

Université de Montréal

Développement d'une méthode d'extraction et d'analyse de nanoparticules d'argent dans le bœuf haché par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode particule unique

Par

Alexandre Chalifoux

Département de Chimie, Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences en chimie

Mai 2023

© Alexandre Chalifoux, 2023

Université de Montréal

Département de Chimie, Faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé

Développement d'une méthode d'extraction et d'analyse de nanoparticules d'argent dans le bœuf haché par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode particule unique

Présenté par

Alexandre Chalifoux

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Patrick Hayes

Président-rapporteur

Kevin Wilkinson

Directeur de recherche

Boutayna Rhourri

Membre du jury

Résumé

La caractérisation de nanomatériaux dans des matrices alimentaires et animales suscite un intérêt scientifique important afin d'évaluer les risques potentiels de l'exposition liés à l'utilisation grandissante des nanomatériaux par plusieurs industries, y compris un certain nombre d'applications agroalimentaires. Un facteur limitant à l'étude et la réglementation des nanomatériaux dans des matrices complexes telle que la nourriture est l'absence de méthodes standardisées pour l'extraction et l'analyse de nanoparticules, tout en évitant l'altération de certaines caractéristiques physicochimiques des nanoparticules. Les travaux présentés dans ce mémoire abordent l'optimisation de plusieurs approches de préparation d'échantillon (hydrolyse enzymatique et alcaline) pour l'extraction de nanoparticules d'Ag préalablement équilibrées dans une matrice de bœuf haché mi-maigre. Les nanoparticules extraites ont été analysées par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode particule unique (SP-ICP-MS) permettant la mesure de leur taille et concentration, mais aussi de la concentration en métal dissous, le tout à de très faibles concentrations (de l'ordre du ng/L). La validation de l'analyse par SP-ICP-MS a été réalisée par évaluation de la répétabilité, de la détermination des limites de détection et par une investigation de l'influence du traitement de données sur l'interprétation des résultats.

Les pertes de nanoparticules lors de la préparation des échantillons ont été minimisées par l'identification et l'optimisation de paramètres clés tels que la composition du médium d'extraction, l'utilisation d'ultrasons et de la manipulation de l'échantillon après dégradation de la matrice. Les meilleurs recouvrements ont été obtenus par hydrolyse alcaline de la matrice en utilisant de l'hydroxyde de tetramethylammonium (TMAH), mais les échantillons obtenus étaient moins stables et plus susceptibles aux altérations des propriétés physicochimiques des nanoparticules que pour la dégradation par hydrolyse enzymatique utilisant lipase et pancréatine de porc.

Mots-clés : Nanoparticules d'argent, ICP-MS en mode particule unique, nanomatériaux, extraction enzymatique, hydrolyse alcaline, Proteinase-K, TMAH, nourriture.

Abstract

The regulation and characterization of nanomaterials in foods and animal matrices are of great interest due to the potential risks associated with their exposure and the increasing number of instances where they are used within the food industry. One factor limiting the scientifically rigorous regulation of nanoparticles in foods is the lack of standardized procedures for the extraction of nanoparticles (NP) from complex matrices, without alteration of their physico-chemical properties. To this end, two sample preparation approaches (enzymatic- and alkaline-based hydrolyses) were tested and optimized in order to extract 40 nm Ag NP, following their equilibration with a fatty ground beef matrix. Extracted NP were characterized using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS), allowing the determination of NP size and concentrations and also dissolved metal concentrations at trace levels. Validation of the SP-ICP-MS analysis was achieved by an evaluation of the repeatability and accuracy and by a determination of the various detection limits. Finally, we also looked into the influence of data treatment on interpretation of the results.

NP losses during the sample preparation were minimized by identifying and optimizing key parameters such as the composition of the extraction media, usage of ultrasonication or the handling of the sample after separation from the undigested matter, among other points. The alkaline approach using TMAH (tetramethylammonium hydroxide) was found to have the highest recoveries, however processed samples were found to be less stable and more prone to alteration of the Ag NP physicochemical characteristics than samples processed using an enzymatic digestion based upon pork pancreatin and lipase.

Keywords: Silver nanoparticles; Single Particle ICP-MS; nanomaterials; Enzymatic Extraction; Alkaline Hydrolysis, Proteinase K, TMAH, Food.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des sigles et abréviations.....	12
Remerciements	14
Chapitre 1 – Introduction	15
1.1 Développement de la nanotechnologie.....	15
1.2 Utilisation de la nanotechnologie par l'industrie agroalimentaire	16
1.3 Risques liés à l'exposition de nanoparticules métalliques.....	17
1.3.1 Stabilité colloïdale en milieu aqueux	17
1.3.2 Voies d'exposition et de distribution dans l'organisme.....	20
1.3.3 Toxicité de certaines nanoparticules métalliques chez les mammifères	21
1.4 Méthodes d'analyse des nanoparticules métalliques.....	22
1.4.1 Techniques de séparation	22
1.4.2 Techniques microscopiques.....	23
1.4.3 Techniques spectroscopiques et électrophorétiques.....	24
1.4.4 Techniques de spectrométrie à plasma à couplage induit	25
1.5 Préparations des échantillons pour l'analyse de NMs dans des matrices biologiques complexes.....	33

1.6 Objectifs du projet de recherche	35
Chapitre 2 – Validation de la méthode analytique	37
2.1 Répétabilité de l’analyse de nanoparticules d’Ag par SP-ICP-MS.....	37
2.1.1 Préparation des échantillons	37
2.1.2 Acquisition des données par SP-ICP-MS	38
2.1.3 Traitement des données brutes.....	39
2.1.4 Validation de la méthode par analyse à long terme d’une suspension de nanoparticules d’Ag.....	39
2.2 Influence du logiciel de traitement de données sur l’interprétation des résultats	41
2.2.1 Traitement de données SP-ICP-MS par Nu Quant	42
2.2.2 Comparaison du traitement des données brutes effectué par Syngistix et Nu Quant	42
Chapitre 3 – Analysis of silver nanoparticles in ground beef by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS)	45
3.1 Abstract	45
3.2 Introduction.....	46
3.3 Results and discussion.....	47
3.3.1 Optimization of NP extraction by enzymatic hydrolysis	48
3.3.2 Fate of Ag NP after the enzymatic extraction	54
3.3.3 Aklaline hydrolysis of the meat matrix	56
3.3.4 Stability of the processed samples over 4 days	56
3.3.5 Evaluation of analytical performance	58
3.4 Material and Methods.....	59
3.4.1 Chemicals and lab equipment.....	59
3.4.2 Preparation of a meat reference material	60

3.4.3 Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis for Ag NP extraction.....	60
3.4.4 Ultrasound assisted alkaline hydrolysis for Ag NP extraction.....	61
3.4.5 Stability of the processed samples.....	61
3.4.6 Mass balances of Ag NPs.....	61
3.4.7 Total Ag determination in samples	61
3.4.8 ICP-MS and SP-ICP-MS sample analysis	62
3.5 Conclusions.....	63
3.6 Author Contributions	63
3.7 Funding.....	63
3.8 Data availability statement	64
3.9 Conflicts of Interest.....	64
3.10 Supplementary information.....	64
3.10.1 Calculation of method limits of detection (LOD) and quantification (LOQ)	71
Conclusions générales.....	73
Références bibliographiques.....	75

Liste des tableaux

Tableau 1 Recouvrement obtenu en mode SP-ICP-MS par rapport à la concentration totale déterminée par ICP-MS en mode quantitatif dans 3 matrices après dilution : eau Milli-Q, extrait enzymatique et extrait alcalin (TMAH).	40
Tableau 2 Paramètres de la courbe d'étalonnage pour l'Ag déterminée par Syngistix et Nu Quant selon une régression de type $y = mx + b$ avec intervalles de confiance pour un niveau de confiance de 95 %	43
Tableau 3 Comparaison entre les résultats obtenus par Syngistix et par Nu Quant sur une série d'analyse. Chaque échantillon est analysé en triplicata. Les mesures ayant une différence statistiquement significative (test t, $p < 0.05$) sont mises en valeur (cellules colorées)	44
Tableau 4 Overview of selected extraction conditions tested for method optimization of enzymatic extraction. The enzymatic solution was composed of 1.5 mg mL^{-1} each of Protease (Proteinase K or Pancreatin) and Lipase. SDS=sodium dodecyl sulfate.....	49
Tableau 5 Recovery of Ag from the meat reference material after alkaline extraction.	56
Tableau 6 Method limits of detection (LoD) and method limits of quantification (LoQ) determined for SP-ICP-MS analysis of Ag NP (LoD_{size} , LoQ_{size} , LoD_{number} , LoQ_{number}) and dissolved Ag (LoD_{diss} , LoQ_{diss}) in two different extraction media (Proteinase K and TMAH).	59

Liste des figures

Figure 1 Évolution du nombre de brevets déposés au bureau américain des brevets et des marques de commerces impliquant la nanotechnologie, séparés par thème d'application. Reproduction de Wu <i>et al.</i> ³	15
Figure 2 Mécanismes possibles des propriétés antibactériennes de nanoparticules d'Ag. Reproduction de Rai <i>et al.</i> ²⁵	17
Figure 3 Schématisation de profils d'énergie d'interactions DLVO (W) entre 2 surfaces identiques séparées par une distance D normalisée selon la réciproque de la longueur de Debye κ séparant les 2 surfaces et de la densité de charge de surface (σ_c). Reproduction de Israelachvili ²⁸	19
Figure 4 Formes d'exposition et voies d'internalisation de NP de TiO ₂ chez l'humain. Reproduction de Musial <i>et al.</i> ³⁰	20
Figure 5 Schéma de l'introduction d'échantillon dans la torche au plasma d'un ICP-MS. Reproduction de Montano <i>et al.</i> ⁶⁴	27
Figure 6 Schéma d'un analyseur de masse de type quadrupôle.	28
Figure 7 Schéma d'un ICP-MS avec analyseur de type temps de vol. Reproduction de Borovinskaya <i>et al.</i> ⁶⁷	29
Figure 8 Schéma d'un ICP-MS à analyseur de masse à double focus de type secteur magnétique. Reproduction de Moldovan <i>et al.</i> ⁶⁸	30
Figure 9 Intensité en fonction du temps détectée dans un échantillon contenant nanoparticules et métal sous forme dissoute (gauche) et mêmes données représentées sous forme d'un histogramme de fréquence en fonction de l'intensité du signal (droit). Reproduction de Laborda <i>et al.</i> ⁶⁹	31
Figure 10 Résumé des différentes approches de préparation d'échantillons biologiques publiés dans la littérature en fonction de la matrice et du type de NP étudiée. Reproduction de Laycock, <i>et al.</i> ⁷⁹	35
Figure 11 Taille moyenne des nanoparticules d'Ag détectées dans un échantillon de contrôle qualité préparé à une concentration d'environ 50 ng/L dans de l'eau Milli-Q à partir d'une solution mère conservée à 4 °C.....	40

Figure 12 Distribution of Ag in centrifugation tubes obtained during the enzymatic extractions (1.5 mg mL⁻¹ Pancreatin + 1.5 mg mL⁻¹ Lipase, 15 min of ultrasonication) of 0.1 g of lyophilized ground beef samples after 15 min of centrifugation at 50 x g for: (a) the prepared reference material at a concentration of 1216 ± 88 ng g⁻¹; (b) a sample where the 40 nm Ag NP were spiked in the extraction media at a concentration of 869 ± 5 ng g⁻¹, immediately before processing. ...50

Figure 13 Distribution of total Ag in samples processed by enzymatic hydrolysis (Pancreatin + Lipase, 1.5 mg mL⁻¹ each) as a function of centrifugation time at 50 xg.52

Figure 14 Influence of sample mass on the recovery of 40 nm Ag NP after enzymatic extraction a mixture of Pancreatin (1.5 mg mL⁻¹) and + Lipase (1.5 mg mL⁻¹).53

Figure 15 Particle size distributions of (a) 20 nm Ag NP in water; (b) 40 nm Ag NP in water; (c) 20 nm Ag NP in the enzymatic extract; and (d) 40 nm Ag NP in the enzymatic extract. A mixture of Pancreatin and Lipase (1.5 mg mL⁻¹ each) was used. The calculated size limit of detection is represented by a dashed line on the PSD. Sizes correspond to the calculated mean diameters (assuming a spherical particle) of 3 samples (each measured in triplicate) with their standard deviations.55

Figure 16 Total Ag concentration in the supernatant of extracts obtained by enzymatic (Pancreatin + Lipase) or alkaline (2.5 % TMAH) extraction as a function of storage time at 4 °C.57

Figure 17 Aging of Ag NP detected in the 2.5 % TMAH extract of a processed sample stored at 4 °C with day 0 being the day the sample was prepared. The LoD_{size} is represented by a dashed line on the PSD.58

Figure 18 Representative images of sample preparation by the enzymatic extraction procedure; (a) before ultrasonication, (b) after ultrasonication, (c) after centrifugation, and (d) separation of colloidal lipids over time for storage at 4°C.65

Figure 19 Representative images of sample preparation by the TMAH extraction procedure; (a) untreated sample, (b) before ultrasonication, and (c) after ultrasonication and centrifugation. 66

Figure 20 PSD of Ag NPs in enzymatic extracts (pancreatin + lipase) in the presence and absence of SDS added to the extraction solution. Sizes correspond to the calculated mean diameters (assuming a spherical particle) of 3 samples (each measured in triplicate) with their standard deviations.66

Figure 21 Particle size distributions of the 40 nm Ag NPs in (a) water; and (b) after alkaline extraction (10 % TMAH) from the meat matrix. The LoD_{size} is represented by a dashed line on the PSD.....67

Figure 22 Aging of Ag NPs detected in the enzymatic extract (pancreatin + lipase) of a processed sample stored at 4 °C. The LoD_{size} is represented by a dashed line on the PSD68

Figure 23 PSD of Ag NP detected in samples processed with 10 % TMAH and stored at room temperature for 24h.69

Figure 24 Ag concentration in the supernatant of samples digested in 2.5 % TMAH as a function a storage time at 4 °C.....70

Figure 25 Schematic diagram of the extraction protocol and analysis of Ag NP content in processed samples. Graphical assests from BioRender.com were used.....70

Liste des sigles et abréviations

AF4 : fractionnement d'écoulement de champ asymétrique

COT : carbone organique total (*TOC; total organic carbon*)

cps : *count per second*

d_{NP} : diamètre d'une nanoparticule

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

LOD : limite de détection

LOQ : limite de quantification

MRC : matériaux de référence certifiés

nAg : nanoparticule d'argent

NMs : nanomatériaux

NP : nanoparticule

SEC : chromatographie par exclusion de taille

SEM : microscopie électronique par balayage (*scanning electron microscopy*)

SP-ICP-MS : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif en mode particule unique (*single particle inductively coupled plasma mass spectrometry*)

σ = écart-type

TEM : microscopie électronique en transmission (*transmission electron microscopy*)

TMAH : hydroxyde de tetramethylammonium

*« All that is gold does not glitter,
Not all those that wander are lost »*

J. R. R. Tolkien, *The Fellowship of the Ring*.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier professeur Wilkinson pour votre patience, confiance et soutien tout au long de ce projet de maîtrise en tant que directeur de recherche. Vos conseils et réponses à mes interrogations, toujours avec bienveillance, ont été précieux afin de mener le projet à terme. Merci beaucoup pour votre disponibilité et support!

Un grand merci à Madjid, toujours extrêmement rassurant de te savoir dans les parages au cas où un imprévu technique arriverait. Un énorme merci pour tes conseils dans le cadre du projet, mais aussi pour ton expérience précieuse et ta bonne humeur au laboratoire!

Merci à tous les membres du groupe de recherche. Un grand merci à Agil, Ibrahim et Zhizhong pour vos conseils et connaissances qui ont été grandement appréciés pour amorcer le projet sur des bases solides et pour les ajustements en cours de route. Un grand merci aussi à Marie-Hélène, Houssame, Reinaldo, Nesrine et à tous les nouveaux arrivants dans le groupe. L'importance des discussions que nous avons eues (sérieuses ou non!) est impossible à quantifier, mais toujours très apprécié et la source de plusieurs idées. Je vous souhaite à tous succès et continuité dans vos projets!

Un énorme merci à ma famille, mes parents et mon petit frère Vincent et aussi à mes amis pour votre amour et votre support inconditionnel. Directement ou indirectement, vous êtes le filet invisible et indestructible me permettant de décrocher pour mieux continuer et ce depuis toujours et je ne pourrais jamais assez vous remercier!

