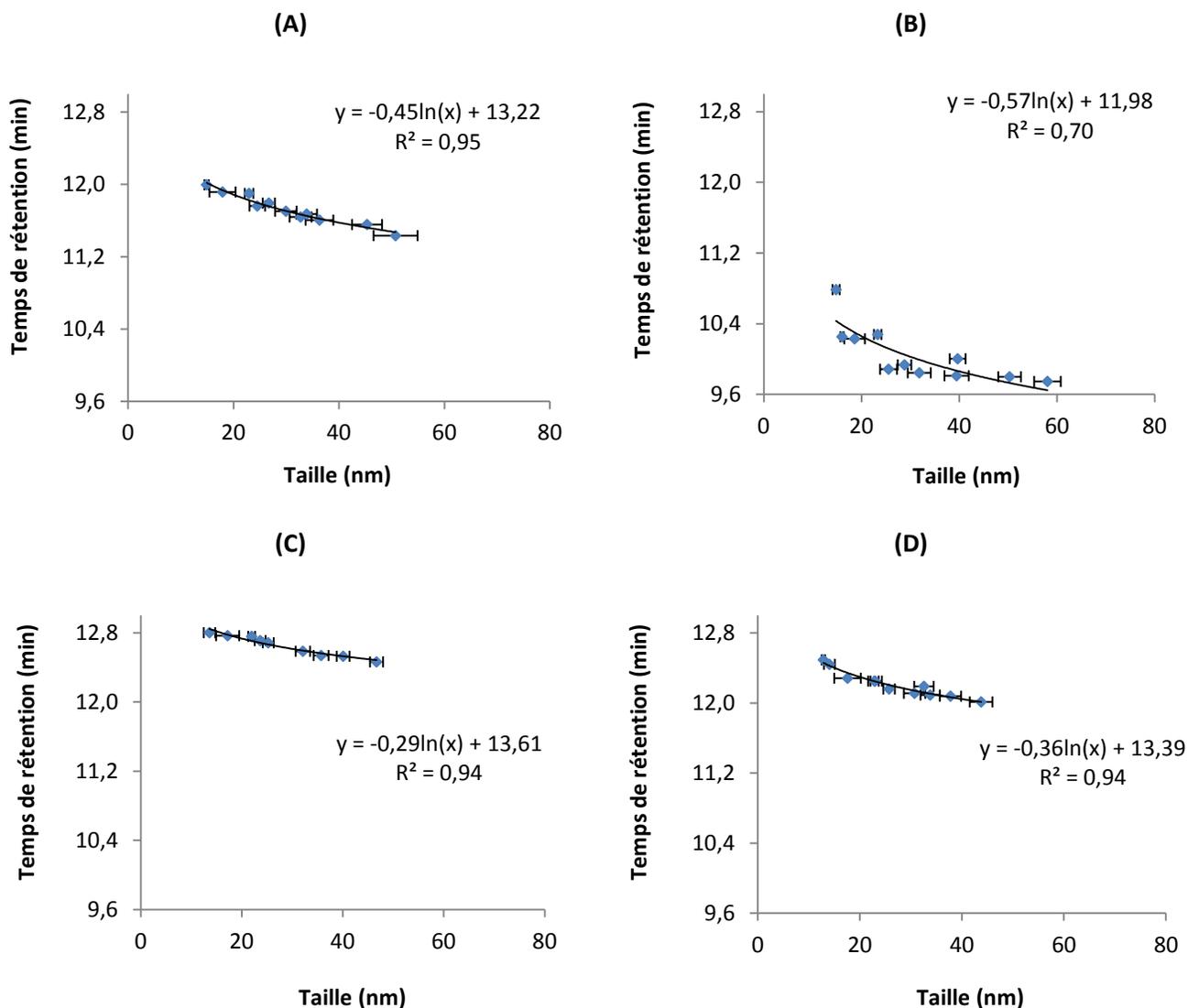
Dans chacun des cas, le type de courbe de tendance adopté est celui qui est prédit par la théorie, soit une fonction logarithmique [19]. Les figures 2.1 à 2.3 rapportent donc respectivement les temps de rétention des nanoparticules standards en fonction des rayons fournis par les fabricants, des rayons de giration obtenus avec le SLS en ligne et des rayons hydrodynamiques obtenus avec le DLS en ligne. À noter que l'éluant utilisé ne contient aucun tensioactif.



**Figure 2.1** Temps de rétention en fonction des rayons fournis par les fabricants de nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC à des pH de l'éluant de (A) 6.7, (B) 7.1, (C) 7.4, (D) 7.7.



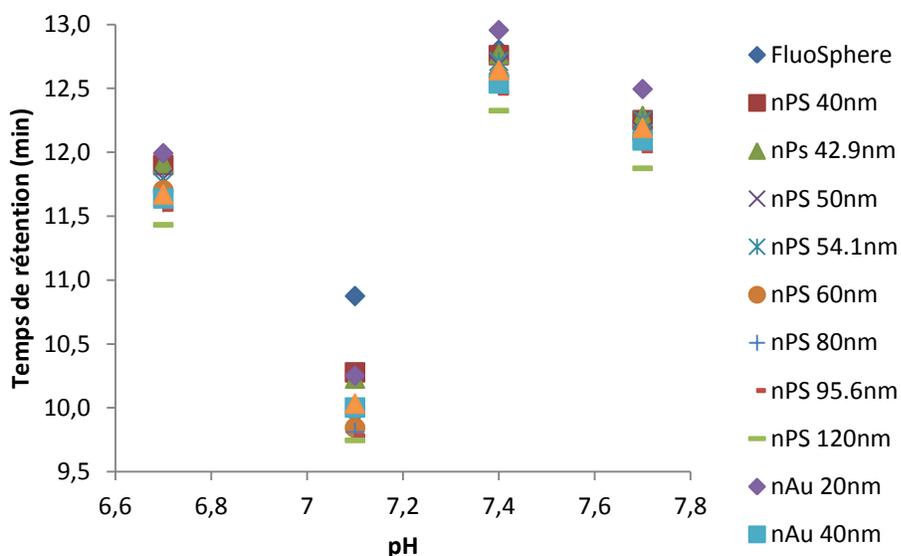
**Figure 2.2** Temps de rétention en fonction des rayons de giration de nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC à des pH de l'éluant de (A) 6.7, (B) 7.1, (C) 7.4, (D) 7.7.



**Figure 2.3** Temps de rétention en fonction des rayons hydrodynamiques de nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC à des pH de l'éluant de (A) 6.7, (B) 7.1, (C) 7.4, (D) 7.7.

Somme toute, dans tous les cas (courbes d'étalonnage autant basées sur les rayons du fournisseur que sur les rayons de giration ou sur les rayons hydrodynamiques), la variation du pH de l'éluant ne semble pas engendrer d'effet considérable sur l'allure des courbes d'étalonnage, cette absence de corrélation étant attendue (étant donné que le pH n'a pas d'influence sur la taille obtenue des nanoparticules dans cette plage de pH, voir les figures 2.5 et 2.6 présentées plus bas). En effet, en comparant l'ensemble des courbes obtenues, il est observé que leur allure est semblable. Il est prédit par la théorie [19, 21]

que les relations entre les temps de rétention et les tailles des nanoparticules ayant élué dans une colonne HDC ne soient pas linéaires dû au profil parabolique de l'éluant s'y écoulant (figure 1.1). Par contre, dans cette plage de pH, il est conclu qu'une variation du pH entraîne aussi une variation des temps de rétention des nanoparticules, sans toutefois qu'une tendance claire puisse être dénotée, comme illustré à la figure 2.4. Ces résultats n'étant que des résultats préliminaires, les courbes d'étalonnage qui ont été utilisées pour déterminer la taille de nanoparticules à partir de leur temps de rétention sont rapportées aux sections 3.3.3 et 3.5.3.



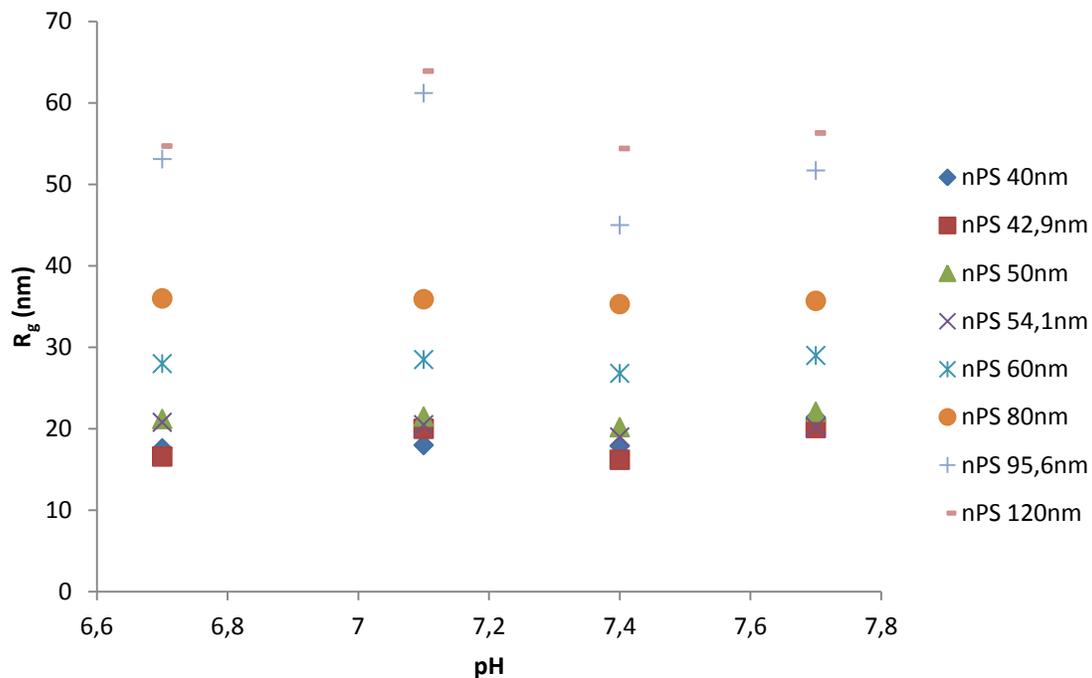
**Figure 2.4** Temps de rétention de nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC en fonction du pH de l'éluant, pour des pH de (A) 6.7, (B) 7.1, (C) 7.4, (D) 7.7.

Étant donné que les temps de rétention d'une nanoparticule varient selon le pH de l'éluant sans toutefois qu'une tendance claire (linéaire, polynomiale, logarithmique ou autre) ne soit perceptible, il a été supposé que la variation des temps de rétention des nanoparticules découlait plutôt de la journée d'utilisation de la colonne HDC, chacune des séries de mesures pour un pH donné ayant été réalisée à une différente journée. Il a donc été présumé que la variation des temps de rétention ne dépend pas du pH de l'éluant utilisé, mais plutôt de la variation intrinsèque du mécanisme de séparation ayant lieu dans

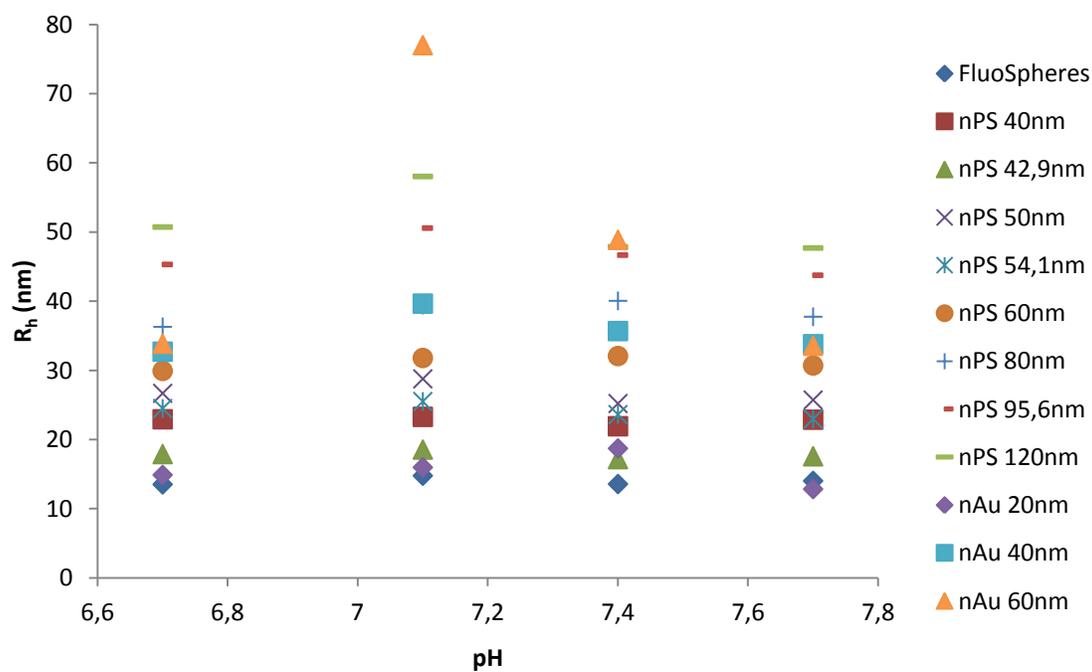
la colonne HDC selon sa journée d'utilisation. En effet, pour chaque série d'analyses réalisées dans une même journée et pour un pH donné, la colonne HDC sépare bel et bien les NP selon leurs tailles.

À la lumière de ces résultats, pour minimiser les impacts de cette variation des temps de rétention selon la journée d'utilisation de la colonne HDC, il a été décidé de faire continuellement passer une solution aqueuse (de même composition que l'éluant, en y ajoutant de l'azure de sodium,  $\text{NaN}_3$ , à une concentration de 0.02% m/m) dans la colonne, à un débit de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , lorsque celle-ci n'est pas utilisée. Il a été démontré que cette mesure a par la suite permis d'obtenir des résultats reproductibles dans le temps (se référer à la section 3.3.4). Par contre, ces variations des temps de rétention en fonction de la journée d'utilisation de la colonne HDC suggèrent que les tailles des nanoparticules ne doivent pas être seulement déterminées à l'aide de courbes d'étalonnage et de leurs temps de rétention, des techniques indépendantes devant être utilisées dans le but de réaliser une caractérisation fiable des nanoparticules.

C'est donc dans cette optique que l'impact du pH de l'éluant sur les rayons de giration et hydrodynamiques déterminés a été étudié, tel que rapporté dans les figures 2.5 et 2.6, de façon à évaluer l'influence des propriétés de l'éluant sur les mesures obtenues avec des appareils de caractérisation indépendants dans lesquels l'éluant s'écoule à un débit de  $1,00 \text{ mL min}^{-1}$  suite à son passage dans la colonne HDC.

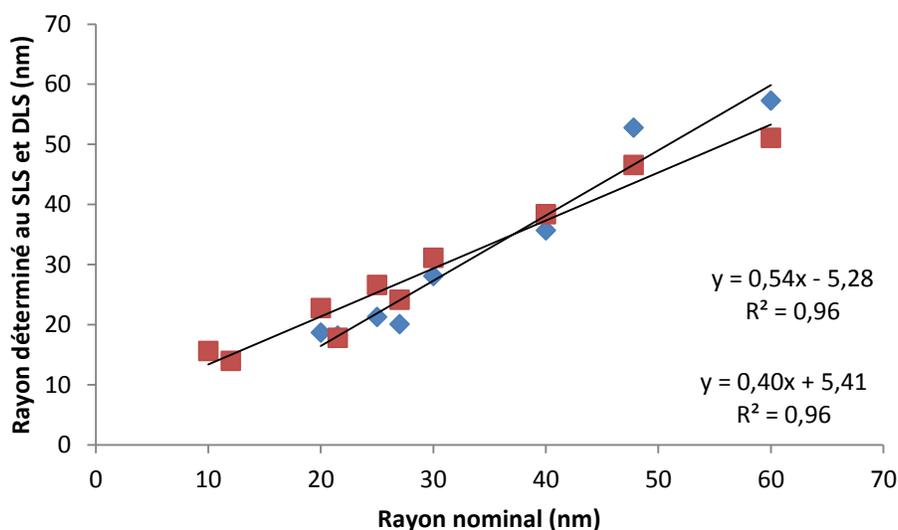


**Figure 2.5** Rayons de giration de nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC en fonction du pH de l'éluant.



**Figure 2.6** Rayons hydrodynamiques de nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC en fonction du pH de l'éluant.

Dans ces cas-ci, le pH de l'éluant ne semble pas avoir d'influence sur l'exactitude des rayons déterminés à l'aide de détecteurs de diffusion de la lumière, les variations observées dans les  $R_g$  et  $R_h$  déterminés étant majoritairement minimales ou sans tendance perceptible en fonction du pH. Ces résultats confirment donc que des détecteurs utilisés en aval de la colonne HDC sont davantage fiables en ce qui a trait à la détermination de la taille des nanoparticules versus l'utilisation des temps de rétention et d'une courbe d'étalonnage. Par contre, tel que démontré à la figure 2.7, les rayons de giration et hydrodynamiques déterminés montrent une bonne corrélation linéaire avec les rayons nominaux.



**Figure 2.7** Rayons de giration (en rouge) et hydrodynamiques (en bleu) de nanoparticules standards individuellement injectées dans la colonne HDC en fonction de leur rayon nominal

### 2.1.2 Influence de la force ionique de l'éluant sur la stabilité des nanoparticules

Jusqu'à présent, un simple éluant, sans surfactant, de concentration de 0.1 mM de  $\text{NaNO}_3$  avait été utilisé. Dans le but de déterminer si les nanoparticules sont stables lorsqu'un éluant de plus haute force ionique est utilisé, la concentration en  $\text{NaNO}_3$  a été augmentée et la détection de certaines nanoparticules standards a été testée.

**Tableau II-3** Stabilité des nanoparticules standards selon la force ionique de l'éluant. NS : instable, aucun pic discernable avec le DLS en ligne; SLD : sous la limite de détection, ratio signal sur bruit trop faible.

Éluant Concentration NaNO <sub>3</sub> (mM)	pH	Nature	Nanoparticules		
			Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Diamètre (nm)	R <sub>h</sub> (nm)
1	5.5	FluoSphères	100	24	NS
		nPS	100	80	NS
	7.6	FluoSphères	100	24	NS
		nPS	100	80	NS
		nAg	20	20	NS
				40	NS
60	NS				
80	NS				
0.1	7.6	FluoSphères	100	24	27 ± 2
		nPS	100	80	79 ± 3
		nAg	20	20	NS
				40	SDL
				60	SDL
80	NS				

Des analyses rapportées au Tableau II-3, il peut être conclu que les FluoSphères et les nPS ne sont pas stables lorsqu'elles sont injectées dans la colonne HDC où un éluant de plus haute force ionique est utilisé, soit à une concentration de 1 mM de NaNO<sub>3</sub>. En effet, les courbes d'étalonnage de la section 2.1.1 ayant été construites à partir de données expérimentales où le même éluant était utilisé mais à une concentration de 0.1 mM de NaNO<sub>3</sub>, il peut être conclu qu'étant donné que seule la force ionique a été ici modifiée, c'est donc l'augmentation de la concentration de NaNO<sub>3</sub> qui a engendré l'instabilité des nPS et des FluoSphères. Par contre, les nAg sont assez stables dans l'éluant de plus faible force ionique (soit de concentration de 0.1 mM de NaNO<sub>3</sub>) pour y être caractérisées, le ratio signal sur bruit étant trop faible ou les nAg y étant carrément instables. À la lumière de ces derniers résultats, il a été décidé que des tensioactifs seraient ajoutés à la composition de base de l'éluant, question de favoriser une stabilité maximale des nanoparticules injectées, peu importe leur nature chimique. La section 3.5.1 présente la méthode expérimentale qui a été utilisée pour optimiser les concentrations de Triton X-100 (tensioactif non-ionique) et de dodécylsulfate de sodium (SDS, tensioactif ionique) dorénavant toujours ajoutées à l'éluant à des concentrations de 0.0013% m/m.

## 2.2 Éluion des nanoparticules selon leur nature chimique

Dans le but de vérifier si, comme la théorie le prédit, l'éluion des nanoparticules dans la colonne HDC ne dépend que de leurs tailles et non pas de leur densité ou de leur nature chimique, des injections individuelles dans la colonne HDC de deux solutions standards de nAu et de nPS de même taille (soit de 30 nm de rayon) ont été réalisées, à un débit de 1.5 mL min<sup>-1</sup>.

**Tableau II-4** Caractérisation de nanoparticules standards de même taille suite à leur éluion individuelle dans la colonne HDC

NP	Rayon (nm)	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	R <sub>g</sub> (nm)	R <sub>h</sub> (nm)	Temps de rétention (min)
nAu	30	50	-	29 ± 2	8.78
nPS	30	50	28 ± 2	33.1 ± 0.8	8.47

À l'aide des résultats du tableau II-4, il est par contre difficile d'évaluer si les nanoparticules présentent ou non des interactions avec la colonne et si oui, si elles ont des différentes interactions avec la colonne selon leur nature. En effet, pour une même taille, le temps de rétention des nPS est plus faible que celui des nAu, mais cela concorde avec le fait qu'il a été déterminé qu'il est possible que les nPS soient légèrement plus grandes que la valeur de 30 nm de rayon fournie par le fabricant, versus les nAu qui sont possiblement légèrement plus petites que la valeur de 30 nm fournie. Compte tenu de ces résultats cohérents et étant donné la proximité des temps de rétention obtenus dans les deux cas, il a été conclu que s'il y a des interactions différentes avec la colonne selon la nature chimique des nanoparticules, que celles-ci ne sont pas d'une amplitude assez élevée pour biaiser les résultats expérimentaux.

## 2.3 Comparaison des limites de détection des détecteurs en ligne et hors ligne

Par la suite, les limites de détection en termes de concentrations de la technique ont été estimées. Un DLS a été utilisé en ligne, soit en étant directement couplé à la

colonne HDC, et en mode hors ligne, c'est-à-dire en n'étant pas couplé à la colonne, tandis qu'un deuxième DLS a été utilisé seulement hors ligne (son système de cuvette ne permettant pas de l'utiliser en ligne). Des nAg de deux différents fournisseurs ont donc été analysées à des fins de comparaison, les résultats étant présentés au tableau II-5.

**Tableau II-5** Caractérisation de nAg standards à l'aide de détecteurs DLS couplés ou non couplés à la colonne HDC

Détecteur	nAg Sigma		nAg NanoComposix	
	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	R <sub>h</sub> (nm)	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	R <sub>h</sub> (nm)
DLS (Heleos II) En ligne	20	21.2 ± 0.7	20	19.1 ± 0.8
DLS (Heleos II) Hors ligne	2	22 ± 4	2	20 ± 4
DLS (Mobius) Hors ligne	2	22.2 ± 0.4	2	22.9 ± 0.2

Dans tous les cas, les rayons déterminés correspondent à la taille des nAg fournie par les fabricants (de 20 nm de rayon). Par contre, avec le DLS en ligne, les solutions doivent être dix fois plus concentrées pour obtenir le même niveau de précision, les écarts-types sur les R<sub>h</sub> obtenus étant beaucoup plus élevés pour une concentration de 2 mg L<sup>-1</sup> de nAg versus pour une concentration de 20 mg L<sup>-1</sup>. Cette nécessité d'utiliser une concentration initiale plus élevée est assurément due à la dilution des nanoparticules lors de leur passage dans la colonne HDC. Il est aussi à noter que le DLS Mobius (longueur d'onde du laser de 532 nm, angle de détection de 171.5°) est l'appareil permettant d'obtenir la plus petite erreur sur les tailles déterminées.

## 2.4 HDC couplée aux détecteurs SLS et DLS en ligne

### 2.4.1 Influence de la taille des nanoparticules sur les limites de détection

Dans le but d'estimer l'influence de la taille des nanoparticules sur les concentrations minimales des solutions à analyser avec le système HDC-DLS en ligne, des solutions de nAu de différentes tailles ont été analysées, chaque solution présentant une concentration de 50 mg L<sup>-1</sup> en nAu. Comme rapporté dans le tableau II-6,

l'exactitude des rayons hydrodynamiques obtenus varie en fonction du volume injecté de nAu, c'est-à-dire en fonction du nombre des nAu injectées.

**Tableau II-6** Exactitude des rayons hydrodynamiques obtenus en fonction de la taille des nAu et du volume injecté

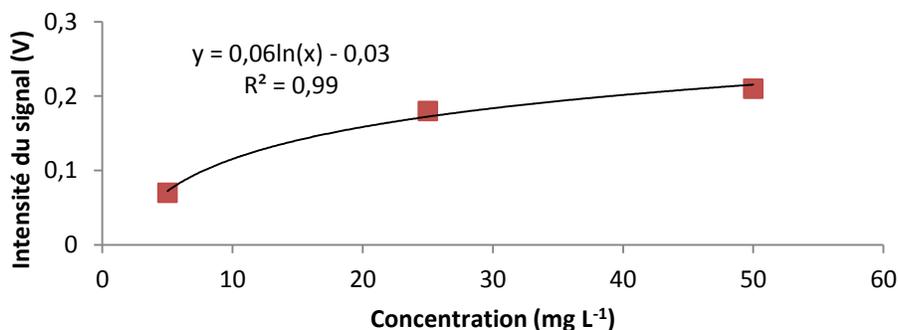
<b>nAu Rayon (nm)</b>	<b>HDC Volume injecté (<math>\mu</math>L)</b>	<b>DLS <math>R_h</math> (nm)</b>
5	100	-
10	100	$43 \pm 2$
20	100	$19.3 \pm 0.9$
	20	$29.8 \pm 0.6$
30	100	$29 \pm 2$
	20	$54 \pm 2$

L'indice de réfraction de l'or étant trop différent de celui de l'eau, la dépendance angulaire de la lumière diffusée n'est pas assez prononcée pour que le SLS puisse être utilisé pour déterminer le  $R_g$  des nAu. En conséquent, seulement les  $R_h$  obtenus sont rapportés dans le tableau II-6. Les nAu de 5 nm de rayon sont trop petites pour être détectées par le DLS, aucun pic chromatographique n'étant observable suite à leur injection, et ce même pour un volume injecté élevé de 100  $\mu$ L. De plus, pour ce qui est des nAu de 10 nm de rayon, même en injectant un volume de 100  $\mu$ L, le  $R_h$  obtenu ne correspond pas à la taille attendue, la concentration n'étant donc ici pas assez élevée et les nanoparticules étant trop petites pour que la fonction d'autocorrélation obtenue ne soit assez précise. En effet, lors de l'acquisition des données, la fonction d'autocorrélation de ces nAu démontrait clairement que la solution est polydisperse ou que le signal est d'une intensité trop faible pour être analysé.

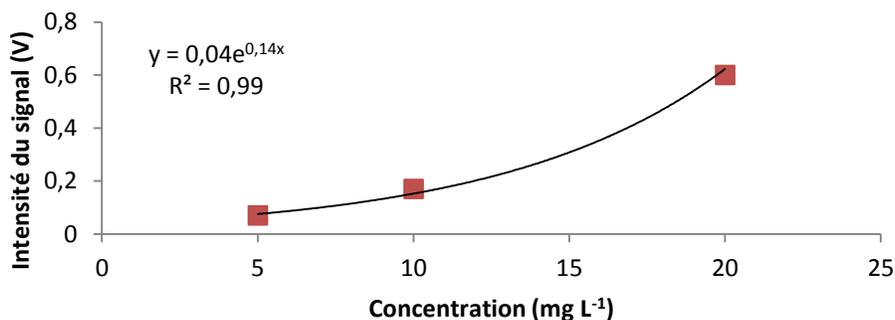
Pour ce qui est des autres nAu, il peut être observé, qu'en général, pour une même concentration (soit de 50 mg L<sup>-1</sup>), un plus grand volume injecté (soit 100  $\mu$ L versus 20  $\mu$ L) permet d'obtenir des résultats plus exacts, c'est-à-dire davantage comparable aux tailles fournies par le fabricant. C'est donc dire que plus les nanoparticules sont petites, plus on gagne à utiliser une concentration élevée, la limite de détection augmentant en diminuant la taille des nanoparticules à détecter.

### 2.4.2 Variation du ratio signal sur bruit selon la concentration des nanoparticules

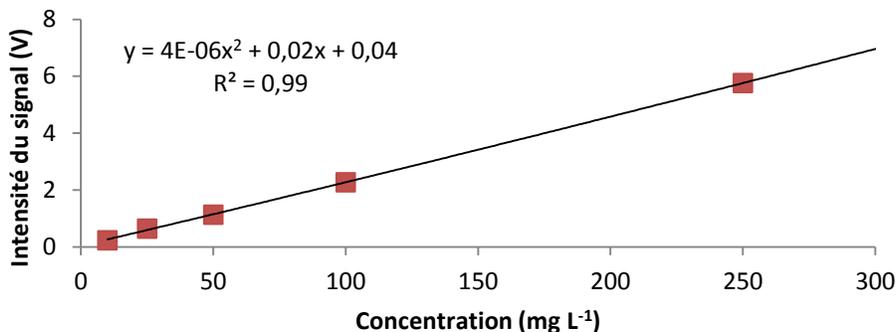
La variation de l'intensité du signal du détecteur DLS selon la concentration en nanoparticules injectée dans une colonne HDC a été étudiée en analysant plusieurs solutions de différentes nanoparticules à des concentrations croissantes. La figure 2.8 rapporte une relation logarithmique entre l'intensité du signal et la concentration en nAu des solutions analysées, tandis que la figure 2.9 présente une relation exponentielle pour des échantillons de nAg standards et que la figure 2.10 rapporte une relation linéaire pour des nPS.



**Figure 2.8** Intensité du signal observé au DLS en ligne en fonction de la concentration de nAu de 20 nm de diamètre



**Figure 2.9** Intensité du signal observé au DLS en ligne en fonction de la concentration de nAg de 40 nm de diamètre



**Figure 2.10** Intensité du signal observé au DLS en ligne en fonction de la concentration de nPS de 80 nm de diamètre

Malgré que des conclusions catégoriques ne puissent être tirées à partir de ces résultats étant donné le faible nombre d'analyses effectuées (spécialement dans les cas des figures 2.8 et 2.9), il peut être présumé que les variations de l'intensité du signal en fonction de la concentration en nanoparticules n'ont pas les mêmes tendances selon la nature des nanoparticules détectées. Ces résultats peuvent être expliqués en considérant les nombreux facteurs qui influencent l'intensité de la lumière diffusée. En effet, l'intensité du signal dépend non seulement de la concentration en nanoparticules de la solution analysée (une concentration plus élevée mène à davantage de diffusion), mais aussi de la taille des nanoparticules (plus une nanoparticule est grosse, plus de lumière est diffusée) et de la nature des nanoparticules (les métaux étant connus pour davantage diffuser la lumière que le polystyrène par exemple). De plus, à de plus hautes concentrations, les nanoparticules sont susceptibles de s'agglomérer. Étant donné que l'amplitude de la diffusion de la lumière dépend de ces nombreux facteurs, aucune tendance générale n'a pu être décelée entre l'intensité du signal détecté et la concentration en nanoparticules des échantillons.