Un merci tout spécial à Mélissa, ton support au quotidien m'a donné la motivation de mener ce projet à terme. Ta présence infaillible à mes côtés est un phare dans la mer d'incertitudes. Merci.

Chapitre 1 – Introduction

1.1 Développement de la nanotechnologie

L'utilisation de nanomatériaux, définis entre autres comme substances ou produits comportant au moins une dimension à l'échelle nanométrique (1 à 100 nm)^{1, 2}, est en forte croissance depuis les dernières décennies (**Figure 1**) et est l'objet d'un grand intérêt économique et scientifique en raison de la grande variété d'applications envisageables^{3, 4}.

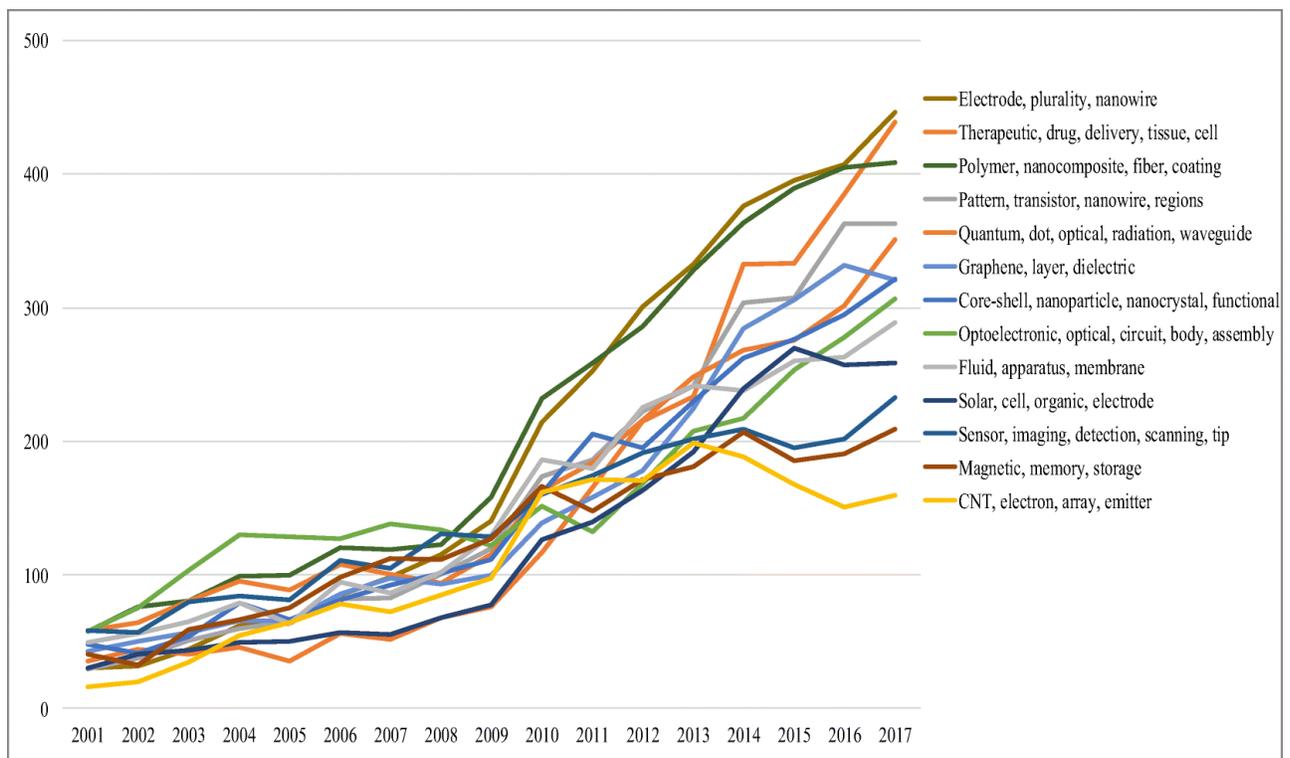


Figure 1 Évolution du nombre de brevets déposés au bureau américain des brevets et des marques de commerces impliquant la nanotechnologie, séparés par thème d'application. Reproduction de Wu *et al.*³

L'intérêt de l'utilisation de nanomatériaux provient de l'exploitation de leurs propriétés physicochimiques spécifiques et uniques à leurs petites dimensions. En raison de leur très petite taille, les nanomatériaux possèdent une grande aire de surface par rapport à leur volume pouvant drastiquement modifier les interactions physiques et chimiques possibles avec la matière⁵. De plus, les tailles des nanomatériaux étant de l'ordre de certains phénomènes électroniques, un

matériau à l'échelle nanométrique peut posséder des propriétés différentes d'un matériel de composition similaire de plus grande échelle⁶. La très grande diversité d'applications développées à partir de nanomatériaux métalliques, allant de composants électroniques au cœur de l'informatique moderne^{7, 8}, de remédiation environnementale⁹ ou encore d'applications biomédicales¹⁰ témoigne de l'importance et la versatilité de l'utilisation de nanomatériaux pour répondre à certains enjeux modernes.

1.2 Utilisation de la nanotechnologie par l'industrie agroalimentaire

Considérant l'importance de l'industrie agroalimentaire à l'échelle du globe, il n'est pas surprenant que l'utilisation de nanomatériaux soit envisagée pour améliorer l'efficacité et la qualité de la production de nourriture^{11, 12}. Les utilisations potentielles des nanoparticules métalliques (NP) impliquent l'ensemble de la chaîne de production et de consommation de nourriture; allant de l'utilisation de NP de CuO comme fongicide en agriculture¹³, NP d'Ag¹⁴ et de ZnO¹⁵ comme supplément alimentaire à la diète du bétail d'élevage ou encore l'utilisation de TiO₂ pour ses propriétés optiques (colorant) dans la composition de plusieurs confiseries ou produits laitiers transformés¹⁶.

Une autre application potentielle des NP est le dopage d'emballages alimentaires afin de conserver les aliments plus longtemps soit par modification des caractéristiques physiques de l'emballage (perméabilité aux gaz et à l'eau, propriétés mécaniques, etc.)^{17, 18} ou par l'utilisation de NP ayant des propriétés limitant la prolifération de microorganismes tel que Ag¹⁹⁻²² ou ZnO^{23, 24} (**Figure 2**).

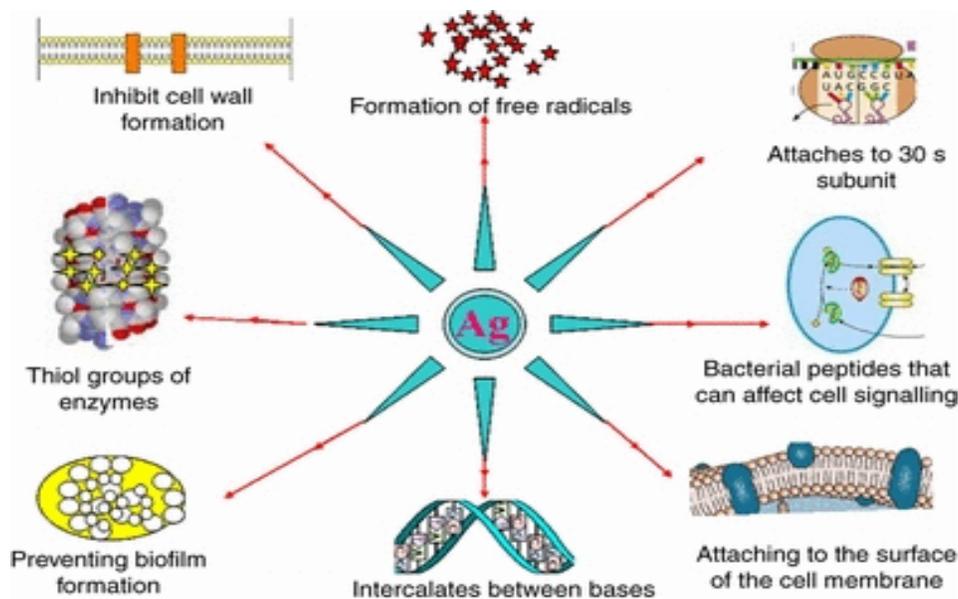


Figure 2 Mécanismes possibles des propriétés antibactériennes de nanoparticules d'Ag. Reproduction de Rai *et al.*²⁵

1.3 Risques liés à l'exposition de nanoparticules métalliques

L'évaluation du risque associé aux NPs dépend de la toxicité intrinsèque du NM en fonction de sa composition, mais aussi des propriétés physicochimiques pouvant influencer sa mobilité dans un environnement donné et les interactions avec les organismes biologiques. Les propriétés physicochimiques comprennent la chimie de surface (fonctionnalisation et charge de surface) des NPs ou leur taille. Dans le cas de nanoparticules métalliques, les transformations chimiques doivent aussi être considérées pour l'évaluation du risque²⁶. La dissolution des nanoparticules (par oxydation de la surface par exemple) entraîne la modification de la taille des NPs, mais aussi la libération du métal sous forme ionique pouvant avoir des interactions et des effets différents sur un organisme. Les NPs peuvent donc faire office de « vecteurs » pour la forme dissoute du métal. L'interaction avec la matière organique peut aussi venir modifier la chimie de surface des NPs et leur toxicité (sulfidation de NPs d'Ag à Ag₂S par exemple²⁷).

1.3.1 Stabilité colloïdale en milieu aqueux

En solution aqueuse, la stabilité d'un colloïde donné (y compris les NP) peut être décrite par la théorie DLVO²⁸. Ce modèle théorique permet de décrire la stabilité colloïdale ainsi que certaines interactions entre 2 surfaces. Selon la théorie DLVO, la stabilité d'une particule dépend de la

somme des interactions attractives et répulsives entre 2 surfaces au travers d'un médium donné. Les interactions attractives comprennent entre autres les forces de Van der Waals et l'attraction électrostatique (entre 2 surfaces de charges opposées) tandis que les interactions répulsives incluent les répulsions électrostatiques et stériques (présence de chaînes de polymères ou autres macromolécules à la surface des NPs par exemple). En milieux aqueux, les interactions de nature électrostatiques impliquent la double couche électrique se formant à la surface par l'arrangement des ions en solution et la portée des interactions électrostatiques varie en fonction de la charge de surface et de la force ionique du milieu. L'ampleur de chacune des interactions (attractives et répulsives) étant différente en fonction de la distance séparant les 2 surfaces, il est possible de tracer un profil de la somme de ces interactions en fonction de la distance entre les 2 surfaces (**Figure 3**) en sachant la taille des particules (ou de l'aire d'interaction de la surface si interaction entre une particule et une surface) et la force ionique du médium. Dans le cas où les forces attractives dominent, on assiste à l'agglomération des NPs entre-elles (homoagrégation) ou à d'autres colloïdes (hétéroagrégation) ou encore à l'adsorption aux surfaces de la matrice environnementale ou biologique. Bien que l'important puit d'énergie potentielle négatif dominant à faible distance (minimum primaire) causé par les forces de Van der Waals implique que tous système colloïdal tend à l'agglomération irréversible comme équilibre thermodynamique, la barrière énergétique créée par les interactions répulsives permet à certains systèmes colloïdaux d'être en équilibre cinétique dans un minimum secondaire. En fonction de l'ampleur de la barrière énergétique, les particules peuvent donc restées dispersées ou former des agglomérats réversibles.

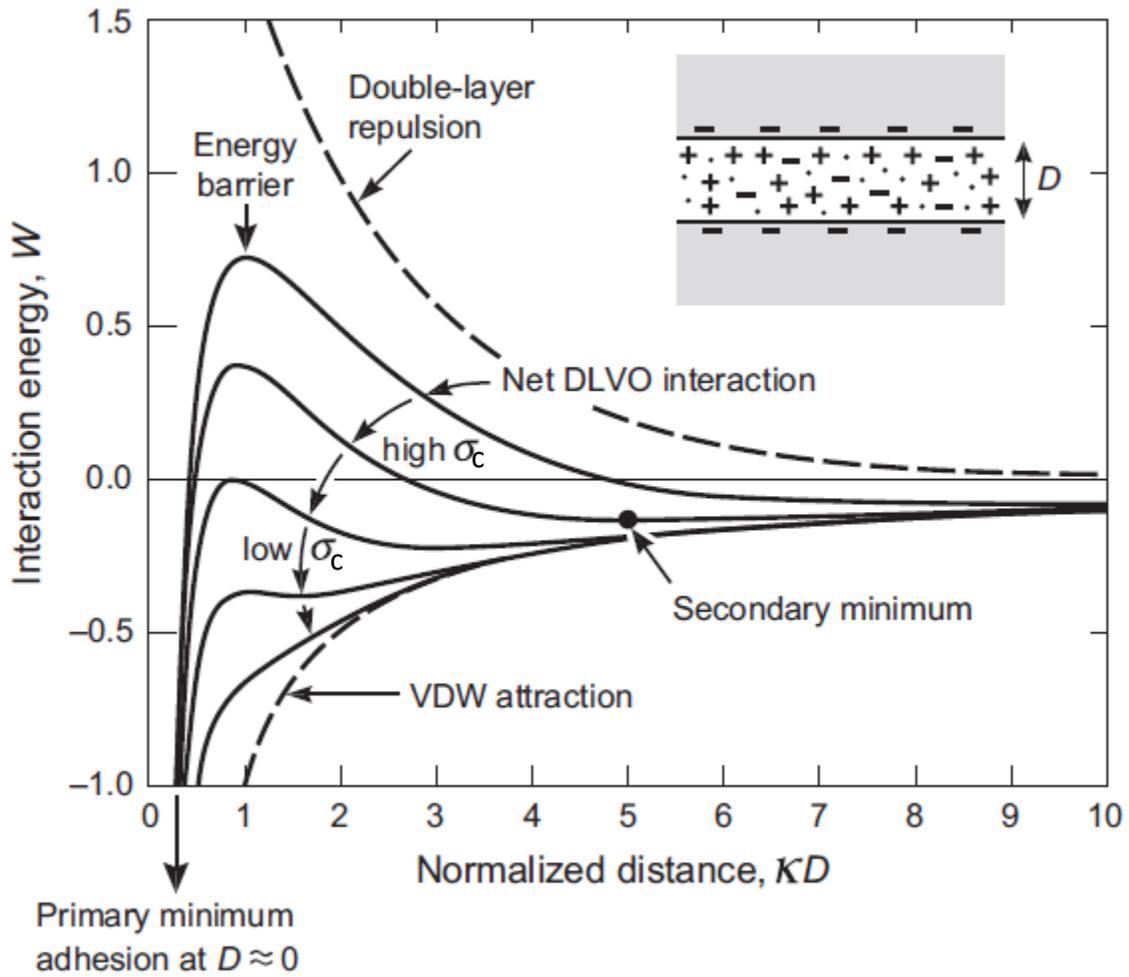


Figure 3 Schématisation de profils d'énergie d'interactions DLVO (W) entre 2 surfaces identiques séparées par une distance D normalisée selon la réciproque de la longueur de Debye κ séparant les 2 surfaces et de la densité de charge de surface (σ_c). Reproduction de Israelachvili²⁸

1.3.2 Voies d'exposition et de distribution dans l'organisme

En fonction de l'organisme étudié, différentes voies d'internalisation sont envisageables pour un même type de NP (**Figure 4**). L'ampleur de l'internalisation dépend de la forme de l'exposition, mais aussi de la taille et des propriétés physicochimiques des NPs. Pour une exposition par inhalation par exemple (aérosols) plus la taille de la NP est petite et plus elle pénétrera profondément dans le système pulmonaire, pouvant ultimement entrer dans le système cardiovasculaire²⁹.