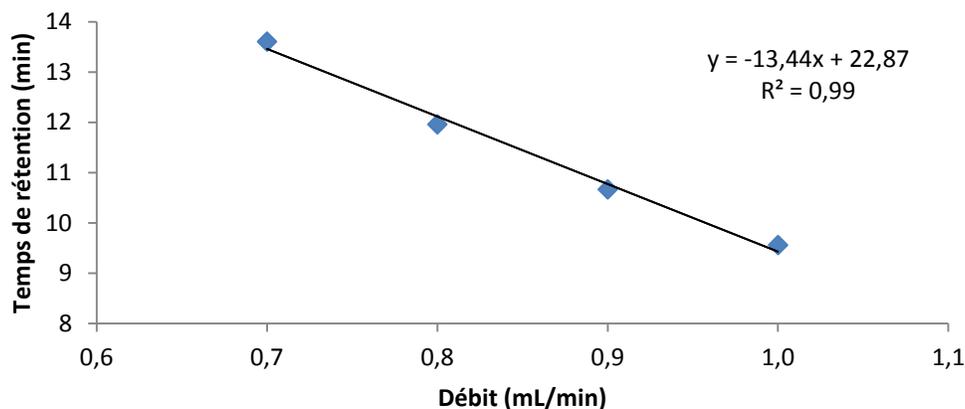
#### 2.4.3 Influence du débit sur les résultats expérimentaux

Par la suite, l'influence du débit de l'éluant sur l'exactitude des rayons de giration et hydrodynamiques obtenues a été évaluée, tel que rapporté dans le tableau II-7.

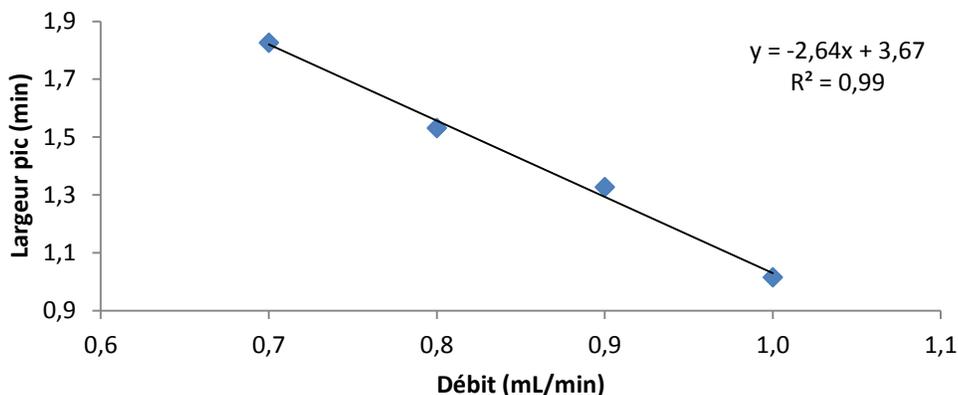
**Tableau II-7** Exactitude des rayons de giration et hydrodynamiques en fonction du débit de l'éluant utilisé

Nanoparticules	Rayon (nm)	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Débit (mL min <sup>-1</sup> )	R <sub>g</sub> (nm)	R <sub>h</sub> (nm)
FluoSphères	10	250	1.00	17 ± 3	16.5 ± 0.5
			0.90	16 ± 3	16.3 ± 0.5
			0.80	17 ± 3	16.4 ± 0.5
			0.70	17 ± 3	16.8 ± 0.5
nPS	40	100	1.00	35 ± 1	42.0 ± 0.9
			0.90	36 ± 0.6	37 ± 3
			0.80	37 ± 1	38 ± 2
			0.70	36 ± 2	36 ± 3

À la lumière de ces résultats, il peut être conclu que le débit de l'éluant n'affecte pas la capacité des détecteurs SLS et DLS à caractériser les nanoparticules, les R<sub>g</sub> et les R<sub>h</sub> obtenus étant très semblables peu importe le débit de l'éluant. Par contre, il est attendu que le débit de l'éluant ait une influence sur les temps de rétention et la largeur des pics chromatographiques lors de la détection des nanoparticules injectées, ces paramètres pouvant être évalués à partir des figures 2.11 et 2.12, respectivement.



**Figure 2.11** Temps de rétention des FluoSphères (concentration de 250 mg L<sup>-1</sup>) en fonction du débit de l'éluant



**Figure 2.12** Largeur du pic chromatographique des FluoSphères (concentration de  $250 \text{ mg L}^{-1}$ ) en fonction du débit de l'éluant

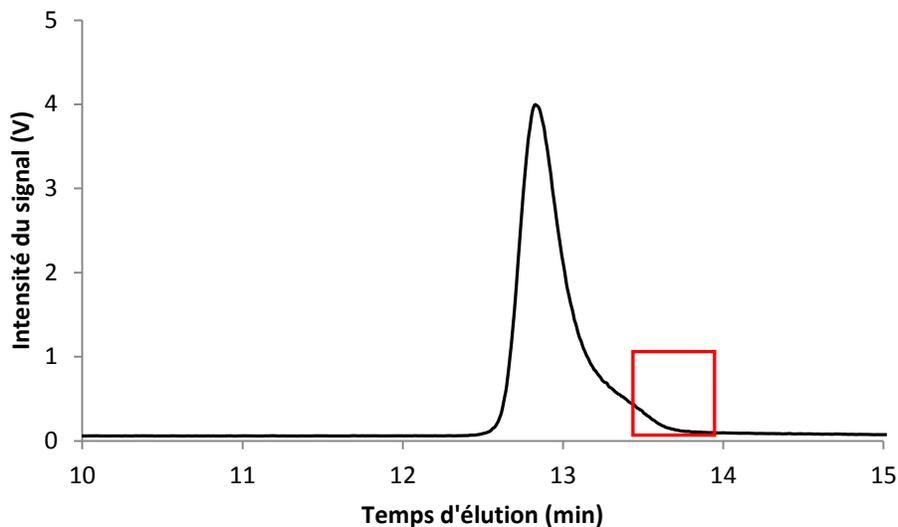
On peut en effet observer à la figure 2.11 que les temps de rétention diminuent linéairement avec l'augmentation du débit. De plus, il a pu être observé, à la figure 2.12, que la largeur du pic chromatographique des FluoSphères diminue aussi linéairement avec l'augmentation du débit de l'éluant. Il peut donc être conclu, qu'étant donné que le débit n'affecte pas l'exactitude des rayons obtenus, que le débit de l'éluant doit être optimisé pour obtenir, lors de séparation de mélange de nanoparticules, la meilleure séparation possible sans s'inquiéter de son impact sur la caractérisation subséquente des nanoparticules.

## 2.5 Séparation de mélanges de nanoparticules

Le but de l'utilisation de la colonne HDC étant de séparer les nanoparticules selon leur taille avant leur détection et leur caractérisation, des mélanges de nanoparticules standards ont été injectés dans la colonne. La détection des nanoparticules à l'aide de détecteurs SLS et DLS directement couplés à la colonne HDC permet d'observer l'effet de la modification de certains paramètres expérimentaux sur l'allure des chromatogrammes et donc d'optimiser l'efficacité de séparation de la méthode.

### 2.5.1 Co-élution

Lorsqu'un mélange de nPS de 80 nm de diamètre, à une concentration de 250 mg L<sup>-1</sup>, et de FluoSphères de 24 nm de diamètre, à une concentration de 750 mg L<sup>-1</sup>, est injecté dans la colonne HDC à un débit de 0.7 mL min<sup>-1</sup>, un seul pic chromatographique est observé sur les détecteurs de diffusion de la lumière, tel qu'illustré à la figure 2.13.



**Figure 2.13** Intensité du signal en fonction du temps suite à l'injection d'un mélange de 250 mg L<sup>-1</sup> de FluoSphères de 24 nm de diamètre et de 750 mg L<sup>-1</sup> de nPS de 80 nm de diamètre dans la colonne HDC

En effet, sous ces conditions, les nPS et les FluoSphères co-éluent, la colonne HDC n'étant pas en mesure de suffisamment séparer les nanoparticules selon leur taille pour que deux pics distincts soient observés. Au sommet du seul pic chromatographique, les rayons  $R_g$  et  $R_h$  correspondent bel et bien à celui des nPS, tel que rapporté dans le tableau II-8.

**Tableau II-8** Caractérisation des nanoparticules détectées suite à l'injection d'un mélange de 250 mg L<sup>-1</sup> de FluoSphères et de 750 mg L<sup>-1</sup> de nPS dans la colonne HDC

Nanoparticules	Rayons (nm)	Temps de rétention (min)	$R_g$ (nm)	$R_h$ (nm)
FluoSphères	10	-	-	-
nPS	40	12.79	$36 \pm 1$	$36 \pm 3$

Par contre, plus on se déplace vers des temps de rétention élevés, plus les rayons obtenus diminuent (la partie dans le carré rouge du chromatogramme de la figure 2.13), ce qui porte à croire que les FluoSphères co-éluent avec les nPS à un temps de rétention correspondant à ceux où la fin du pic chromatographique des nPS est détecté. Ces résultats de co-élution démontrent donc la nécessité d'optimiser les paramètres expérimentaux dans le but d'atteindre une séparation des NP maximisée.

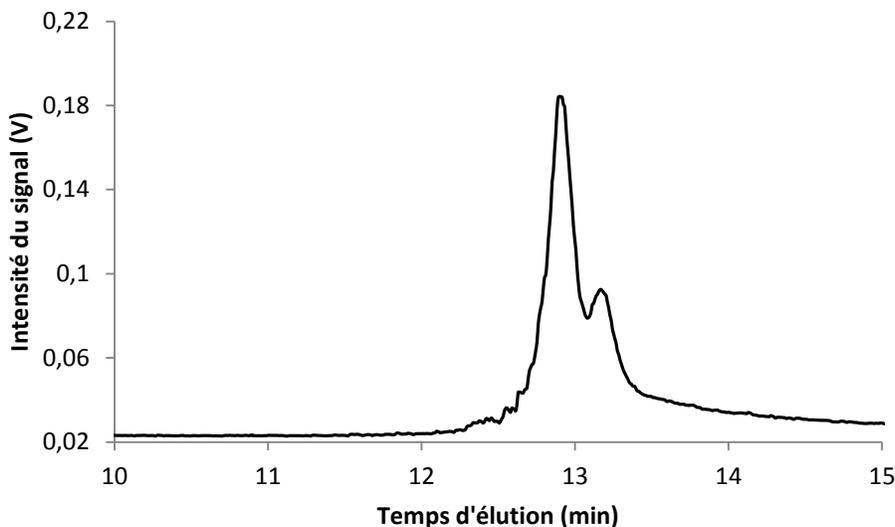
## 2.5.2 Séparation de mélanges de deux types de nanoparticules

### 2.5.2.1 Influence des concentrations relatives sur la détection des NP

Étant donné que l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de nPS de 80 nm de diamètre et de FluoSphères de 24 nm de diamètre n'a pas découlé en l'observation de deux pics chromatographiques distincts à la section 2.6.1, il pourrait être supposé que la séparation d'un mélange de nAu de 20 nm de diamètre à une concentration de 19.2 mg L<sup>-1</sup> et de nAg de 40 nm de diamètre à une concentration de 0.8 mg L<sup>-1</sup> ne serait pas possible. Par contre, comme rapporté au tableau II-9 et à la figure 2.14, la séparation a bel et bien pu être réalisée.

**Tableau II-9** Caractérisation à l'aide du DLS en ligne des nanoparticules détectées suite à l'injection d'un mélange de 19.2 mg L<sup>-1</sup> de nAu et de 0.8 mg L<sup>-1</sup> de nAg dans la colonne HDC

Nanoparticules	Rayon (nm)	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Temps de rétention (min)	R <sub>h</sub> (nm)
nAu	20	19.2	13.17	18.7 ± 0.2
nAg (NanoComposix)	40	0.8	12.92	37.9 ± 0.5



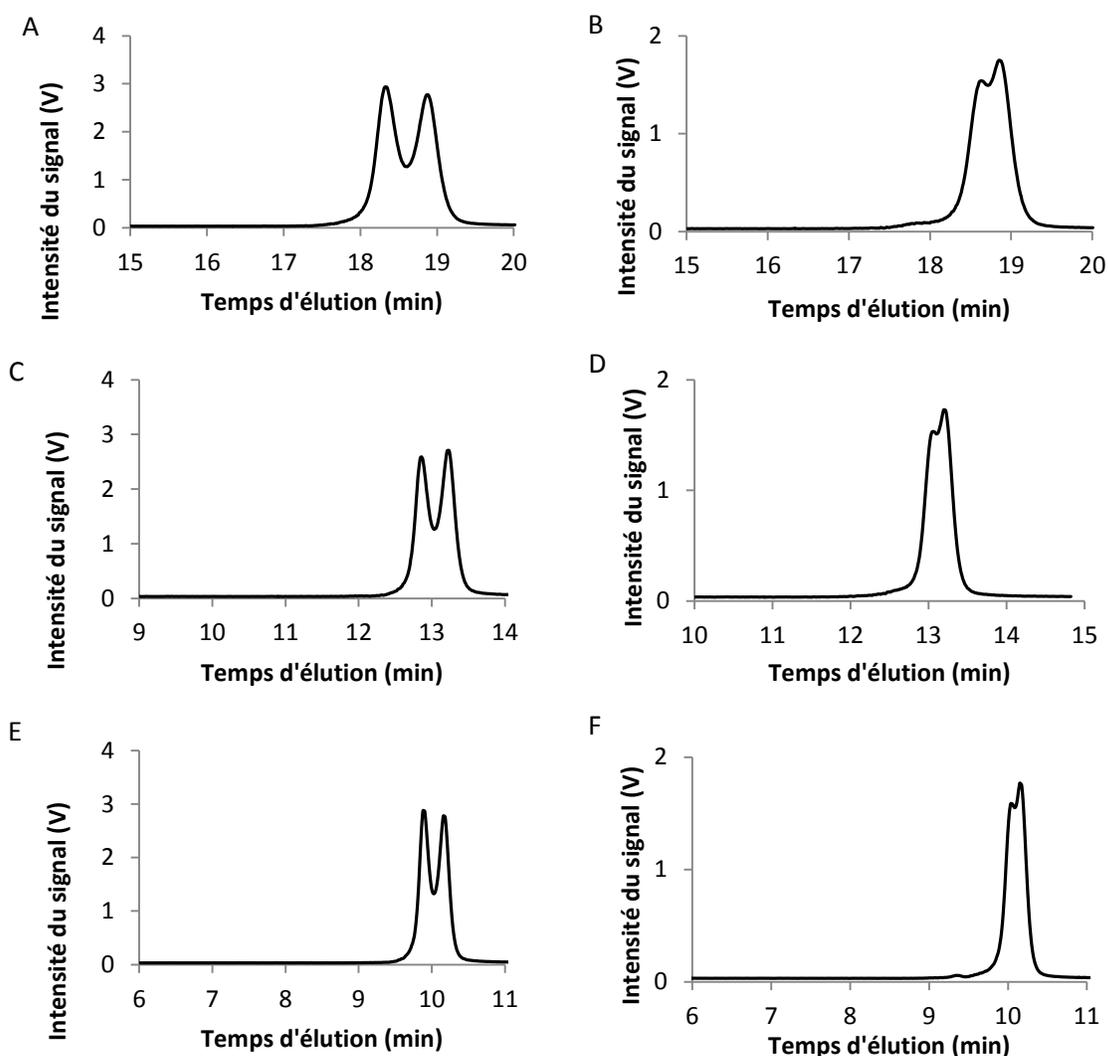
**Figure 2.14** Intensité du signal en fonction du temps suite à l'injection d'un mélange de  $19.2 \text{ mg L}^{-1}$  de nAu de 20 nm de diamètre et de  $0.8 \text{ mg L}^{-1}$  de nAg de 40 nm de diamètre dans la colonne HDC

Il peut donc être conclu, qu'étant donné qu'un mélange de nanoparticules de tailles assez semblables a ici été séparé assez efficacement pour observer deux pics chromatographiques distincts, ce qui n'avait pas été possible d'observer à la figure 2.13 et ce même pour des nanoparticules de tailles davantage éloignées, que les concentrations relatives jouent un rôle important. En effet, celles-ci doivent permettre que l'amplitude de la diffusion de la lumière d'un type de nanoparticules dans le mélange ne soit pas trop élevée de sorte que le signal découlant de la détection d'un autre type de nanoparticules ne soit pas complètement masqué.

### 2.5.2.2 Influence du débit de l'éluant sur la résolution

En connaissant dorénavant le rôle qu'ont les concentrations relatives des nanoparticules d'un mélange sur la résolution des signaux des détecteurs de diffusion de la lumière, l'influence du débit de l'éluant a par la suite été évalué. En utilisant des concentrations de FluoSphères de 24 nm de diamètre et de nPS de 80 nm de diamètre de respectivement  $180$  et  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , deux pics chromatographiques ont cette fois-ci pu être observés. L'expérience a même pu être poussée plus loin, c'est-à-dire en séparant un

mélange de FluoSphères de 24 nm de diamètre et de nPs de 50 nm de diamètre en utilisant des concentrations de 300 et de 60 mg L<sup>-1</sup>, respectivement. En effet, comme montré à la figure 2.15, la visualisation de ces séparations est possible et la variation du profil des pics chromatographiques selon le débit de l'éluant utilisé peut également y être observée.



**Figure 2.15** Intensité du signal du DLS en ligne en fonction du temps suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de 180 mg L<sup>-1</sup> de FluoSphères de 24 nm de diamètre et de 100 mg L<sup>-1</sup> de nPS de 80 nm de diamètre à un débit de (A) 0.7, (C) 1.0 et (E) 1.3 mL min<sup>-1</sup>, et d'un mélange de 300 mg L<sup>-1</sup> de FluoSphères de 24 nm de diamètre et de 60 mg L<sup>-1</sup> de nPS de 50 nm de diamètre à un débit de (B) 0.7, (D) 1.0 et (F) 1.3 mL min<sup>-1</sup>.

Il peut donc être confirmé que, dans les deux cas, la séparation des nanoparticules d'un même mélange est possible, et ce peu importe le débit utilisé. Ainsi, à partir de ces résultats, il a pu être déterminé que plus le débit de l'éluant augmente, plus la différence entre les temps de rétention diminue et plus la largeur des pics chromatographiques est faible (tableau II-10), ce qui laisse présager qu'il y a alors moins de diffusion et de dilution des nanoparticules. Les temps d'analyse sont aussi de cette façon moins longs. Par contre, aucune relation entre la résolution et le débit de l'éluant n'a pu être observée. Ces résultats préliminaires ont été poussés plus loin via des analyses de l'influence du débit sur la résolution, analyses rapportées dans le Chapitre 4.

**Tableau II-10** Caractérisation des nanoparticules détectées suite à l'injection d'un mélange de (A) 180 et 100 mg L<sup>-1</sup> de 24 et 80 nm de FluoSphères et de nPS et de (B) 300 et 60 mg L<sup>-1</sup> de 24 et 50 nm de FluoSphères et de nPS dans la colonne HDC

Mélange	Débit (mL min <sup>-1</sup> )	Temps de rétention (min)		Différence entre les temps de rétention (min)	Largeur des deux pics (min)	Résolution
		FluoSphères	nPS			
A	0.7	18.87	18.33	0.54	1.02	1.06
	1.0	13.22	12.86	0.36	0.70	1.03
	1.3	10.16	9.89	0.27	0.53	1.02
B	0.7	18.86	18.63	0.23	0.74	0.62
	1.0	13.16	13.02	0.14	0.51	0.55
	1.3	10.15	10.03	0.12	0.39	0.62

### 2.5.3 Mélange de trois ou quatre types de nanoparticules

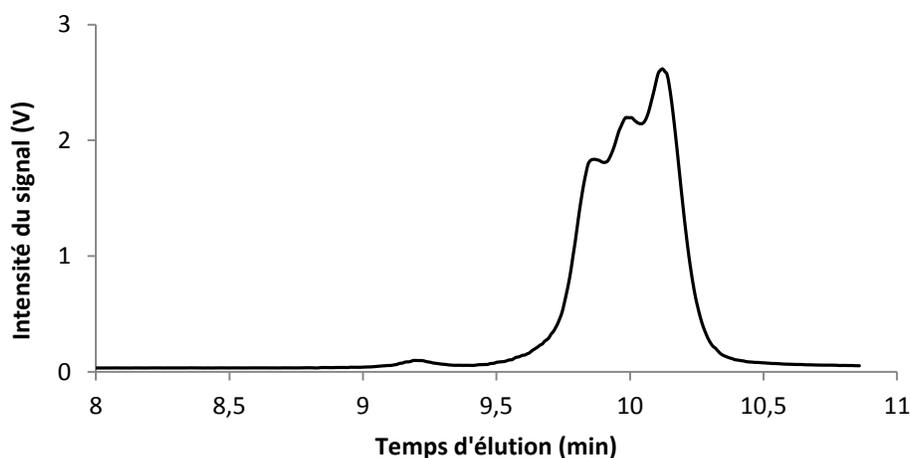
#### 2.5.3.1 Séparations efficaces

En utilisant des concentrations relatives favorisant une bonne ségrégation des pics chromatographiques, c'est-à-dire que chaque type de nanoparticules doit diffuser la lumière à une intensité comparable pour ne pas masquer le signal des autres types de nanoparticules, il a été possible de visualiser la séparation d'un mélange de trois types de nanoparticules. En effet, comme rapporté dans le tableau II-11 et à la figure 2.16, un

mélange de FluoSphères et de nPS de deux tailles différentes a été séparé assez efficacement par la colonne HDC pour permettre de déceler trois pics sur le chromatogramme obtenu.

**Tableau II-11** Caractérisation des nanoparticules détectées suite à l'injection d'un mélange de  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de FluoSphères de 24 nm de diamètre, de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de nPS de 50 nm de diamètre et de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de nPS de 80 nm de diamètre dans la colonne HDC

Nanoparticules	Rayon (nm)	Concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$R_g$ (nm)	$R_h$ (nm)	Temps de rétention (min)
FluoSpheres	12	800	-	$16.1 \pm 0.9$	13.17
nPS	25	60	$21 \pm 2$	$24 \pm 1$	13.01
	40	20	$33 \pm 1$	$36 \pm 1$	12.84

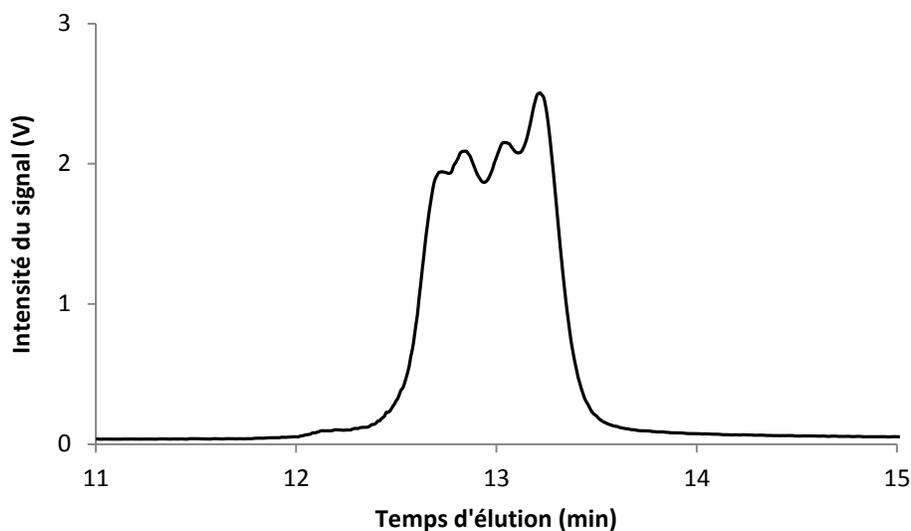


**Figure 2.16** Diffusion de la lumière en fonction du temps suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de FluoSphères de 24 nm de diamètre, de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de nPS de 50 nm de diamètre et de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de nPS de 80 nm de diamètre.

Ce qui est d'autant plus intéressant est que la séparation a pu être observée et ce même si seulement 15 nm sépare les deux types de nPS contenues dans le mélange et que seulement 13 nm sépare les FluoSphères des nPS de 25 nm, ce qui confirme donc la performance de séparation de la colonne HDC. Un mélange de quatre différents types de nanoparticules a donc été par la suite injecté dans la colonne HDC et comme le démontrent le tableau II-12 et la figure 2.17, ce mélange de FluoSphères et de nPS de 50, 80 et 120 nm de diamètres a aussi été efficacement séparé.

**Tableau II-12** Caractérisation des nanoparticules détectées suite à l'injection d'un mélange de  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de FluoSphère de 24 nm de diamètre, de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de nPS de 50 nm de diamètre, de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de nPS de 80 nm de diamètre et de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de nPS de 120 nm de diamètre dans la colonne HDC

Nanoparticules	Rayon (nm)	Concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$R_g$ (nm)	$R_h$ (nm)	Temps de rétention (min)
FluoSpheres	12	800	-	$16.1 \pm 0.9$	13.22
nPS	25	60	$22 \pm 2$	$26 \pm 1$	13.04
	40	20	$38 \pm 1$	$39 \pm 2$	12.83
	60	10	$49 \pm 1$	$46 \pm 2$	12.73



**Figure 2.17** Intensité du signal en fonction du temps suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de FluoSphères de 24 nm de diamètre, de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de nPS de 50 nm de diamètre, de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de nPS de 80 nm de diamètre et de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de nPS de 120 nm de diamètre.

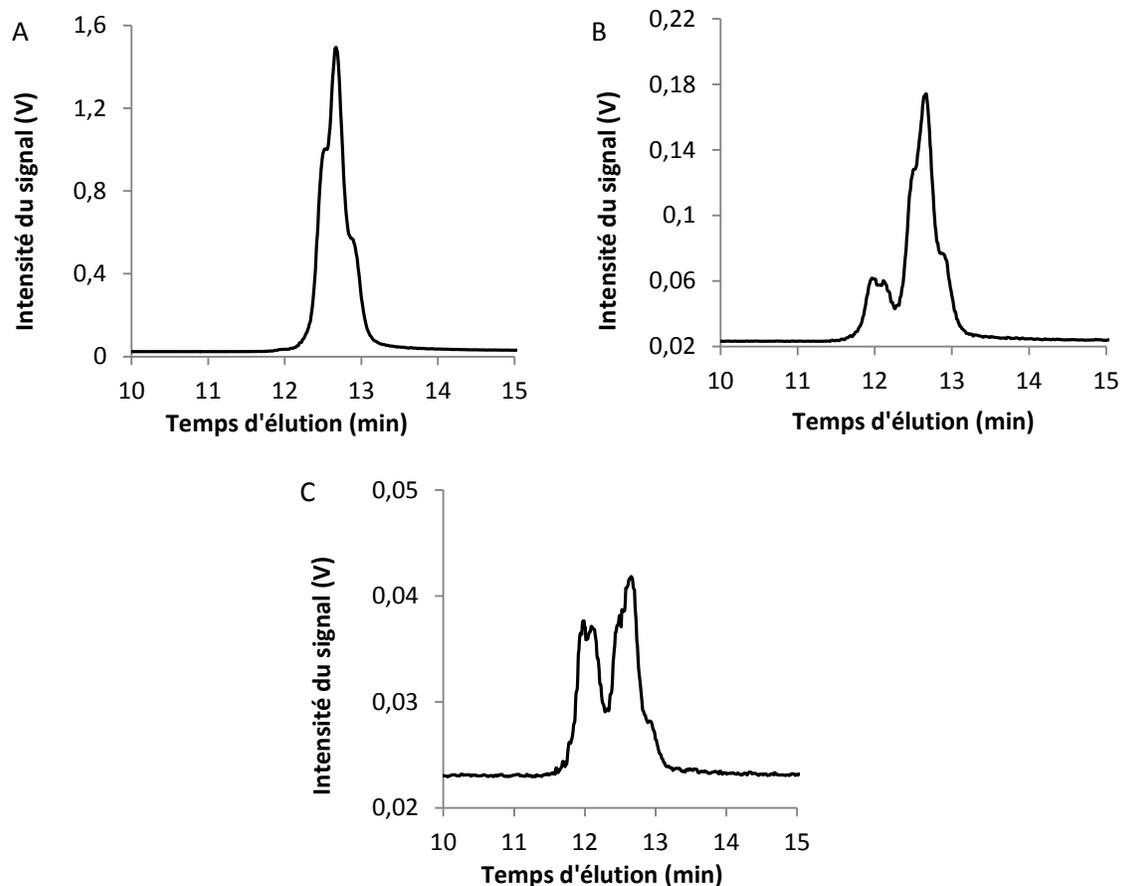
### 2.5.3.2 Influence de la concentration des nanoparticules sur la résolution

Par la suite, l'influence sur la résolution de la concentration en nanoparticules d'un mélange de trois types de nanoparticules de différentes tailles a été évaluée en injectant le même mélange de nanoparticules mais à des concentrations décroissantes.

**Tableau II-13** Caractérisation des nanoparticules (NP) détectées suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de nAg de 20 nm de rayon et de nPS de 40 et 60 nm de rayons à des concentrations décroissantes

Séparation	NP	Rayon (nm)	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	$R_g$ (nm)	$R_h$ (nm)	Intensité du signal (V)
<b>A</b>	nAg	20	3	-	29.2 ± 0.5	0.57
	nPS	40	14	31 ± 2	37.6 ± 0.6	1.50
	nPS	60	7	48 ± 1	53 ± 1	1.00
<b>B</b>	nAg	20	0.3	-	64 ± 2	0.07
	nPS	40	1.4	36.1 ± 0.8	53 ± 1	0.17
	nPS	60	0.7	47.8 ± 0.8	85 ± 1	0.13
<b>C</b>	nAg	20	0.03	-	-	0.04
	nPS	40	0.14	-	-	0.04
	nPS	60	0.07	-	-	0.04

À l'aide du tableau II-13, il peut être remarqué qu'avec les détecteurs en ligne de diffusion de la lumière, seulement le mélange le plus concentré en nanoparticules a pu être caractérisé convenablement. En effet, en observant les chromatogrammes correspondant, soit ceux de la figure 2.18, il peut être rapidement constaté que seul le premier chromatogramme présente un signal stable, d'intensité assez élevée par rapport à celle du bruit de fond et permettant la détection des trois différents types de nanoparticules du mélange.



**Figure 2.18** Séparation d'un mélange de nAg de 20 nm de rayon et de nPS de 40 et 60 nm de rayons, leurs concentrations étant de (A) 3, 14 et 7 mg L<sup>-1</sup>, (B) 0.3, 1.4 et 0.7 mg L<sup>-1</sup> et de (C) 0.03, 0.14 et 0.07 mg L<sup>-1</sup>, respectivement.

Dans les buts de contourner le manque de sensibilité des détecteurs de diffusion de la lumière et pour obtenir davantage d'informations sur l'influence de la concentration en nanoparticules du mélange injecté dans la colonne HDC sur la qualité de la séparation ayant eu lieu, de 10 à 13 fractions d'environ 200  $\mu$ L d'éluat ont été récoltés à des temps de rétention situés entre 11.5 et 14.1 minutes suite à l'injection d'un mélange de NP. De cette façon, chaque fraction d'éluat devrait contenir un seul type de nanoparticules étant donné la séparation qui a eu lieu dans la colonne HDC. Comme rapporté dans les tableaux II-14 à II-16, la caractérisation hors ligne de chacune des fractions procure des informations sur le contenu en nanoparticules de chaque tranche d'éluat en fonction du temps, des nanoparticules présentes en trop faibles concentrations pour être détectées en ligne pouvant dorénavant être détectées grâce au DLS hors ligne (Mobius, Wyatt

Technology) qui est davantage sensible. En effet, selon le  $R_h$  déterminé à l'aide du DLS hors ligne, une conclusion quant au contenu en nanoparticules de chaque fraction d'éluat a pu être tirée.

**Tableau II-14** Caractérisation des nanoparticules contenues dans chacune des fractions d'éluat collectées suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de nAg de 20 nm de rayon et de nPS de 40 et 60 nm de rayons à des concentrations de 3, 14 et 7 mg L<sup>-1</sup>, respectivement (séparation A de la figure 2.18). Les  $R_h$  ont été déterminés avec le détecteur DLS hors ligne (Wyatt Mobius) suite à la collection de 10 fractions de 0.2 mL.

Intervalle de temps de rétention (min)	$R_h$ (nm)	Conclusion sur le contenu de l'éluat pendant cet intervalle de temps de rétention
11.9 – 12.1	-	Éluant seulement
12.1 – 12.3	61 ± 3	nPS 60 nm
12.3 – 12.5	52 ± 2	nPS 60 nm
12.5 – 12.7	49 ± 1	nPS 40 nm
12.7 – 12.9	31.7 ± 0.5	Mélange de nPS 40nm et de nAg 20nm
12.9 – 13.1	29 ± 2	nAg 20nm
13.1 – 13.3	34 ± 2	Très peu de nAg 20nm
13.3 – 13.5	-	Éluant seulement
13.5 – 13.7	-	Éluant seulement
13.7 – 13.9	-	Éluant seulement

**Tableau II-15** Caractérisation des nanoparticules contenues dans chacune des fractions d'éluat collectées suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de nAg de 20 nm de rayon et de nPS de 40 et 60 nm de rayons à des concentrations de 0.3, 1.4 et 0.7 mg L<sup>-1</sup>, respectivement (séparation B de la figure 2.18). Les  $R_h$  ont été déterminés avec le détecteur DLS hors ligne (Wyatt Mobius) suite à la collection de 12 fractions de 0.2 mL.

Intervalle de temps de rétention (min)	$R_h$ (nm)	Conclusion sur le contenu de l'éluat pendant cet intervalle de temps de rétention
11.5 – 11.7	-	Éluant seulement
11.7 – 11.9	-	Éluant seulement
11.9 – 12.1	72 ± 4	Début de l'élution des nPS 60 nm
12.1 – 12.3	59.6 ± 0.9	nPS 60 nm
12.3 – 12.5	58 ± 3	nPS 60 nm
12.5 – 12.7	53 ± 1	Fin de l'élution des nPS 60 nm
12.7 – 12.9	37 ± 3	nPS 40nm
12.9 – 13.1	30 ± 1	nAg 20nm
13.1 – 13.3	-	Éluant seulement
13.3 – 13.5	-	Éluant seulement
13.5 – 13.7	-	Éluant seulement
13.7 – 13.9	-	Éluant seulement

**Tableau II-16** Caractérisation des nanoparticules contenues dans chacune des fractions d'éluat collectées suite à l'injection dans la colonne HDC d'un mélange de nAg de 20 nm de rayon et de nPS de 40 et 60 nm de rayons à des concentrations de 0.03, 0.14 et 0.07 mg L<sup>-1</sup>, respectivement (séparation C de la figure 2.18). Les  $R_h$  ont été déterminés avec le détecteur DLS hors ligne (Wyatt Mobius) suite à la collection de 12 fractions de 0.2 mL.

<b>Intervalle de temps de rétention (min)</b>	<b><math>R_h</math> (nm)</b>	<b>Conclusion sur le contenu de l'éluat pendant cet intervalle de temps de rétention</b>
11.5 – 11.7	-	Éluant seulement
11.7 – 11.9	-	Éluant seulement
11.9 – 12.1	79 ± 4	Début de l'éluat des nPS 60 nm
12.1 – 12.3	69 ± 3	nPS 60 nm
12.3 – 12.5	70 ± 6	nPS 60 nm
12.5 – 12.7	76 ± 5	Fin de l'éluat des nPS 60 nm
12.7 – 12.9	53 ± 2	nPS 40nm
12.9 – 13.1	45 ± 2	nAg 20nm
13.1 – 13.3	-	Éluant seulement
13.3 – 13.5	-	Éluant seulement
13.5 – 13.7	-	Éluant seulement
13.7 – 13.9	-	Éluant seulement

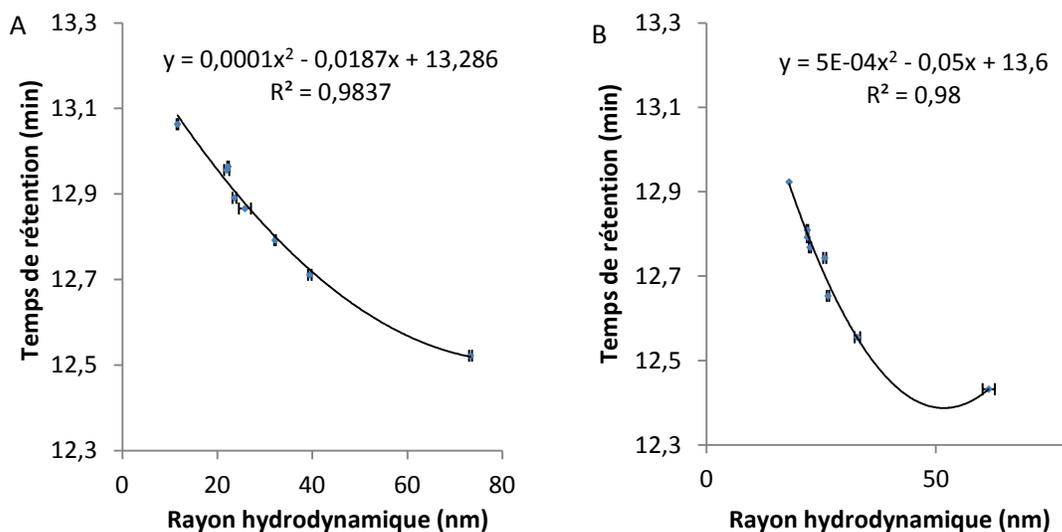
Malheureusement, il semble que le DLS hors ligne, pour ces dernières concentrations (Tableau II-16, séparation C), ne soit plus assez sensible pour déterminer adéquatement la taille des nanoparticules présentes dans les fractions récoltées. Il est donc difficile de déterminer si la concentration en nanoparticules d'un mélange injecté dans la colonne HDC a une certaine influence sur la qualité de la séparation ou non. Un détecteur davantage sensible, tel que le SP-ICPMS, a été utilisé (résultats présentés dans le Chapitre 4) afin de mieux nous informer de l'influence de la concentration des nanoparticules sur la résolution.

## **2.6 Détection de nanoparticules en matrices environnementales**

### **2.6.1 Eau de rivière**

Dans le but de vérifier si les nanoparticules ont le même comportement dans des matrices plus complexes, une courbe d'étalonnage a été construite à partir d'échantillons d'eau de rivière (rivière Ste-Rose à Laval, échantillon prélevé le 24 septembre 2013) à

laquelle des nanoparticules standards ont été ajoutés (à des concentrations rapportées au Tableau II-1). Aussi, ces courbes d'étalonnage permettent d'évaluer la stabilité des nanoparticules standards dans l'eau de rivière.



**Figure 2.19** Temps de rétention en fonction des rayons hydrodynamiques des nanoparticules standards dans (A) de l'eau Milli-Q et dans (B) de l'eau de rivière.

Comme illustré à la figure 2.19, les courbes d'étalonnage ont été obtenues en portant les temps de rétention des nanoparticules standards injectées dans la colonne HDC en fonction des  $R_h$  obtenus à l'aide du DLS en ligne. Il peut alors être remarqué que dans les deux cas, les courbes obtenues sont de type polynomial et que leurs  $R^2$  sont identiques. Il peut donc être supposé que les nanoparticules ont une stabilité semblable dans les deux types de matrice et ont un mécanisme de rétention comparable dans la colonne HDC. Les nanoparticules semblent donc avoir des propriétés similaires peu importe qu'elles aient été ajoutées à de l'eau Milli-Q ou à de l'eau de rivière avant leur élution.

### 2.6.2 Eaux usées

Le but premier du développement d'une méthode analytique se basant sur l'utilisation de la chromatographie hydrodynamique couplée à des détecteurs puissants étant de détecter et de caractériser des nanoparticules en matrice environnementale, pour

ce qui est des analyses préliminaires subséquentes, elles ont été réalisées en ajoutant des nanoparticules standards dans des échantillons d'eaux usées. Ces échantillons d'affluent traité, d'effluent primaire et d'effluent secondaire ont été prélevés le 28 août 2013 à la station d'épuration de St-Hyacinthe et ont été filtrés sur une membrane de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore) dans le but d'y éliminer les larges agrégats et les particules de poussières avant leur injection dans la colonne HDC. Une première étape était donc, comme rapporté dans le tableau II-17, de caractériser les eaux usées sans y avoir ajouté de nanoparticules pour y détecter ou non la présence de particules originellement présentes dans les échantillons.

**Tableau II-17** Caractérisation de particules intrinsèquement présentes dans les eaux usées

<b>Eaux usées</b>	<b>R<sub>h</sub> (nm)</b>	<b>% (m/m)</b>
Affluent traité	1.3	77
	165.7	23
Effluent primaire	187.9	100
Effluent secondaire	15.1	6
	95.2	86
	884.1	8

Il peut donc être conclu que les eaux usées contiennent des particules de tailles nanométriques. Il est donc possible que les particules originellement contenues dans les eaux usées soient des sources d'interférences par rapport aux nanoparticules standards à détecter, la taille de ces particules et des nanoparticules qui seront ajoutées aux eaux usées pouvant se chevaucher.

En sachant que certaines interférences sont possibles, des nanoparticules standards ont été ajoutées à des échantillons d'affluent traité, d'effluent primaire et d'effluent secondaire, comme rapporté dans les tableaux II-18 à II-20, dans le but de vérifier leurs propriétés et leur stabilité dans ce type de matrice environnementale.

**Tableau II-18** Caractérisation de nanoparticules standards dans des eaux usées, soit de l'affluent traité. Tous les échantillons ont été préalablement filtrés sur une membrane de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore).

Nanoparticules	Rayon (nm)	Concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	SLS en ligne	DLS en ligne	DLS hors ligne
			$R_g$ (nm)	$R_h$ (nm)	$R_h$ (nm)
nAu	10	10	-	> 200	-
nPS	10	200	-	$18.6 \pm 0.2$	$22 \pm 8$
nAg NanoComposix	20	4	-	> 200	-
nAg Sigma	20	4	-	> 200	-
nPS	20	100	$24.0 \pm 0.3$	$29.2 \pm 0.4$	$26 \pm 7$
	21.5	95	$22.0 \pm 0.3$	$25.6 \pm 0.3$	-
	25	100	$21.0 \pm 0.2$	$23.9 \pm 0.6$	$3 \cdot 10^1 \pm 1 \cdot 10^1$
	27	200	$20.9 \pm 0.3$	$26.1 \pm 0.4$	$28 \pm 5$
	30	50	$30.9 \pm 0.2$	$35.9 \pm 0.6$	-
	40	100	$43.5 \pm 0.1$	$47.3 \pm 0.4$	-
	60	100	$52.8 \pm 0.3$	$41 \pm 3$	-

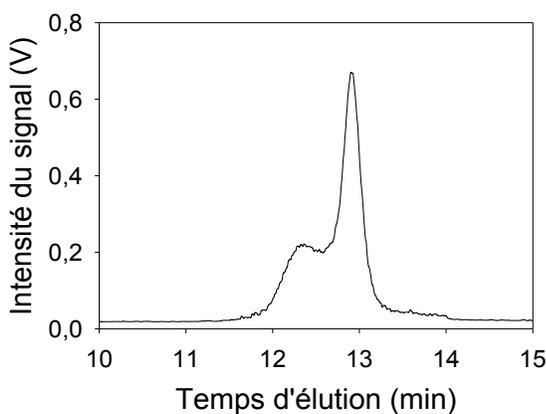
**Tableau II-19** Caractérisation de nanoparticules standards dans des eaux usées, soit de l'effluent primaire. Tous les échantillons ont été préalablement filtrés sur une membrane de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore).

Nanoparticules	Rayon (nm)	Concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	SLS en ligne	DLS en ligne	DLS hors ligne
			$R_g$ (nm)	$R_h$ (nm)	$R_h$ (nm)
nAu	10	10	-	> 200	-
nPS	10	200	-	$21.0 \pm 0.2$	-
nAg NanoComposix	20	4	-	> 200	-
nAg Sigma	20	4	-	> 200	-
nPS	20	100	$49.0 \pm 0.1$	$78.8 \pm 0.2$	$25 \pm 8$
	21.5	95	$19.7 \pm 0.2$	$28.7 \pm 0.3$	$23 \pm 5$
	25	100	$20.5 \pm 0.2$	$26.7 \pm 0.4$	$3 \cdot 10^1 \pm 1 \cdot 10^1$
	27	200	$20.5 \pm 0.2$	$23.9 \pm 0.6$	$30 \pm 7$
	30	50	$27.5 \pm 0.2$	$33.2 \pm 0.5$	$5 \cdot 10^1 \pm 2 \cdot 10^1$
	40	100	$39.6 \pm 0.2$	$41.7 \pm 0.6$	-
	60	100	$53.4 \pm 0.2$	$43 \pm 3$	-

**Tableau II-20** Caractérisation de nanoparticules standards dans des eaux usées, soit de l'effluent secondaire. Tous les échantillons ont été préalablement filtrés sur une membrane de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore).

Nanoparticules	Rayon (nm)	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	SLS en ligne	DLS en ligne	DLS hors ligne
			R <sub>g</sub> (nm)	R <sub>h</sub> (nm)	R <sub>h</sub> (nm)
nAu	10	10	-	> 200	16 ± 2
nPS	10	200	-	16.8 ± 0.2	-
nAg NanoComposix	20	4	-	> 200	15 ± 4
nAg Sigma	20	4	-	> 200	-
	20	100	17.0 ± 0.4	23.9 ± 0.3	-
	21.5	95	19.9 ± 0.3	24.7 ± 0.3	-
nPS	25	100	20.7 ± 0.2	27.7 ± 0.3	29 ± 4
	27	200	18.8 ± 0.3	23.6 ± 0.6	4*10 <sup>1</sup> ± 2*10 <sup>1</sup>
	30	50	28.9 ± 0.3	36.9 ± 0.6	-
	40	100	40.5 ± 0.2	46.9 ± 0.6	-
	60	100	53.0 ± 0.3	41 ± 3	-

Il peut donc être ici remarqué que pour les trois types d'eaux usées, qu'il est souvent difficile de détecter les nanoparticules standards à travers le bruit de fond provenant des particules originellement contenues dans les eaux usées, comme présenté en exemple à la Figure 2.20.



**Figure 2.20** Intensité du signal mesuré au DLS en ligne suite à l'injection dans la colonne HDC d'une solution de 95 mg L<sup>-1</sup> de nPS de 21.5 nm de rayon dans l'affluent primaire

En conséquent, une solution réside assurément en l'utilisation de la colonne HDC afin de séparer les nanoparticules des particules de l'eau avant d'effectuer leur détection. Par contre, dans les cas où la séparation n'est pas suffisante pour permettre de différencier les nanoparticules des particules naturellement présentes dans la matrice environnementale, l'utilisation d'un détecteur spécifique tel que le SP-ICPMS est de mise.

## **2.7 Conclusions suite à l'optimisation préliminaire de la méthode**

L'ensemble des tests et expériences réalisés dans ce chapitre ont permis de déterminer que :

- Tel que la théorie de la chromatographie hydrodynamique le prédit, les nanoparticules ont bel et bien des temps de rétention inversement proportionnels à leurs tailles;
- L'incorporation de tensioactifs dans la composition de l'éluant (0.0013 % m/m de Triton-X et de 0.0013 % m/m de SDS) permet de jouir d'une bonne stabilité des nanoparticules suite à leur injection dans la colonne HDC;
- Lors de l'utilisation de détecteurs non-spécifiques tels que le DLS et le SLS, les concentrations des échantillons de nanoparticules doivent être élevées (de l'ordre du  $\text{mg L}^{-1}$ ) pour assurer leur détection;
- Suite à l'injection d'un mélange de nanoparticules dans la colonne HDC, l'efficacité de la séparation dépend de la différence en tailles entre les différentes espèces de nanoparticules;
- À l'aide de la méthode, la séparation et détection de nanoparticules dans des matrices environnementales (eau de rivière et eaux usées) est possible.

C'est donc sur la base de ces conclusions que l'optimisation finale d'une méthode reposant sur l'utilisation en ligne de la HDC avec des détecteurs DLS, SLS et (SP)ICPMS a pu être réalisée.

### **Chapitre 3. Séparation, détection et caractérisation de nanoparticules manufacturées dans des eaux naturelles en utilisant la chromatographie hydrodynamique couplée à de multiples détecteurs (diffusion de la lumière, l'ultracentrifugation analytique et le mode particule unique de l'ICPMS)**

**Avant-propos :** L'article suivant décrit la caractérisation de solution de nanoparticules standards et le comportement de ces nanoparticules lors de leur élution dans la colonne de chromatographie hydrodynamique (HDC). Puis, l'optimisation des conditions expérimentales de séparation de mélanges de nanoparticules manufacturées standards à l'aide de la colonne HDC couplée à des détecteurs de diffusion de la lumière a permis d'atteindre une efficacité de séparation satisfaisante. Finalement, le couplage de la chromatographie hydrodynamique à un détecteur de spectrométrie de masse par torche à plasma (dans son mode “*single particle*”) a permis de détecter de faibles concentrations de nanoparticules d'argent dans une eau naturelle.

La majeure partie de la recherche d'information pertinente dans la littérature, des manipulations en laboratoire et de l'analyse des résultats a été réalisée par l'auteure de ce mémoire. L'interprétation des résultats, la rédaction et la révision de cet article ont été effectuées en collaboration entre l'auteure de ce mémoire et son directeur de recherche.

Finalement, il est à noter que certaines sections présentées dans les chapitres précédents sont reprises dans l'article à des fins de reproductions intégrales.

L'article et l'information supplémentaire ont été publiés dans le journal *Environmental Chemistry* sous la référence suivante :

Proulx, K., Wilkinson, K.J., *Separation, detection, and characterisation of engineered nanoparticles in natural waters using hydrodynamic chromatography and multi-method detection (light scattering, analytical ultracentrifugation and single particle ICP-MS)*. Environmental Chemistry, 2014.11: p.392-401.

Kim Proulx<sup>A</sup> and Kevin J. Wilkinson<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Department of Chemistry, Biophysical Environmental Chemistry group, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montreal (QC), Canada H3C 3J7

## **Environmental context**

The effects of engineered nanoparticles on the environment and on human health are difficult to evaluate largely because nanoparticles are so difficult to measure. The main problems are that concentrations are low and the engineered nanoparticles are often difficult to distinguish from the environmental matrices in which they are found. We report a separation technique that facilitates the detection of engineered nanoparticles in natural waters.

## **Abstract**

Few analytical techniques are presently able to detect and quantify engineered nanoparticles (ENPs) in the environment. The major challenges result from the complex matrices of environmental samples and the low concentrations at which the ENPs are expected to be found. Separation techniques such as asymmetric flow field flow fractionation (AF4) and more recently, hydrodynamic chromatography (HDC) have been used to partly resolve ENPs from their complex environmental matrices. In this paper, HDC was first coupled to light scattering detectors in order to develop a method that would allow the separation and detection of ENPs spiked into a natural water. Size fractionated samples were characterised using off-line detectors including analytical ultracentrifugation (AUC), dynamic light scattering (DLS) and single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS). HDC was able to separate a complex

mixture of polystyrene, silver and gold nanoparticles (radii of 60, 40, 20 and 10 nm) contained within a river water matrix. Furthermore, the feasibility of using HDC coupled to SP-ICP-MS was demonstrated by detecting  $4 \text{ mg L}^{-1}$  of a 20-nm (radius) nAg in a river water sample.

### 3.1 Introduction

Engineered nanoparticles (ENPs) represent a diverse group of manmade materials that have at least one dimension in the 1-100 nm size range. Owing to their nanoscale sizes, they have a large proportion of their atoms on the particle surface, often resulting in significant differences in their reactivity with respect to either the bulk materials or the dissolved ions [1]. ENPs such as carbon nanotubes, silver nanoparticles, quantum dots and metal oxides can now be found in thousands of commercial products (Project on Emerging Nanotechnologies, see <http://www.nanotechproject.org/cpi>, accessed 6 June 2014).

Owing to the growing and widespread use of ENPs, their impacts on the environment and on human health are growing concerns; however, environmental risk is poorly known [56] mainly because of the difficulties involved with quantifying exposure concentrations. Several groups have used regional scale flow analyses to evaluate ENP loading to the environment and these studies have suggested that for nano silver (nAg), nano titanium dioxide (nTiO<sub>2</sub>) and nano zinc oxide (nZnO), current levels in the environment may already pose risks to aquatic organisms [12]. Nonetheless, modelling studies generally do not take into account transformations to the ENPs, including their removal by sedimentation or by dissolution. Indeed, only a few studies have attempted, with limited success, to detect ENPs in the environment (e.g. Tiede et al. [19, 25], Domingos et al. [32], Kaegi et al. [57] and Weinberg et al. [8]).

Sensitive and robust techniques are thus urgently required to detect, characterise and quantify ENPs in natural samples. Key requirements include the ability to distinguish

ENPs from the complex environmental matrices in which they are found and assurance that the technique itself does not induce dissolution, aggregation or agglomeration. To that end, several groups have coupled asymmetric flow field flow fractionation (AF4) [26, 38, 56] to various detectors, including inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The use of other promising techniques such as hydrodynamic chromatography (HDC) has been somewhat limited [12, 19, 25]. Like AF4, HDC separates particles on the basis of the particles' diffusion coefficients, which are inversely related to their hydrodynamic diameters through the Stokes–Einstein equation [21, 24]. In HDC, the stationary phase is a packed bed of non-porous and non-coated silica spheres that have been developed in order to minimise interactions with the sample. The column void volume can be considered to be a network of flow channels or capillaries in which a parabolic flow profile is established. In this manner, larger particles that cannot reach the surface of the beads are eluted faster [21] in a separation process that is, in principle, independent of particle density or particle composition [19]. Minimal sample preparation is required and in theory, minimal sample perturbation occurs during the passage of the sample through the HDC column [21]. As with AF4, it is possible to couple HDC to multiple detection techniques. Nonetheless, AF4 generally requires both greater technical expertise and longer run times and it can be limited by artefacts that occur due to interactions of the sample with the AF4 channel membrane [21, 29]. Although only a few research groups have examined ENP detection using HDC, Tiede et al. [25] convincingly showed that HDC coupled to ICP-MS could be used to separate gold and silver nanoparticles from their dissolved ions [19, 21, 25].

In this study, we have tested the hydrodynamic separation of several ENP size standards: gold (nAu), polystyrene (nPS) and silver (nAg) nanoparticles and their mixtures. Initially, techniques were optimised at environmentally high concentrations (2–100 mg L<sup>-1</sup>) in order to use the available on-line detectors (static (SLS) and dynamic light scattering (DLS)), which provide direct information on the radii of gyration ( $R_g$ ) and the hydrodynamic radii ( $R_h$ ) of the ENPs. Once the experimental parameters were well defined for the elution, off-line detection of HDC fractions were realised using DLS, analytical ultracentrifugation (AUC [39, 41, 45]) and single particle inductively coupled

plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS [46, 48]) at lower ENP concentrations ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $3 \text{ mg L}^{-1}$  for DLS and AUC and  $0.1\text{-}2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  for SP-ICP-MS). Finally, the direct coupling of the HDC column to SP-ICP-MS allowed the direct detection and characterisation of a nanosilver particle that was spiked into a river water sample at environmentally relevant concentration of  $4 \mu\text{g L}^{-1}$ . The paper will demonstrate some of the advantages and disadvantages of using HDC for the separation of ENP in natural waters.

## 3.2 Experimental section

### 3.2.1 Reagents

All reagents were prepared in Milli-Q water (Millipore, Billerica, MA, USA,  $R > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , organic carbon  $< 2 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Sodium nitrate (Fluka, Basel, Switzerland,  $>99\%$ ) was used to adjust the ionic strength of the eluent whereas sodium hydroxide (Sigma–Aldrich, SigmaUltra, St Louis, MO, USA) and nitric acid (Fisher Scientific, TraceSELECT Ultra, Waltham, MA USA) were used to adjust its pH. Sodium dodecyl sulfate (SDS, G-Biosciences, Biotechnology grade, St Louis, MO) and Triton X-100 (Sigma Triton X-100 solution BioUltra) were respectively added to the eluent as anionic and non-ionic surfactants. Except when specified, an eluent of  $1 \text{ mM NaNO}_3$ ,  $0.0013\%$  w/w Triton X-100 at a pH of  $7.5 (\pm 0.2)$  was used (the motivation for this eluent composition has been provided in the Supplementary material, Table SIII-1). Sodium azide ( $0.02\%$  w/w, Fisher Scientific) was added to solutions that were used to rinse the HDC column at the end of each experiment. Several types of nanoparticles (nPS, nAg, nAu) were used during the column optimisation (Table III-1) and in order to evaluate the role of ENP composition on retention times. Samples were filtered over a  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  membrane (Millipore) in order to remove large aggregates and dust particles, before their injection into the HDC.

**Table III-1. Nanoparticles employed for the optimisation of the hydrodynamic chromatography column**

<b>Engineered nanoparticle (ENP)</b>	<b>Nominal radius (nm)</b>	<b>Additional information</b>
Polystyrene (nPS)	12	FluoSpheres® Life Technologies™, yellow-green fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}}=505$ nm, $\lambda_{\text{em}}=515$ nm), aldehyde-sulfate coated, 2% solids, contains 2 mM sodium azide, concentration of the stock solution was 100 mg L <sup>-1</sup> .
nPS	20, 21.5, 27, 40, 60	Bangs Laboratories Inc., 1% solids, NIST traceable particle size standards. Concentrations of the stock solutions were 100 mg L <sup>-1</sup> , 100 mg L <sup>-1</sup> , 200 mg L <sup>-1</sup> , 100 mg L <sup>-1</sup> and 100 mg L <sup>-1</sup> respectively.
nPS	25, 30	Bangs Laboratories Inc., 1% solids, fluorescence due to confocal envy green ( $\lambda_{\text{ex}}=525$ nm, $\lambda_{\text{em}}=565$ nm). Concentrations of the stock solutions were 100 mg L <sup>-1</sup> and 50 mg L <sup>-1</sup> , respectively.
Gold (nAu)	10	Ted Pella Inc., PELCO® NanoXact™ tannic acid capped, ENP stock solution was 50 mg L <sup>-1</sup> .
Silver (nAg)	20	Sigma-Aldrich, citrate stabilized, ENP stock solution was 20 mg L <sup>-1</sup> .
nAg	20	NanoComposix, citrate stabilized NanoXact Ag, ENP stock solution was 20 mg L <sup>-1</sup> .

### 3.2.2 Hydrodynamic chromatography

The HDC column was a PL-PSDA cartridge, type 1 column with a separation range of 5 to 300 nm, a length of 80 cm and an internal diameter of 7.5 mm (Agilent Technologies Canada Inc., Mississauga, ON, Canada). An Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary HPLC fitted with an Agilent 1260 Infinity Standard Autosampler (Agilent) was used for the separations. A Dawn Heleos II detector (Wyatt Technologies, Santa Barbara, CA, USA) was employed to acquire the on-line SLS and DLS data. On-line DLS data reported in this paper were acquired at a scattering angle of 99°. Translational diffusion coefficients of the ENPs were determined from the exponential decay of an autocorrelation function, which was then used to calculate their hydrodynamic radii ( $R_h$ ) based upon the Stokes–Einstein equation. In SLS, the particle’s radius of gyration is determined from the angular dependence of the scattered light (18 angles measured). For a spherical particle, the  $R_g$  is theoretically related to its hydrodynamic radius by  $R_g^2 =$

$(3/5)R_h^2$ . For the particles studied here (radii of 10–60 nm), a linear order Zimm fit model was used to analyse the SLS data. For nAu and nAg, the difference between their refractive indices and that of water was too high to allow the angular dependence of the scattered light to be used to determine the  $R_g$ . Moreover, owing to the absence of a dependency of the scattered light on scattering angle,  $R_g$  could not be obtained for particles with radii below 10–15 nm.

All tubing was made of inert materials. An injection volume of 20  $\mu\text{L}$  was employed as a compromise to obtain optimal sensitivity, peak widths and retention times (Supplementary material, Fig. S3.1) using a flow rate of  $1.00 \text{ mL min}^{-1}$  and a pressure of  $\approx 78$  bar. pH measurements were made using a 744 Metrohm pH-meter (Metrohm, Riverview, FL, USA). An Infinity 1260 analytical scale fraction collector (Agilent Technologies Canada) was used to collect sample fractions for off-line analysis. Numerous calibration curves were prepared by analysing spiked nanoparticles in Milli-Q water and both blanks and standards were run frequently (before and after each batch of experiments) in order to monitor the analytical performance of the instruments.

### 3.2.3 Off-line particle characterisation

Data were also acquired from several off-line detectors, including an AUC, a second DLS instrument (Mobius, Wyatt Technologies, scattering angle of  $171.5^\circ$ ) and an inductively coupled plasma mass spectrometer (PerkinElmer NexION 300X, Mississauga, ON, Canada) run mainly in single particle mode. AUC (Beckman Coulter, ProteomeLab XL-1, Indianapolis, IN, USA) was carried out by performing 100 to 150 interference scans (655 nm) per sample using a centrifugation speed of 5000 to 10 000 rpm ( $\approx 1800$ – $7300$  g) at  $20^\circ\text{C}$ . Radii obtained from the AUC are sedimentation based radii (Stokes' radii) that can be determined from Stokes' law using known particle densities.

SP-ICP-MS experiments were carried out on triplicate samples using the following data acquisition parameters: 1 sweep per read; 20 000 reads per replicate; settling time of 0.1 ms and a dwell time of 3 ms. Nebulisation efficiency was determined

from the sample flow rate  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ ) and the concentration ( $100 \text{ ng L}^{-1}$ ), size ( $R_h = 30 \text{ nm}$ ) and density of the nAu ( $19\,320 \text{ kg m}^{-3}$ ) by analysing a standard solution of nAu with a known concentration [52]. The particle number concentration was obtained from the frequency of detected pulses and the calculated nebulisation efficiency [15, 17]. Diluted suspensions were employed so that, statistically speaking, only single particles reached the mass spectrometer during any given measurement (dwell) time [14]. For example, sample fractions ( $75 \text{ }\mu\text{L}$ ) collected from the HDC column were generally diluted by a factor of 100 before SP-ICP-MS analysis (an additional dilution of  $\approx 500$  occurred during ENP elution in the HDC column). A threshold limit of three standard deviations ( $3\sigma$ ) above the background signal was set in order to discriminate between dissolved metal and pulses due to the ENPs [14, 15, 50].

Means and standard deviations were determined from triplicate measurements. An analysis of variance was performed at  $P = 0.05$  and where applicable, significant differences were identified using the Student-Newman-Keuls test, also at  $P = 0.05$ . Although all separations were run in triplicate, only a single representative chromatogram has been presented.

### 3.3 Results and discussion

#### 3.3.1 ENP size determinations

Where possible, the manufacturer's particles dimensions were verified for each of the ENP standards using SLS, DLS, AUC and SP-ICP-MS (Table III-2). For SLS and DLS, radii were obtained from on-line measurements on diluted samples ( $\approx 500\times$  due to elution through the HDC column). AUC, DLS and SP-ICP-MS were performed off-line on standards (concentrations provided in Table III-1) that did not pass through the HDC column (samples diluted to  $0.1 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  for SP-ICP-MS). It must be emphasised that each of the detection techniques relies on different fundamental principles and provides slightly different values of radii (e.g.  $R_g$ ,  $R_h$ , sedimentation or mass based  $R$ ) such that results cannot be directly compared [32]. For example, when using DLS or SLS, radii ( $R_h$  or  $R_g$ ) were often slightly larger than the radii provided by the manufacturer. In the

literature, this effect is generally attributed to sample polydispersity because large particles will scatter much more light than smaller ones. Although this explanation may be valid for the offline DLS [32, 45], it is unlikely to be the unique explanation for the samples measured post-column (on line), where an important decrease in their polydispersity is expected because of their passage through the HDC column. AUC results gave (sedimentation) radii that were generally very close to the manufacturer's radii. In that case, a small underestimation of particle sizes may have been due to an overestimation of the particle densities used to estimate particle sizes in the Stokes' law calculations. Indeed, particle densities based upon the ENP core material were used without taking into account the outer shell stabilisers, which could result in a lower overall density and thus a larger calculated radius [59]. Finally, only metal based ENPs with radii >10–20 nm can be detected by SP-ICP-MS. For the nAg, the physical sizes determined by Sp-ICP-MS were very close to the manufacturers' nominal sizes.