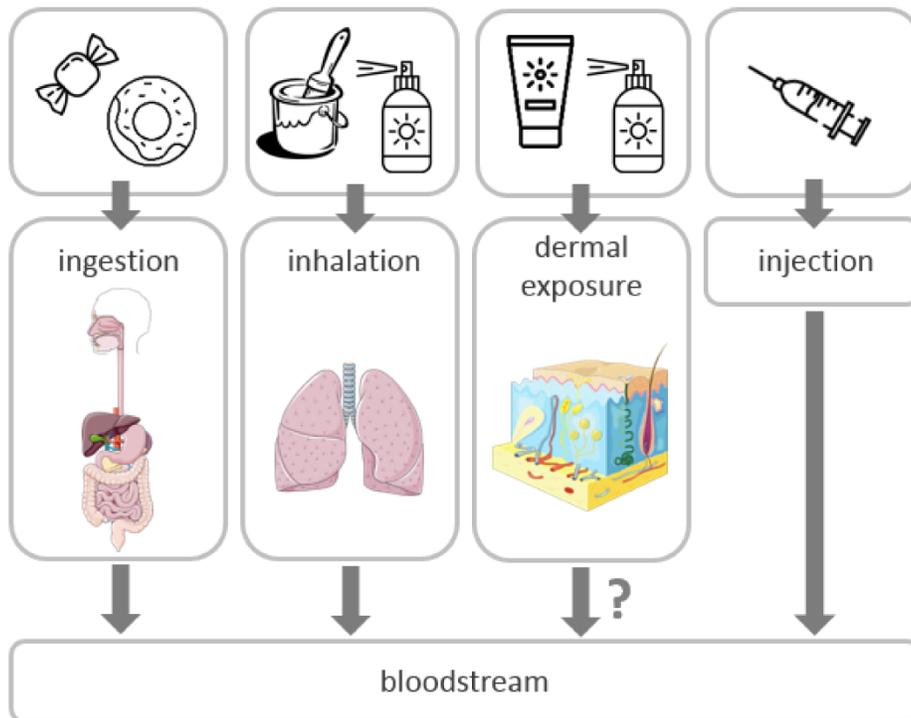


Figure 4 Formes d'exposition et voies d'internalisation de NP de TiO₂ chez l'humain. Reproduction de Musial *et al.*³⁰

Une fois dans le système circulatoire, les NPs peuvent être distribuées dans l'ensemble du corps bien qu'en raison de leur taille et chimie de surface, certaines barrières biologiques peuvent limiter l'internalisation dans certains organes ou encore favoriser la rétention dans certains tissus. Par exemple, après 1 heure après l'injection intraveineuse dans des rats de NPs de TiO₂ de 70 nm, les plus grandes concentrations ont été mesurées dans le foie suivi de la rate, du sang et des tissus musculaires respectivement³¹⁻³³. Une baisse considérable de la concentration en NPs dans le sang

a pu être mesurée 24 h après injection accompagnée d'une persistance jusqu'à 28 jours dans certains organes³¹.

L'exposition principale aux NMs utilisées dans l'industrie agroalimentaire étant la voie orale (ingestion de nourriture), l'internalisation gastro-intestinale de NPs est cruciale à examiner pour l'évaluation du risque. En raison de la présence de matière organique (nourriture, enzymes digestives, flore bactérienne intestinale, sels biliaires, etc.) et des conditions du milieu (gradient de pH et force ionique en fonction de la région du tube digestif), l'altération des propriétés physicochimiques des NPs est possible tout au long du transit gastro-intestinal. Une faible internalisation (≈ 0.6 % de la dose administrée) de NPs de TiO_2 (70 nm de taille moyenne) est initialement observée chez le rat par voie orale³², mais des NPs de plus petites tailles peuvent être plus facilement transportées au travers de la paroi intestinale³⁴. Une fois internalisées, il a été observé que les NP d'Ag (de tailles inférieures à 20 nm) ont le potentiel de migrer jusqu'au placenta et fœtus en gestation de rongeurs³⁵ et même de parvenir jusqu'à certains organes des nourrissons³⁶.

1.3.3 Toxicité de certaines nanoparticules métalliques chez les mammifères

Bien qu'étant un élément essentiel à la régulation de plusieurs processus biologiques, le Zn est toxique lorsque présent en trop grandes quantités. Les NPs de ZnO sont aussi potentiellement toxique par stress oxydatif pouvant endommager certains organes ou provoquer l'inflammation de tissus¹⁵. Une étude étudiant l'effet d'une exposition à long terme à des NPs de ZnO (30 à 50 nm) sur le développement de souris a démontré un impact sur la croissance des individus, mais aussi sur la distribution d'autres minéraux (Fe, Mn, Cu) dans certains organes en fonction de la dose administrée (50, 500 et 5000 mg/kg)³⁷.

Les NPs d'Ag ont une action biocide similaire aux NPs de ZnO et selon la littérature des effets toxiques semblables³⁸. Une étude de l'exposition périnatale par voie orale aux NP d'Ag (≈ 30 nm) chez la souris de Tiwari et associés³⁹ a permis l'observation, entre autres, de l'augmentation de la taille de la rate ainsi que la présence de marqueurs d'inflammation chronique pouvant se poursuivre plusieurs mois après l'arrêt de l'exposition (0.5, 5 et 50 mg/kg). L'inflammation des

poumons de 2 espèces de rats a aussi été observée par exposition par inhalation à des NP d'Ag d'environ 15 nm⁴⁰.

La toxicité des NPs de TiO₂ fait l'objet d'une grande attention scientifique et médiatique en raison de son utilisation dans un grand nombre d'applications et par son potentiel génotoxique pouvant mener au développement de cancers chez l'être humain et autres mammifères³⁰. Ces inquiétudes ont mené l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) à évaluer en 2021 que l'utilisation de TiO₂ comme additif alimentaire (E171) ne peut plus être considérée hors de tout doute comme étant sans danger pour la consommation⁴¹. L'évaluation par l'EFSA a mené à l'interdiction par l'Union européenne (règlement 2022/63⁴²) de l'utilisation du E171 dans les denrées alimentaires à partir du mois d'août 2022 et est toujours en vigueur.

1.4 Méthodes d'analyse des nanoparticules métalliques

Afin de correctement évaluer le risque associé à l'exposition aux NMs, il est nécessaire de pouvoir réaliser leur quantification et caractérisation dans les différents compartiments environnementaux, mais aussi dans les matrices biologiques. Plusieurs techniques analytiques permettent d'évaluer les caractéristiques physiques et chimiques des NMs telles que la concentration, la composition, la taille, la morphologie ou encore la chimie de surface des NMs.

1.4.1 Techniques de séparation

Certaines techniques de séparation telles que le fractionnement d'écoulement de champ asymétrique (*asymetric flow field-flow fractionation*, AF4) ou encore la chromatographie par exclusion de taille (*size exclusion chromatography*, SEC) permettent de séparer les différents constituants d'un échantillon liquide en fonction de leur taille. Le couplage de ces techniques à un détecteur UV-Vis permet la détection de matière organique et de NP ayant des bandes d'absorbance caractéristiques (Au ou Ag par exemple^{43, 44}) tandis que le couplage avec un ICP-MS permet de réaliser l'analyse de NPs métalliques à de plus faibles tailles et concentrations en raison de la meilleure sensibilité⁴⁵. Un avantage des techniques de séparation est, moyennant une résolution suffisante entre les pics d'élution, de pouvoir séparer et quantifier les NMs en fonction de leur morphologie⁴⁶ ou de leur association avec la matière organique en couplant détection UV

ou analyseur de carbone organique total (COT) et détection par ICP-MS^{47, 48} ce qui est particulièrement intéressant pour obtenir des informations sur l'interaction des NMs avec la matière organique naturelle colloïdale ou autres matrices biologiques pouvant entraîner des modifications à la composition des NPs⁴⁵. Cependant, l'utilisation des techniques de séparation est limitée par le long temps d'élution (généralement plus de 30 minutes) nécessaire pour obtenir une bonne résolution ainsi que la perte d'analyte aux surfaces de l'instrument pouvant affecter les limites de détection ainsi que la contamination d'échantillons subséquents^{49, 50}.

1.4.2 Techniques microscopiques

Technique mature et couramment employée pour la caractérisation de la matière à très petite échelle, la microscopie électronique permet d'obtenir des images de très grandes résolutions de l'ordre du nanomètre. En comparaison aux techniques de microscopie optique classiques utilisant comme source des photons de plus grandes longueurs d'onde, la microscopie électronique utilise un flux d'électrons accélérés par une différence de potentiel pour interagir avec la matière.

En microscopie électronique par balayage (*scanning electron microscopy, SEM*), un faisceau d'électrons primaire à haute énergie balaye la surface de l'échantillon produisant, par interaction avec les atomes de l'échantillon, des électrons secondaires pouvant être détectés. Ceci permet de reconstruire la topographie de la surface de l'échantillon en mesurant la variation du flux d'électrons secondaires détecté. En microscopie électronique par transmission (TEM), le faisceau d'électrons utilisé est de plus grande énergie qu'en SEM et une image est obtenue en analysant le faisceau d'électrons transmis au travers de l'échantillon. L'image obtenue reflète les différences de densité électronique dans l'échantillon pouvant affecter le faisceau incident par diffusion, absorption ou encore diffraction des électrons.

L'interaction entre le flux d'électrons de haute énergie de la source en SEM/TEM et les atomes de l'échantillon peut exciter les électrons de cœur de l'échantillon, menant à la production de rayons X pouvant être analysés par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX) permettant ainsi de caractériser la composition élémentaire de l'échantillon. La possibilité d'obtenir des informations sur la composition chimique des NPs et de leur environnement ainsi

que des images permettant de déterminer la taille et la morphologie est très intéressante pour la caractérisation de NMs.

La microscopie électronique a entre autres été utilisée afin de confirmer et caractériser l'absorption de NPs d'Ag présent dans le sol par des verres de terre⁵¹, la formation de NP d'Ag₂S dans une matrice contenant des tissus de poulet⁵² ou encore l'étude de NPs présentes dans des contenants d'aliments⁵³. Malgré tout, l'utilisation de la microscopie électronique est limitée par une préparation complexe et parfois longue des échantillons et par la difficulté d'utiliser la microscopie électronique pour obtenir une mesure de quantification de NMs précise et représentative d'un échantillon macroscopique. En effet bien qu'en théorie la microscopie électronique permet d'observer individuellement les NPs se trouvant dans le champ de vision de l'instrument, les limites de détection *pratiques* de la technique pour l'analyse quantitative sont parfois supérieures aux concentrations en NPs observées dans l'environnement où l'observation d'un nombre de NPs statistiquement significatif peut demander un temps d'analyse important. Néanmoins, le développement de méthodes de préconcentration de l'échantillon avant analyse⁵⁴ est envisageable pour pallier à cette limitation.

1.4.3 Techniques spectroscopiques et électrophorétiques

Certaines techniques spectroscopiques exploitent le mouvement Brownien des NPs entraînant des variations dans la diffusion de la lumière d'un échantillon liquide pour caractériser la matière colloïdale en suspension. Pour l'analyse de nanoparticules, la diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*, DLS) ainsi que la diffusion de lumière statique sont deux techniques permettant de déterminer rapidement la taille hydrodynamique des NPs ainsi que certains autres paramètres d'intérêts pour l'étude d'interactions des NPs. En associant une mesure de la diffusion de la lumière des particules à un mouvement par électrophorèse (*electrophoretic light scattering*, ELS), il est possible de mesurer la mobilité électrophorétique des NPs et par la suite d'évaluer le potentiel zêta qui fournit des informations sur certaines interactions dépendantes de la double couche électronique (agrégation, adsorption, etc.). Bien que pouvant potentiellement analyser de très petites NP (jusqu'à 1 nm), les techniques de diffusion de la lumière pour l'analyse de NP dans des matrices complexes sont limitées par les concentrations nécessaires pour effectuer les

mesures (de l'ordre du $\mu\text{g/L}$), mais aussi par la nécessité d'avoir un échantillon relativement homogène (analyse non spécifique) avec une faible polydispersité de taille de particules en suspension. Cette limitation résulte du fait que la taille moyenne déterminée est biaisée en faveur des grandes particules^{55, 56}.

1.4.4 Techniques de spectrométrie à plasma à couplage induit

Étant l'une des techniques analytiques de référence pour l'analyse élémentaire (métaux, métalloïdes et quelques non-métaux) à de très faibles concentrations (ng/L), la spectrométrie de masse à plasma à couplage induit (ICP-MS) est un outil analytique d'intérêt pour la quantification de NMs métalliques. Par elle-même, l'analyse par ICP-MS classique en mode quantitatif ne permet pas la détermination de paramètres importants pour la caractérisation de NMs à l'exception de la concentration. En effet, pour la caractérisation de NPs il est nécessaire de coupler l'ICP-MS avec d'autres techniques telles que SEC ou AF4 mentionnées plus tôt.

Une adaptation des mesures par ICP-MS permettant l'analyse et la caractérisation de colloïdes métalliques ainsi que de nanoparticules d'Or est décrite dans les travaux de Degueldre *et al.*, publiés il y a près de 20 ans^{57, 58}. Un frein initial à l'adoption de cette technique, maintenant connue sous le nom de spectrométrie de masse à plasma induit en mode particule unique (*single particle inductively coupled plasma mass spectrometry*, SP-ICP-MS) était la difficulté d'effectuer des mesures en continu à court temps d'intégration (< 3 ms). Dans une moindre mesure, le manque de disponibilité de matériaux de référence certifiés (MRC) de NP métalliques de taille et concentration connue et caractérisée, nécessaire à l'étalonnage et la détermination de l'efficacité de transport du système d'introduction de l'appareil utilisé, limitait le développement et la validation des méthodes. Les avancées technologiques en instrumentation analytique, la production de MRC accessibles ainsi que l'approfondissement des principes théoriques et de protocoles permettant de déterminer certains paramètres nécessaires à l'étalonnage^{59, 60} ont permis de favoriser l'adoption de la technique. À ce jour, la SP-ICP-MS est une technique attrayante pour l'analyse des NPs inorganiques permettant la détermination de la distribution de taille, de la concentration en NP ainsi que la concentration de la forme dissoute du métal à de très faibles concentrations, et ce en potentiellement une seule mesure rapide.

1.4.4.1 Description des composantes de l'instrument

Bien que les spécificités puissent varier en fonction du modèle de l'instrument et des applications, la configuration générale des composantes d'un ICP-MS est généralement la même, peu importe l'instrument. L'échantillon est introduit dans un plasma d'argon permettant l'atomisation et l'ionisation de l'échantillon qui sera par la suite analysé par un spectromètre de masse.

Système d'introduction

Les échantillons analysés par ICP-MS sont généralement liquides et acheminés à un nébuliseur pneumatique à l'aide d'une pompe péristaltique ou encore par auto-aspiration en profitant du fait que le flux de gaz inerte (généralement de l'Ar) utilisé pour nébuliser l'échantillon crée une différence de pression (par effet venturi) suffisante pour aspirer un liquide, si la longueur de tube menant au nébuliseur est assez courte⁶¹. Une fois l'échantillon nébulisé, l'aérosol produit circule dans une chambre de nébulisation permettant d'éliminer les plus grosses gouttelettes de l'aérosol ainsi que d'amoinrir les différences dans la quantité de matière acheminée à la torche à plasma par introduction constante de l'échantillon, améliorant la précision des mesures. L'élimination des plus grosses gouttelettes permet aussi d'augmenter la sensibilité de l'analyse en réduisant la quantité de solvant à vaporiser une fois l'aérosol introduit dans le cœur du plasma. En fonction de l'application désirée, des systèmes d'introduction alternatifs ont aussi été développés comme l'ablation laser pour l'analyse d'échantillons solides permettant d'obtenir de l'information sur la distribution spatiale d'un élément, technique d'intérêt pour le suivi de NP par imagerie biomédicale⁶². Un autre exemple est le couplage d'un ICP-MS à un système d'introduction par échange de gaz permettant l'analyse d'échantillons d'air contenant des aérosols⁶³.

Source d'ionisation et interface

La source d'ionisation d'un ICP-MS (Figure 5) est un plasma d'argon à couplage induit dont la décharge est soutenue et confinée par le champ magnétique produit par solénoïde parcouru par un champ électrique alternatif. La fréquence du champ électrique est généralement de 27 ou 40 MHz contrôlée par un générateur de radiofréquence⁶¹.