**Table III-2. Engineered nanoparticle (ENP) radii given by the manufacturer (nm) and measured radii obtained from static (SLS) and dynamic light scattering (DLS), analytical ultracentrifugation (AUC) and single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS).** On-line measurements were made after passage of a single particle standard through HDC column, whereas off-line measurements refer to direct injections of the standards into the detector. Standard deviations are given for all measurements,  $n = 3$ . BDL, below the particle size detection limits of the instruments; NP, not possible; ND, not determined;  $R$ , radius;  $R_g$ , radius of gyration;  $R_h$ , radius of hydration

Nanoparticle types	Manufacturer's radius (nm)	On-line SLS ( $R_g$ )	On-line DLS ( $R_h$ )	Off-line DLS ( $R_h$ )	Off-line AUC ( $R$ )	Off-line SP-ICP-MS ( $R$ )
nAu	10	BDL	$11.9 \pm 0.1$	$11.1 \pm 0.1$	$8.0 \pm 2.9$	BDL
nAg (NanoComposix)	20	BDL	$24.5 \pm 0.9$	$20.3 \pm 0.1$	ND	$19.6 \pm 0.3^A$
nAg (Sigma)	20	BDL	$21.9 \pm 0.4$	$23.1 \pm 0.3$	ND	$19.7 \pm 0.3^A$
nPS	12	BDL	$15.6 \pm 0.1$	$19.0 \pm 0.1$	$12.1 \pm 2.1$	NP
	20	$17.3 \pm 0.4$	$22.0 \pm 0.2$	$24.1 \pm 7.4$	ND	NP
	21.5	$17.2 \pm 0.4$	$22.3 \pm 0.2$	$19.8 \pm 1.7$	$16.6 \pm 2.8$	NP
	25	$23.4 \pm 0.4$	$25.8 \pm 0.3$	$28.6 \pm 6.0$	$24.5 \pm 2.9$	NP
	27	$23.2 \pm 0.3$	$23.6 \pm 0.3$	$26.5 \pm 6.5$	ND	NP
	30	$33.2 \pm 0.4$	$31.5 \pm 0.6$	$37.8 \pm 0.9$	ND	NP
	40	$41.8 \pm 0.3$	$37.7 \pm 0.7$	$45.2 \pm 0.8$	$36.2 \pm 6.1$	NP
	60	$66.9 \pm 0.3$	$49.1 \pm 1.5$	$63.2 \pm 1.0$	ND	NP

<sup>A</sup> nAg concentrations used for SP-ICP-MS were  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.3.2 Chromatographic evaluation of the ENP standards

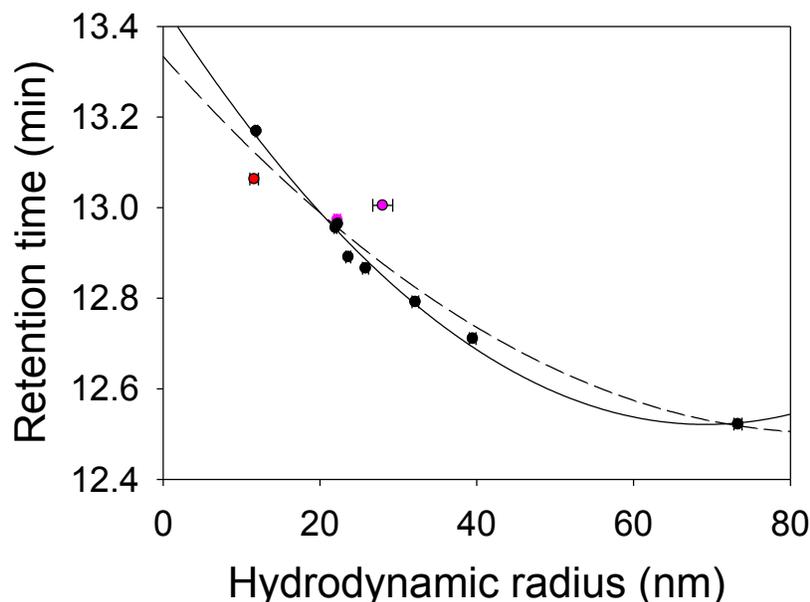
Particle standards were first run individually. Visual analysis of the chromatographs (Supplementary material, Fig. S3.2) showed that peaks were symmetrical and narrow. Because only a single peak was obtained in each case, this is again strong evidence that the ENP standards were monodisperse, even after transport through the HDC column. Indeed, asymmetry factors ( $F_a$ ) corresponding to the ratio of the back half-width of the peak to the front half-width of the peak taken at 10% maximal intensity [60, 61] were calculated (Table III-3). Peak symmetries are considered to be excellent when they are between 0.95 and 1.05, and acceptable when in the ranges of 0.8–0.95 or 1.05–1.20. Polydispersity indices (standard deviation  $\div$  mean) that were obtained with the off-line DLS measurements were also provided. The data showed that the nAu was the least monodisperse of the ENPs. In addition to its intrinsic polydispersity, the larger asymmetry factor may have been due to its small nominal size, which results in slightly longer elution times. Nevertheless, it is possible to conclude that the standards were initially all very monodisperse and that they were able to pass through the column with relatively few interactions with the HDC stationary phase.

**Table III-3. Polydispersity of the engineered nanoparticles (ENP) standards after elution through the hydrodynamic chromatography column.** Asymmetry factors correspond to the ratio of the back half-width of the peak to the front half-width of the peak at its 10% maximal intensity. Polydispersities are calculated from the off-line dynamic light scattering (DLS) (standard deviation,  $\sigma$ , divided by the mean hydrodynamic radii,  $R_h$ ).

Nanoparticles	Manufacturer's Radius	Polydispersity index	Asymmetry Factor $F_a$
nAu	10	$0.15 \pm 0.02$	$2.00 \pm 0.05$
nAg (NanoComposix)	20	$0.05 \pm 0.01$	$0.77 \pm 0.09$
nAg (Sigma)	20	$0.06 \pm 0.01$	$0.52 \pm 0.03$
nPS	10	$0.05 \pm 0.01$	$0.68 \pm 0.04$
	20	$0.09 \pm 0.01$	$1.19 \pm 0.07$
	21.5	$0.01 \pm 0.00$	$1.23 \pm 0.06$
	25	$0.04 \pm 0.01$	$1.13 \pm 0.05$
	27	$0.06 \pm 0.01$	$1.21 \pm 0.06$
	30	$0.06 \pm 0.01$	$1.08 \pm 0.03$
	40	$0.02 \pm 0.01$	$1.35 \pm 0.03$
	60	$0.00 \pm 0.00$	$1.33 \pm 0.06$

### 3.3.3 Column calibration

Calibration curves were prepared from the measured retention times and the measured hydrodynamic radii (on-line DLS) for the nPS (Fig.3.1). An excellent polynomial fit of the experimental data was obtained over the size range of 20-80 nm ( $R^2 = 0.98$ ). The observed, non-linear relationship between the retention times and hydrodynamic radii is predicted by theory and because of the fact that the velocity profile of the eluent in the column is not flat but parabolic [19, 22]. Retention times were extremely reproducible from one day to another (coefficient of variation of 0.10 %,  $n = 30$ ).



**Fig. 3.1.** Calibration curve based on the nanopolystyrene nPS (black points), nAu (red point) and nAg (pink points) standards. The curve was prepared based upon the measured hydrodynamic radii of the standards (solid line: nPS only; dotted line: all engineered nanoparticles (ENPs)). A similar curve using the nominal radii provided by the manufacturers is provided in Fig. S3.3.

Addition of the nAg and the nAu data to the nPS calibration curve (Fig. 3.1) weakened the  $R^2$  (0.91 as opposed to 0.98). Note, however, that when the manufacturers' radii were employed for the calibration (Supplementary material, Fig. S3.3), the coefficients of determination were excellent, increasing to 0.98 and 0.97 when plotted against the respective retention times of the nPS and of all the ENPs. The small decrease in the coefficient of determination that was observed when nAu and nAg were included likely resulted from the additional experimental error due to their DLS measurements. Indeed, it can be more difficult to measure the sizes of nAg and nAu as compared to nPS given that they are slightly more prone to dissolution or agglomeration. Light scattering measurements of the nAg gave radii that were slightly larger than nominal radii (Table III-2) (and the other analytical techniques). The above data suggest that it may be necessary to use both retention times and independent particle sizing techniques (e.g. DLS, SLS and SP-ICP-MS) in order to get accurate determinations of ENP sizes.

### 3.3.4 Reproducibility analysis

Retention times and sizes were measured for 2 mg L<sup>-1</sup> nAg samples (NanoComposix) at three different pH values over 18 days. No buffer was used, however pH measurements were verified before and after each experiment. The reproducibility of the retention times and the signal intensities are indicated by the standard deviations of repeated measurements whereas the  $R_h$  values provide an indicator of the consistency of the light scattering detector over time. Overall, retention times and particle radii were fairly constant, although at the longest equilibration times, a slight increase in retention times may have occurred, consistent with a measured decrease in  $R_h$  (Table III-4). Given the general overall consistency in the analytical signals, it appears that a slight dissolution of the nAg was occurring (ENP sizes determined by DLS decreased slightly with time; Student–Newman–Keuls,  $P < 0.05$ ), rather than there being any significant decrease in column reproducibility over time ( $\leq 18$  days).

**Table III-4. Effect of the sample pH on retention times and hydrodynamic radii ( $R_h$ ) determined for 2 mg L<sup>-1</sup> of citrate coated nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm).** Superscripted letters for a given pH value refer to significant differences obtained by the Student-Newman-Keuls test at  $P < 0.05$ . HDC, hydrodynamic chromatography;  $R$ , radius.

Analysis day	Sample pH	Retention time (min)	HDC $R$ (nm)	$R_h$ (nm)	Signal intensity (V)
t	6.1	12.95 ± 0.02	19.8 ± 1.5	30.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.01
t+1		12.96 ± 0.05	19.3 ± 3.2	30.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.05
t+4		12.92 ± 0.01	21.8 ± 0.4	28.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.04
t+10		12.96 ± 0.03	19.3 ± 1.9	28.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.04
t+18		12.96 ± 0.04	19.3 ± 2.7	26.6 ± 0.6 <sup>c</sup>	0.34 ± 0.04
t		7.0	12.93 ± 0.01	21.1 ± 0.8	35.0 ± 0.5 <sup>a</sup>
t+1	12.93 ± 0.03		21.1 ± 2.2	35.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.04
t+4	12.93 ± 0.01		21.1 ± 0.8	31.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.04
t+10	12.94 ± 0.02		20.5 ± 1.2	26.9 ± 0.6 <sup>c</sup>	0.36 ± 0.04
t+18	12.95 ± 0.03		19.8 ± 1.9	28.8 ± 0.6 <sup>d</sup>	0.35 ± 0.05
t	8.2		12.96 ± 0.01	19.3 ± 0.7	31.5 ± 0.3 <sup>a</sup>
t+1		12.93 ± 0.03	21.1 ± 2.2	30.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.05
t+4		12.94 ± 0.02	20.4 ± 1.2	28.9 ± 0.3 <sup>c</sup>	0.31 ± 0.04
t+10		12.96 ± 0.02	19.3 ± 1.5	29.1 ± 0.6 <sup>c</sup>	0.33 ± 0.06
t+18		12.95 ± 0.02	19.8 ± 1.5	28.0 ± 0.6 <sup>d</sup>	0.33 ± 0.08

### 3.3.5 Role of sample concentration

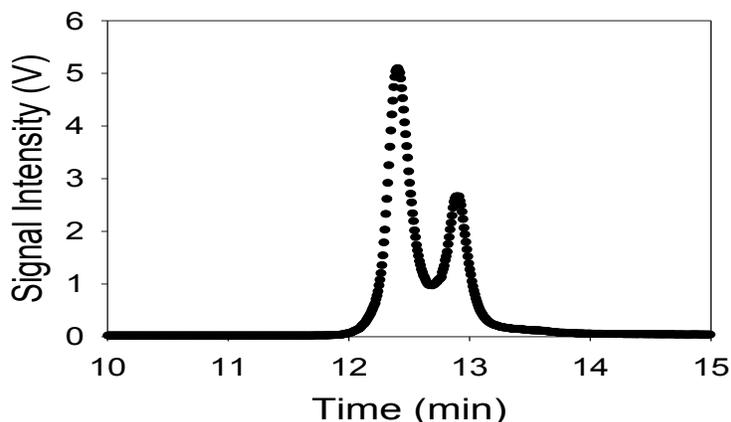
The effect of ENP concentration on retention times, signal intensities and radii was also verified (Table III-5). For concentrations between 5 and 500 mg L<sup>-1</sup>, signal intensity increased with ENP concentration, with relatively good correlation coefficients ( $R^2 = 0.86$ , nAu;  $R^2 = 0.98$ , nAg;  $R^2 = 0.99$ , nPS). As above, no significant differences in retention times or HDC radii were observed with increasing concentration (one-way analysis of variance, ANOVA,  $P > 0.05$ ), although an increase in the hydrodynamic radii was observed by DLS (nAg and nPS, Student-Newman-Keuls,  $P < 0.05$ ). This result, in addition to the reproducibility analysis (above), indicated that light scattering was probably a more sensitive indicator of particle size changes than were retention times. Nevertheless, the observed trends in particle size with concentration were not consistent among the different particle types (cf. nAu and nAg) nor was there an obvious explanation for the observed decrease in particle size with increasing particle concentration (nAg, nPS). It is likely that the differences were due to data quality with increasing signal to noise; however, the relationship is not straightforward given that signal intensity depends on both particle size and particle composition. For the on-line light scattering detector, it was important to have an analytical signal that was substantially greater than the detector noise of  $\approx 0.02$  V. However, whereas higher concentrations give a better signal to noise, the potential for ENP agglomeration also increases.

**Table III-5. Effects of engineered nanoparticle (ENP) concentration on hydrodynamic chromatography (HDC) retention times and particle radii determined by light scattering.** Superscripted letters for a given ENP refer to significant differences obtained by the Student-Newman-Keuls test at  $P < 0.05$ .  $R$ , radius;  $R_g$ , radius of gyration;  $R_h$ , hydrodynamic radius

ENP (radii)	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Retention time (min)	HDC $R$ (nm)	$R_g$ (nm)	$R_h$ (nm)	Signal intensity (V)
<b>nAu</b> <b>10 nm</b>	50	13.19 ± 0.03	13.7 ± 0.1	-	15.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.03
	25	13.17 ± 0.01	13.6 ± 0.1	-	13.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.03
	5	13.16 ± 0.03	13.6 ± 0.2	-	13.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.07 ± 0.01
<b>nAg</b> <b>20 nm</b>	20	12.88 ± 0.03	24.5 ± 2.1	-	20.1 ± 0.8 <sup>a</sup>	3.16 ± 0.06
	10	12.87 ± 0.05	25.2 ± 3.4	-	22.3 ± 0.5 <sup>b</sup>	1.49 ± 0.16
	5	12.87 ± 0.01	25.2 ± 0.5	-	24.0 ± 0.3 <sup>c</sup>	0.67 ± 0.03
<b>nPS</b> <b>40 nm</b>	500	-	-	-	-	saturation
	250	12.67 ± 0.02	48.0 ± 2.3	43.4 ± 0.3	36.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	5.76 ± 0.36
	100	12.68 ± 0.01	46.9 ± 0.8	43.4 ± 0.3	39.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.27 ± 0.07
	50	12.69 ± 0.01	44.7 ± 1.5	42.9 ± 0.3	40.7 ± 0.4 <sup>c</sup>	1.13 ± 0.07
	25	12.69 ± 0.01	45.8 ± 0.8	42.9 ± 0.3	41.8 ± 0.4 <sup>d</sup>	0.64 ± 0.01
	10	12.69 ± 0.03	45.8 ± 4.1	42.1 ± 0.3	46.0 ± 0.4 <sup>e</sup>	0.23 ± 0.01

### 3.3.6 ENP mixtures

HDC and other size exclusion chromatographies do not have the same resolving capability as other chromatographic techniques. For example, it was not possible to completely resolve a 60-nm nPS from a 20-nm nAg (Fig. 3.2), although this may have been partly due to the high concentrations that were required to get good signal to noise from the light scattering detectors. At lower, more environmentally relevant concentrations, greater resolution of the ENPs may have been possible, because at the lower concentrations, less co-elution should occur due to the smaller peak widths.

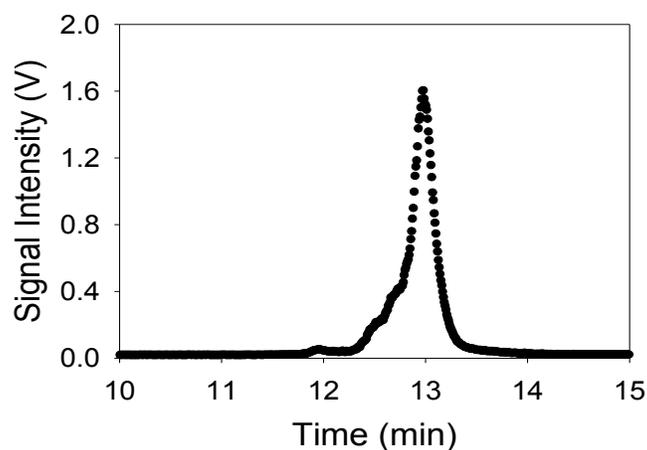


**Fig. 3.2.** Chromatogram of a mixture of  $10 \text{ mg L}^{-1}$  nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm) and  $30 \text{ mg L}^{-1}$  of a nanopolystyrene (nPS) (Bangs, nominal radius of 60 nm).

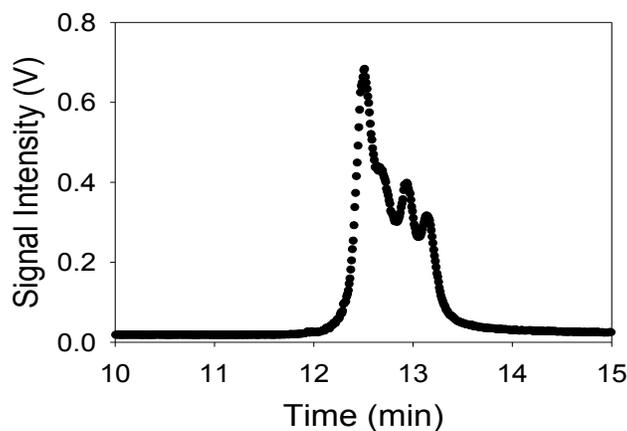
The ability of the HDC to separate ENP mixtures of different types and sizes was further evaluated. First,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  of each of four different ENPs were mixed and separated (Table III-6a). Clearly, resolution of the four particle types was difficult to obtain; nAg showed the highest light scattering intensity, followed by nAu and then the two nPS. Particle size was also critical with the larger particles scattering more light than the smaller ones, which may explain the poor agreement between the nominal sizes and the  $R_h$  determined for the nAu and the nAg in Table III-6a. The fact that the peaks were not clearly distinguishable (just enough to be able to observe four maximum intensities for the four ENP retention times) limited the ability of the DLS detector to determine particle radii. Clearly, the ability to resolve different particle sizes and compositions will depend greatly on the size and nature of the ENPs, the number of components and the sample matrix. When concentrations of the ENPs in the mixtures were varied in order to obtain similar peak intensities, more individual components could be resolved (Table III-6b, c).

**Table III-6. Roles of engineered nanoparticle (ENP) concentrations, particle types and particle sizes on the separation and measured radii (determined from retention times, radius of gyration,  $R_g$  and hydrodynamic radius,  $R_h$ ) obtained for a four particle mixture.** Superscripted letters for a given ENP refer to significant differences obtained by the Student-Newman-Keuls test at  $P < 0.05$ : HDC, hydrodynamic chromatography; R, radius.

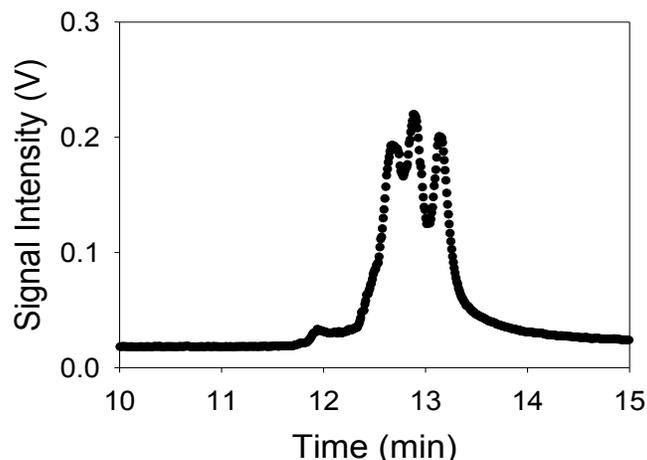
Mixture	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Retention time (min)	HDC $R$ (nm)	$R_g$ (nm)	$R_h$ (nm)	Signal intensity (V)
nAu 10nm	10	13.10 ± 0.05	14.0 ± 0.1	-	22.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.11
nAg 20nm	10	12.96 ± 0.05	19.5 ± 3.9	-	27.8 ± 0.6 <sup>c</sup>	1.56 ± 0.08
nPS 40nm	10	12.71 ± 0.02	42.5 ± 3.2	32.3 ± 0.3	38.0 ± 1.3 <sup>f</sup>	0.41 ± 0.04
nPS 60nm	10	12.51 ± 0.03	75.1 ± 5.4	58.7 ± 0.3	64.1 ± 0.9 <sup>h</sup>	0.21 ± 0.02



nAu 10nm	29	13.14 ± 0.01	13.7 ± 0.1	-	14.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.05
nAg 20nm	2	12.94 ± 0.02	20.5 ± 1.2	-	21.5 ± 0.3 <sup>d</sup>	0.39 ± 0.02
nPS 40nm	14	12.68 ± 0.01	46.9 ± 1.1	46.2 ± 0.3	28.5 ± 0.5 <sup>g</sup>	0.43 ± 0.05
nPS 60nm	6	12.51 ± 0.01	73.6 ± 1.5	63.0 ± 0.3	60.2 ± 0.7 <sup>i</sup>	0.67 ± 0.05



Mixture	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Retention time (min)	HDC <i>R</i> (nm)	<i>R<sub>g</sub></i> (nm)	<i>R<sub>h</sub></i> (nm)	Signal intensity (V)
nAu 10nm	30	13.14 ± 0.02	13.7 ± 0.0	-	14.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.03
nAg 20nm	1	12.89 ± 0.03	23.9 ± 2.4	-	32.2 ± 0.3 <sup>e</sup>	0.22 ± 0.05
nPS 40nm	8	12.67 ± 0.05	48.0 ± 6.1	37.6 ± 0.3	30.2 ± 0.6 <sup>g</sup>	0.19 ± 0.02
nPS 60nm	3	12.53 ± 0.01	70.7 ± 2.1	54.2 ± 0.1	69.9 ± 1.1 <sup>j</sup>	0.09 ± 0.01



Fractions that were collected after the separation of two of the ENP mixtures (i.e. mixtures corresponding to Fig. 3.2 and Table III-6b) were also analysed using the off-line detectors. In general, both the on-line and off-line light scattering confirmed that the separation of the ENP mixtures was occurring, as expected, in the order of decreasing particle size (Table SIII-2, Table III-7). Radii obtained using both the off-line and on-line DLS decreased with time, in agreement with HDC separation principles and in reasonable agreement with the calibration curve that was obtained for the individual particle standards (Fig. 3.1). SP-ICP-MS data were also consistent with those determined by DLS and retention times. Size distributions corresponding to the SP-ICP-MS data in Table III-7 are provided in the Supplementary material (Fig. S3.3).

**Table III-7. Separation of an engineered nanoparticle (ENP) mixture (composition corresponding to Table III-6b) and fraction characterisation using off-line detectors.**

Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) data were determined from the Ag signal, when Ag was above detection limits. On-line dynamic light scattering (DLS) data are provided only for the signals of maximum scattering intensity (for which the signal to noise ratio was high).  $R$ , radius;  $R_h$ , hydrodynamic radii

<b>Fraction number</b>	<b>Retention time (min)</b>	<b>SP-ICP-MS <math>R</math> (nm)</b>	<b>DLS off-line <math>R_h</math> (nm)</b>	<b>DLS on-line <math>R_h</math> (nm)</b>
1	12.0-12.1		61.2 ± 3.7	
2	12.1-12.2		54.5 ± 4.7	
3	12.2-12.3		60.6 ± 3.6	
4	12.3-12.4		51.0 ± 2.7	59.1 ± 0.7
5	12.4-12.5		54.7 ± 0.3	
6	12.5-12.6		54.2 ± 1.1	52.1 ± 0.6
7	12.6-12.7		41.9 ± 1.6	
8	12.7-12.8		29.3 ± 1.7	
9	12.8-12.9	26.1 ± 0.2	32.8 ± 5.4	22.6 ± 0.3
10	12.9-13.0	30.4 ± 0.2	24.1 ± 1.4	
11	13.0-13.1	27.7 ± 0.2	21.1 ± 4.8	13.2 ± 0.2
12	13.1-13.2	24.7 ± 0.1	42.9 ± 29.5	
13	13.2-13.3		13.7 ± 2.2	
14	13.3-13.4		12.6 ± 1.8	
15	13.4-13.5		18.4 ± 3.6	
16	13.5-13.6		21.8 ± 6.7	
17	13.6-13.7			
18	13.7-13.8			
19	13.8-13.9			
20	13.9-14.0			

### 3.3.7 Analysis of a spiked natural river water sample

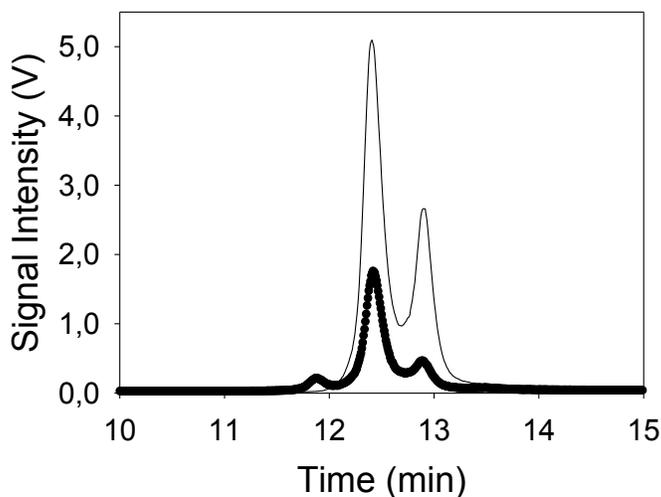
One of the major difficulties with detecting ENPs in natural waters results from the concomitant presence of natural nanoparticles, including fulvic and humic acids ( $\approx 2$ –5 nm [62]) and natural colloids [63]. Furthermore, repartitioning of the ENPs may occur due to dissolution and agglomeration, among other processes [49, 57]. In this context, the observation of Ag in the 1–100-nm size fraction can be due to the real presence of nAg or due to the adsorption or precipitation of  $\text{Ag}^+$  or nAg in the colloidal size fraction [14]. Similarly, dissolved Ag determined by SP-ICP-MS refers to  $\text{Ag}^+$  but also to any Ag

complexes or Ag nanoparticles with diameters smaller than those that can be distinguished as ENPs ( $\approx 20$  nm using the method described above) [14, 16, 49].

HDC was used for the separation and detection of the four ENP mixtures (as per Table III-6b) and the nAg–nPS mixture (as per Fig. 3.2) that were spiked into a natural water sample (0.45- $\mu\text{m}$  filtered water taken from the Ste Rose River in Laval, QC, on 24 September 2013). The resulting HDC separations are presented in Tables III-8 and III-9. Once again, SP-ICP-MS data were obtained for the nAg; calculated SP-ICP-MS size distributions are provided in Figs S3.4 and S3.5. The control chromatogram (without the addition of ENPs) is presented in Fig. S3.6. The fractions collected after the separation of the spiked ENPs were analysed using off-line detection.