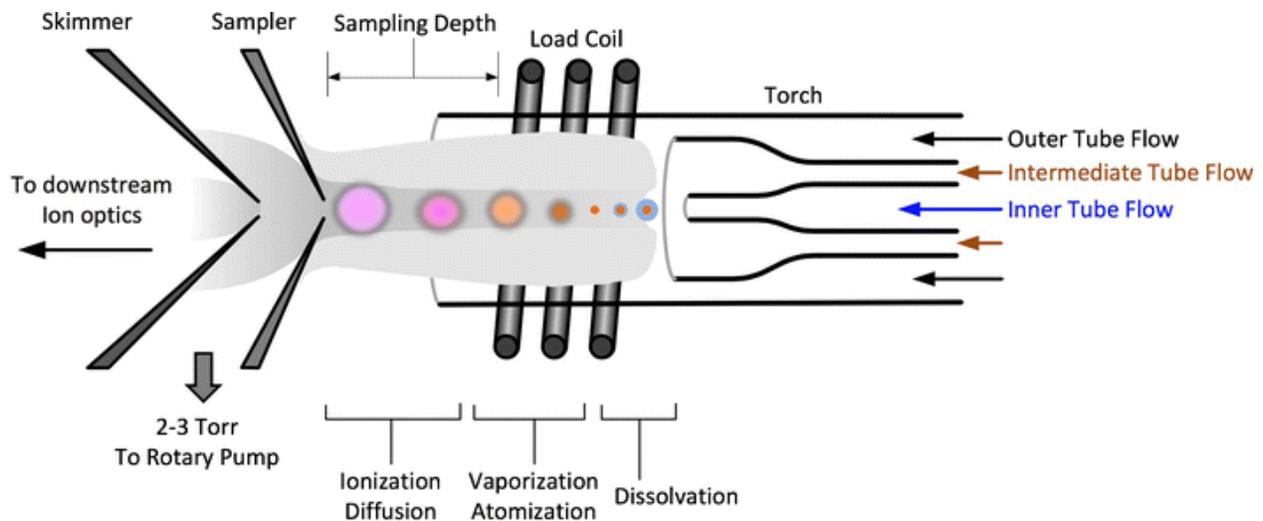


Figure 5 Schéma de l'introduction d'échantillon dans la torche au plasma d'un ICP-MS. Reproduction de Montano et al⁶⁴.

Les hautes températures (jusqu'à 10 000 K) produites dans le plasma entraînent la désolvation de l'aérosol, suivi de la vaporisation et l'atomisation des analytes. Le plasma d'Ar ayant une grande énergie d'ionisation d'environ 15.8 eV (énergie de première ionisation d'un atome d'Ar) permet l'ionisation de la plupart des éléments du tableau périodique à l'exception du fluor, du néon et de l'hélium. Les ions présents dans le plasma sont par la suite acheminés vers le filtre de masse et le détecteur en raison de la très grande différence de pression entre la chambre contenant le plasma à pression ambiante (≈ 760 Torr) et l'analyseur de masse sous vide ($\approx 10^{-6}$ Torr) en passant au travers d'une interface composée de plusieurs cônes (2 ou 3 selon l'instrument) maintenue à une pression intermédiaire à celle des 2 compartiments ($\approx 1-5$ Torr).

Filtre de masse et détecteur

Le spectromètre de masse de l'instrument est composé d'un filtre de masse et d'un détecteur. Le détecteur le plus couramment utilisé pour détecter les ions sortant du filtre de masse est un multiplicateur d'électrons utilisant des dynodes discrètes permettant de générer et d'amplifier le signal. L'impact d'un ion sur la première dynode produit des électrons pouvant aller impacter une 2^e dynode qui générera aussi des électrons secondaires pouvant impacter une 3^e dynode et ainsi de suite par réaction en chaîne, jusqu'à être mesuré par un collecteur de charge permettant de convertir le signal électrique en *counts*⁶¹.

Les principaux filtres de masses utilisés en ICP-MS permettant de filtrer les ions extraits du plasma en fonction de leur rapport de masse sur charge (m/z) sont le quadripôle, le secteur magnétique et l'analyseur à temps de vol. Un analyseur de type quadripôle (**Figure 6**) est composé de 4 électrodes soumises à un potentiel ayant une composante de courant continu et de courant alternatif. Chaque paire d'électrodes opposées est soumise au même potentiel, mais de polarité opposée, créant un champ électrostatique permettant de contrôler la stabilité de la trajectoire des ions passant dans le filtre de masse. L'application d'un certain potentiel permet donc de filtrer les ions non voulus en neutralisant leur charge et leur vitesse au contact des électrodes ou en les éjectant en passant entre les électrodes.

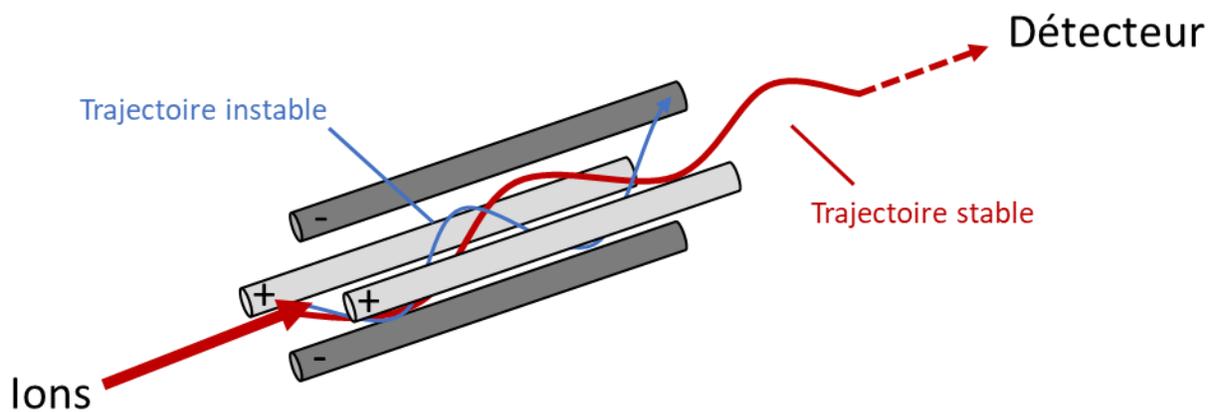


Figure 6 Schéma d'un analyseur de masse de type quadripôle.

Le principe de séparation d'un analyseur à temps de vol (**Figure 7**) est de filtrer les ions en exploitant leur énergie cinétique. L'entièreté des ions entrant dans l'analyseur est tout d'abord accélérée par l'application d'une différence de potentiel, avant de parcourir un parcours de distance fixe en « U » et finalement atteindre le détecteur. Les ions ayant un m/z plus petit vont atteindre le détecteur en un temps de vol plus court, en raison de leur plus faible inertie, que les ions à haut m/z .

Un aspect extrêmement intéressant des analyseurs à temps de vol est la capacité d'effectuer une mesure sur l'ensemble d'une plage d'isotopes voulue de façon quasi simultanée, ce qui ouvre la porte à des analyses en mode SP-ICP-MS sur plusieurs isotopes à la fois, permettant d'obtenir des informations supplémentaires sur la composition et l'origine des NPs détectées^{65, 66}.

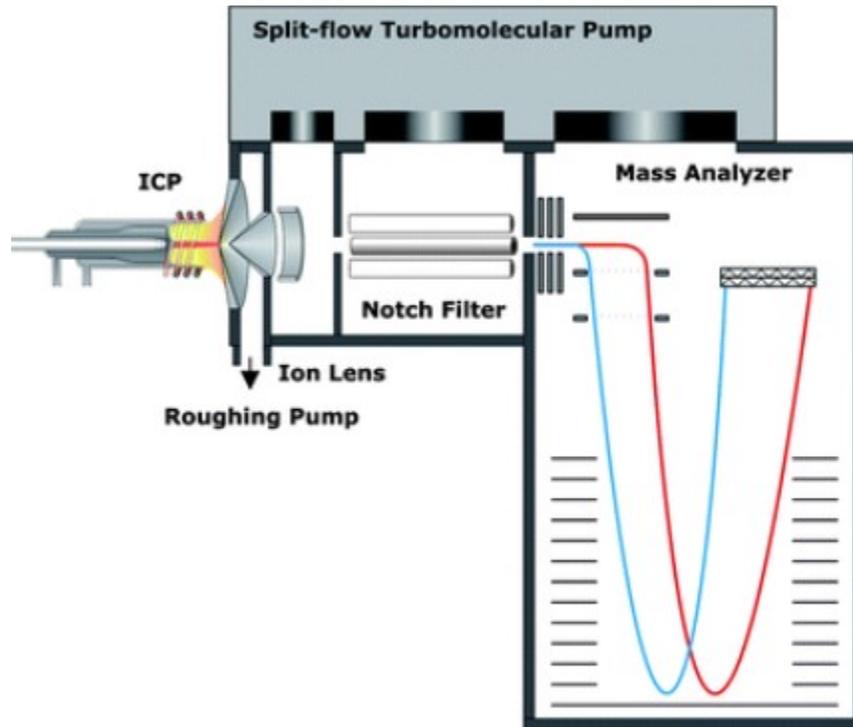


Figure 7 Schéma d'un ICP-MS avec analyseur de type temps de vol. Reproduction de Borovinskaya *et al.*⁶⁷

Un filtre de masse de type secteur magnétique (**Figure 8**) permet de sélectionner les ions pouvant atteindre le détecteur à l'aide de champs magnétiques produits par des électroaimants. Les ions entrant l'analyseur de masse sont accélérés avant de passer au premier électroaimant permettant d'ajuster l'angle de la trajectoire et le second électroaimant (analyseur électrostatique) filtrant selon l'énergie cinétique des ions avant d'atteindre le détecteur⁶¹.

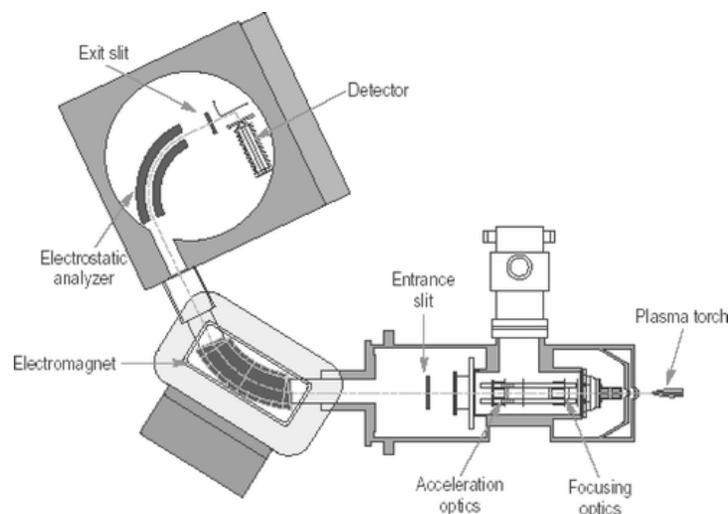


Figure 8 Schéma d'un ICP-MS à analyseur de masse à double focus de type secteur magnétique. Reproduction de Moldovan *et al.*⁶⁸

Le principal avantage d'un analyseur de masse de type secteur magnétique est la possibilité d'obtenir une résolution supérieure à un analyseur de type quadropôle ou temps de vol (jusqu'à 10 000 en mode haute résolution en comparaison à environ 300-400 et pour les analyseurs de type quadropôle et 2 000 à 6 000 pour les analyseurs à temps de vol), permettant d'éliminer les interférences spectrales et ainsi d'obtenir des limites de détection en général 5 à 10 fois supérieures que pour les autres analyseurs.

1.4.4.2 Principes théoriques de l'analyse par SP-ICP-MS

Le principe de détection et d'analyse des NPs par SP-ICP-MS est l'analyse en continu du signal détecté par l'appareil après l'injection d'un échantillon en employant un court temps d'intégration du signal (< 1 ms) permettant ainsi d'obtenir une intensité du signal en fonction du temps. Lorsqu'une NP est introduite dans le plasma, elle sera atomisée et les atomes la composant ionisée ce qui provoquera la détection d'un événement à haute intensité (un « pic ») se démarquant du bruit de fond continu. Le signal détecté en SP-ICP-MS peut donc être divisé en 2 catégories (**Figure 9**) soit le signal continu associé aux formes dissoutes de l'élément, généralement de faible intensité, et les pics de hautes intensités associés aux nanoparticules.

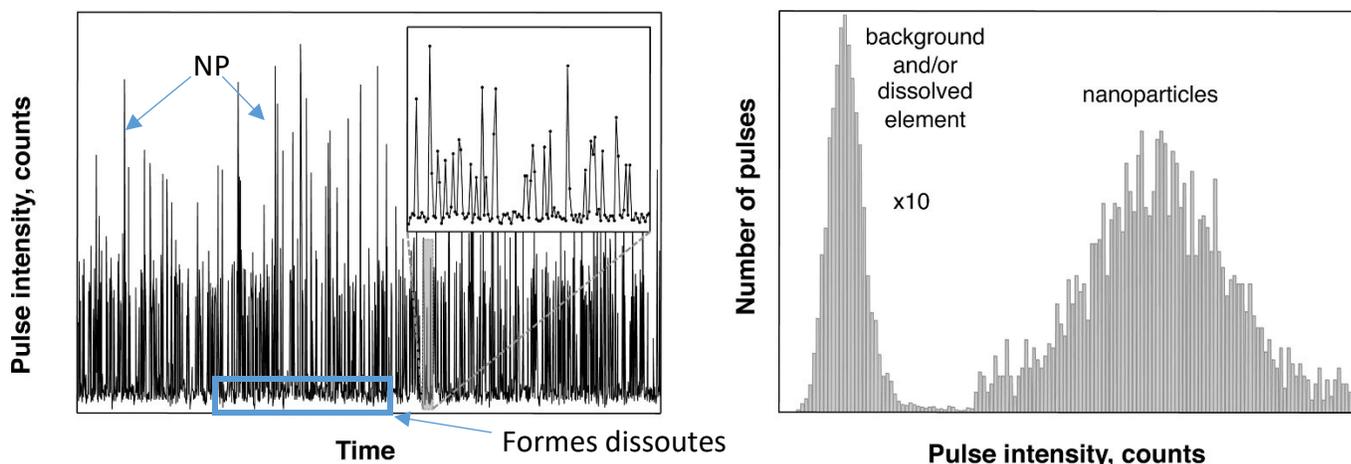


Figure 9 Intensité en fonction du temps détectée dans un échantillon contenant nanoparticules et métal sous forme dissoute (gauche) et mêmes données représentées sous forme d'un histogramme de fréquence en fonction de l'intensité du signal (droit). Reproduction de Laborda *et al.*⁶⁹

Pour séparer les pics d'événements de nanoparticules du signal du bruit de fond, un critère de seuil de détection correspondant à une valeur d'intensité n fois plus importante que l'écart-type (σ) du signal enregistré est généralement utilisé. Un critère minimum de 3σ est généralement utilisé, mais en fonction des matrices et du signal enregistré, un critère plus restrictif est recommandé afin d'éviter les faux-positifs⁷⁰.

Afin de pouvoir corréler l'intensité des pics détectés à une taille de nanoparticule, il est nécessaire de réaliser un étalonnage de l'appareil avec des standards ioniques ce qui permet d'obtenir la sensibilité de l'appareil (K_R , en cps/ngL⁻¹) utilisée afin d'obtenir l'efficacité de détection (K_{ICPMS} , en *count*/atome) selon les équations suivantes :

$$(1) K_{ICPMS} = \frac{K_R \times 10^9}{\eta_{neb} Q_{sam} K_m}$$

$$(2) K_m = \frac{A N_{Av}}{M_M}$$

où Q_{sam} correspond au débit d'aspiration de l'échantillon par le système d'introduction en L/s, η_{neb} l'efficacité de nébulisation (efficacité de transport) et K_m le nombre d'atomes par g pour l'isotope de l'élément analysé (¹⁰⁷Ag par exemple) pouvant être obtenu en considérant l'abondance naturelle de l'isotope mesuré, A , le nombre d'Avogadro, N_{Av} , et la masse molaire de

l'élément, M_m . L'efficacité de nébulisation est un paramètre pouvant varier en fonction du système d'introduction choisi et doit être déterminée préalablement, généralement selon les méthodes décrites par Pace et associés⁶⁰. De différentes méthodes proposées, les deux ayant la meilleure précision sont l'analyse d'une suspension de nanoparticules de concentration et taille connues (généralement des NPs d'or) ou dans l'éventualité où la concentration en NP de l'échantillon de référence analysé n'est pas certifiée (seulement la taille), un étalonnage avec standards ioniques de l'élément de la NP de référence doit aussi être réalisé.