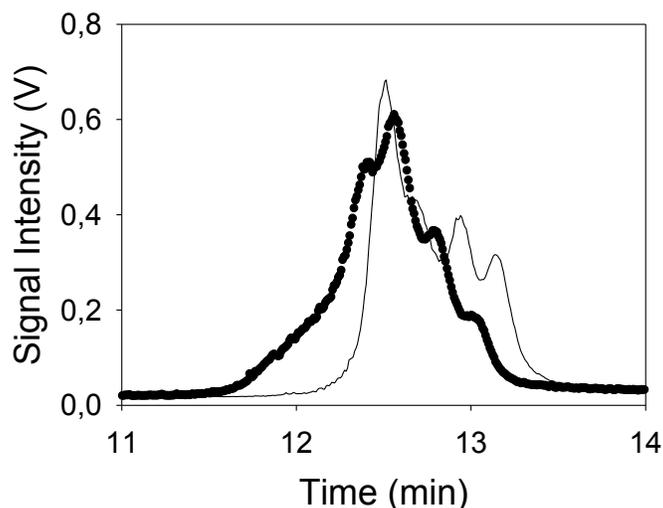
**Table III-8. Separation of an engineered nanoparticle (ENP) mixture of  $10 \text{ mg L}^{-1}$  nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm) and  $30 \text{ mg L}^{-1}$  of nanopolystyrene (nPS, Bangs, nominal radius of 60 nm) (cf. Fig. 3.2) spiked into a natural water.** Fraction characterisation was performed using analytical ultracentrifugation (AUC), single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) (Ag) and dynamic light scattering (DLS) (off-line and on-line). The chromatogram is shown below the table (the pale line reproduces the same mixture spiked in Milli-Q water).  $R$ , radius;  $R_h$ , hydrodynamic radii

Fraction number	Retention time (min)	AUC $R$ (nm)	SP-ICP-MS $R$ (nm)	DLS off-line $R_h$ (nm)	DLS on-line $R_h$ (nm)
1	12.0-12.1			$67.0 \pm 7.4$	
2	12.1-12.2			$65.9 \pm 6.6$	
3	12.2-12.3			$61.9 \pm 3.2$	
4	12.3-12.4			$57.8 \pm 6.4$	$56.5 \pm 0.9$
5	12.4-12.5			$64.1 \pm 4.7$	$50.7 \pm 1.1$
6	12.5-12.6			$56.2 \pm 7.4$	$60.9 \pm 0.8$
7	12.6-12.7			$58.6 \pm 6.7$	
8	12.7-12.8		$20.1 \pm 0.7$	$59.5 \pm 17.0$	
9	12.8-12.9	$20.7 \pm 0.1$	$20.7 \pm 0.6$	$36.3 \pm 6.1$	$33.6 \pm 0.4$
10	12.9-13.0	$21.0 \pm 0.1$	$24.7 \pm 4.1$	$33.8 \pm 14.1$	$30.4 \pm 0.4$
11	13.0-13.1	$20.8 \pm 0.1$	$22.0 \pm 1.0$	$31.0 \pm 11.5$	
12	13.1-13.2			$29.1 \pm 7.2$	
13	13.2-13.3			$46.0 \pm 5.2$	
14	13.3-13.4			$38.7 \pm 10.5$	
15	13.4-13.5			$45.1 \pm 5.8$	



**Table III-9. Separation of an engineered nanoparticle (ENP) mixture (29 mg L<sup>-1</sup> of 10 nm nAu, 2 mg L<sup>-1</sup> of 20 nm nAg, 40 mg L<sup>-1</sup> of 40 nm nanopolystyrene (nPS) and 6 mg L<sup>-1</sup> of 60 nm nPS) (cf. Table III-6B) spiked into a natural water. Fraction characterization was performed using analytical ultracentrifugation (AUC), single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) (Ag signal) and dynamic light scattering (DLS) (on-line and off-line). The chromatogram is shown below the table (the pale line reproduces the same mixture spiked in Milli-Q water). *R*, radius; *R<sub>h</sub>*, hydrodynamic radii**

Fraction number	Retention time (min)	AUC <i>R</i> (nm)	SP-ICP-MS <i>R</i> (nm)	DLS off-line <i>R<sub>h</sub></i> (nm)	DLS on-line <i>R<sub>h</sub></i> (nm)
1	12.0-12.1				
2	12.1-12.2				
3	12.2-12.3			51.1 ± 12.4	
4	12.3-12.4			46.6 ± 7.0	
5	12.4-12.5			45.5 ± 16.5	51.4 ± 0.8
6	12.5-12.6			42.9 ± 7.9	41.8 ± 0.7
7	12.6-12.7			40.2 ± 11.9	
8	12.7-12.8	17.9 ± 0.1	20.3 ± 0.2	44.1 ± 16.1	29.4 ± 0.4
9	12.8-12.9	17.3 ± 0.1	20.9 ± 0.1	30.6 ± 7.9	
10	12.9-13.0		20.5 ± 0.1	26.6 ± 4.6	
11	13.0-13.1		19.3 ± 0.1	25.0 ± 10.8	21.8 ± 0.4
12	13.1-13.2			19.2 ± 8.9	
13	13.2-13.3			13.0 ± 3.8	
14	13.3-13.4			25.4 ± 16.9	
15	13.4-13.5			34.1 ± 6.0	
16	13.5-13.6			19.1 ± 9.9	
17	13.6-13.7			34.3 ± 6.1	
18	13.7-13.8			37.1 ± 6.3	
19	13.8-13.9				
20	13.9-14.0				



In the river water matrix, the HDC column was indeed able to acceptably separate both of the spiked ENP mixtures (Tables III-8, III-9). Indeed, both retention times (12.7 to 13.1 min) and off-line radii measurements (SP-ICP-MS, AUC) were similar to those detected in Milli-Q water and during the column calibration. The observation that the radii of nAg were in the range of their nominal sizes and their similarity to the results obtained in Milli-Q water suggested that little or no particle transformation (such as dissolution or agglomeration) was occurring in the natural water. Nonetheless, both on-line and off-line DLS gave radii that were larger than both the nominal particle sizes and sizes obtained by SP-ICP-MS and AUC (fractions 8–11, Tables III-8, III-9). Because the polydispersity of the sample fractions is reduced following their passage through the HDC column, it is likely that the differences can be attributed to either the different nature of the measurements (DLS,  $R_h$ ; AUC, sedimentation  $R$ ; SP-ICP-MS, physical radius of Ag atoms) or to the simplifying calculations used to calculate  $R$  (AUC and SP-ICP-MS did not include the citrate stabiliser or the adsorbed natural organic matter in either the density (AUC) or the mass (SP-ICP-MS) calculations). Given the difficulties involved with ENP size determinations, especially using such small ( $\approx 75 \mu\text{L}$ ) fraction volumes, it would be speculative to attempt to draw any firmer conclusions based upon the available data.

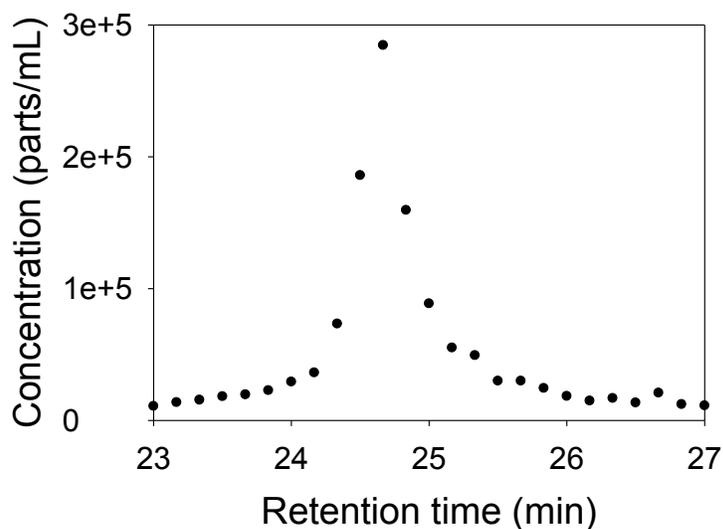
As expected, additional peaks were observed for the chromatograms that were acquired in the natural waters as compared to those obtained in Milli-Q water and it is highly likely that these peaks corresponded to natural colloidal particles. Peaks were also clearly identified in the control chromatograms (e.g. river water with no added ENP, Fig. S3.6). Although the presence of natural colloids has the ability to mask the ENP signal for non-specific detectors such as DLS or AUC, the HDC separation was clearly beneficial. For example, for a river water sample spiked with  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  of nAg, off-line DLS gave multiple peaks, none of which corresponded to the nAg. In contrast, when the sample was eluted through the HDC column, the background peaks were separated and the nAg (Table III-10), with a radius of  $22.1 \pm 6.1 \text{ nm}$ , could be identified in the eluent fractions collected between 12.9 and 13.1 min.

**Table III-10. Dynamic light scattering (DLS) size distributions of 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  of nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm) spiked in the river water sample: (a) distribution before separation on the hydrodynamic column (HDC) column; (b) size of the sample fraction collected between 12.9-13.1 min.**

nAg sample	Hydrodynamic radii (nm)	% mass
(a)	$8.1 \pm 0.4$	$51.8 \pm 2.5$
	$40.3 \pm 6.6$	$15.9 \pm 2.6$
	$279.5 \pm 22.1$	$32.3 \pm 2.6$
(b)	$22.1 \pm 2.7$	100

### 3.3.8 Detection of low nAg concentrations using HDC coupled to on-line SP-ICP-MS

The work above was designed to demonstrate the capacity of the HDC to separate ENPs, the reproducibility of the technique and the role of matrix interferences. Clearly, ENPs will be found at much lower concentrations in environmental samples. Furthermore, the HDC dilutes samples by  $\approx 500\times$ , depending upon particle size and elution volumes. As seen above, very few particle sizing techniques, including the AUC and the DLS, can be used for ENP concentrations below several hundred micrograms per litre, depending upon particle size and composition. Indeed, the only detector examined here that has the capacity to quantify ENPs at environmentally relevant concentrations is the ICP-MS, run in regular or single particle mode. Indeed, nAg has previously been detected at environmentally realistic concentrations using AF4 coupled to both ICP-MS [58] and SP-ICP-MS [14]. Therefore, the SP-ICP-MS was directly connected to the HDC column, in order to obtain information on the nAg concentrations and sizes. In this case,  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  of the nAg was spiked into the river water and the elution was performed using a reduced flow rate of  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ . Owing to the lower flow rate (50% of that used above) and the added tubing required for the coupling, the observed elution times were longer than those observed previously. Nonetheless, it was clear that an excellent signal to noise ratio could be obtained for the Ag signal seen at 24.7 min (Fig. 3.3, complete chromatogram shown in Fig. S3.7). By running the ICP-MS in single particle detection mode, a particle radius of  $20.3 \pm 0.6 \text{ nm}$  was determined, consistent with the nominal size and with sizes determined previously by SP-ICP-MS, DLS and AUC (Table III-2).



**Fig. 3.3.** Partial chromatogram (concentration in particles (parts) per mL in function of time) of river water sample spiked with  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  of nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm) following separation by hydrodynamic chromatography (HDC) and detection using single particle inductively coupled plasma mass spectrometer (SP-ICP-MS). A particle radius of  $20.3 \pm 0.6$  nm was determined for the Ag signal detected at 24.7 min using SP-ICP-MS. The entire chromatogram is presented in Fig. S3.7.

### 3.4 Conclusions

The capabilities of the HDC column to separate ENPs according to their sizes have been evaluated by measuring retention times and comparing calibrated times with sizes determined by several on-line (DLS, SLS) and off-line (DLS, AUC, SP-ICP-MS) detectors. Among the off-line detectors, the most straightforward and easy to use detector was the (backscattering) DLS detector (throughput of a few minutes per sample), even though the AUC (throughput of hours per sample) and SP-ICP-MS (throughput of minutes per sample) detectors gave results that were consistent with expected particle sizes. As a separation technique, HDC results were relatively straightforward to interpret, with ENP retention times increasing monotonically as a function of decreasing particle sizes. In addition, the HDC removed much of the background signal due to environmental colloids and natural organic matter, allowing for a reasonable separation of the ENPs. Although the use of on-line detectors provided the most direct confirmations

of ENP size, the light scattering detectors were limited by their relatively high detection limits (i.e. minimum of  $\approx 200 \mu\text{g L}^{-1}$ ), especially when compared to expected environmental concentrations of the ENP. Given that the detection of ENPs in realistic natural samples will require sensitive detectors such as the ICP-MS or SP-ICP-MS, some initial results demonstrating clearly the ability of HDC-SP-ICP-MS to separate, characterise and quantify nAg in a river water sample have also been provided. Future developments will be required in order to optimise the technique for microgram or even nanogram per litre detection limits, especially for the smallest ENPs that are currently below the size detection limits of the SP-ICP-MS (diameters of 10–20 nm). Nonetheless, the HDC technique clearly has the capacity to complement more frequently used separation techniques, such as the AF4.

### 3.5 Supplementary material

#### 3.5.1 Composition of the eluent

The effect of eluent composition was verified for the 20 nm nAg since it was potentially the most difficult ENP to analyse (due to ongoing dissolution/agglomeration). All eluents had a pH of 7.5 ( $\pm 0.2$ ) and a  $\text{NaNO}_3$  concentration of 1 mM. Radii obtained by injecting  $2 \text{ mg L}^{-1}$  of nAg had a much greater signal to noise ( $\approx 0.02 \text{ V}$ ) and were less accurate than those measured at  $20 \text{ mg L}^{-1}$ .

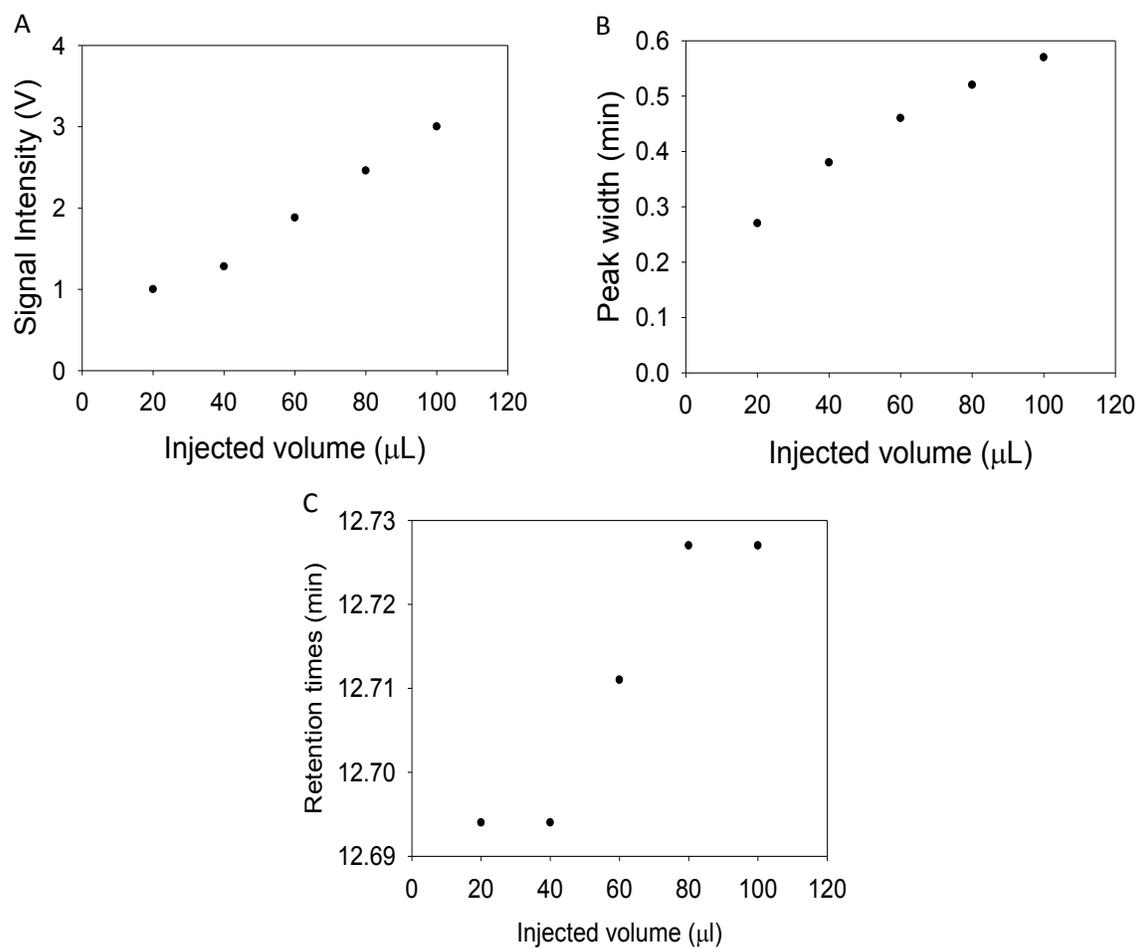
**Table SIII-1. Hydrodynamic radii obtained for nAg (Sigma) with a nominal radius of 20 nm when analysed with the on-line HDC-DLS. All eluents contained 1 mM  $\text{NaNO}_3$  at pH 7.5 ( $\pm 0.2$ ).**

Eluent		nAg concentrations ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Nanoparticles	
SDS concentrations (%w/w)	Triton X-100 concentrations (%w/w)		$R_h$ (nm)	Signal intensity (V)
0	0	20	$20.8 \pm 1.0$	2.01
0.0013	0.0013		$20.7 \pm 1.2$	2.81
0.0013	0.0013		$42.1 \pm 1.1$	0.36
0.0025	0.0025	2	$30.5 \pm 0.6$	0.34
0.01	0.01		$36.7 \pm 0.8$	0.39
0.05	0.01		$34.4 \pm 0.7$	0.37

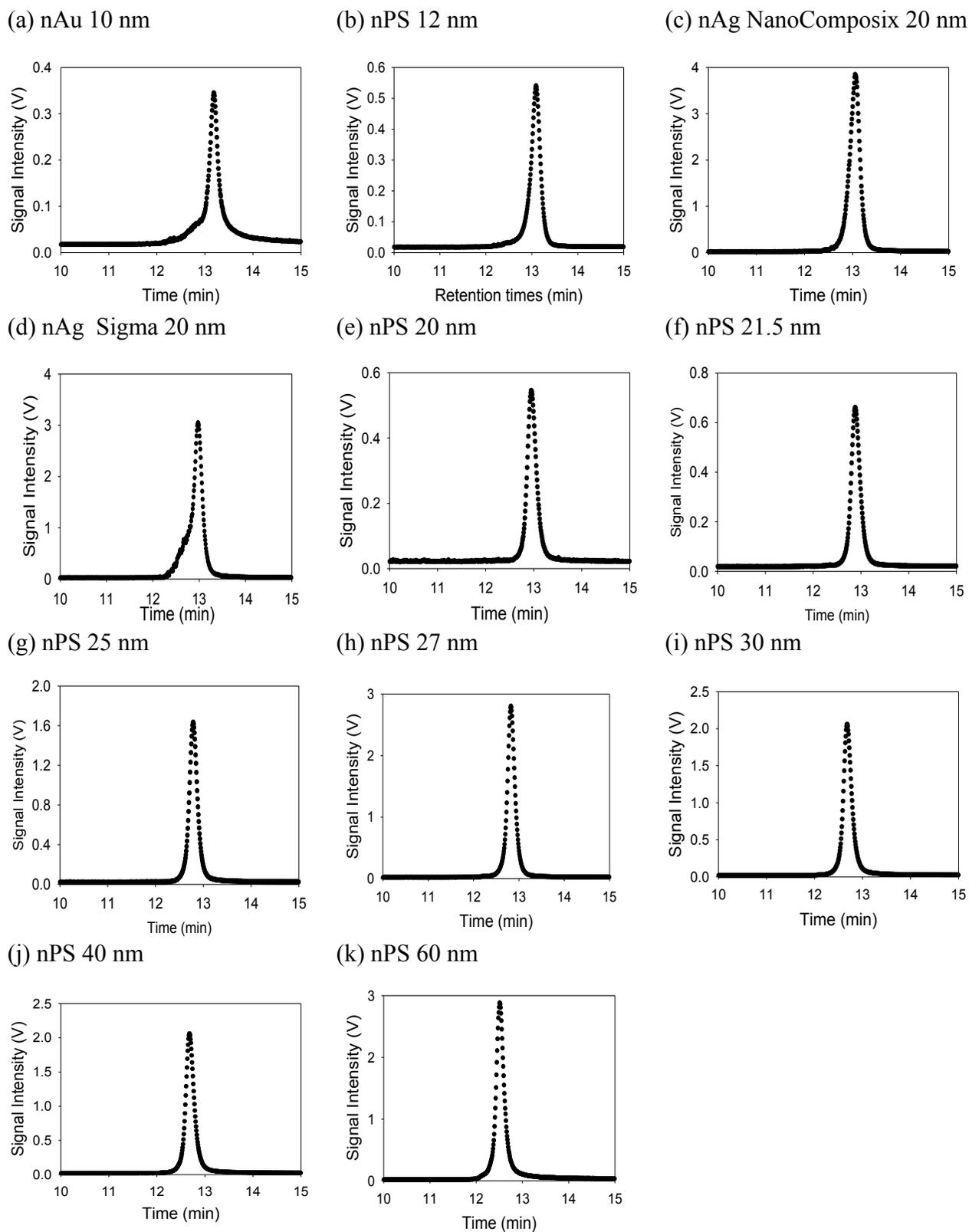
Other preliminary work on the optimisation of the eluent composition showed that the nanoparticles appeared to be stable over the pH range of 6.5 to 8. Furthermore, in the absence of added surfactant, particle agglomeration was observed for eluent  $\text{NaNO}_3$  concentrations that exceeded 0.1 mM. In order to ensure minimal perturbation of environmental samples, a pH of 7.5 and ionic strength of 1 mM were selected for general use in order to fairly closely mimic a natural water. Maximum recovery of the ENP was obtained when the surfactants SDS and Triton X-100 were added to the eluent. We assume that the surfactant addition minimised ENP adsorption onto larger particles and colloids. Nonetheless, when the SP-ICP-MS was used as a detector, surfactant concentrations had to be minimised due to the formation of emulsions during the sample nebulisation step. Based upon all of the previous considerations and the results in Table SIII-1, an eluent composition of 1 mM  $\text{NaNO}_3$ , 0.0013 % w/w SDS, 0.0013 % w/w Triton X-100 at a pH of 7.5 was used for all subsequent analyses. Indeed, a further increase in the surfactant concentrations above 0.0013% w/w did not result in a substantial increase of the peak intensity (Table SIII-1).

### **3.5.2 Role of injection volume**

To some extent, detection limits can be decreased by increasing sample injection volumes. As expected, for  $250 \text{ mg L}^{-1}$  of the 40 nm nPS standard, the height and width of the peaks obtained from the on-line DLS detector increased with increasing injection volume (Fig. S3.1a, b). In contrast, retention times were also seen to increase for injection volumes above  $40 \text{ }\mu\text{L}$ . To minimise problems associated with wide peaks and variable retention times, an injection volume of  $20 \text{ }\mu\text{L}$  was used for all of the reported experiments.

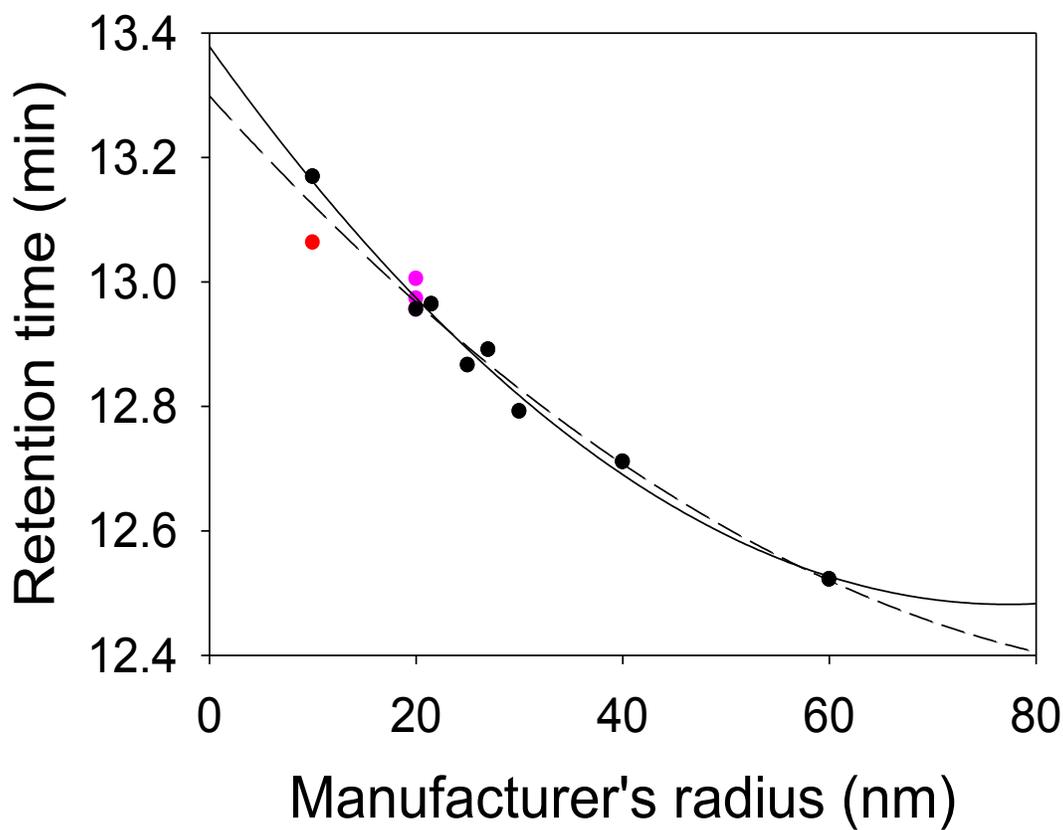


**Fig. S3.1.** Role of the injected sample volume on: (a) signal intensities; (b) peak widths; and (c) retention times.



**Fig. S3.2.** Chromatograms of ENP standards obtained using the on-line light scattering signal (DLS) collected at 99°.

### 3.5.3 Calibration curves using manufacturers' radii



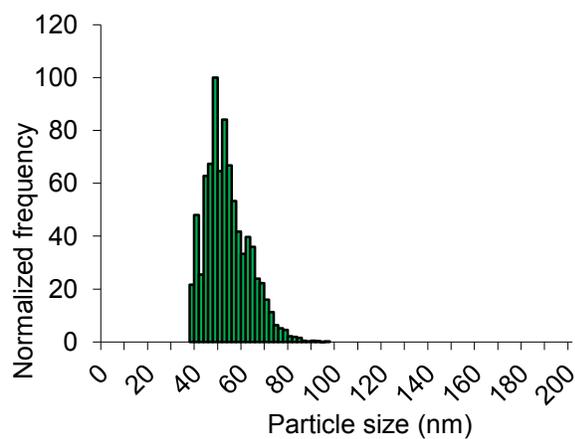
**Fig. S3.3.** Calibration curve based on the nPS (black points), nAu (red point) and nAg (pink points) standards. The curve was prepared using the manufacturers' radii for the particle standards (solid line: nPS only; dotted line: all ENP).

### 3.5.4 ENP mixtures

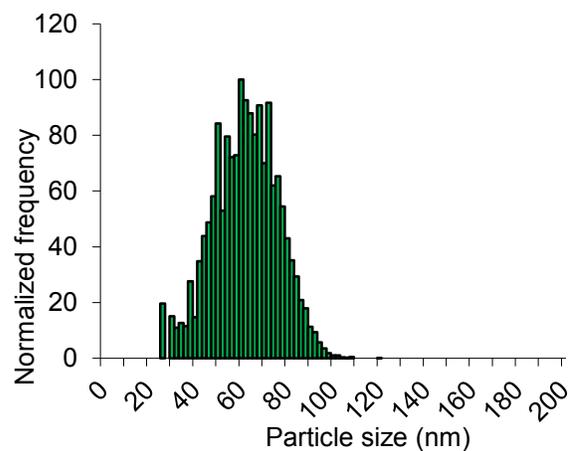
**Table SIII-2. Separation of an ENP mixture (composition corresponding to the ENP mixture of Fig. 3.2).** The characterisation of sample fractions was performed using off-line and on-line dynamic light scattering.

# Fraction	Retention time (min)	DLS off-line $R_h$ (nm)	DLS on-line $R_h$ (nm)
1	12.0-12.1	61.3 ± 4.0	
2	12.1-12.2	58.3 ± 5.2	
3	12.2-12.3	55.7 ± 6.6	57.1 ± 1.0
4	12.3-12.4	65.4 ± 6.2	45.0 ± 2.0
5	12.4-12.5	69.0 ± 8.1	
6	12.5-12.6	66.6 ± 7.1	
7	12.6-12.7	61.2 ± 15.7	
8	12.7-12.8	40.5 ± 8.4	29.7 ± 0.6
9	12.8-12.9	34.9 ± 7.4	21.8 ± 0.6
10	12.9-13.0	27.8 ± 4.5	22.2 ± 0.5
11	13.0-13.1	21.8 ± 2.6	
12	13.1-13.2	25.0 ± 2.1	
13	13.2-13.3	28.8 ± 6.7	
14	13.3-13.4	24.4 ± 5.0	
15	13.4-13.5	15.5 ± 1.2	

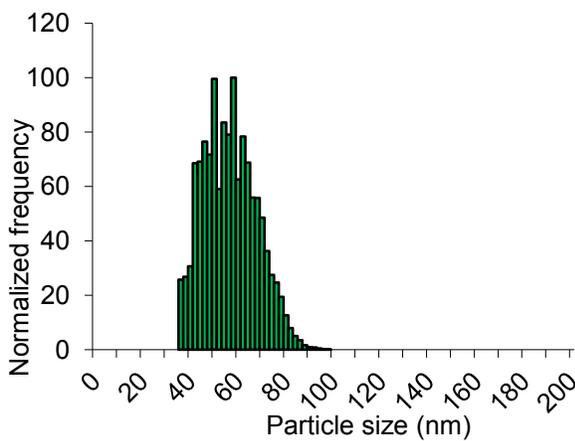
Fraction #9



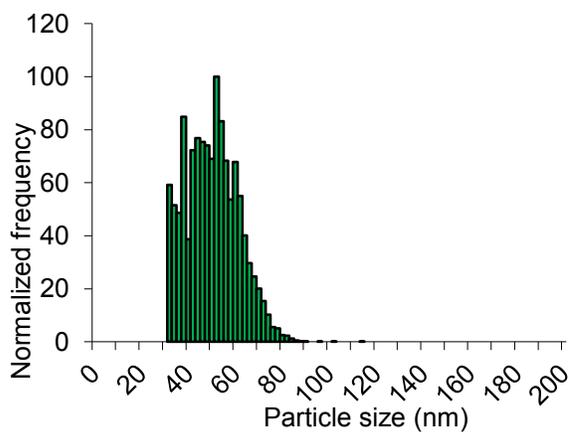
Fraction #10



Fraction #11

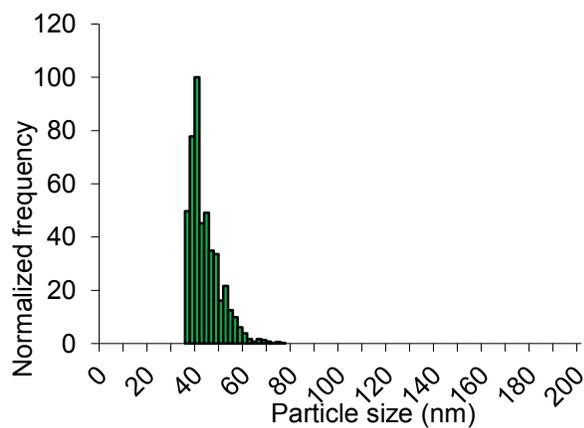


Fraction #12

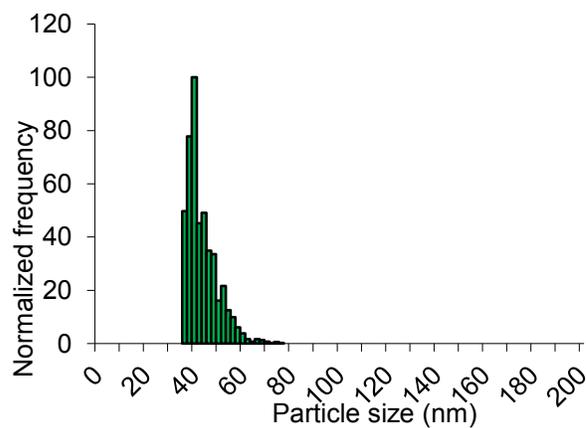


**Fig. S3.4.** SP-ICP-MS nAg size distributions data of several sample fractions of the ENP mixture detailed in Table III-6B.