La taille d'une nanoparticule détectée (d_{NP} , en nm) peut ainsi être calculée (assumant une forme sphérique) à partir de l'intensité du pic (I_{NP} , en *count*) selon l'équation 3 où ρ est la densité de la nanoparticule (en g/cm^3) et F_p , la fraction massique de l'élément dans la particule en question.

$$(3) \quad d_{NP} = \left(\frac{6I_{NP}}{\pi\rho F_p K_{ICPMS} K_m} \right)^{1/3} \times 10^7$$

La concentration en nombre de particules (C_{num} , particules/L) dans l'échantillon peut être déterminée à partir du nombre de particules détectées (N), du temps d'analyse (t_i , en secondes), de l'efficacité de nébulisation et du débit d'aspiration de l'instrument selon l'équation 4.

$$(4) \quad C_{num} = \frac{N}{\eta_{neb} Q_{sam} t_i}$$

1.4.4.3 Limitations de la SP-ICP-MS

Bien qu'innovante, la SP-ICP-MS n'est pas sans limitations⁷¹. Étant basées sur une détection en fonction du flux de masse, les limites de détection en tailles de NP varient en fonction de la sensibilité du ICP-MS pour un élément donné, mais aussi en fonction de la concentration en métal dissout présent dans l'échantillon. Un bruit de fond important peut occulter le signal de petites particules⁷² empêchant leur détection et bien que l'impact du bruit de fond peut être amoindri en diluant l'échantillon, en utilisant un temps d'intégration plus court^{73, 74} ou en enlevant la fraction dissoute à l'aide de résines à échange d'ions⁷⁵ cela reste une possible limitation dans certaines matrices. La SP-ICP-MS est aussi sensible aux interférences spectrales pouvant affecter les limites de détection, mais certaines stratégies sont envisageables dans de tels cas tels que l'utilisation d'un ICP-MS à secteur magnétique dont la haute résolution permet la détection de

seulement l'analyte désiré⁷⁶ ou encore l'utilisation d'un spectromètre de masse en tandem (MS/MS) équipé d'une cellule de réaction pour se débarrasser des ions polyatomiques interférents^{77, 78}. L'analyse par SP-ICP-MS ne permet pas non plus d'obtenir d'informations *post hoc* sur la morphologie d'une NP.

1.5 Préparations des échantillons pour l'analyse de NMs dans des matrices biologiques complexes

L'étude des impacts de la présence de NPs dans différents organismes nécessite une isolation des NPs de la matrice biologique sans perturbations avant de pouvoir en faire l'analyse. Un défi pour l'analyse de certains NPs dans des matrices complexes est le dynamisme inhérent des transformations physiques et chimiques que peuvent subir les NPs. Pour que la caractérisation soit représentative, les conditions d'extractions des NPs ne doivent idéalement pas altérer les caractéristiques physiques et chimiques tel que la taille, la composition, la chimie de surface ou encore la présence d'une forme dissoute de l'élément. Le développement de méthode de préparation d'échantillon doit donc tenir en compte d'utiliser des conditions « douces » permettant la dégradation de la matrice biologique sans affecter les NPs. À ce jour, il n'existe aucun protocole standardisé pour la préparation d'échantillons biologiques pour l'analyse de NPs métallique, mais certaines tendances se discernent dans la littérature publiée^{50, 79} (**Figure 10**). Pour la dégradation de matrices végétales, l'utilisation de l'enzyme Macerozyme R-10 permettant de dégrader les tissus végétaux est l'approche généralement employée avec succès; entre autres pour l'analyse de l'internalisation de NP d'Ag par *Arabidopsis thaliana*⁸⁰, l'étude de la bioaccumulation de NP de palladium sur la croissance de la moutarde blanche⁸¹ ou encore les NPs de CeO₂ par les plants de certaines espèces potagères⁸².

Pour la dégradation de tissus d'origines animales, deux approches sont majoritairement employées : une dégradation des tissus par des enzymes (protéases et lipases) ou par un agent alcalin. Parmi la littérature, un nombre limité d'études compare directement l'efficacité des deux approches sur une même matrice afin de déterminer l'approche la plus efficace⁸³⁻⁸⁸. Aucun consensus clair sur l'approche à privilégier ne se démarque dans les conclusions de ces études, certaines suggérant l'approche enzymatique tandis que d'autres préconisent l'approche alcaline.

La grande variation dans la composition (quantité de matière grasse, présence de fibres musculaires, etc.) des matrices étudiées (huitres⁸³, foie de poisson⁸⁵, placenta humain⁸⁶ ou encore rate de rongeurs⁸⁸) laisse envisager que le choix de l'approche optimale n'est pas généralisable à l'ensemble des tissus animaux, mais plutôt potentiellement au cas par cas en fonction de la composition de la matrice. Néanmoins, selon les résultats publiés, la dégradation par un agent alcalin est généralement plus efficace à dégrader la matrice animale que l'utilisation d'enzymes, mais certaines études soulèvent également l'observation d'agglomération des NPs dans ces conditions^{84, 86}.

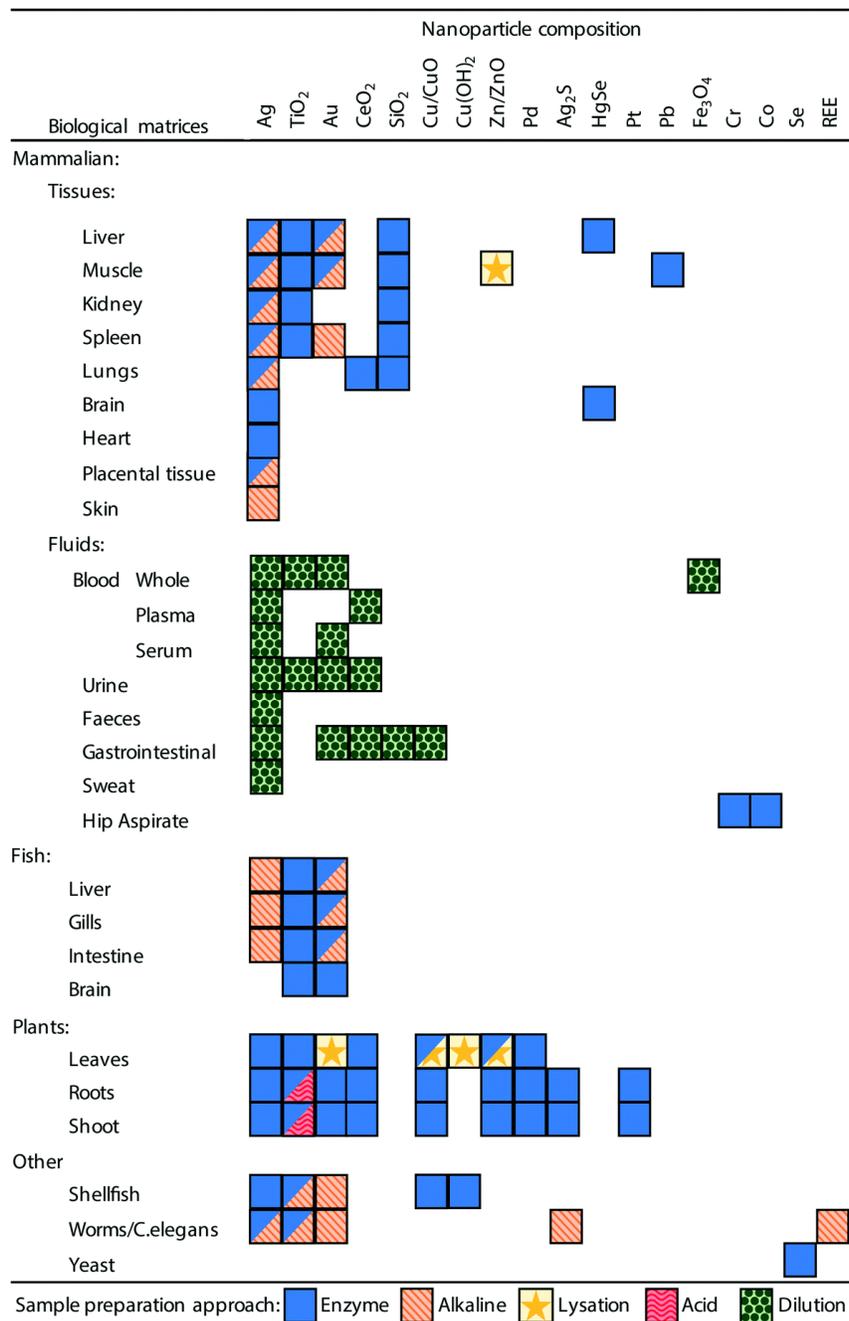


Figure 10 Résumé des différentes approches de préparation d'échantillons biologiques publiés dans la littérature en fonction de la matrice et du type de NP étudiée. Reproduction de Laycock, *et al.*⁷⁹

1.6 Objectifs du projet de recherche

Ce mémoire détaille l'optimisation et la comparaison de 2 approches (digestion enzymatique et digestion alcaline) pour l'extraction et la caractérisation de nanoparticules d'Ag par SP-ICP-MS dans une matrice alimentaire peu étudiée (bœuf haché) ayant une teneur en gras plus élevée que

la plupart des matrices détaillées dans la littérature. En premier lieu, considérant l'absence d'échantillons de références certifiés contenant des NPs pour la validation et le développement de méthodes d'analyse de nanomatériaux métalliques, un échantillon de référence contenant des NP d'Ag de 40 nm a été préparé et utilisé pour le développement de protocoles de dégradation et d'extraction de NP. Les NPs ayant été incorporées profondément dans la matrice, cet échantillon de référence devrait être plus représentatif des conditions réelles pour juger de l'efficacité d'une l'extraction qu'une simple fortification dans le médium d'extraction, généralement utilisé dans la littérature.

L'objectif premier était le développement d'un protocole de digestion permettant l'extraction rapide et quantitative des NPs d'Ag de la matrice animale sans altération des NPs (agglomération, dissolution, etc.). Il était aussi important de déterminer les paramètres clés influençant le taux de recouvrement ou l'altération des NPs par l'utilisation de bilan de masses et la variation de certains paramètres tels que la masse de l'échantillon ou la composition de la solution utilisée pour l'extraction. Les protocoles optimisés ont été validés en second temps par analyse statistique : détermination de la répétabilité, des limites de détection et des limites de quantification.

Finalement, la stabilité d'échantillons traités par les méthodes optimisées a été étudiée sur 4 jours après préparation, information importante pour la reproductibilité des résultats au laboratoire dans les cas où un échantillon doit être analysé à nouveau ou dans l'éventualité où un échantillon préparé ne peut être analysé la journée même.

Chapitre 2 – Validation de la méthode analytique

Afin de s'assurer de la validité de la méthode de caractérisation et quantification des nanoparticules d'argent par SP-ICP-MS employée, une suspension de nanoparticules de taille et concentration connue est analysée avant chaque série de mesures. La répétabilité⁸⁹ (équation 5) et la précision de la méthode analytique sont détaillées dans ce chapitre par l'analyse statistique de la caractérisation par SP-ICP-MS d'une suspension de nanoparticules utilisée comme échantillon de contrôle de qualité dans le cadre d'analyses effectuées sur plusieurs mois. L'influence potentielle du traitement de données sur l'interprétation des résultats est aussi abordée par l'analyse des données brutes d'une série de mesures, par 2 logiciels différents.

$$(5) \text{ Répétabilité} = \frac{t_{(0,975;n-1)} \times \sigma}{\sqrt{n}}$$

Où t correspond à la valeur du T de Student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance de 95 %, n le nombre de mesures et σ l'écart-type sur la détermination d'une mesure d'un contrôle préparé par le même analyste sur le même instrument une journée différente.

2.1 Répétabilité de l'analyse de nanoparticules d'Ag par SP-ICP-MS

2.1.1 Préparation des échantillons

Les suspensions mères de nanoparticules d'argent (40 nm, NanoXact) et d'or (50 nm, Ultra-Uniform) utilisées proviennent de NanoComposix. Les solutions standards d'argent (CGAG1) et d'or (CGAUN1) ionique utilisées pour l'étalonnage de l'appareil proviennent d'Inorganic Ventures tout comme une solution de référence certifiée multi-éléments (QCP-QCS-3). La validation de l'étalonnage pour l'or et l'argent de l'instrument est effectuée par l'analyse des standards de références certifiés multi-éléments QCP-QCS-3 (Inorganic Ventures) et QCS-27 (High Purity Standards). Les acides utilisés (HNO_3 , PlasmaPure, SCP Science et HCl de Fisher Scientifics) pour la préparation des étalons standards et des échantillons acidifiés sont certifiés de qualité ultra-

trace. Un système de purification d'eau Milli-Q (Millipore Sigma) est utilisé pour obtenir de l'eau désionisée ($R > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$; $\text{COT} < 2 \text{ }\mu\text{g/L}$).

Afin de minimiser les pertes de nanoparticules par adsorption aux parois des tubes ou par agrégation, les suspensions de nanoparticules d'or et d'argent sont préparées la journée même de l'analyse à partir des suspensions mères. Après dilution, les suspensions sont plongées dans un bain à ultrason pour 10 minutes suivi d'une agitation par vortex pendant 1 min avant l'injection dans l'appareil. Afin d'évaluer les pertes par adsorption au système d'introduction, une aliquote de chaque échantillon de nanoparticules d'argent est diluée à la fois dans 10 mL d'eau Milli-Q pour analyse par SP-ICP-MS permettant de mesurer la concentration en Ag ionique et en Ag particulaire. Une autre aliquote est diluée dans 10 mL d'une solution de 2% d'acide nitrique suivi d'une digestion à 85 °C pendant 6 heures de l'échantillon acidifié pour analyse de l'argent total contenu par ICP-MS en mode quantitatif.

2.1.2 Acquisition des données par SP-ICP-MS

La prise de mesure est effectuée à l'aide d'un ICP-MS à triple quadrupôle (NexION 5000, Perkin Elmer) ainsi que du module Nano (version V3.2.2111.0.759) du logiciel Syngistix (Perkin Elmer). L'optimisation du signal est effectuée quotidiennement en aspirant une solution multi-élément tout en ajustant la position de la torche, le flux de gaz au nébuliseur, les différences de potentiel aux lentilles d'extractions ainsi que l'optique ionique (quadrupôle défecteur). L'étalonnage de l'appareil pour l'Ag et l'Au est effectué par aspiration de solutions étalons comprises entre 50 et 500 ng/L dans une matrice de 2% HNO_3 pour l'Ag et entre 200 et 2 000 ng/L dans une matrice de 2% HCl pour l'Au. Pour des raisons de stabilité, les solutions utilisées pour l'étalonnage de l'Au sont préparées la journée même de l'analyse. Le signal à un m/z de 107 est utilisé pour l'analyse de l'isotope ^{107}Ag ainsi que 197 pour ^{197}Au . Le débit d'aspiration du système d'introduction est déterminé par gravimétrie après l'optimisation de l'appareil par le suivi de l'aspiration d'eau Milli-Q pendant 5 minutes. L'efficacité de transport de l'appareil est déterminée par l'étalonnage de l'Au ionique suivi de l'analyse (mesure répétée 5 fois) d'une suspension de nanoparticules d'Au de taille connue⁶⁰. Le temps d'analyse d'une prise de mesure est de 50 s avec un temps d'intégration du signal de 50 μs pour chaque point de mesure. Chaque échantillon analysé par SP-

ICP-MS est analysé en triplicata et entre chaque échantillon, le système d'introduction de l'appareil est nettoyé en aspirant successivement de l'eau Milli-Q pendant 60 s, une solution de 2% HNO₃ pendant 90 s et finalement de l'eau Milli-Q à nouveau pendant 60 s.

2.1.3 Traitement des données brutes

Le module Nano du logiciel Syngistix est utilisé pour le traitement d'une partie des données du mode SP-ICP-MS. Le seuil utilisé pour discriminer entre le signal du bruit de fond ionique et les événements de nanoparticules est $5 \times \sigma$. Le module Nano permet le calcul de la concentration en nombre de particules par volume d'échantillon, la concentration massique de la fraction ionique (en fonction du signal du bruit de fond) ainsi qu'une distribution de taille des NP détectées dans l'échantillon. La concentration massique en NP est déterminée par calculs externes en utilisant un gabarit Excel à partir de la distribution de taille et des paramètres d'étalonnage. À partir de la distribution de taille, la taille moyenne des NP est aussi déterminée en ajustant une courbe gaussienne sur la distribution obtenue à l'aide du logiciel IGOR Pro (V6.3.7.2, WaveMetrics).