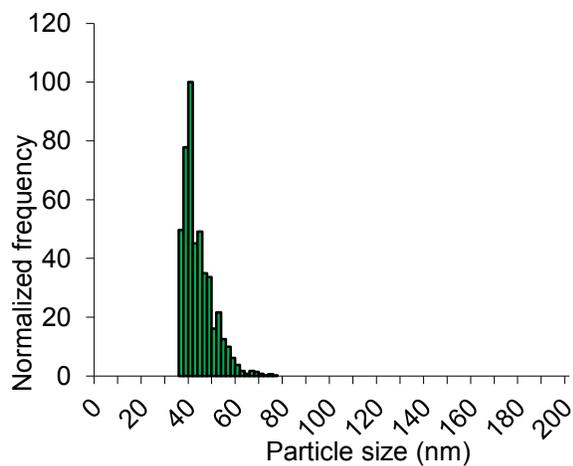
Fraction #8



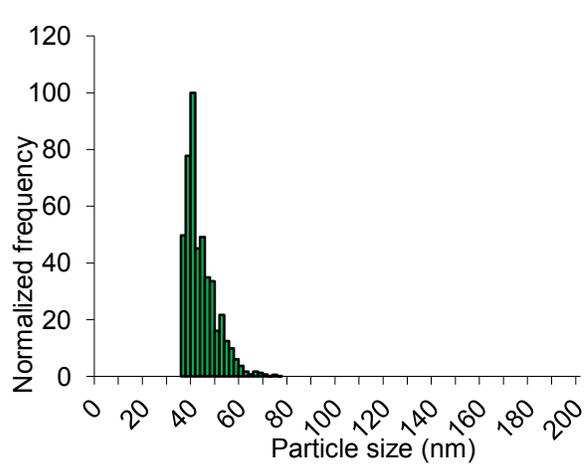
Fraction #9



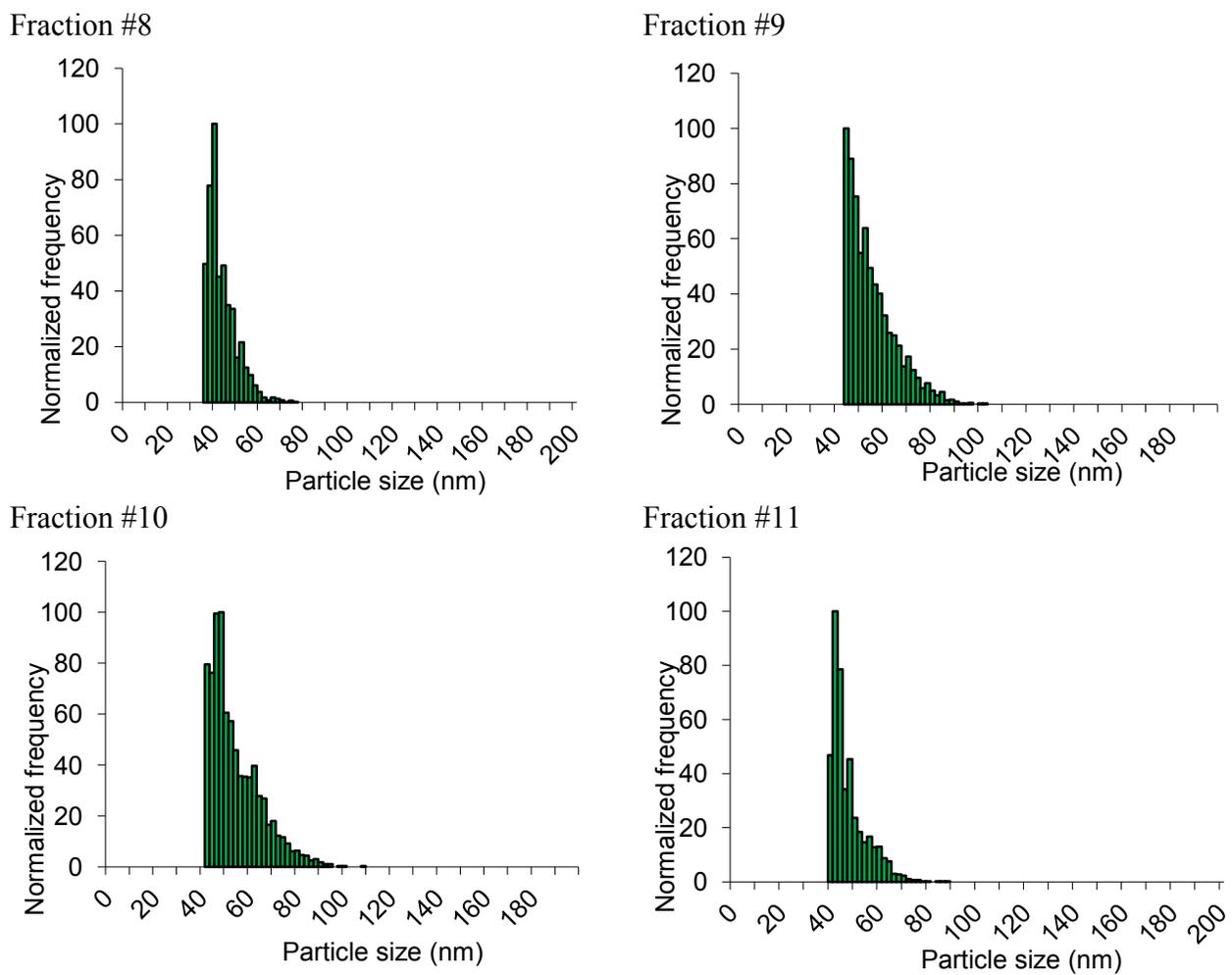
Fraction #10



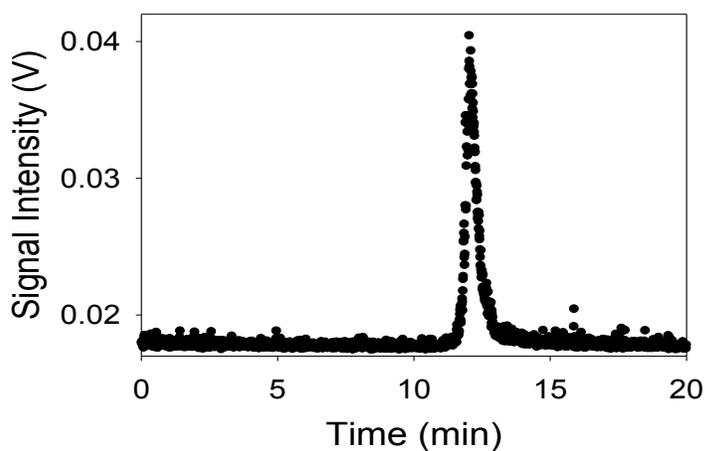
Fraction #11



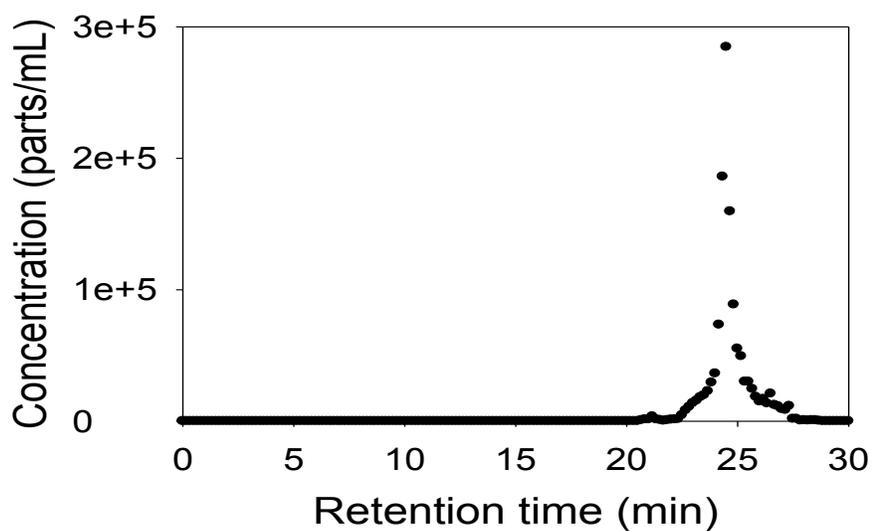
**Fig. S3.5.** SP-ICP-MS nAg size distributions data of several sample fractions of the ENP mixture in the natural river water (detailed in Table III-8).



**Fig. S3.6.** SP-ICP-MS nAg size distributions data of several sample fractions of the ENP mixture in the natural river water (detailed in Table III-9).



**Fig. S3.7.** Chromatogram of river water with no added ENP, obtained using the on-line light scattering signal (DLS) collected at  $99^\circ$ .



**Fig. S3.8.** Chromatogram of a river water sample spiked with  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  of nAg (NanoComposix, nominal radius of 20 nm) following separation by HDC and detection using SP-ICP-MS. A particle radius of  $20.3 \pm 0.6$  nm was determined for the Ag signal detected at 24.7 min using SP-ICP-MS.

### 3.6 Acknowledgements

Funding for this work is provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC Strategic Projects 430659; NSERC scholarship to K. Proulx), the *Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies* and Environment Canada. A grant from the Canadian Water Network and the City of Calgary is also greatly appreciated. The authors are also grateful for the technical assistance from Madjid Hadioui, Leosvey Alessandra Diaz Lozada and Caroline Peyrot.

## **Chapitre 4. Séparation, détection et caractérisation de nanomatériaux dans des eaux usées municipales en utilisant la chromatographie hydrodynamique couplée à l'ICPMS et l'ICPMS en mode particule unique**

**Avant-propos :** L'article suivant décrit l'optimisation d'une méthode analytique basée sur le couplage de la chromatographie hydrodynamique à un détecteur de spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif dans son mode classique et son mode particule unique, méthode permettant de séparer des mélanges de nanoparticules selon leur tailles et de les détecter et caractériser à des concentrations représentatives de celles rencontrées dans l'environnement, c'est-à-dire de l'ordre du  $\mu\text{g L}^{-1}$  au  $\text{ng L}^{-1}$ . De plus, la détection et la caractérisation de mélanges nanoparticules d'argent dans des eaux usées ont été réalisées. Finalement, l'application de la méthode développée à divers échantillons d'eaux usées et naturellea permis de déterminer que si ces eaux contiennent de l'Ag, la concentration en Ag se trouve sous les limites de détection de  $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ .

La majeure partie de la recherche d'information pertinente dans la littérature, des manipulations en laboratoire et de l'analyse des résultats a été réalisée par l'auteure de ce mémoire. Les manipulations en laboratoire en lien avec le développement et l'utilisation de la méthode de caractérisation utilisant le (SP)ICPMS ont été réalisées conjointement entre l'auteure de ce mémoire et le deuxième co-auteur de cet article. L'interprétation des résultats, la rédaction et la révision de cet article ont été effectuées en collaboration entre l'auteure de ce mémoire et son directeur de recherche.

Finalement, il est à noter que certaines sections présentées dans les chapitres précédents sont reprises dans l'article à des fins de reproductions intégrales.

L'article et l'information supplémentaire ont été soumis au journal Water Research sous la référence suivante :

*Separation, detection, and characterisation of nanomaterials in municipal wastewater using hydrodynamic chromatography coupled to ICPMS and single particle ICPMS*

Kim Proulx, Madjid Madioui and Kevin J. Wilkinson

Department of Chemistry, Biophysical Environmental Chemistry group, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montreal (QC), Canada H3C 3J7

## **Abstract**

Engineered nanoparticles (ENP) are increasingly being incorporated into consumer products and reaching the environment at a growing rate. Unfortunately, few analytical techniques are available that allow the detection of ENP in complex environmental matrices. The major limitations with existing techniques are their relatively high detection limits and their inability to distinguish ENP from other chemical forms (e.g. ions, dissolved) or from natural colloids. Of the matrices that are considered to be a priority for method development, ENP are predicted to be found at relatively high concentrations in wastewaters and wastewater biosolids. In this paper, we demonstrate the capability of hydrodynamic chromatography (HDC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS), in its classical and single particle modes (SP ICPMS), to identify ENP in wastewater influents and effluents. The paper first focuses on the detection of standard silver nanoparticles (nAg) and their mixtures, showing that significant dissolution of the nAg was likely to occur. For the nAg, detection limits of  $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$  were found for the HDC ICPMS whereas  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  was determined for the HDC SP ICPMS (based on results for the 80 nm nAg). In the second part of the paper, HDC ICPMS and HDC SP ICPMS was performed on some unspiked natural samples (wastewaters, river water). While nanosilver was below detection limits, it was possible to identify some (likely natural) Cu nanoparticles using the developed separation technology.

**Keywords**

Nanosilver, nanoparticles, hydrodynamic chromatography, single particle ICPMS, wastewaters

**4.1 Introduction**

Engineered nanoparticles (ENP) are products with at least one dimension in the 1-100 nm size range. Their enhanced reactivity with respect to bulk materials, makes them interesting for a number of applications [1]. Indeed, ENP such as carbon nanotubes, metal nanoparticles and quantum dots are found in numerous industrial and consumer products [2, 16].

In order to understand the fate and impact of ENP, it is critical to discriminate among the dissolved, nanoscale and bulk materials [15]. Of particular concern are ENPs that are released into municipal sewers from households, industrial sources, paints and coatings. Indeed, recent studies have predicted that significant loads of ENPs will accumulate in municipal wastewater treatment plants (WWTPs) [14, 64], resulting in levels of ENP, such as silver nanoparticles (nAg) [10], that may already pose risks to aquatic organisms [48]. However, due to their low concentrations and the presence of a complex background matrix [14], few techniques are currently available for their detection [66]. Robust techniques that allow the quantification of ENP in wastewaters are only now beginning to emerge [6, 8, 10, 25, 64].

Similar to flow field flow fractionation (fFFFF), hydrodynamic chromatography (HDC) [67] can be used to separate ENP based upon their diffusion coefficients, which are inversely related to their hydrodynamic diameters through the Stokes-Einstein equation [21]. Since it employs a column that limits interactions with the stationary phase, HDC is a powerful, minimally perturbing technique for separating ENP in environmental samples [67]. By coupling HDC with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS), it is possible to attain the low concentrations that are expected to

be found in natural samples (ref). By running the ICPMS in single particle detection mode (SP ICPMS) [46, 47], particle size distributions can be obtained directly.

In this study, we first tested the hydrodynamic separation of several ENP standards (gold (nAu), polystyrene (nPS) and silver (nAg) nanoparticles) and their mixtures spiked into a municipal wastewater sample. Following the optimization of separation parameters (ENP concentration, eluent flow rate, etc.), the standard ENP were separated, detected and characterized, first at high concentrations (1-100 mg L<sup>-1</sup>) using on-line light scattering detectors (static (SLS) and dynamic light scattering (DLS)) and then at environmentally relevant concentrations (1-20 µg L<sup>-1</sup>) using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) and its single particle mode (SP ICPMS) [46, 48]. Using the optimized instrumental parameters, HDC ICPMS and HDC SP ICPMS were then performed on several spiked and unspiked wastewater and river water samples in order to determine the capacity of the techniques to identify and quantify nanoparticles.

## 4.2 Experimental section

### 4.2.1 Reagents

An optimized HDC eluent of 1 mM NaNO<sub>3</sub>, 0.0013 % w/w SDS, 0.0013 % w/w Triton X-100 at a pH of 7.5 (±0.2) [25, 67] was prepared using Milli-Q water (R > 18 MΩ cm, organic carbon < 2 µg L<sup>-1</sup>); sodium nitrate (Fluka, >99%) to adjust the ionic strength and sodium hydroxide (Sigma-Aldrich, SigmaUltra) and nitric acid (Fluka, TraceSELECT®Ultra) to adjust the pH. Sodium dodecyl sulfate (SDS, G-Biosciences, Biotechnology grade) and Triton X-100 (Sigma Triton™X-100 BioUltra) were added to the eluent as anionic and non-ionic surfactants, respectively. pH measurements were made using a Metrohm 744 pH-meter. Sodium azide (0.02% w/w, Fisher Scientific) was added to eluent that was used to rinse the HDC column at the end of each experiment. A number of nanoparticle standards (polystyrene, gold and silver nanoparticles; Table IV-1) or their mixtures were used to validate the efficiency of the separations and optimize the separation parameters. A 100 mg L<sup>-1</sup> solution of a fulvic acid (Suwannee River fulvic

acid, SRFA; International Humic Substances Society, IS101F) was prepared for a limited number of injections on the HDC column.

**Table IV-1.** Standard nanoparticles employed for validation/optimization experiments.

<b>ENP</b>	<b>Nominal diameter (nm)</b>	<b>Additional information</b>
Polystyrene (nPS)	42.9, 51, 57, 60, 120	Bangs Laboratories Inc., 1% solids, NIST traceable particle size standards.
Gold (nAu)	60	Ted Pella Inc., PELCO® NanoXact™ tannic acid capped, pure ENP solution was 50 mg L <sup>-1</sup> .
Gold (nAu)	60	NIST reference material, RM 8013, stock solution of 50 mg L <sup>-1</sup> , citrate stabilized.
Silver (nAg)	40, 80	Ted Pella Inc., PELCO® NanoXact™ citrate stabilized, pure ENP solution was 20 mg L <sup>-1</sup> .

#### 4.2.2 Hydrodynamic chromatography and on-line detection

A PL-PSDA, type 1 HDC column with a separation range of 5 to 300 nm, a length of 80 cm and an internal diameter of 7.5 mm (Agilent) was used on an Agilent 1260 Infinity Bio-inert quaternary HPLC fitted with an autosampler (Agilent 1260 Infinity Standard). All tubing was made of inert materials, including the tubing used to connect the HDC column to the ICPMS. With the exception of the preliminary experiments, two flow rates were employed, depending upon the detector: 0.50 mL min<sup>-1</sup> and 1.00 mL min<sup>-1</sup>. An injection volume of 20 µL was employed with a pressure of approximately 3800 kPa for the eluent flow rate of 0.50 mL min<sup>-1</sup> (ICPMS detection). At 1.00 mL min<sup>-1</sup>, an injection volume of 20 µL was employed with a pressure of approximately 7800 kPa (light scattering detection). Both blanks and ENP standards were run frequently in order to monitor the analytical performance of the instruments. The detailed experimental protocol and justification for some of the HDC separation parameters have been provided previously [67].

A Dawn Heleos II detector (Wyatt Technologies) was employed to acquire the on-line static (SLS) and dynamic (DLS) light scattering data (scattering angle of 99°). Translational diffusion coefficients of the ENP were determined from the exponential

decay of an autocorrelation function, which was then used to calculate their hydrodynamic radii,  $R_h$ , based upon the Stokes-Einstein equation [36]. Where possible, the angular dependence of the scattered light (18 measured angles) was used to determine the particle's radius of gyration ( $R_g$ ). For a spherical particle,  $R_g$  is related to its hydrodynamic radius by  $R_g^2 = (3/5) R_h^2$ . For the particles studied here (diameters of 40-120 nm), a linear order Zimm fit model was used to analyse the SLS data [35]. Some samples were also directly verified off-line, using a second DLS instrument (Mobius, Wyatt Technologies, scattering angle of 171.5°).

Data were also acquired by coupling an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICPMS, PerkinElmer NexION 300X) to the HDC column, using either classical or single particle (SP ICPMS). In classical ICPMS, elemental values are averaged over 3 s (integration time for a given isotope= 1 s, 3 replicates), whereas SP ICPMS uses the short-term (~ms) variations of the ICPMS signal to calculate nanoparticle concentrations and sizes. SP ICPMS experiments were carried out using the following data acquisition parameters: 1 sweep per read; 20,000 reads per replicate; settling time of 0.1 ms; dwell time of 100  $\mu$ s (fast scan mode) and a flow rate of 0.50 mL min<sup>-1</sup> (controlled by the HPLC pump). Nebulisation efficiency was determined from a NIST standard solution of nAu using the following parameters: sample flow rate (0.50 mL min<sup>-1</sup>); concentration (100 ng L<sup>-1</sup>); size ( $R_h = 30$  nm); particle density (19320 kg m<sup>-3</sup>) [52]. Particle number concentrations were determined from the frequency of detected pulses using the calculated nebulisation efficiency [15, 17]. For SP ICPMS of known ENP suspensions, concentrations were adjusted so that, statistically speaking, only single particles reached the mass spectrometer during any given measurement time (dwell time) [14]. For example, nAg suspensions ranging between 0.5 and 18  $\mu$ g L<sup>-1</sup> were injected into the HDC column in order to attain ENP concentrations that were in the range of 1 to 100 ng L<sup>-1</sup> when they reached the mass spectrometer (dilution occurred mainly in the HDC column). A threshold limit of three standard deviations ( $3\sigma$ ) above the background signal acquired using dissolved metal only was used to discriminate between dissolved metal and the ENP [14, 15, 50]. For ICPMS measurements, samples were acidified at the exit of the HDC column, whereas in SP ICPMS, samples were not acidified.

### 4.2.3 Sample collection and preparation

Experiments were performed with both spiked and unspiked samples. For the experiments involving nAg spikes, influent and effluent waters were collected from the Repentigny (Quebec, Canada) municipal treatment plant on February 21<sup>th</sup> 2014. Samples were pre-filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  Nylon membrane (Millipore) in order to remove large aggregates and dust particles [38], prior to injection on the HDC column. HDC ICPMS and HDC SP ICPMS experiments were always performed within 3 hours of nAg addition (time needed to prepare the samples and the instruments and to inject and detect the ENP). For experiments without the nanoparticle spike, six additional samples were collected from three wastewater treatment plants and a local river (Table IV-2). These samples were also prefiltered prior to their injection on the HDC column.

**Table IV-2.** Water sample identification.

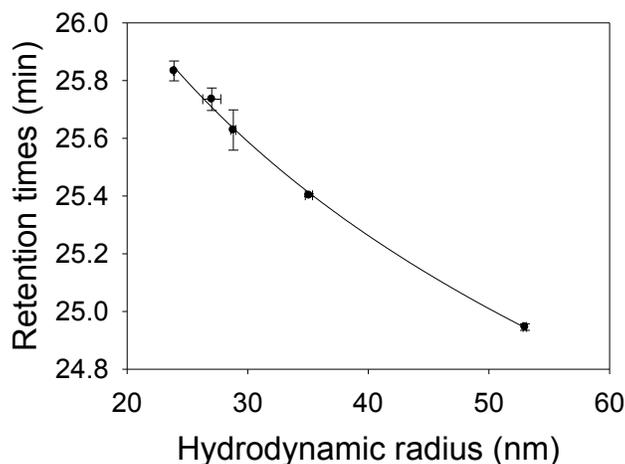
Type of water	Date of sampling	Location of sampling	pH	Prefiltration
Influent	11-08-2014	Le Gardeur wastewater treatment	7.18	0.45 $\mu\text{m}$
Effluent		plant	7.12	0.45 $\mu\text{m}$
Effluent	20-03-2014	Montreal wastewater treatment	7.23	0.22 $\mu\text{m}$
		plant		
Influent	05-09-2014	Repentigny wastewater treatment	7.38	0.45 $\mu\text{m}$
Effluent		plant	7.64	0.45 $\mu\text{m}$
River water	08-05-2014	Des Prairies river	7.37	0.22 $\mu\text{m}$

Means and standard deviations were determined from triplicate measurements. An analysis of variance was performed at  $P = 0.05$  and where applicable, significant differences were identified using a Student-Newman-Keuls test or a Student t test, also at  $P = 0.05$ . Statistical tests were performed using standard deviations obtained from repeated measurements ( $n = 3$ ) rather than the breadth of the particle size distributions. Although all separations were run in triplicate, only single representative chromatograms have been presented below.

## 4.3 Results and discussion

### 4.3.1 Influence of experimental parameters on HDC performance

Numerous preliminary experiments were performed in order to evaluate the role of eluent flow rates and ENP concentrations on the resolution of multiple ENP peaks. When using light scattering detectors and  $\text{mg L}^{-1}$  concentrations of the ENP, the optimal resolution occurred at the highest tested flow rate of  $1.50 \text{ mL min}^{-1}$  (Figs. S4.1, S4.2; Tables SIV-1, SIV-2), whereas optimal separations for the HDC ICPMS/HDC SP ICPMS were obtained using a  $0.50 \text{ mL min}^{-1}$  flow rate (Fig. S4.3, Table SIV-3). The calibration curve obtained at  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$  for latex standards (nPS) is presented in Fig. 4.1.



**Fig. 4.1.** Calibration curve obtained for latex particle standards at a flow rate of  $0.50 \text{ mL min}^{-1}$ . The curve (logarithmic fit,  $R^2$  of 0.998) was obtained by plotting the retention times as a function of the *measured* hydrodynamic radii obtained from light scattering.

### 4.3.2 Characterisation of the natural water samples (influent, effluents, river water)

The main inorganic and organic components of the water samples were measured by ICPMS and an organic carbon analyser (Table SIV-7). For the Repentigny station that was used for optimization, no major differences in the inorganic content of the influent and the effluent waters were observed. In that case, the influent water did contain

substantially more organic carbon than the treated effluent. Particle size distributions of the Repentigny samples were determined using both off-line DLS and on-line HDC DLS/SLS. These results showed that the samples initially contained numerous particles in the nanoparticle size range with the potential capacity to mask signals from the ENP (Figure S4.5).

### 4.3.3 Standard ENP spiked into wastewater samples

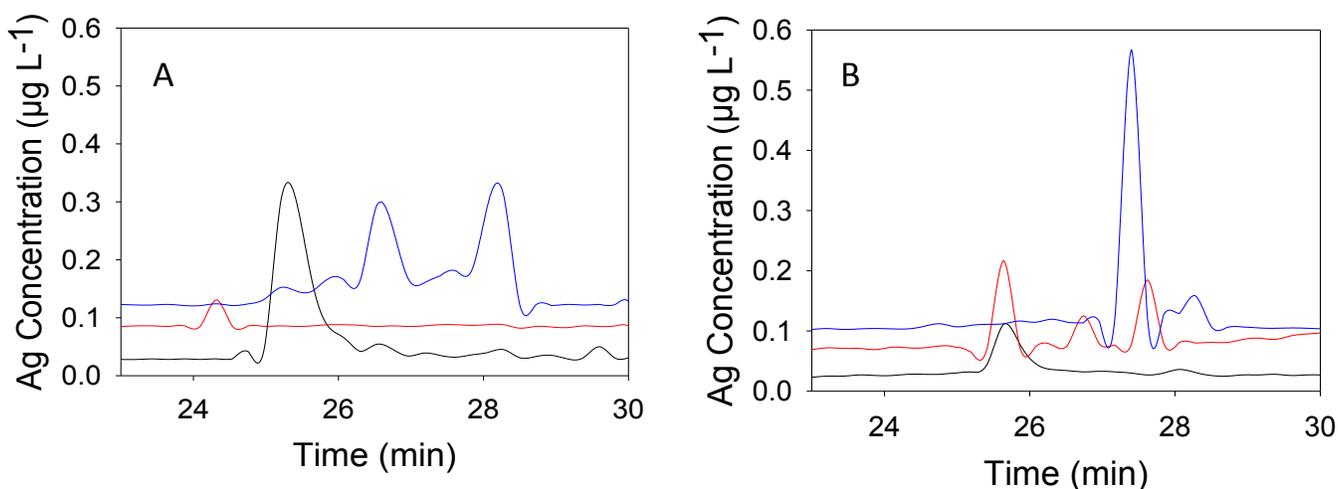
Nanosilver (40 and 80 nm) was spiked into Milli-Q water or the Repentigny influent and effluent. When SP ICPMS was performed without prior separation by HDC (Table IV-3), extremely low particle concentrations were analysed ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$  for the 40 nm nAg;  $0.18 \mu\text{g L}^{-1}$  for the 80 nm nAg), corresponding to high particle recoveries (in Milli-Q water, 97% for the 40 nm nAg; 109% for the 80 nm nAg). Particle sizes were consistent, in Milli-Q water, with the nominal sizes provided by the manufacturer (40 nm:  $38.0 \pm 0.4$  nm; 80 nm:  $76.2 \pm 0.4$  nm; Table IV-3). In both the influent and effluent waters, particle sizes measured by SP ICPMS, for both nAg, were significantly (Student t-test,  $P < 0.05$ ) smaller than those measured in the Milli-Q water. In addition, particle numbers appeared to decrease in both waters when compared to Milli-Q water, although differences were not always significant due mainly to the high uncertainty on particle number concentrations. Since no particle agglomeration was observed, SP ICPMS data suggested that the losses of nAg in the wastewater samples could mainly be attributed to particle dissolution. Indeed, concentrations of dissolved Ag measured by SP ICPMS were consistent with an important particle dissolution occurring in all three waters (Table IV-3).

**Table IV-3.** SP ICPMS and HDC SP ICPMS measurements of two nAg (nominally 40, 80 nm) measured in Milli-Q water and the Repentigny influent and effluent. Nanoparticle concentrations were 100x greater when using HDC in order to account for sample dilution during elution. Particle diameters and concentrations attributed to the HDC SP ICPMS were made at the maximum (Ag) peak intensities ( $\pm 0.2$  min). For a given particle/particle concentration, superscripted letters refer to significant differences obtained using a Student-Newman-Keuls test at  $P=0.05$ .

nAg	Technique	Sample concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Sample matrix	Diameter (nm)	nAg concentration ( $10^6$ parts/L)	Dissolved concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Retention time (min)
40 nm	SP ICPMS	0.05	MQW	$38.0 \pm 0.4^a$	$111 \pm 6^a$	$0.06 \pm 0.01$	-
			Influent	$32.6 \pm 0.6^{a,b}$	$74 \pm 27^{a,b}$	$0.07 \pm 0.02$	-
			Effluent	$36.2 \pm 2.8^b$	$85 \pm 10^b$	$0.06 \pm 0.01$	-
	HDC	5	MQW	$40.8 \pm 3.2^a$	$1272 \pm 266^a$	-	$25.9 \pm 0.3$
			Influent	$41.8 \pm 2.8^a$	$905 \pm 94^a$	-	$26.6 \pm 1.4$
			Effluent	$38.0 \pm 3.2^a$	$1015 \pm 106^a$	-	$25.0 \pm 0.5$
80 nm	SP ICPMS	0.18	MQW	$76.2 \pm 0.4^a$	$87 \pm 8^a$	$0.06 \pm 0.01$	-
			Influent	$47.2 \pm 11.9^b$	$58 \pm 17^a$	$0.08 \pm 0.03$	-
			Effluent	$71.0 \pm 1.8^c$	$69 \pm 10^a$	$0.07 \pm 0.01$	-
	HDC	18	MQW	$74.0 \pm 5.0^a$	$1154 \pm 377^a$	-	$25.4 \pm 0.1$
			Influent	$61.4 \pm 16.8^a$	$451 \pm 90^b$	-	$25.1 \pm 0.5$
			Effluent	$73.8 \pm 17.6^a$	$814 \pm 121^a$	-	$25.2 \pm 1.0$

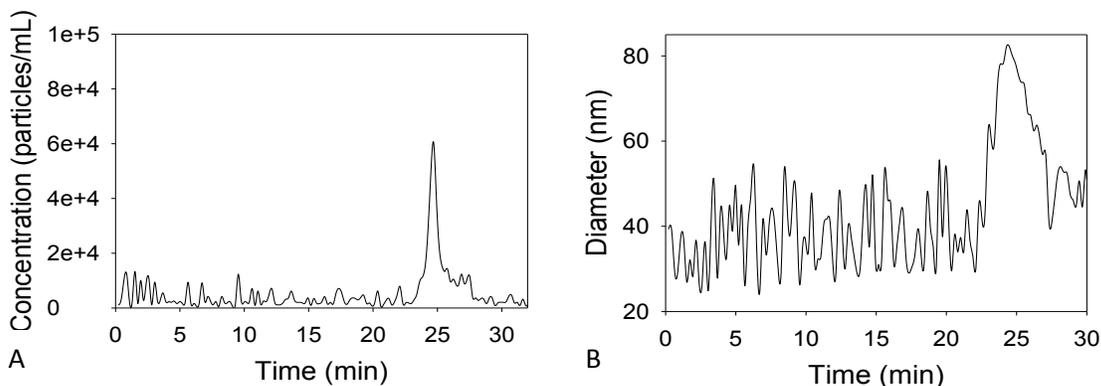
When the HDC column was coupled to the SP ICPMS, retention times of  $25.9 \pm 0.3$  min (40 nm) and  $25.4 \pm 0.1$  min (80 nm) were found for the nAg in deionised water, in good agreement with the retention times that would be expected from the particle curve calibration (Fig. 4.1: 26.1 min for the 40 nm particles and 25.2 min for the 80 nm particles). Once again, both particle numbers and particle radii appeared to decrease in the influent samples with respect to samples run in Milli-Q water. In the effluents, declines of ENP sizes and concentrations were not statistically significant (Table IV-3). For both influent and effluent samples, particle size distributions were broadened with respect to those obtained in Milli-Q water. Similar to the SP ICPMS measurements on the unfractionated samples, the observed reductions of particle numbers and particle sizes were consistent with a partial particle dissolution and increased particle polydispersity in the more complex sample matrices.