2.1.4 Validation de la méthode par analyse à long terme d'une suspension de nanoparticules d'Ag

Évaluer l'étalonnage de l'appareil (efficacité de transport et sensibilité) avant l'analyse par SP-ICP-MS est très important afin de s'assurer de l'exactitude des résultats obtenus pour une interprétation claire des résultats et une répétabilité des résultats afin de comparer entre différentes séries de mesures réalisées sur des journées différentes à l'aide d'un contrôle préparé à partir d'une même solution mère avant chaque série de mesures. L'analyse des résultats obtenus par SP-ICP-MS pour le contrôle sur une durée de 8 mois (**Figure 11**) permet d'évaluer que la répétabilité de la méthode pour ce qui est de la détermination de la taille de nanoparticules d'Ag par SP-ICP-MS est de 38.3 ± 0.9 nm pour un niveau de confiance de 95% selon l'équation 5. Pour l'interprétation et la comparaison de mesures réalisées sur des journées d'analyse différentes, tout changement de taille inférieur à 1 nm ne serait donc pas statistiquement significatif. Pour ce qui est de l'exactitude, la taille obtenue par SP-ICP-MS pour le contrôle est en accord avec la valeur de référence du fabricant (déterminée par TEM) de 40 ± 4 nm.

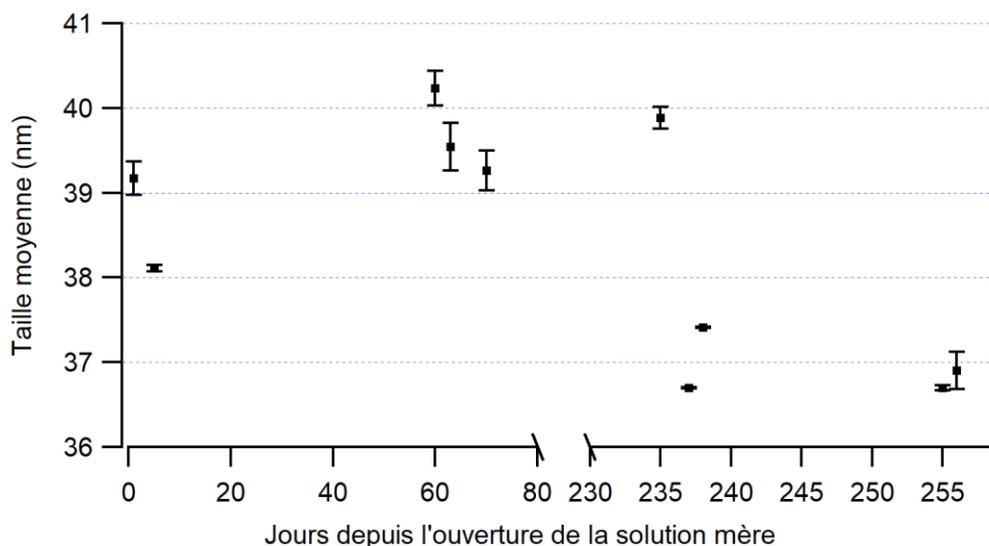


Figure 11 Taille moyenne des nanoparticules d'Ag détectées dans un échantillon de contrôle qualité préparé à une concentration d'environ 50 ng/L dans de l'eau Milli-Q à partir d'une solution mère conservée à 4 °C.

Pour la mesure de concentration totale d'Ag (somme de la concentration en Ag sous forme de NP et sous forme ionique) par SP-ICP-MS en comparaison à la concentration totale déterminée en mode quantitatif d'un échantillon acidifié, le recouvrement obtenu est inférieur dans la matrice d'eau Milli-Q du contrôle par rapport aux autres des matrices plus complexes (**Tableau 1**) sur l'ensemble des mesures effectuées dans la même période.

Tableau 1 Recouvrement obtenu en mode SP-ICP-MS par rapport à la concentration totale déterminée par ICP-MS en mode quantitatif dans 3 matrices après dilution : eau Milli-Q, extrait enzymatique et extrait alcalin (TMAH).

Matrice	Recouvrement (%)
Eau Milli-Q (contrôle)	74 ± 9
Extrait enzymatique (dilution 1 : 100)	107 ± 10
Extrait alcalin (dilution 1 : 100)	98 ± 8

Les matrices d'extraits dilués correspondent au surnageant obtenu après une dégradation par hydrolyse d'un échantillon de viande soit par des enzymes (Proteinase-K ou pancréatine de porc et lipase de *C. rugosa*) ou par une base forte (TMAH). Les détails concernant ces extractions seront abordés dans le chapitre 3. Le recouvrement inférieur obtenu dans l'eau Milli-Q peut être expliqué par l'absence de matière organique (protéines, enzymes, etc.) présente dans les extraits pouvant s'adsorber à la surface des nanoparticules et stabiliser la suspension colloïdale⁹⁰. Il en résulte ainsi d'une réduction de l'adsorption aux parois du tube d'échantillon ou au système d'introduction de l'ICP-MS pour les matrices plus complexes.

Outre l'exactitude et la répétabilité, les limites de détection et de quantification d'une méthode d'analyse sont d'autres paramètres d'importance à déterminer pour une méthode d'analyse. C'est particulièrement le cas pour l'analyse de nanoparticules par SP-ICP-MS considérant que cette méthode d'analyse permet d'obtenir une mesure de la taille et de la concentration en nanoparticules, mais aussi la concentration en métal sous forme dissoute. Chacun de ces paramètres comporte une LOD et LOQ devant être déterminé pour chaque matrice étudiée. La détermination de ces paramètres de validation et l'impact sur l'interprétation des résultats sont détaillés au chapitre 3.

2.2 Influence du logiciel de traitement de données sur l'interprétation des résultats

Le traitement des données brutes de SP-ICP-MS implique le développement d'outils spécialisés dans ce type de mesures pour en faciliter l'interprétation. Certains outils développés sont libres d'accès^{70, 91} tandis que d'autres applications font partie de la gamme logicielle de compagnies spécialisées en développement d'instruments analytiques. Bien que le principe théorique général derrière la technique est commun à toutes les approches de traitement de données, le détail de la détermination de certains paramètres (distinction entre le bruit de fond et les événements de nanoparticules par exemple) peut potentiellement différer d'une approche à une autre.

Pour s'assurer que le traitement de données effectué au cours des travaux détaillés dans ce mémoire (soit l'utilisation du module Nano du logiciel Syngistix ainsi que des calculs externes tels

que détaillés plus haut) n'induit pas un biais systématique dans l'interprétation des données, les données brutes issues d'une série d'analyse de plusieurs échantillons ont aussi été analysées par le logiciel Nu Quant de Nu Instruments.

2.2.1 Traitement de données SP-ICP-MS par Nu Quant

L'acquisition des données brutes de cette série d'analyse a été réalisée sur le NexION 5000 détaillé précédemment. La version du logiciel Nu Quant utilisé est 2.2.2385.1. Le logiciel Nu Quant permet la discrimination par un algorithme entre le bruit de fond et un signal de nanoparticule en analysant les variations dans le bruit de fond local. Le logiciel détermine les points d'inflexion des « pics » à haute intensité (supérieur à un seuil prédéterminé par l'utilisateur) des événements de nanoparticules pour ensuite intégrer le signal sur l'entièreté du pic afin de déterminer la masse (et par le fait même la taille) de la nanoparticule détectée⁷⁶. Afin d'éviter les faux positifs, Nu Quant permet aussi l'utilisation d'un lissage des données brutes afin de réduire les variations dans le signal du bruit de fond pouvant être détectées de façon erronée.

Pour le traitement des données brutes, un lissage de 5 points (l'intensité du signal de chaque point est moyennée avec les 2 points précédents et suivants), 3 itérations de lissage ainsi qu'un seuil de 5 fois l'écart-type du bruit de fond local est utilisé pour l'entièreté des échantillons. Aucun traitement de données supplémentaire n'est nécessaire en utilisant Nu Quant considérant que la plupart des paramètres pertinents à la caractérisation de nanoparticules (entre autres concentration en nombre et masse pour la fraction particulaire, taille des particules détectées et concentration massique de la fraction ionique) sont calculés par le logiciel. Pour comparaison, la taille moyenne des nanoparticules détectées a été calculée de la même façon avec les 2 approches soit par l'utilisation d'une distribution gaussienne telle que détaillé plus haut à l'aide de IGOR Pro.

2.2.2 Comparaison du traitement des données brutes effectué par Syngistix et Nu Quant

Pour ce qui est de l'efficacité de transport, une valeur de 5.94 % est obtenue avec Syngistix comparativement à 5.82 % avec Nu Quant (écart relatif de 2.02%). Des différences quant à

l'intégration du signal des étalons ioniques d'Ag impactent légèrement (de façon non statistiquement significative) l'étalonnage ionique (**Tableau 2**).

Tableau 2 Paramètres de la courbe d'étalonnage pour l'Ag déterminée par Syngistix et Nu Quant selon une régression de type $y = mx + b$ avec intervalles de confiance pour un niveau de confiance de 95 %

Constante	Syngistix	Nu Quant
m (cps/ngL⁻¹)	183 ± 8	186 ± 8
b (x 10³ cps)	0 ± 2	0 ± 2

L'influence du traitement de données sur les résultats obtenus (**Tableau 3**) permet de conclure que globalement les différences entre les approches de traitement de données n'influencent pas l'interprétation des résultats. Le nombre d'événements interprétés comme étant des nanoparticules est le même pour les 2 logiciels, ce qui se reflète dans la concentration en nombre calculé qui est égale à l'exception d'un seul échantillon où la différence de valeur pour l'efficacité de transport a pu impacter le résultat. La taille moyenne déterminée par Nu Quant est systématiquement plus élevée de 0.34 ± 0.07 nm par rapport à Syngistix en raison de la différence sur l'efficacité de transport et de l'étalonnage pour l'Ag, mais considérant que cette différence est en deçà de la répétabilité de la méthode l'impact sur l'interprétation des résultats est négligeable.

La détermination de la concentration de la fraction ionique par Syngistix est impactée par le manque de précision sur la mesure de la moyenne du signal du bruit de fond par le logiciel. Sur la version du module Nano de Syngistix utilisée (V3.2.2111.0.759), l'export de données traitées par le logiciel limite le nombre de chiffres significatifs affichés à 0.01 counts (soit 200 cps avec le temps d'intégration de 50 μ s utilisé) et 0.01 ppb (10 ng/L), ce qui limite la précision de la détermination de la concentration en Ag ionique au ng/L près même en réalisant manuellement le calcul à partir de l'intensité de signal mesurée. Cette limitation de précision (écart-type de 0 obtenu pour certains échantillons, en rouge sur le tableau 3) impacte surtout les mesures inférieures à 10 ng/L pourtant supérieures à la limite de quantification mesurée dans la matrice

des échantillons analysés soit 1.52 ± 0.05 ng/L (échantillons d'extraits dans une matrice de TMAH dilué 1 : 200, voir chapitre 3 pour plus d'informations).

Tableau 3 Comparaison entre les résultats obtenus par Syngistix et par Nu Quant sur une série d'analyse. Chaque échantillon est analysé en triplicata. Les mesures ayant une différence statistiquement significative (test t, $p < 0.05$) sont mises en valeur (cellules colorées)

Échantillon	NP détectés pour 50 s d'analyse		[Ag ⁺] (ng/L)		[nAg] ($\times 10^3$ part./mL)		[nAg] (ng/L)		Taille moyenne (nm)	
	Syngistix	Nu Quant	Syngistix	Nu Quant	Syngistix	Nu Quant	Syngistix	Nu Quant	Syngistix	Nu Quant
1	1 520 ± 14	1 527 ± 17	2 ± 0	2.1 ± 0.2	87.0 ± 0.8	89 ± 1	27.0 ± 0.6	27.3 ± 0.5	36.9 ± 0.2	37.2 ± 0.2
2	27 ± 4	23 ± 1	53 ± 3	56 ± 1	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1	n/a ¹	n/a	n/a ¹	n/a
3	10 ± 4	9 ± 4	54 ± 2	47 ± 10	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.3	n/a	n/a	n/a	n/a
4	9 ± 2	8 ± 2	55 ± 0	55 ± 1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	n/a	n/a	n/a	n/a
5	1 423 ± 23	1 424 ± 31	3 ± 0	3.98 ± 0.05	82 ± 1	83 ± 2	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.6	36.21 ± 0.09	36.56 ± 0.08
6	1 458 ± 18	1 454 ± 11	5 ± 0	4.4 ± 0.3	84 ± 1	85.0 ± 0.6	22.9 ± 0.4	23.2 ± 0.3	36.30 ± 0.05	36.68 ± 0.07
7	1 452 ± 12	1 439 ± 15	5 ± 0	5.2 ± 0.4	83.1 ± 0.7	84.1 ± 0.9	22.3 ± 0.3	22.6 ± 0.3	36.2 ± 0.1	36.50 ± 0.09

¹ Calculs non effectués pour toutes les cellules grisées en raison d'un nombre insuffisant de NP détectées dans l'échantillon

Chapitre 3 – Analysis of silver nanoparticles in ground beef by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS)

Alexandre Chalifoux¹, Madjid Hadioui¹, Nesrine Amiri¹, Kevin J. Wilkinson^{1*}

¹Department of Chemistry, Université de Montréal, 1375 Ave. Thérèse-Lavoie-Roux, Montreal, QC, H2V 0B3

*Correspondence: kj.wilkinson@umontreal.ca

Molecules 2023, 28(11), 4442; <https://doi.org/10.3390/molecules28114442>

3.1 Abstract

The regulation and characterization of nanomaterials in foods are of great interest due to the potential risks associated with their exposure and the increasing number of applications where they are used within the food industry. One factor limiting the scientifically rigorous regulation of nanoparticles in foods is the lack of standardized procedures for the extraction of nanoparticles (NP) from complex matrices, without alteration of their physico-chemical properties. To this end, we tested and optimized two sample preparation approaches (enzymatic- and alkaline-based hydrolyses) in order to extract 40 nm Ag NP, following their equilibration with a fatty ground beef matrix. NP were characterized using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS). Fast sample processing times (< 20 min) were achieved by using ultrasonication to accelerate matrix degradation. NP losses during the sample preparation were minimized by optimizing choice of enzymes/chemicals, the use of surfactants, the product concentration and sonication. The alkaline approach using TMAH (tetramethylammonium hydroxide) was found to have the highest recoveries (over 90%), however alkaline processed samples were found to be less stable than samples processed using an enzymatic digestion based upon pork pancreatin and lipase (≈ 60 % recovery). Low method detection limits (MDL) of 4.8×10^6 particles g^{-1} with a size

detection limit (SDL) of 10.9 nm were achieved for the enzymatic extraction whereas a MDL of 5.7×10^7 particles g^{-1} and a SDL of 10.5 nm were obtained for the alkaline hydrolysis.

Keywords: Silver nanoparticles; Single Particle ICP-MS; nanomaterials; Enzymatic Extraction; Alkaline Hydrolysis, Proteinase K, TMAH.

3.2 Introduction

There is growing interest and use of engineered nanomaterials (ENMs) over the past few decades, with applications ranging from nanoelectronics to nanotechnology enabled agriculture⁹²⁻⁹⁵. ENMs are also being used in the food sciences to answer important challenges faced by the industry⁹⁶. For example, nano-enabled packaging is being used to extend product shelf-life and avoid spoilage, either by improving the physical properties of the packaging itself (e.g., gas-barrier properties) or by releasing active agents that slow bacterial proliferation^{12, 17, 97}. Nonetheless, there are currently concerns with respect to the exposure of humans to nanoparticles (NPs) through their presence in food, which have led to regulations to control their use²⁶. For example, there is growing public awareness of the risks associated TiO₂ as a food additive (E171), as reflected by recent rulings of the European Commission⁴¹.

From a regulatory perspective, the widespread use of ENMs comes with its own set of challenges. Their small sizes and wide range of surface properties makes their detection and characterization in complex biological matrices, including foodstuffs, a non-trivial endeavor. For the inorganic nanomaterials, recent advances in SP-ICP-MS have been useful to facilitate the measurement of multiple physical parameters of the NPs, including their size distribution and concentration, and the concentration of dissolved forms of the metals. Nonetheless, the non-perturbing and quantitative extraction of NP from food is difficult, from a regulatory perspective, given that there is no widely standardized method for NP extraction and since analysis must be verified for NP stability⁷⁹.

A limited number of studies have developed sample preparation protocols for the analysis of NP in biological matrices, with an emphasis on matrix degradation approaches. Indeed, in order to avoid altering the NP, most extraction procedures use 'soft extraction' conditions by using

enzymes (e.g., Proteinase K ⁹⁸⁻¹⁰⁰, Pectinase ¹⁰¹, Pancreatin/Lipase ¹⁰²) or alkali (usually TMAH, tetramethylammonium hydroxide ^{101, 103, 104}) to degrade the biological matrices. Nonetheless, variable outcomes (i.e. NP number and size recoveries, as well as reproducibility) have been reported for the extractions, depending on the nature of the treated matrix and the target nanoparticles. For example, although Vidmar *et al.* ⁸⁶ found similar NP recoveries from placental tissue, they opted for an enzymatic approach over an alkaline treatment due to the observation of NP aggregation when using the alkaline conditions. In contrast, studies examining the extraction of NP from fish liver ^{85, 87} showed that the enzymatic approach had lower recoveries, likely due to the inability of the protease (Proteinase K) to properly digest fatty tissue. A gentle approach using methanol was also investigated by Laughton *et al.* ¹⁰⁵. The authors found that the use of methanol to extract Au, CuO and ZnO NP from leaf tissues (organic kale, lettuce and corn) led to more reproducible results than an enzyme-based extraction. These diverse findings show the complexity of analyzing NP in biological matrices, including food, which complicates any intended use of the measurements for regulatory purposes. Finally, there is no certified reference material for NP in food with which one can build new protocols.

Therefore, the objective of this study was to investigate the parameters that influence the recovery of metallic NP from a high fat animal matrix consisting of an in-house prepared ground beef reference material. Ultrasound assisted extraction, using either enzymes or TMAH, was employed to gently extract the NP from the animal tissue. Silver nanoparticles (20 and 40 nm) were chosen as the model NP due to both their widespread use as an antimicrobial agent, in addition to their sensitivity to changes during the extraction process (*e.g.*, agglomeration, dissolution). Investigated parameters include centrifugation, sample size and composition of the extraction solution. Emphasis was also placed on determining the analytical limitations of the SP-ICP-MS data acquisition and the medium-term stability (5 days) of a processed sample.

3.3 Results and discussion

Representative photos of the enzymatic and alkaline (TMAH) extractions are provided in the supplementary material (**Figure 18 et Figure 19**).

3.3.1 Optimization of NP extraction by enzymatic hydrolysis

In order to optimize the extraction method from the reference material, Ag NP recoveries were determined for all experimental conditions by dividing the mass of Ag NP obtained by SP ICP-MS by the total Ag obtained following acid digestion (**Tableau 4**). Extremely poor recovery (0.9 ± 0.8 %) of the 40 nm Ag NP was obtained with a purely mechanical degradation of the sample matrix (ultrasonication only in Milli-Q water, without enzymes). A comparatively better recovery (15 ± 7 %) was obtained by a 24 h enzymatic hydrolysis (Pancreatin/Lipase) without ultrasonication. When ultrasonication was combined with enzymatic hydrolysis, recovery increased further to 38 ± 3 %. This is a good example of the synergistic effects of ultrasound assisted enzymatic hydrolysis, which facilitated a reasonable degradation of the sample matrix in a considerably shorter time (15 min) than conventional enzymatic methods. Lyophilization was added in order to better homogenize the samples. It had no impact ($38 \pm 3\%$ vs $39 \pm 5\%$) on the recovery of the 40 nm Ag NP, when equivalent amounts of meat were enzymatically degraded (i.e., once water losses associated with freeze-drying process were taken into account).

No Ag was detected in the meat homogenate that did not contain a Ag NP spike (total [Ag] < 0.1 ng g^{-1} after total acid digestion and quantitative ICP-MS analysis). No detectable losses of Ag were measured due to the freeze-drying and grinding of the reference material, which was spiked with $252 \pm 5 \text{ ng g}^{-1}$ of 40 nm Ag NP, which would correspond to approx. 1260 ng Ag per g in dried meat. Indeed, following the loss of water during lyophilization, the mass of meat was reduced to 20.1 ± 0.1 % of its original weight and a concentration of $1216 \pm 88 \text{ ng g}^{-1}$ of Ag was determined, corresponding to a recovery of 96 ± 7 %.

Mass balances were performed (**Figure 12 Figure 13**) to determine where the major losses were occurring. In order to reduce the adsorptive losses as much as possible, centrifugation rather than filtration¹⁰⁶ was used to reduce surface interactions, while removing large agglomerates and undigested meat that could potentially obstruct the ICP-MS introduction system. The reduction of sample manipulation, such as avoiding sample transfer to 'clean' tubes also resulted in a much-improved extraction efficiency of $63 \pm 8\%$ Ag (from $39 \pm 5\%$).

Tableau 4 Overview of selected extraction conditions tested for method optimization of enzymatic extraction. The enzymatic solution was composed of 1.5 mg mL⁻¹ each of Protease (Proteinase K or Pancreatin) and Lipase. SDS=sodium dodecyl sulfate.

Extraction medium ^a	Extraction				Meat sample (spiked with Ag NP)				Recovery of Ag mass (%)
	Sonication time (min)	Centrifugation		Supernatant transfer ^b	Ag NP size (nm)	Lyophilization	mass (g)	Replicates	
		Speed (g)	time (min)						
Ultrapure water only	15	50	15	Yes	40	No	0.5	3	0.9 ± 0.8
Pancreatin + Lipase	15	50	15	Yes	40	No	0.5	3	38 ± 3
	15	50	15	Yes	40	Yes	0.1	3	39 ± 5
	0 ^c	500	3	No	40	Yes	0.1	2	15 ± 7
	15	500	3	No	40	Yes	0.1	3	63 ± 8
	15	500	3	No	40	Yes	0.025	3	67 ± 12
	15	500	3	No	40	Yes	0.01	3	62 ± 7
	15	500	2	No	40	Yes	0.02	3	63 ± 3
	15	500	3	No	40	Yes	0.05	2	42 ± 2
	15	500	3	No	20	Yes	0.02	3	62 ± 7
Pancreatin + Lipase + 1% SDS	15	500	2	No	40	Yes	0.02	3	39 ± 6
Proteinase K + Lipase + 1% SDS	15	500	2	No	40	Yes	0.02	3	43 ± 2

^a Extraction solution is stabilized at pH 7.5 by a 5 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonate) buffer in all conditions other than the ultrapure water control.

^b 4 mL of the upper supernatant after centrifugation was transferred to another tube.

^c 24 h at 37 °C without ultrasonication.

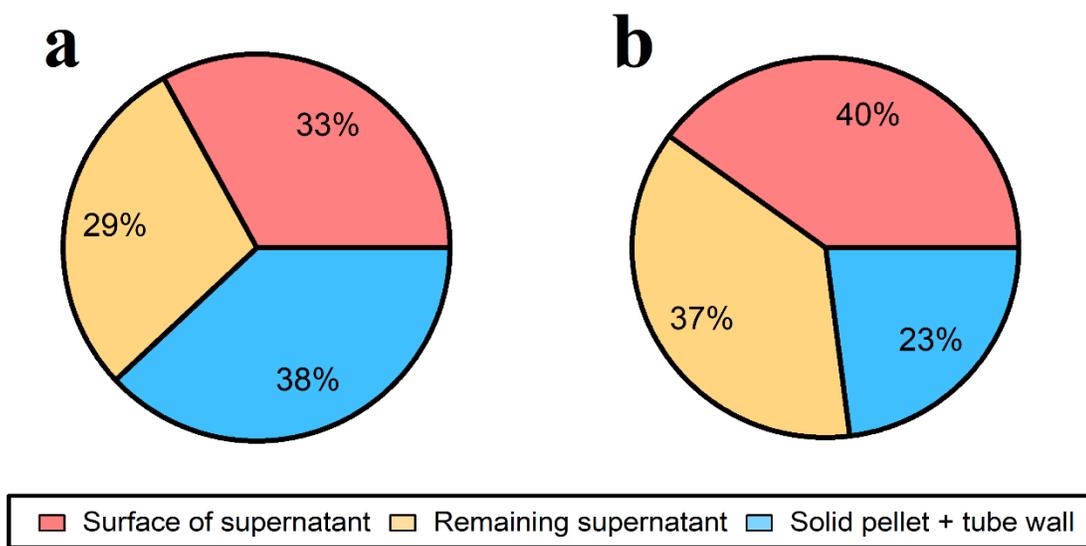


Figure 12 Distribution of Ag in centrifugation tubes obtained during the enzymatic extractions (1.5 mg mL^{-1} Pancreatin + 1.5 mg mL^{-1} Lipase, 15 min of ultrasonication) of 0.1 g of lyophilized ground beef samples after 15 min of centrifugation at $50 \times g$ for: (a) the prepared reference material at a concentration of $1216 \pm 88 \text{ ng g}^{-1}$; (b) a sample where the 40 nm Ag NP were spiked in the extraction media at a concentration of $869 \pm 5 \text{ ng g}^{-1}$, immediately before processing.

A similar extraction efficiency of $62 \pm 1 \%$ when using the ultrasonication assisted Pancreatin and Lipase were used for the enzymatic hydrolysis of the ground beef that had been thoroughly equilibrated with the Ag NP (**Figure 12a**). In contrast, when the 40 nm Ag NP were simply spiked into an extraction media containing non-spiked meat, and then ultrasonicated, extraction efficiencies were even higher ($77 \pm 4 \%$), showing that part of the losses (Ag in the solid fraction that cannot be analyzed by SP-ICP-MS) occurred during the equilibration of the Ag NP with the complex organic matrix (**Figure 12b**). It is hypothesized that the NP were deeply incorporated in the meat matrix where they could not be easily analysed. Another of the difficulties of the SP ICP-MS technique is that adsorptive losses of the NP to the multiple surfaces of the ICP-MS and vessels used for sample preparation are generally inevitable, given the nature of the surfaces and the fact that samples are not acidified¹⁰⁷. Indeed, based upon the spike recovery experiments, adsorptive losses to tubes and ICP-MS were also substantial. Indeed, the data indicate that the observed

losses (~40%) were fairly evenly split between losses to the meat and adsorptive losses to the ICP-MS and tubing.

In preliminary experiments, centrifugation times and speeds were adjusted in order to minimize sample contact times, while increasing the separation of large particles and minimizing the losses of Ag NP. For a centrifugation at 50 xg, Ag was quantified in the upper supernatant, in the lower supernatant and in the pellet, for different centrifugation times (**Figure 13**). Most of the Ag mass was recovered in the supernatant (~60%) although substantial Ag could also be found in the meat pellet and on the inner wall of the sample tube (~40%). Centrifugation time had no impact on the distribution of Ag in the various fractions. From the insight obtained through the mass balance experiments, it became clear that adsorptive losses of the enzymatic extraction method could be reduced, but not eliminated, by reducing sample manipulation and by using polypropylene tubes^{106, 107}. Nonetheless, the high protein content of the enzymatic solution was likely responsible for some of the adsorptive losses. Although recoveries could be improved, in the presence of the enzyme mixtures, it was not possible to increase them above $63 \pm 8\%$ for the 40 nm Ag NP or $62 \pm 7\%$ for the 20 nm Ag NP (**Tableau 4**).

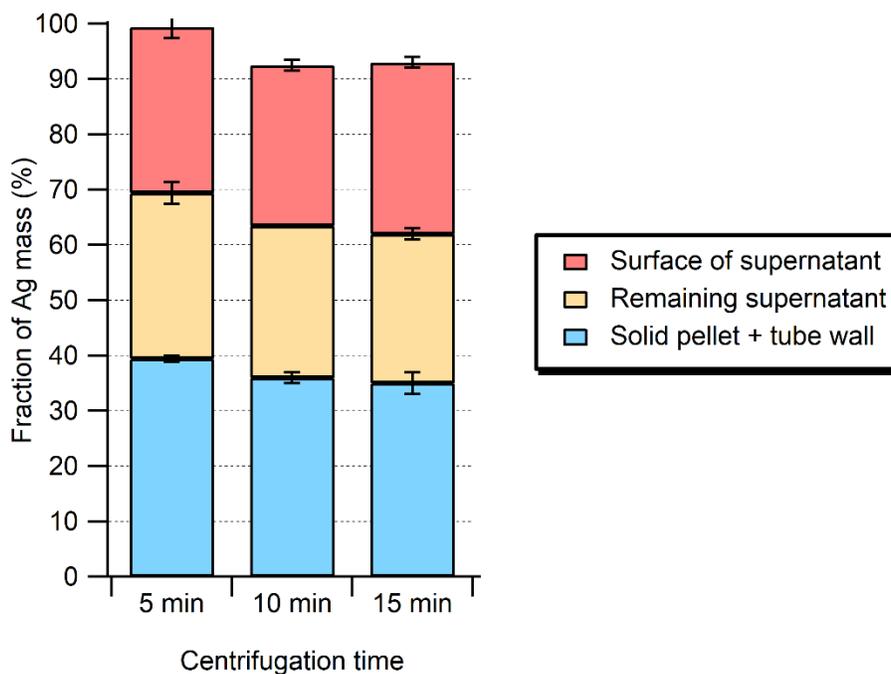


Figure 13 Distribution of total Ag in samples processed by enzymatic hydrolysis (Pancreatin + Lipase, 1.5 mg mL⁻¹ each) as a function of centrifugation time at 50 xg.

Further optimizations were focused on trying to improve the degradation of the meat matrix by varying the extraction volume, sample mass and examining the choice of enzymes. For an identical volume (and activity) of enzyme, the use of smaller sample mass did not lead to a statistically significant increase in Ag NP recovery (**Figure 14**). Furthermore, even with smaller sample sizes, total degradation of the matrix was still not achieved, as some white colored organic matter was visible after sample processing (**Figure 18**). Such a result suggests that sample degradation was limited by the nature of the sample rather than due to a mass driven limitation that would vary as a function of the mass to solution volume ratios. Nonetheless, the influence of sample composition (fatty tissue content, protein composition, presence of connective tissue, etc.) on the efficiency of the extraction method has yet to be determined with certainty.

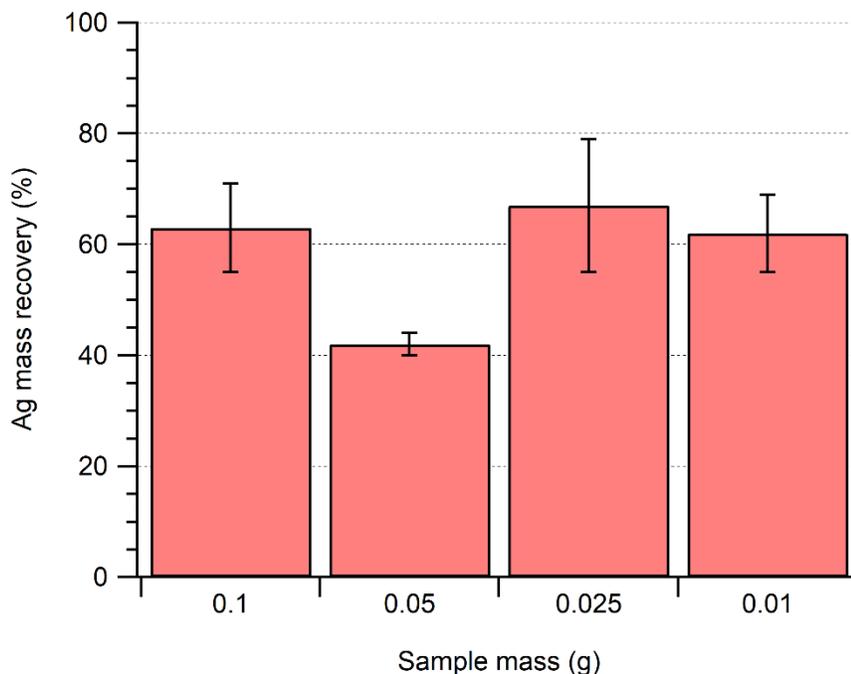


Figure 14 Influence of sample mass on the recovery of 40 nm Ag NP after enzymatic extraction a mixture of Pancreatin (1.5 mg mL^{-1}) and + Lipase (1.5 mg mL^{-1}).