Due to their dilution during the chromatographic separation, samples that were injected onto the HDC column were initially 100x more concentrated than those measured directly by SP ICPMS; however, measured particle concentrations were only about ~10x greater (Table IV-3). The lower than expected particle numbers resulted from the fact that only nanoparticles that had retention times between 23-30 minutes were quantified by HDC SP ICPMS. In addition, some particle loss due to adsorption or capture of the nAg by the HDC column was likely to have occurred. Indeed, when the HDC was coupled to the ICPMS (classical mode), Ag was detected in several nanoparticle size fractions (Fig. 4.2), i.e. retention times from 23-30 minutes, although, concentrations were very near Ag detection limits (ca.  $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ , Table SIV-8). For the Milli-Q water samples (black lines, Fig. 4.2), most Ag was detected in the 25-26 minutes interval, which corresponded to particle sizes of 20-50 nm. In the effluent samples (blue lines), retention times were displaced to longer retention times, corresponding to smaller particle sizes, for both nAg. A similar shift was observed for the 80 nm nAg in the influent but this was not the case for the smaller (40 nm) nAg where only a small peak was detected at 24.3 minutes, corresponding to a size of approximately  $94.3 \pm 0.4$  nm (Fig. 4.1). Note that for both the influent and the effluent, Ag was observed in several Ag fractions, indicating either increased polydispersity of the nAg or adsorption of Ag to colloidal particles in the samples. The HDC column was coupled to the SP ICPMS, retention times of  $25.9 \pm 0.3$  min (40 nm) and  $25.4 \pm 0.1$  min (80 nm) were found for the nAg in deionised water, consistent with retention times that were expected from the particle curve calibration (Fig. 4.1: 26.1 min for 40 nm particles and 25.2 min for 80 nm particles). Once again, both particle numbers and particle radii appeared to decrease in the influent samples with respect to samples run in Milli-Q water. In the effluents, declines of ENP sizes and concentrations were not statistically significant (Table IV-3). For both influent and effluent samples, particle size distributions were broadened with respect to those obtained in Milli-Q water. Similar to the SP ICPMS measurements on the unfractionated samples, the observed reductions of particle numbers and particle sizes were consistent with partial particle dissolution and increased particle polydispersity in the more complex sample matrices.



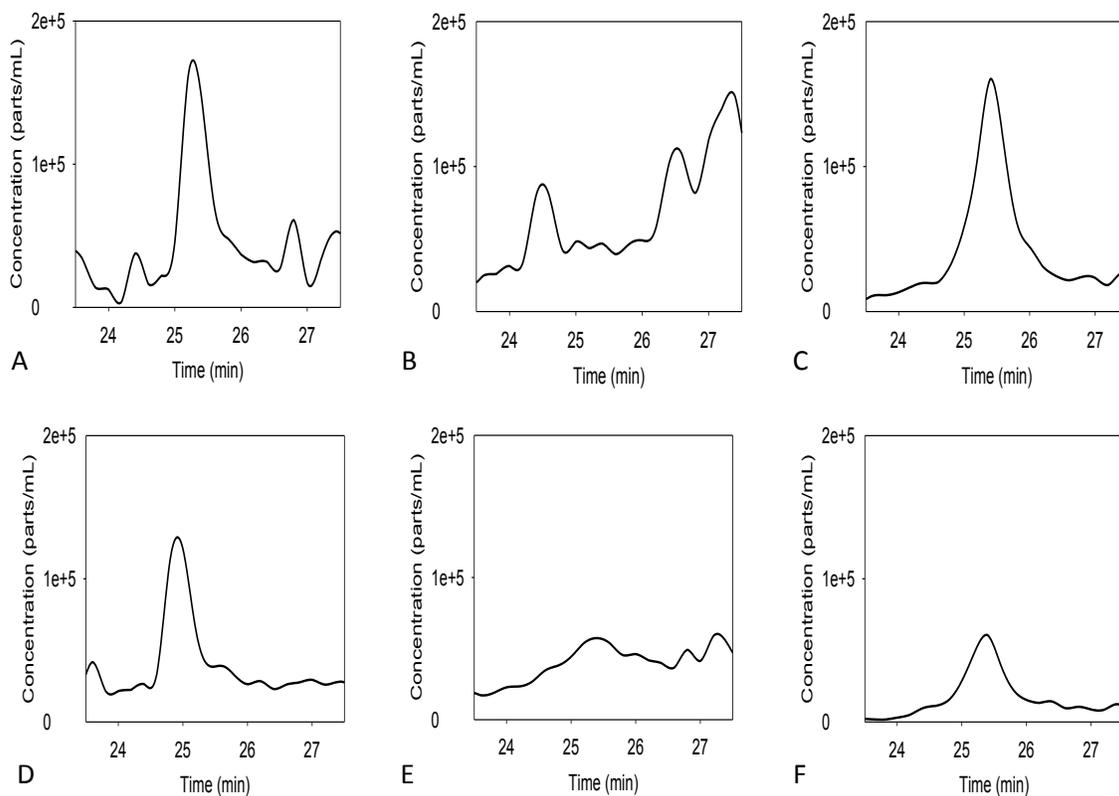
**Fig. 4.2.** HDC chromatograms determined from Ag concentrations determined using ICPMS (HDC ICPMS): (A) 40 nm nAg spiked at a concentration of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  in Milli-Q water (black), WWTP influent (red) and WWTP effluent (blue line), and (B) 80 nm nAg spiked at a concentration of  $18 \mu\text{g L}^{-1}$  in Milli-Q water (black), WWTP influent (red) and WWTP effluent (blue line). Note that the y-axis data for the influent and effluent samples have been shifted by 0.5 and  $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively, in order to facilitate identification of the chromatographic peaks.

Chromatograms generated by HDC SP ICPMS were consistent with those determined with the ICPMS detector. For example, for the 80 nm nAg (Fig. 4.3), particles were detected with retention times between 24 and 28 min. The maximum signal intensity occurred at 25.2 minutes where a particle diameter of 73.8 nm was measured. A particle number detection limit of 26700 particles  $\text{mL}^{-1}$  ( $0.1 \mu\text{g Ag L}^{-1}$  for 80 nm particles) could be determined from 3x the standard deviation of the chromatographic signal for retention times where no nanoparticles were expected (i.e. < 20 min; Fig. 4.3A). Particle diameters could not be distinguished from a background signal corresponding to ca. 24-40 nm here (15 nm in the literature: ref madjid 2014). The HDC SP ICPMS detection limit of  $0.1 \mu\text{g Ag L}^{-1}$  compares with a detection limit of  $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$  that could be determined in a similar manner from the HDC ICPMS results (Fig. 4.2).



**Fig. 4.3.** HDC SP ICPMS chromatogram of the 80 nm nAg spiked into the Repentigny wastewater effluent at a concentration of  $18 \mu\text{g L}^{-1}$ : (A) nAg particle concentrations and (B) nAg particle diameters.

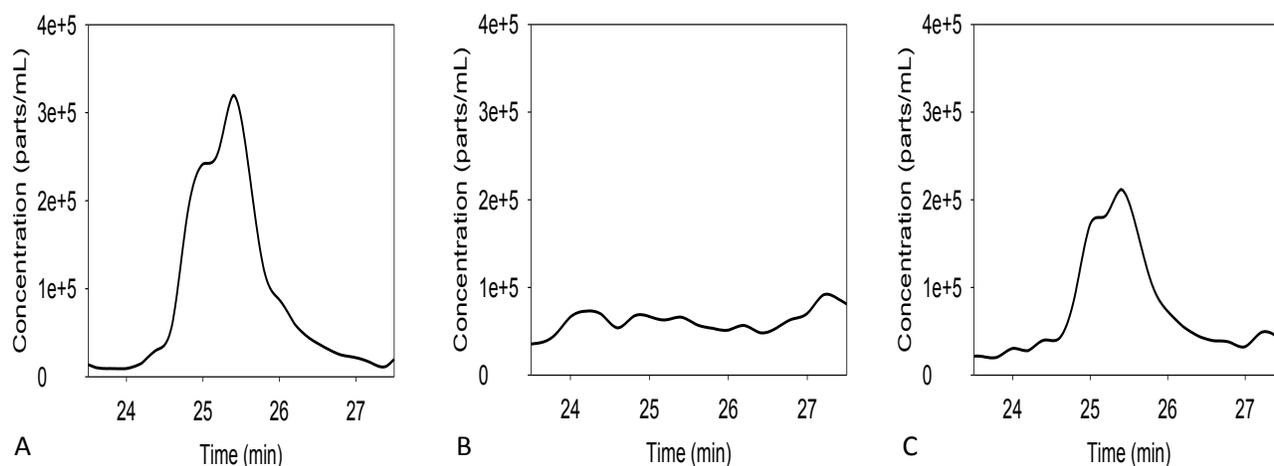
For HDC SP ICPMS, when the nAg were spiked into each of the matrices, a much stronger signal was obtained for the nAg in deionised water (Fig. 4.4A, 4.4D) than for either the influent (4B, 4E) or effluent (4C, 4F) samples. Indeed, while peaks with the expected retention times were clearly visible in Milli-Q water, they were extremely difficult to distinguish from the baseline for the spiked influent samples. The nearly complete disappearance of peaks in the influent (Fig. 4.4B, 4.4E) was surprising, but could be explained both by a greater particle polydispersity; a greater proportion of nanoparticles that were below or near the detection limit for HDC SP ICPMS and potential retention of Ag by the HDC. Particle number concentrations had decreased by 29% for the 40 nm nAg and by 61% for the 80 nm nAg. Since both HDC and SP ICPMS (but not ICPMS) are performed on non-acidified samples, it was expected that significant adsorptive losses could occur during those steps of the analysis. In fact, an average recovery of 103% was determined for the analysis of the nAg by SP ICPMS whereas losses of 50-90% were observed for HDC ICPMS (Table SIV-8), suggesting that much of the decrease in signal occurred due to adsorption to the HDC column.



**Fig. 4.4.** HDC SP ICPMS chromatograms for  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  of 40 nm nAg spiked into (A) Milli-Q water, (B) wastewater influent and (C) wastewater effluent and for  $18 \mu\text{g L}^{-1}$  of 80 nm nAg spiked into (D) Milli-Q water, (E) wastewater influent and (F) wastewater effluent.

#### 4.3.4 ENP mixtures spiked into wastewater samples

A mixture of the two nAg was spiked into the three waters and then separated by HDC SP ICPMS. Once again, in the influent waters (Fig. 4.5B), it was difficult to resolve the nAg from the baseline. In that case, only a single peak corresponding to  $45.6 \pm 1.8$  nm could be detected. In Milli-Q water (Fig. 4.5A) and in the effluent (Fig. 4.5C), peaks corresponding to the two nAg could be partially resolved. For the mixture in Milli-Q water, a diameter of  $76.0 \pm 5.8$  nm was determined at the maximum intensity for the first peak (nominal size of 80 nm) whereas a diameter of  $50.8 \pm 3.0$  nm was evaluated for the second peak (nominally 40 nm). In the effluent, a measured diameter of  $71.4 \pm 5.6$  nm was determined for the 80 nm nAg whereas a value  $52.0 \pm 5.4$  nm was measured for the 40 nm nAg.



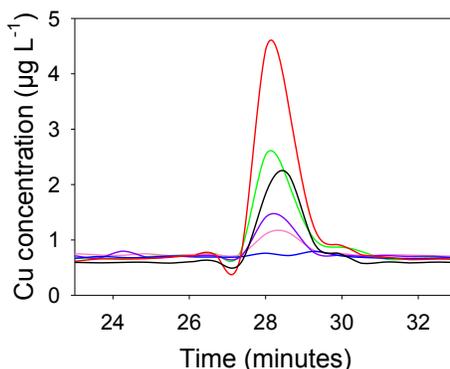
**Fig. 4.5.** HDC SP ICPMS chromatograms of a nAg mixture containing  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  of a 40 nm nAg and  $18 \mu\text{g L}^{-1}$  of an 80 nm nAg spiked into (A) Milli-Q water, (B) influent water and (C) effluent water.

Above (sections 4.3.3 and 4.3.4), hydrodynamic chromatography was coupled to the ICPMS, either in standard mode or in single particle detection (SP ICPMS). The optimized technique and knowledge of the method detection limits were subsequently employed to examine several non-spiked waters that were collected from three WWTP and a river (Table IV-2).

#### 4.3.5 Characterisation of non-spiked environmental samples

Influent, effluent and river water samples were analysed by using the HDC ICPMS and the HDC SP ICPMS, with an emphasis on detecting nAg. For all samples, nAg and  $\text{Ag}^+$  were below the HDC SP ICPMS detection limit ( $26700 \text{ particles L}^{-1}$ ; ca.  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ; particle size of 24 nm). When HDC ICPMS was used (detected elements: Ag, Ca, Cu, Ni, Zn and Mg), only Cu nanoparticles (Cu NP, detection limit of  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) were identified in the samples (Fig. 4.6). Nanosilver ( $\text{Ag}^+$  detection limit of  $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and other potential NP (containing Ca, Cu, Ni, Zn, Mg) were below detection limits (Table IV-4) in the selected wastewater samples. Note that the retention times for the Cu NP were high (mean of  $28.4 \pm 0.5 \text{ min}$ ), which corresponded to a particle size of approximately 2.5 nm (Fig. 4.1). Such sizes are highly suggestive of colloidal humic substances. Indeed, when  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of a fulvic acid standard (SRFA) was spiked with

Cu (Fig. S4.6), very similar retention times ( $28.8 \pm 0.2$  min) with respect to those observed in the non-spiked water samples were obtained. Interestingly, effluent samples had lower concentrations of the Cu NP than their corresponding influents.



**Fig. 4.6.** HDC ICPMS chromatograms of the non-spiked water samples using ICPMS detection for Cu (from largest to smallest peaks): influent sample from Repentigny WWTP (red); influent sample of *Le Gardeur* WWTP (green); effluent sample from Repentigny WWTP (black); effluent sample from Montreal WWTP (purple), effluent sample of *Le Gardeur* WWTP (pink); freshwater from *Des Prairies* River (blue line).

**Table IV-4.** Detection limits of selected elements analysed by HDC ICPMS.

Elements	Detection limits ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>Mg</b>	3.6
<b>Ca</b>	3.2
<b>Ni</b>	0.04
<b>Cu</b>	0.10
<b>Zn</b>	0.03
<b>Ag</b>	0.03

#### 4.4 Conclusions

It is difficult to identify nanoparticles in complex environmental matrices such as wastewater influents and effluents. Two complementary techniques (HDC ICPMS; HDC SP ICPMS) were developed here for that use. The HDC separates the nanomaterials as a function of their hydrodynamic sizes (largest to smallest) and retention times can be used to get information on particle sizes. The ICPMS detector has the advantage of lower

detection limits, however, when it is used in SP ICPMS mode, confirmatory information on particle sizes and numbers could also be obtained. When influent and effluent WW samples were spiked with silver nanoparticles, some particle dissolution was suspected, leading to lower (detected) particle numbers. When the optimized technique was employed to detect NP in several WW samples, nanoparticles were generally below method detection limits (e.g. nAg size limit of 24 nm; 26700 particles mL<sup>-1</sup>; Ag concentration limit of 0.1 µg L<sup>-1</sup>). In fact, only small (ca. 2.5 nm) Cu NP were detected in the non-spiked WW samples. Those NP have been tentatively identified as Cu bound to humic substances, which is consistent with the high content of dissolved organic carbon in these waters.

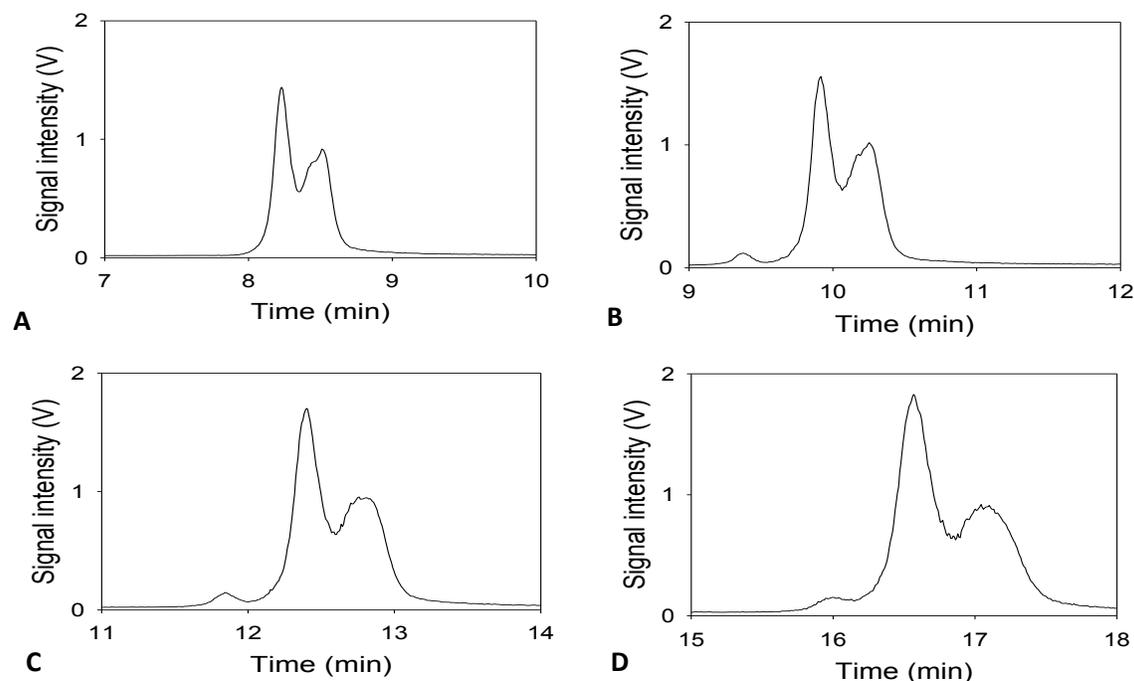
## 4.5 Supplementary material

### 4.5.1 Role of the eluent flow rate on HDC separation

The light scattering detectors (dynamic light scattering: DLS; static light scattering: SLS) were used initially to optimize flow rates (0.75 to 1.50 mL min<sup>-1</sup>) for an ENP mixture containing nAg (40 nm), nAu (60 nm) and nPS (120 nm). As expected, retention time differences between the nanoparticles increased by decreasing the flow rate (Fig. S4.1, Table SIV-1) while peak widths were minimized with higher flow rates (Fig. S4.2, Table SIV-2). Particle diameters (gyration diameter:  $D_g$ , hydrodynamic diameter:  $D_h$ ) were not influenced by the eluent flow rate, implying that the flow rate (in these ranges) did not influence the performance of the light scattering detectors. Optimal resolution occurred at the highest tested flow rate of 1.50 mL min<sup>-1</sup>, although there was little overall impact on the quality of the nanoparticle separation with flow rate (as previously demonstrated ref: philippe and shaumann 2014). When using ICPMS as the detector, lower flow rates are required and thus the experiment was also repeated using a range of flow rates from 0.3 to 0.8 mL min<sup>-1</sup> in which the separation of two nAg (5 µg L<sup>-1</sup> of the 40 nm nAg and 18 µg L<sup>-1</sup> of the 80 nm nAg) was evaluated. As above, peak separation and peak width increased with decreasing flow rate (Fig. S4.3, Table SIV-3). In this case, maximum resolution was determined for a flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>. Although the ICPMS specifically measures Ag, one of the roles of the HDC column is to

reduce interferences by separating particles of different sizes. Since lower eluent flow rates result in larger retention time differences among the particles, lower flow rates will favor the detection of individual nanoparticles. In order to minimize the time of the separation (to ensure minimal sample modifications), while maximizing resolution, within the experimental constraints of the ICPMS, a flow rate of  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$  was used for the rest of the HDC ICPMS and HDC SP ICPMS separations.

Finally, it became clear that it was beyond the capacity of the light scattering detectors to measure environmentally relevant concentrations of the ENP, since their detection limits were on the order of  $\text{mg L}^{-1}$  (Table SIV-4). Therefore the SP ICPMS was used to verify the effect of particle concentrations on the nAg separation at a fixed eluent flow rate of  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ . As was observed with the DLS detector (Table SIV-5), a decreasing nAg concentration had little effect on retention time differences or peak widths (Fig. S4.4, Table SIV-6), resulting in no decrease in resolution as long as the concentrations remained above the detection limits of the instrument (on the order of  $\mu\text{g L}^{-1}$  for HDC SP ICPMS).



**Fig. S4.1.** Influence of the eluent flow rate on the HDC separation of a mixture of nanoparticles: 6 mg L<sup>-1</sup> of 40 nm nAg, 2 mg L<sup>-1</sup> of 60 nm nAu and 15 mg L<sup>-1</sup> of 120 nm nPS. Chromatograms were acquired using an eluent flow rate of (A) 1.50 mL min<sup>-1</sup>, (B) 1.25 mL min<sup>-1</sup>, (C) 1.00 mL min<sup>-1</sup> and (D) 0.75 mL min<sup>-1</sup>, using on-line dynamic light scattering.

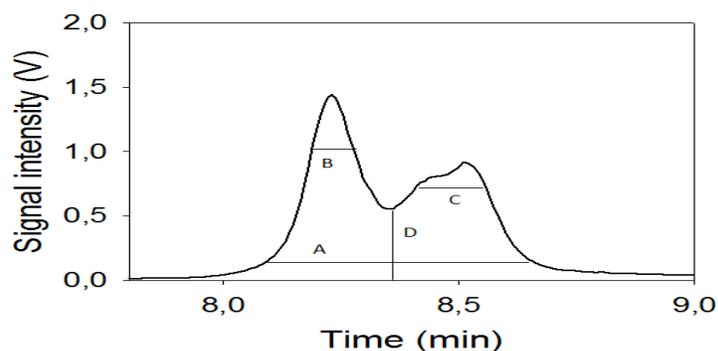
**Table SIV-1.** Influence of the eluent flow rate on retention times, gyration diameters ( $D_g$ ), hydrodynamic diameters ( $D_h$ ) and signal intensities determined for a mixture of 6 mg L<sup>-1</sup> nAg (40 nm), 2 mg L<sup>-1</sup> nAu (60 nm) and 15 mg L<sup>-1</sup> nPS (120 nm) spiked in Milli-Q water using HDC DLS/SLS.

ENP	Eluent flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	Retention time (min)	Retention time difference (min)	$D_g$ (nm)	$D_h$ (nm)	Signal intensity (V)
nAg 40nm	1.50	8.48 ± 0.01	0.03	-	55 ± 3	1.1 ± 0.1
nAu 60nm		8.45 ± 0.01		-	62 ± 7	0.9 ± 0.1
nPS 120nm		8.23 ± 0.01		105 ± 2	109 ± 2	1.64 ± 0.03
nAg 40nm	1.25	10.23 ± 0.02	0.05	-	55 ± 3	1.00 ± 0.04
nAu 60nm		10.18 ± 0.02		-	66 ± 6	0.90 ± 0.01
nPS 120nm		9.89 ± 0.01		106 ± 2	113 ± 3	1.72 ± 0.05
nAg 40nm	1.00	12.79 ± 0.05	0.05	-	56 ± 4	0.92 ± 0.08
nAu 60nm		12.74 ± 0.05		-	60 ± 8	0.86 ± 0.07
nPS 120nm		12.35 ± 0.02		0.39	106 ± 1	117 ± 1
nAg 40nm	0.75	17.10 ± 0.07	0.11	-	56 ± 1	1.22 ± 0.09
nAu 60nm		16.99 ± 0.02		-	65 ± 2	1.04 ± 0.08
nPS 120nm		16.53 ± 0.03		0.46	102 ± 1	128 ± 4

In order to evaluate the influence of the eluent flow rate on the quality of the separation of an ENP mixture, different experimental parameters were determined. The example in Fig. S4.2 provides the meaning of these parameters whereas the calculated values are reported in Table SIV-2. The resolution between the peaks was calculated, based on Equation (1):

$$R = \frac{2(t_{r\ nPS} - t_{r\ nAg-nAu})}{w_{nPS} + w_{nAg-nAu}} \quad (1)$$

where  $R$  refers to resolution,  $t_r$  refers to retention time and  $w$  refers to peak width (at its 75% maximal height). Since the nAu and the nAg eluted closely together,  $t_{r\ nAg-nAu}$  and  $w_{nAg-nAu}$  refer to mean values for the two peaks (i.e.  $t_{r\ nAg-nAu}$  corresponds to the mean of the two retention times and  $w_{nAg-nAu}$  corresponds to the peak width comprising both the nAu and nAg signals).

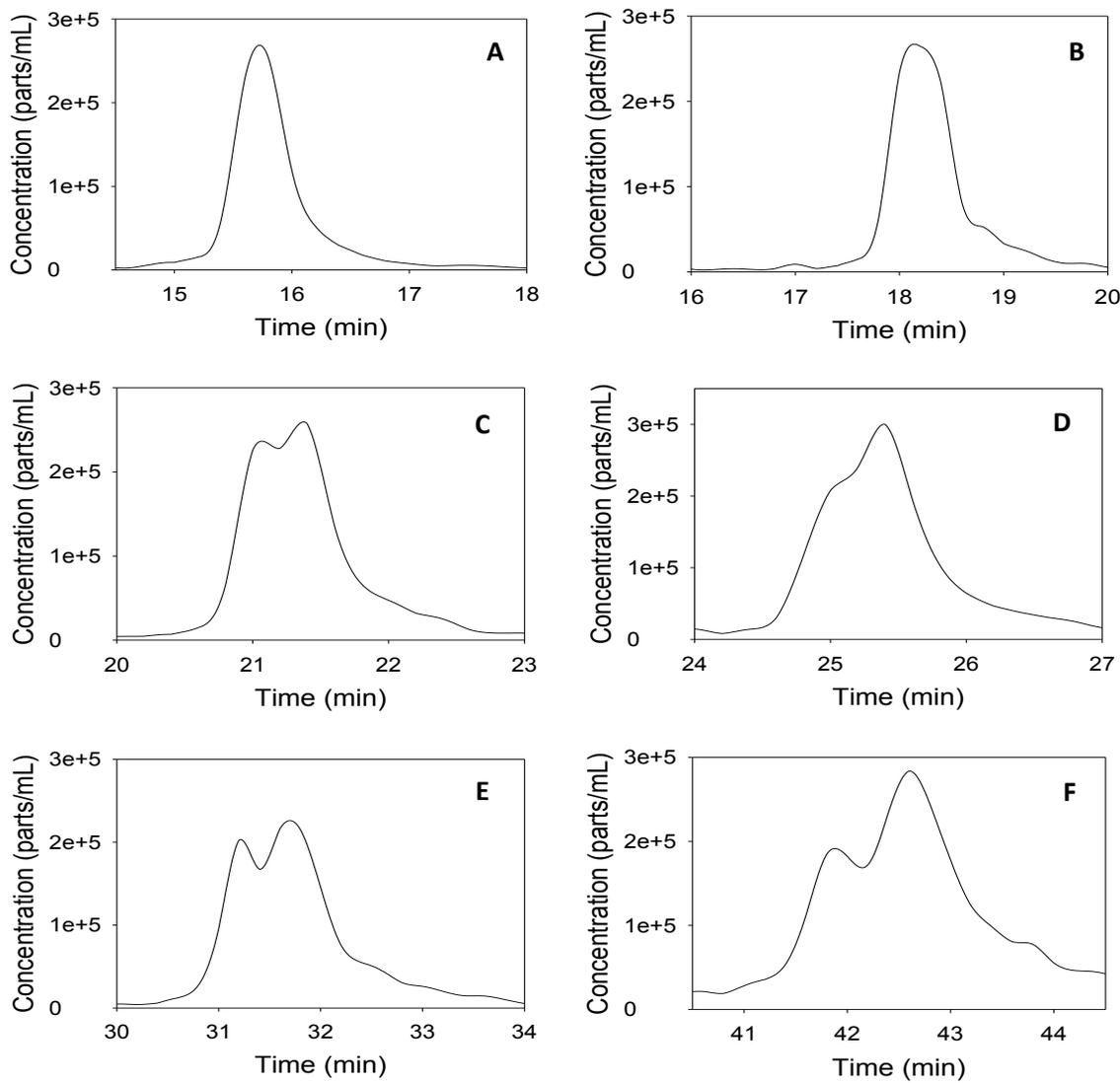


**Fig. S4.2.** HDC DLS chromatogram of experimental measurements that were used to evaluate the performance of the HDC separation. A corresponds to the overall peak width at its 20% maximal height, B to the peak width at its 75% maximal height (nPS), C to the peak width at its 75% maximal height (nAu and nAg) and D to the minimal signal intensity between the principal peaks.

**Table SIV-2.** On-line parameters determined by HDC DLS in order to characterize the influence of the eluent flow rate on the separation of a mixture of 6 mg L<sup>-1</sup> of nAg (40 nm), 2 mg L<sup>-1</sup> of nAu (60 nm) and 15 mg L<sup>-1</sup> of nPS (120 nm).

<b>Flow rate (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>A (min)</b>	<b>B (min)</b>	<b>C (min)</b>	<b>D (V)</b>	<b>Resolution</b>
<b>1.50</b>	0.44 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.27 ± 0.01	2.17 ± 0.04
<b>1.25</b>	0.57 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.28 ± 0.02	2.16 ± 0.06
<b>1.00</b>	0.70 ± 0.05	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.26 ± 0.02	2.12 ± 0.02
<b>0.75</b>	0.91 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.30 ± 0.04	2.04 ± 0.05

These results suggested that a lower eluent flow rate would provide higher retention time differences between the nanoparticles, but that a higher flow rate would cause less ENP dispersion due to a minimization of the peak widths.



**Fig. S4.3.** Evaluation of the influence of the eluent flow rate on the separation quality of a mixture of two nAg (40 nm, 80 nm nominal diameters) for flow rates of (A) 0.80 mL min<sup>-1</sup>, (B) 0.70 mL min<sup>-1</sup>, (C) 0.60 mL min<sup>-1</sup>, (D) 0.50 mL min<sup>-1</sup>, (E) 0.40 mL min<sup>-1</sup> and (F) 0.30 mL min<sup>-1</sup> using HDC SP ICPMS.

**Table SIV-3.** HDC SP ICPMS retention time differences and resolution between the nAg 40 nm and the nAg 80 nm depending on the eluent flow rate.

Flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	Retention time differences (min)	Resolution
0.8	0.23 ± 0.04	0.52 ± 0.08
0.7	0.35 ± 0.07	0.64 ± 0.08
0.6	0.38 ± 0.08	0.59 ± 0.06
0.5	0.50 ± 0.10	0.63 ± 0.11
0.4	0.53 ± 0.06	0.54 ± 0.08
0.3	0.73 ± 0.06	0.42 ± 0.05

#### 4.5.2 Role of ENP concentrations on HDC separation performance

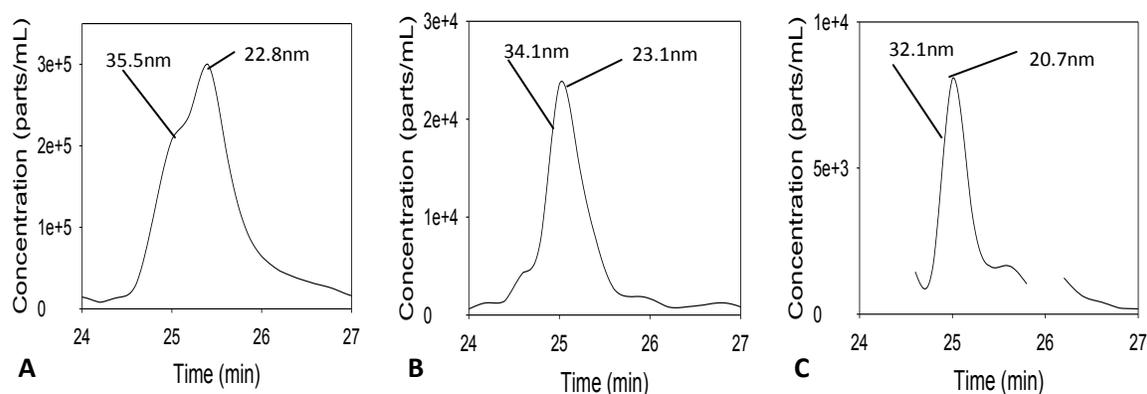
Neither diameters ( $D_h$  and  $D_g$ ) nor retention times changed as a function of the ENP concentrations that were examined (Table SIV-4). Furthermore, retention time differences among peaks were very similar, regardless of ENP concentrations. Consistent with this result, calculated resolutions (Table SIV-5) demonstrated no clear trend emerged as a function of ENP concentration. The only experimental factor that was influenced by modifications to the ENP concentration was the signal intensity.

**Table SIV-4.** Evaluation of the influence of ENP concentrations on HDC DLS retention times, gyration diameters, hydrodynamic diameters and signal intensities as determined for a mixture of nAg (40 nm), nAu (60 nm) and nPS (120 nm) spiked into Milli-Q water with an eluent flow rate of 1.50 mL min<sup>-1</sup>.

#	ENP	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Retention time (min)	Retention time difference (min)	$D_g$ (nm)	$D_h$ (nm)	Signal intensity (V)
1	nAg 40nm	8	8.48 ± 0.01	0.03 0.23	-	58 ± 1	1.91 ± 0.07
	nAu 60nm	3	8.45 ± 0.01		-	73 ± 2	1.62 ± 0.06
	nPS 120nm	19	8.22 ± 0.01		105 ± 1	93 ± 3	2.85 ± 0.03
2	nAg 40nm	6	8.48 ± 0.01	0.03 0.22	-	55 ± 3	1.10 ± 0.11
	nAu 60nm	2	8.45 ± 0.01		-	62 ± 7	0.90 ± 0.09
	nPS 120nm	15	8.23 ± 0.01		109 ± 3	109 ± 2	1.64 ± 0.03
3	nAg 40nm	3	8.49 ± 0.01	0.04 0.21	-	60 ± 1	0.62 ± 0.06
	nAu 60nm	1	8.45 ± 0.01		-	63 ± 1	0.56 ± 0.05
	nPS 120nm	8	8.24 ± 0.01		104 ± 1	118 ± 1	0.90 ± 0.03
4	nAg 40nm	2	8.50 ± 0.01	0.06 0.20	-	-	0.31 ± 0.01
	nAu 60nm	1	8.44 ± 0.01		-	-	0.25 ± 0.01
	nPS 120nm	4	8.24 ± 0.01		106 ± 1	115 ± 2	0.44 ± 0.01

**Table SIV-5.** Separation parameters (Fig. S4.2) and resolution from the HDC DLS separation of several mixtures of nAg (40 nm), nAu (60 nm) and nPS (120 nm) spiked into Milli-Q water. An eluent flow rate of  $1.50 \text{ mL min}^{-1}$  was employed. Particle concentrations are given in Table SIV-4.

# Mixture	A	B	C	D	Resolution
<b>1</b>	$0.47 \pm 0.02$	$0.08 \pm 0.01$	$0.16 \pm 0.01$	$0.78 \pm 0.01$	$2.17 \pm 0.04$
<b>2</b>	$0.44 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.03$	$0.54 \pm 0.01$	$2.40 \pm 0.03$
<b>3</b>	$0.44 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.01$	$0.10 \pm 0.01$	$0.34 \pm 0.02$	$2.56 \pm 0.02$
<b>4</b>	$0.45 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.01$	$0.17 \pm 0.01$	$2.30 \pm 0.02$



**Fig. S4.4.** Evaluation of the influence of the ENP concentrations on the separation quality of a mixture of two nAg (40 nm and 80 nm) for concentrations of (A) 5 and  $18 \mu\text{g L}^{-1}$  (B) 1 and  $3.6 \mu\text{g L}^{-1}$  (5x dilution) and (C) 0.5 and  $1.8 \mu\text{g L}^{-1}$  (10x dilution) using HDC SP ICPMS.

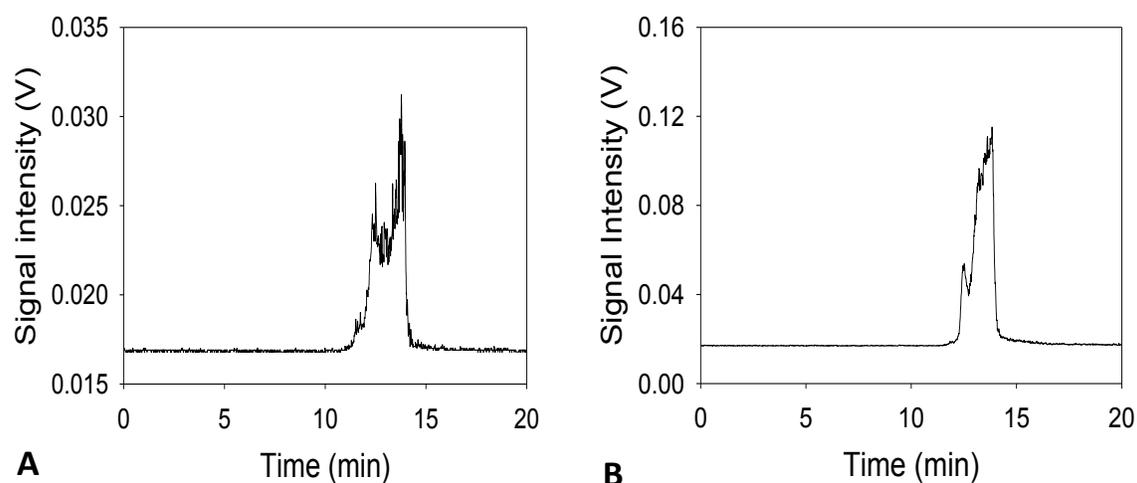
**Table SIV-6.** HDC SP ICPMS retention time differences between the 40 nm nAg and the 80 nm nAg, depending on their concentrations.

ENP	Concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Retention time differences (min)
nAg 40nm	5	$0.50 \pm 0.10$
nAg 80nm	18	
nAg 40nm	1	$0.43 \pm 0.06$
nAg 80nm	3.6	
nAg 40nm	0.5	$0.45 \pm 0.05$
nAg 80nm	1.8	

### 4.5.3 Characterisation of wastewater and river samples

**Table SIV-7.** Semi-quantitative ICPMS and total organic carbon (DOC) analysis of the river and wastewater samples (LOD: limit of detection).

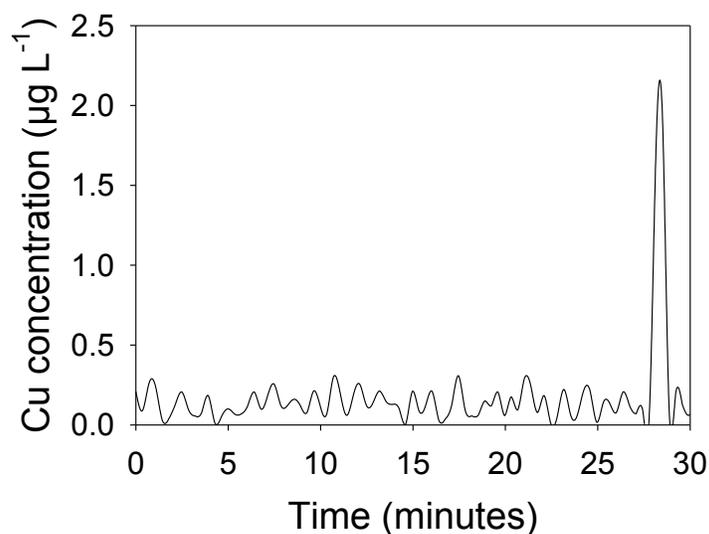
Analyte	Concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
	Repentigny WWTP (optimisation)		Repentigny WWTP (non-spiked samples)		<i>Le Gardeur</i> WWTP		Montreal WWTP	<i>Des Prairies</i> River
	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Effluent	
<b>Mg</b>	5111 ± 123	4839 ± 117	10382 ± 83	12458 ± 100	16824 ± 406	14699 ± 355	19733 ± 476	2691 ± 65
<b>Ca</b>	14315 ± 717	13772 ± 690	16511 ± 510	20833 ± 620	33223 ± 490	32381 ± 478	26915 ± 545	6253 ± 92
<b>Ni</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	7.86 ± 0.07	< LOD	< LOD
<b>Cu</b>	3.1 ± 0.1	3.0 ± 0.1	4.1 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.8 ± 0.1	13.2 ± 0.8	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.1
<b>Zn</b>	16 ± 2	15 ± 2	39 ± 2	15 ± 1	5.1 ± 0.7	12 ± 2	13 ± 2	< LOD
<b>Ag</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>DOC (mg C L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	28.55	23.62	21.46	10.91	7.38	7.58
<b>pH</b>	7.52	7.28	7.38	7.64	7.18	7.12	7.23	7.37



**Fig. S4.5.** (A) Influent and (B) effluent chromatograms obtained for the Repentigny WWTP using on-line dynamic light scattering detectors. For this flow rate of  $1.00 \text{ mL min}^{-1}$ , a retention time of 12.50 minutes in the influent corresponds to a particle diameter of ca. 153 nm (calibration, ref proulx), although SLS gave a  $D_g$  of  $132 \pm 2 \text{ nm}$  and DLS gave sizes of  $358 \pm 4 \text{ nm}$  (online) or  $359 \pm 20 \text{ nm}$  (offline).

**Table SIV-8.** Recoveries of Ag during HDC ICPMS analysis for nAg spiked into Milli-Q water and wastewater samples. 5 and  $18 \mu\text{g L}^{-1}$  nAg was spiked into the samples (recovered concentrations and particle sizes are given in the table). The recoveries were calculated by taking into account the volumes of the injected samples ( $20 \mu\text{L}$ ) and of each of the sample fractions (35 fractions of  $0.1 \text{ mL}$  analysed over 7 minutes of elution at a flow rate of  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ ).

ENP	Sample concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Sample Matrix	Ag concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							Recoveries (%)
			23-24 min	24-25 min	25-26 min	26-27 min	27-28 min	28-29 min	29-30 min	
nAg 40 nm	5	Milli-Q			0.30					29.7
		Influent		0.08						8.1
		Effluent			0.12	0.16	0.07	0.20		54.5
nAg 80 nm	18	Milli-Q			0.11			0.04		8.2
		Influent			0.17	0.08	0.014			31.4
		Effluent					0.47	0.06		29.2



**Fig. S4.6.** Chromatogram of  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of a fulvic acid standard (Suwannee River standard fulvic acid) spiked with  $\text{Cu}^{2+}$  obtained for Milli-Q water using HDC ICPMS. For this flow rate of  $0.50 \text{ mL min}^{-1}$ , the retention time of  $28.8 \pm 0.2$  minutes corresponds to a particle diameter of ca. 1.8 nm (Fig. 4.1).

#### 4.6 Acknowledgements

Funding for this work was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the *Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies*, the Canadian Water Network and the City of Calgary. Assistance from the Repentigny, *Le Gardeur* and Montreal WWTP and the groups of Y. Comeau (*École Polytechnique*) and S. Ghoshal (McGill) was also greatly appreciated.

## Chapitre 5. Conclusion

Au cours des dernières années, les NM ont été incorporés dans une grande variété de matériaux manufacturiers dus à leurs propriétés uniques découlant de leur petite taille. Malgré leur utilisation dorénavant répandue, l'impact des NM sur l'environnement et sur la santé de la population suite à leur utilisation et leur rejet est largement méconnu car, par exemple, les études de toxicité sur les ions  $\text{Ag}^+$  ne peuvent être utilisées pour évaluer la toxicité des nAg. De plus, les nanoparticules présentes dans les produits de soin personnel tels que les cosmétiques, les pâtes à dents ou les crèmes solaires sont relâchées dans les égouts municipaux suite à leur utilisation. Les agences de réglementation se questionnent donc par rapport aux concentrations de NP qui sont déchargées, c'est-à-dire à savoir si les rejets des usines d'épuration d'eaux usées contiennent des nanoparticules en quantités suffisantes pour présenter des risques pour l'environnement ou pour la population. En effet, des résultats préliminaires attestent que les nAg, les nTiO<sub>2</sub> et les nZnO sont déjà présentes à des concentrations assez élevées dans les effluents des usines de traitement des eaux usées pour engendrer des risques pour les organismes aquatiques [65]. Le but de ce projet de recherche est donc de tenter de répondre à ces questions en fournissant les informations nécessaires à la réalisation d'études de destin environnemental et de toxicité via le développement d'une technique analytique permettant de détecter, caractériser et quantifier les NP en matrices environnementales, c'est-à-dire dans de l'eau de rivière et dans des eaux usées. Actuellement, seulement quelques groupes de recherche sont en mesure de réaliser ces analyses, les principaux défis découlant des faibles concentrations des NM en matrice environnementale et des multiples sources d'interférences présentent dans ce type d'échantillons. De plus, la technique analytique développée ne doit pas altérer les propriétés physiques des NP lors de leur caractérisation.

L'approche utilisée a donc été de premièrement séparer des nanoparticules selon leur taille, à l'aide de la chromatographie hydrodynamique, pour ensuite les détecter et les caractériser en temps réel à l'aide de détecteurs directement couplés à la colonne chromatographique. Pour ce faire, la caractérisation de nanoparticules standards a été en

premier lieu réalisée en confirmant leur taille fournie par les fabricants via l'utilisation d'une panoplie de détecteurs indépendants tels que des détecteurs de diffusion statique et dynamique de la lumière, d'une ultracentrifugeuse analytique, d'un ICPMS en mode particule unique et à l'aide d'une courbe d'étalonnage et des temps de rétention des nanoparticules dans la colonne HDC. Il a été ensuite confirmé que la colonne HDC sépare bel et bien les NP seulement selon leurs tailles en couplant la colonne HDC à des détecteurs DLS et SLS, la détection des nanoparticules en temps réel ayant permis de confirmer que les plus grosses NP ont effectivement des temps de rétention plus faibles dans la colonne HDC que de plus petites NP. Ensuite, l'influence des conditions expérimentales telles que la composition de l'éluant, le débit de l'éluant et la concentration en NP des échantillons injectés dans la colonne HDC sur la qualité de la séparation de mélanges de NP a été évaluée. Il a été démontré qu'un éluant de propriétés (pH, force ionique) semblables à celles d'une eau naturelle mais auquel une faible quantité de tensioactifs a été ajoutée permet de favoriser la stabilité et donc le maintien de l'intégrité des NP injectées dans le système analytique. Aussi, seulement le débit de l'éluant traversant la colonne HDC a une influence sur la qualité de la séparation d'un mélange de NP, un débit plus faible résultant en des temps de rétention davantage espacés. Finalement, la séparation et la détection de nanoparticules standards ajoutées à des échantillons environnementaux tels que de l'eau de rivière et des eaux usées ont aussi été réalisées grâce à la méthode développée.

En effet, ayant dorénavant bien caractérisé les mélanges de nanoparticules dans des échantillons d'eau Milli-Q, il a par la suite été prouvé que lorsque les NP sont ajoutées à des échantillons d'eau de rivière, que leur passage dans la colonne HDC permet de les séparer des particules originalement présentes dans l'eau, minimisant ainsi l'impact de ces interférents sur la qualité de la caractérisation des NP ensuite réalisée. Aussi, il a été possible d'utiliser la colonne HDC couplée au détecteur SP-ICPMS dans leurs conditions optimisées pour séparer, détecter et caractériser les nAg d'un mélange de nAg de 80 et 40 nm ajouté à des échantillons d'eau Milli-Q et d'eaux usées (d'affluent et d'effluent) à des concentrations de 18 et 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivement (injection dans la colonne HDC d'un mélange à des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{g L}^{-1}$  et détection à l'aide

du SP-ICPMS de concentrations de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  dû à la dilution ayant eu lieu lors de l'élution des NP), ce qui correspond aux concentrations de NP qu'il est attendu de rencontrer dans l'environnement. Finalement, l'analyse d'échantillons d'eaux usées avec la méthode HDC-SP-ICPMS développée a permis de confirmer que ceux-ci ne contenaient originalement pas de nAg.

Somme toute, les résultats obtenus au cours de ce projet de maîtrise ont permis de mettre en lumière le potentiel d'une technique analytique se basant sur le couplage de la chromatographie hydrodynamique avec un détecteur (SP)ICPMS lorsqu'appliquée à la détection et la caractérisation de NP en matrice environnementale. En effet, l'injection des échantillons de NP dans la colonne HDC permet de séparer les NP de particules de plus grandes ou plus petites tailles initialement présentes dans les échantillons environnementaux et auxquelles des ions de même nature que les NP auraient pu s'adsorber, ces particules ayant pu être des sources d'interférences. De plus, l'utilisation en ligne d'un SP-ICPMS permet de déterminer la nature, la taille et la concentration des NP (et des ions dissous) dans un échantillon, et ce à des concentrations de NP représentatives de la réalité environnementale.

Par contre, la principale limite de la méthode est actuellement que le SP-ICPMS ne permet pas de distinguer les signaux des plus petites nanoparticules de ceux des ions dissous (limite de détection en termes de taille d'environ 20 nm de diamètre). Étant donné que les plus petites NP sont soupçonnées de présenter une plus grande toxicité (étant suspectées d'être davantage en mesure de traverser la membrane cellulaire), la limite de détection en termes de taille de la méthode se doit d'être diminuée. Pour ce faire, une avenue présentement évaluée par certains étudiants du groupe de recherche est d'utiliser une colonne échangeuse d'ions en amont du SP-ICPMS dans le but de minimiser la concentration en ions des échantillons de NP faisant leur entrée dans le SP-ICPMS, le bruit de fond lié à la présence d'ions étant alors minimisé et la discrimination des plus petits pulses découlant de la détection des plus petites NP étant alors facilitée.

Finalement, une attention particulière pourrait être apportée aux étapes de collecte, de transport, d'entreposage et de préparation des échantillons

environnementaux, manipulations préalables à l'application de la présente méthode analytique développée. En effet, l'ensemble de ces étapes ne doivent pas induire de modifications de l'état des nanoparticules initialement présentes dans des eaux usées par exemple, pour ainsi s'assurer que si des nanoparticules sont détectées, que les résultats de leur caractérisation représentent bel et bien leur état dans l'environnement.

## Références

- [1] Hochella, M.F., *Nanoscience and technology the next revolution in the Earth sciences*. Earth and Planetary Science Letters, 2002. **203**(2): p. 593-605.
- [2] Rejeski, D., T. Kuiken, and E. Pauwels. *Project on Emerging Nanotechnologies*. 2013; Available from: <http://www.nanotechproject.org/>.
- [3] Pergantis, S.A., T.L. Jones-Lepp, and E.M. Heithmar, *Hydrodynamic Chromatography Online with Single Particle-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Ultratrace Detection of Metal-Containing Nanoparticles*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(15): p. 6454-6462.
- [4] Laborda, F., Jimenez-Lamana, J., Bolea, E., and Castillo, J.R., *Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2013. **28**(8): p. 1220-1232.
- [5] Woodrow Wilson International Center for Scholars, *A nanotechnology consumer products inventory*. 2014.
- [6] von der Kammer, F., Ferguson, P.L., Holden, P.A., Masion, A., Rogers, K. R., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., and Unrine, J.M., *Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): General considerations and conceptual case studies*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2012. **31**(1): p. 32-49.
- [7] Baalousha, M., B. Stolpe, and J.R. Lead, *Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(27): p. 4078-4103.
- [8] Weinberg, H., A. Galyean, and M. Leopold, *Evaluating engineered nanoparticles in natural waters*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(1): p. 72-83.
- [9] Mueller, N.C. and B. Nowack, *Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**(12): p. 4447-4453.
- [10] Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., and Nowack, B., *Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(24): p. 9216-9222.

- [11] Nowack, B., Mueller, N.C., Gottschalk, F., Sonderer, T., and Scholz, R.W., *Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2009. **237**.
- [12] Rakcheev, D., A. Philippe, and G.E. Schaumann, *Hydrodynamic Chromatography Coupled with Single Particle-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Investigating Nanoparticles Agglomerates*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(22): p. 10643-10647.
- [13] Poda, A.R., Bednar, A. R., Kennedy, A. J., Harmon, A., Hull, M., Mitrano, D. M., Ranville, J. F., and Steevens, J., *Characterization of silver nanoparticles using flow-field flow fractionation interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(27): p. 4219-4225.
- [14] Mitrano, D.M., Leshner E. K., Bednar, A., Monserud, J., Higgins, C. P., and Ranville, J. F., *Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2012. **31**(1): p. 115-121.
- [15] Pace, H.E., Rogers, N. J., Jarolimek, C., Coleman, V. A., Gray, E. P., Higgins, C. P., and Ranville, J. F., *Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: A Performance Evaluation and Method Comparison in the Determination of Nanoparticle Size*. Environmental Science & Technology, 2012. **46**(22): p. 12272-12280.
- [16] Tuoriniemi, J., G. Cornelis, and M. Hasselov, *Size Discrimination and Detection Capabilities of Single-Particle ICPMS for Environmental Analysis of Silver Nanoparticles*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(9): p. 3965-3972.
- [17] Pace, H.E., Rogers, N. J., Jarolimek, C. Coleman, V. A., Higgins, C. P., and Ranville, J. F., *Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(24): p. 9361-9369.
- [18] Reed, R.B., Higgins, C. P., Westerhoff, P., Tadjiki, S., and Ranville, J. F., *Overcoming challenges in analysis of polydisperse metal-containing nanoparticles by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2012. **27**(7): p. 1093-1100.
- [19] Tiede, K., Boxall, A. B. A., Tiede, D., Tear, S. P., David, H., and Lewis, J., *A robust size-characterisation methodology for studying nanoparticle behaviour in 'real' environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2009. **24**(7): p. 964-972.

- [20] Brewer, A.K. and A.M. Striegel, *Characterizing a spheroidal nanocage drug delivery vesicle using multi-detector hydrodynamic chromatography*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **399**(4): p. 1507-1514.
- [21] Gray, E.P., Bruton, T. A., Higgins, C. P., Halden, R. U., Westerhoff, P., and Ranville, J. F., *Analysis of gold nanoparticle mixtures: a comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2012. **27**(9): p. 1532-1539.
- [22] Small, H. and M.A. Langhorst, *Hydrodynamic Chromatography*. Analytical Chemistry, 1982. **54**(8): p. A892-&.
- [23] Tiede, K., Boxall, A. B. A., Tear, S. P., Lewis, J., David, H., and Hasselov, M., *Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment*. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2008. **25**(7): p. 795-821.
- [24] Striegel, A.M. and A.K. Brewer, *Hydrodynamic Chromatography*. Annual Review of Analytical Chemistry, Vol 5, 2012. **5**: p. 15-34.
- [25] Tiede, K., Boxall, A. B. A., Wang, X., Gore, D., Tiede, D., Baxter, M., David, H., Tear, S. P., and Lewis, J., *Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2010. **25**(7): p. 1149-1154.
- [26] Cho, T.J. and V.A. Hackley, *Fractionation and characterization of gold nanoparticles in aqueous solution: asymmetric-flow field flow fractionation with MALS, DLS, and UV-Vis detection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **398**(5): p. 2003-2018.
- [27] Bednar, A.J., Poda, A. R., Mitrano, D. M., Kennedy, A. J., Gray, E. P., Ranville, J. F., Hayes, C. A., Crocker, F. H., and Steevens, J. A., *Comparison of on-line detectors for field flow fractionation analysis of nanomaterials*. Talanta, 2013. **104**: p. 140-148.
- [28] Kammer, F.V.D., M. Baborowski, and K. Friese, *Field-flow fractionation coupled to multi-angle laser light scattering detectors: Applicability and analytical benefits for the analysis of environmental colloids*. Analytica Chimica Acta, 2005. **552**(1-2): p. 166-174.
- [29] Lead, K.W.J., *Environmental colloids and particles: behaviour, separation and characterisation*. John Wiley & Sons, 2007. **10**.
- [30] von der Kammer, F., Legros, S., Larsen, E. H., Loeschner, K., and Hofman, T., *Separation and characterization of nanoparticles in complex food and*

- environmental samples by field-flow fractionation*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(3): p. 425-436.
- [31] Zattoni, A., Rambaldi, D. C., Reschiglian, P., Melucci, M., Krol, S., Coto Garcia, A. M., Sanz-Medel, A., Roessner, D., and Johann, C., *Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering detection for the analysis of structured nanoparticles*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(52): p. 9106-9112.
- [32] Domingos, R.F., Baalousha, M. A., Ju-Nam, Y., Reid, M. M., Tufenkji, N., Lead, J. R., Leppard, G. G., and Wilkinson, K. J., *Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(19): p. 7277-7284.
- [33] Schmidt, B., Loeschner, K., Hadrup, N., Mortensen, A., Sloth, J. J., Koch, C. B., and Larsen, E. H., *Quantitative Characterization of Gold Nanoparticles by Field-Flow Fractionation Coupled Online with Light Scattering Detection and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(7): p. 2461-2468.
- [34] Hasseløev, M., Readman, J. W., Ranville, J. F., and Tiede, K., *Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles*. Ecotoxicology, 2008. **17**(5): p. 344-361.
- [35] Larkin, M., *Introduction to Light Scattering and Phase Analysis Light Scattering*. Wyatt Technology Corporation: Santa Barbara, California., 2013.
- [36] Chen, M., *Introduction to Dynamic light Scattering and Phase Analysis Light Scattering*. Wyatt Technology Corporation: Santa Barbara, California., 2013.
- [37] Haruhisa Kato, A.N., Kayori Takahashi and Shinichi Kinugasa, *Accurate size and size-distribution determination of polystyrene latex nanoparticles in aqueous medium using dynamic light scattering and assymetrical flow field flow fractionation with multi-angle light scattering*. Nanomaterials, 2012. **2**: p. 15-30.
- [38] Cumberland, S.A. and J.R. Lead, *Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(52): p. 9099-9105.
- [39] Planken, K.L. and H. Coelfen, *Analytical ultracentrifugation of colloids*. Nanoscale, 2010. **2**(10): p. 1849-1869.
- [40] Wohlleben, W. and M.D. Lechner, *AUC and HDC characterization of heterogeneous polymer dispersions*. Colloid and Polymer Science, 2008. **286**(2): p. 149-157.

- [41] Perevyazko, I., Vollrath, A., Hornig, S., Pavlov, G. M., and Schubert, U. S., *Characterization of Poly(methyl methacrylate) Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation Using Analytical Ultracentrifugation, Dynamic Light Scattering, and Scanning Electron Microscopy*. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 2010. **48**(18): p. 3924-3931.
- [42] Zook, J.M., Rastogi, V., MacCuspie, R. I., Keene, A. M., and Fagan, J., *Measuring Agglomerate Size Distribution and Dependence of Localized Surface Plasmon Resonance Absorbance on Gold Nanoparticle Agglomerate Size Using Analytical Ultracentrifugation*. *ACS Nano*, 2011. **5**(10): p. 8070-8079.
- [43] Cole, J.L. and J.C. Hansen, *Analytical ultracentrifugation as a contemporary biomolecular research tool*. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 1999. **10**(4): p. 163-76.
- [44] Schuck, A.B.a.P., *Analytical Ultracentrifugation in the Study of Protein Self-association and Heterogeneous Protein-Protein Interactions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*, 2014.
- [45] Alexander Bootz, V.V., Dieter Schubert, and Jorg Kreuter, *Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(buytl cyanoacrylate) nanoparticles*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003. **57**: p. 369-375.
- [46] Degueldre, C. and P.Y. Favarger, *Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study*. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003. **217**(1-3): p. 137-142.
- [47] Degueldre, C., P.Y. Favarger, and S. Wold, *Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode*. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **555**(2): p. 263-268.
- [48] Laborda, F., Jimenez-Lamana, J., Bolea, E., and Castillo, J. R., *Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2011. **26**(7): p. 1362-1371.
- [49] Hadioui, M., S. Leclerc, and K.J. Wilkinson, *Multimethod quantification of Ag<sup>+</sup> release from nanosilver*. *Talanta*, 2013. **105**: p. 15-19.
- [50] Franze, B., I. Strenge, and C. Engelhard, *Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: evaluation of three different pneumatic and piezo-based sample introduction systems for the characterization of silver*

- nanoparticles*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2012. **27**(7): p. 1074-1083.
- [51] Liu, J., Murphy, K. E., MacCuspie, R. I., and Winchester, M. R., *Capabilities of Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the Size Measurement of Nanoparticles: A Case Study on Gold Nanoparticles*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(7): p. 3405-3414.
- [52] Hadioui, M., C. Peyrot, and K.J. Wilkinson, *Improvements to Single Particle ICPMS by the Online Coupling of Ion Exchange Resins*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(10): p. 4668-4674.
- [53] Farkas, J., Peter, H., Christian, P., Urrea, J. A. G., Hasselov, M., Tuoriniemi, J. Gustafsson, S., Olsson, E., Hylland, K., and Thomas, K. V., *Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine*. Environment International, 2011. **37**(6): p. 1057-1062.
- [54] Wilkinson, K. J., *Emerging issues in toxicology: Characterization of nanoparticles in aqueous media*. Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology (Férard, J.F. and Blaise, C., editors). p. 395-406. DOI: 10.1007#978-94-007-5704-2\_38
- [55] Powers, K., Palazuelos, M., Moudgil, B., and Roberts, S., *Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies*. Nanotoxicology, 2007. **1**(1): p. 42-51.
- [56] Wiesner, M.R., Lowry, G. V., Alvarez, P., Dionysiou, D., and Biswas, P., *Assessing the risks of manufactured nanomaterials*. Environmental Science & Technology, 2006. **40**(14): p. 4336-4345.
- [57] Kaegi, R., Voegelin, A., Ort, C., Sinnet, B., Thalmann, B., Krismer, J., Hagendorfer, H., Elumelu, M., and Mueller, E., *Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems*. Water Research, 2013. **47**(12): p. 3866-3877.
- [58] Hoque, M.E., Khosravi, K., Newman, K., and Metcalfe, C. D., *Detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous matrices using asymmetric-flow field flow fractionation with inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2012. **1233**: p. 109-115.
- [59] Mahl, D., Diendorf, J., Meyer-Zaika, W., and Epple, M., *Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2011. **377**(1-3): p. 386-392.

- [60] Dolan, J.W., *Why do peaks Tail?*  
<http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgceurope/382003/69793/article.pdf>, 2003.
- [61] L. R. Snyder, J.J.K., J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*. 1997. Wiley: New York.
- [62] Lead, J.R., Wilkinson, K. J., Balnois, E., Cutak, B. J., Larive, C. K., Assemi, S., and Beckett, R., *Diffusion coefficients and polydispersities of the Suwannee River fulvic acid: Comparison of fluorescence correlation spectroscopy, pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance, and flow field-flow fractionation*. *Environmental Science & Technology*, 2000. **34**(16): p. 3508-3513.
- [63] Lead, J.R. and K.J. Wilkinson, *Aquatic colloids and nanoparticles: Current knowledge and future trends*. *Environmental Chemistry*, 2006. **3**(3): p. 159-171.
- [64] Pycke, B.F.G., Benn, T. M., Herckes, P., Westerhoff, P., and Halden, R. U., *Strategies for quantifying C-60 fullerenes in environmental and biological samples and implications for studies in environmental health and ecotoxicology*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2011. **30**(1): p. 44-57.
- [65] Gottschalk, F., Ort, C., Scholz, R. W., and Nowack, B., *Engineered nanomaterials in rivers - Exposure scenarios for Switzerland at high spatial and temporal resolution*. *Environmental Pollution*, 2011. **159**(12): p. 3439-3445.
- [66] Mitrano, D.M., Barber, A., Bednar, A., Westerhoff, P., Higgins, C. P., and Ranville, J. F., *Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS) (vol 27, pg 1131, 2012)*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2013. **28**(12): p. 1949-1949.
- [67] Proulx, K. and K.J. Wilkinson, *Separation, detection and characterisation of engineered nanoparticles in natural waters using hydrodynamic chromatography and multi-method detection (light scattering, analytical ultracentrifugation and single particle ICP-MS)*. *Environmental Chemistry*, 2014. **11**(4): p. 392-401.