Proteinase K is a well-known enzyme, often used as the protease of choice to degrade animal tissue, often in conjunction with a surfactant such as SDS (sodium dodecyl sulfate) or Triton-X100 in the extraction medium. Indeed, data on the activity, stability and other parameters of interest for the Proteinase K are readily available in the literature ^{108, 109}. Nonetheless, when recoveries for the Proteinase K were compared to those obtained for porcine Pancreatin (both extractions in the presence of 1% SDS), no significant statistical difference was observed, with a recovery of ~40 % in both cases. Addition of SDS to the Pancreatin extraction medium appeared to have a negative impact on the recovery of Ag NP ($39 \pm 6 \%$), when compared to the control without SDS ($63 \pm 3 \%$). The surfactants are usually added in order to stabilize the NP and prevent their agglomeration in the extraction suspensions. The decreased recovery is thus a counter-intuitive observation that might have resulted from an increase in the ionic strength associated with the addition of the SDS. On the other hand, homo-agglomeration of the Ag NP was not observed with similar PSD (particle size distribution) obtained by SP-ICP-MS in the presence and absence of SDS (mean sizes of $39.2 \pm 0.2 \text{ nm}$ vs $39.1 \pm 0.2 \text{ nm}$ respectively, **Figure 20**). Non-ionic surfactants such

as Triton X100 or Tween-80 might be better suited alternatives to SDS for extractions involving low Ag NP concentrations ¹¹⁰.

The Ag NP recoveries presented above are lower than what is reported in the literature for the enzymatic hydrolysis of other food matrices. For example, Peters *et al.*' study ⁵² on the Proteinase K based extraction of Ag NP from chicken meat is often used as a basis for method development. In that work, recoveries of $98 \pm 7\%$ were obtained. Nonetheless, recoveries were validated using a 60 nm Ag NP spike that was added immediately before sample processing, with a reduction in recovery (reduction of up to 40 %) noted with longer equilibrium times, again demonstrating that NP that are well integrated into the biological matrices are harder to recover. Another approach using pork Pancreatin and Lipase for the digestion of mollusc tissues showed recoveries of about 80% for the Ag NP ¹¹¹. In this current study, the ground beef had a considerably higher fat content than the other matrices with fatty tissues representing about half of the biological material. This possibly includes both intramuscular and intermuscular fat due to the butchering process involved in its production. Indeed, after sample processing, some white residues were observed in the slightly cloudy white suspension, a reminder that the enzymatic digestion is less efficient in degrading fats, despite the Lipase that was included in the extraction media. In addition, similar to the known adsorption of proteins and enzymes at the surface of metallic NP, lipids can also contribute to the formation of an eco-corona ¹¹², which could increase adsorptive losses to the container walls and increase unrecoverable NP bound to the undigested tissues.

3.3.2 Fate of Ag NP after the enzymatic extraction

The extraction procedure that is used must limit or avoid alteration of the physical properties of the NP during extraction and the NP should remain stable with time so that extracted particles are the most representative possible of the original sample. Possible changes to the size of the Ag NP were investigated by comparing the particle size distribution (PSD) of the suspension of Ag NPs used for the preparation of the reference materials to the measured PSD obtained after sample preparation and extraction.

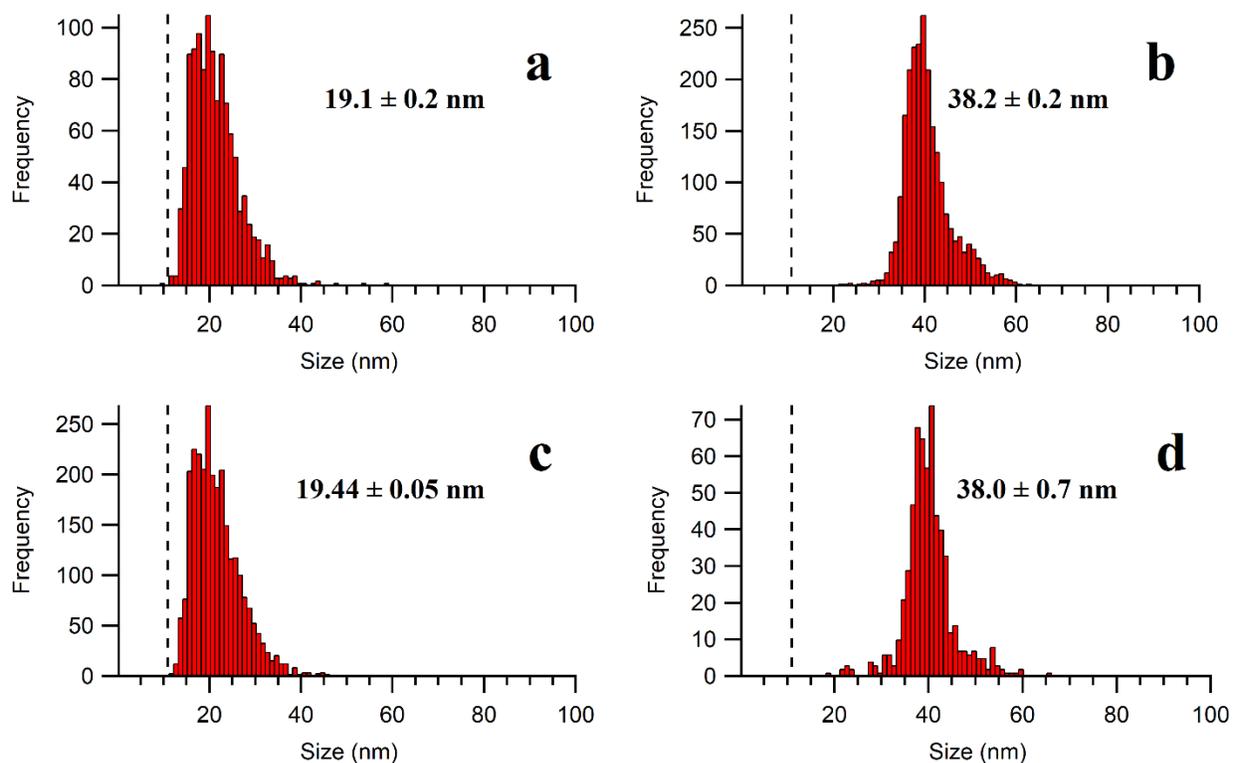


Figure 15 Particle size distributions of (a) 20 nm Ag NP in water; (b) 40 nm Ag NP in water; (c) 20 nm Ag NP in the enzymatic extract; and (d) 40 nm Ag NP in the enzymatic extract. A mixture of Pancreatin and Lipase (1.5 mg mL^{-1} each) was used. The calculated size limit of detection is represented by a dashed line on the PSD. Sizes correspond to the calculated mean diameters (assuming a spherical particle) of 3 samples (each measured in triplicate) with their standard deviations.

Note that in preliminary investigations without an ice bath, the temperature of the extraction medium rose to over 70°C following 15 min of ultrasonication, which appeared to cause partial dissolution of the Ag NP ¹¹³. By immersing the extraction vessel in a water bath at room temperature, some NP dissolution was still observed with an increased detection of ionic Ag and smaller NP, as compared to the stock suspensions. On the other hand, when an ice bath was used to limit overheating, no apparent agglomeration or dissolution was detected by SP-ICP-MS for either the 20 nm or 40 nm NP extracted from the meat matrix (**Figure 15**).

3.3.3 Alkaline hydrolysis of the meat matrix

Given the low recoveries of the enzymatic extractions, TMAH was also tested as a means to digest the matrix, while avoiding dissolution or agglomeration of the NP. Indeed, recoveries (**Tableau 5**) were significantly improved when compared to the enzymatic extraction, with a nearly complete recovery of the Ag NP under both tested conditions. As with the enzymatic extraction, no immediate size alterations of the 40 nm NP were noted when compared to the PSD of the stock suspension (38.0 ± 0.1 nm vs 38.2 ± 0.2 nm, **Figure 21**). Furthermore, upon visual observation, the obtained supernatant was clearer than the one obtained with enzymatic extraction, indicating that the alkaline extraction degraded better the organic matrix, notably the fatty tissues, which likely explained the higher obtained recoveries. For both tested TMAH concentrations (10 % and 2.5 % w/w in Milli-Q water), an ionic Ag spike into the extraction media was fully recovered, with no observation of Ag NP formation.

Tableau 5 Recovery of Ag from the meat reference material after alkaline extraction.

Extraction medium	Extraction			Meat sample		Recovery of Ag mass (%)
	Sonication time (min)	Centrifugation		mass (g)	Replicates	
		Speed (g)	time (min)			
10 % TMAH	15	500	2	0.02	3	92 ± 6
10 % TMAH, ionic Ag spike	15	500	2	0.02	3	89 ± 5
2.5 % TMAH	15	500	2	0.02	3	96.1 ± 0.3
2.5 % TMAH, ionic Ag spike	15	500	2	0.02	3	114 ± 2

3.3.4 Stability of the processed samples over 4 days

Sample stability was examined over 4 days (**Figure 16**). While the cloudy white suspension obtained after enzymatic extraction eventually slowly separated into a white opaque supernatant during storage at 4 °C, it was possible to re-homogenize the sample using a vortex shaker and restore the sample to its original appearance. Ag NP sizes (Day 1: 39.1 ± 0.2 nm; Day 4: 38.8 ± 0.2 nm, **Figure 22**) and dissolved Ag concentrations remained stable over this time period, with no significant differences between Day 0 and Day 4 (Student t-test, $p > 0.05$). On the other hand, a

partial solubilization of the Ag NP (associated with a size decrease and increase in ionic background) was observed when storing samples at 15 °C for greater than 3 days.

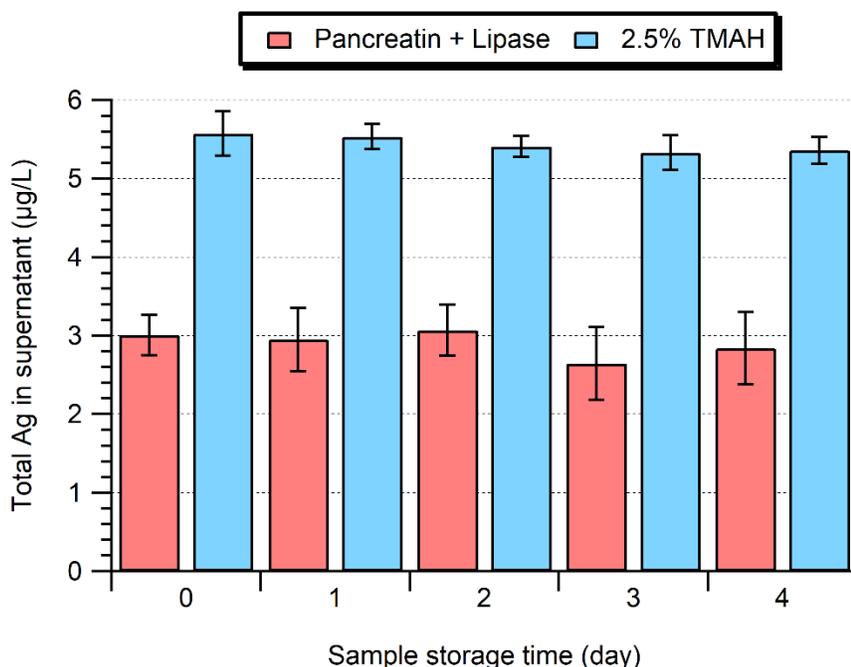


Figure 16 Total Ag concentration in the supernatant of extracts obtained by enzymatic (Pancreatin + Lipase) or alkaline (2.5 % TMAH) extraction as a function of storage time at 4 °C.

Overnight settling is used in several studies as part of the sample preparation of animal tissues with TMAH ^{35, 86, 114, 115}. To investigate its impact on the 10 % TMAH extractions, samples were stored at room temperature in the dark for 24 h and then reanalyzed. While good recoveries ($88 \pm 9 \%$) were observed for the spiked reference material, some agglomeration of the Ag NP was observed after 24h (**Figure 23**). This observation has been noted in a few other studies involving animal matrices ^{84, 86}. Under these conditions, a loss of ionic Ag was also observed (recovery of the ionic Ag mass decreased from $89 \pm 5 \%$ to $60 \pm 6 \%$), which was associated with the formation of a statistically significant ($> \text{LoQ}_{\text{number}}$) number of small Ag NP. The detected NP represented a small fraction of the detected Ag ($2.1 \pm 0.8 \%$), indicating adsorptive losses of ionic Ag to the inner walls of the containers or to the undigested organic matter.

Under alkaline conditions, sample stability was improved when a lower TMAH concentration was used in the extraction media and for samples stored at 4 °C, where they appeared to be stable

for at least 24 hours. Nonetheless, it should be noted that a slight increase in NP size and slight decrease in NP concentration was observed after 4 days, indicating that agglomeration was still occurring, albeit at a reduced rate (**Figure 17**). For the ionic Ag spike, the samples showed good stability over 4 days following their extraction by 2.5 % TMAH (**Figure 24**) and in contrast to the 10 % TMAH extraction, the formation of Ag NP was not observed. The lack of formation of Ag NP might have been due to the lower ionic strength or the slightly lower pH of the medium.

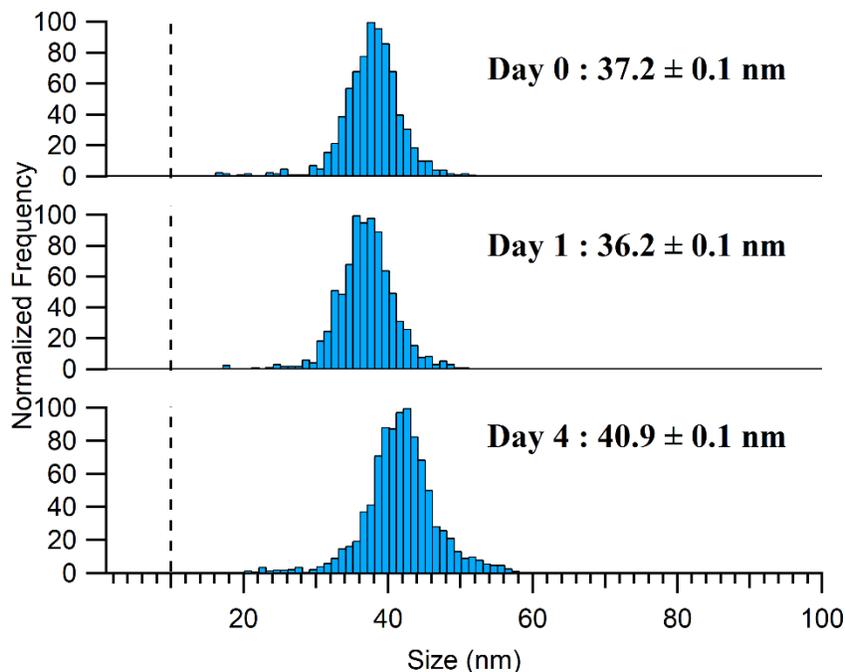


Figure 17 Aging of Ag NP detected in the 2.5 % TMAH extract of a processed sample stored at 4 °C with day 0 being the day the sample was prepared. The LoD_{size} is represented by a dashed line on the PSD.

3.3.5 Evaluation of analytical performance

The method detection limits for the enzymatic and alkaline extractions were determined from the analysis of a processed meat sample blank (without Ag NP) prepared in the same way as the spiked reference material and analyzed 10 times (**Tableau 6**, details on calculations are included in the supplementary material). With respect to particle size and dissolved metal concentrations, no statistical difference in analytical performance was obtained between the two extraction media. The calculated size detection limit (LoD_{size}) in the meat extracts was in the range 10-12 nm, which was similar to those determined in a Milli-Q water blank. Nonetheless, higher particle

number detection limits (LoD_{number}) were obtained following alkaline extraction. Usually, fewer than 10 NP events were detected during a 50 s acquisition time, which is on-par with the expected number of false negatives ⁷⁰. The LoD_{number} corresponded to ppt (parts per trillion) levels of particulate silver in meat. For example, under the assumption that we are detecting 20 nm or 40 nm monodisperse Ag NP, it is possible to calculate particle mass LoDs of 0.21 ng g⁻¹ and 1.7 ng g⁻¹, respectively, for the enzymatic extraction.

Tableau 6 Method limits of detection (LoD) and method limits of quantification (LoQ) determined for SP-ICP-MS analysis of Ag NP (LoD_{size} , LoQ_{size} , LoD_{number} , LoQ_{number}) and dissolved Ag (LoD_{diss} , LoQ_{diss}) in two different extraction media (Proteinase K and TMAH).

Extraction Medium ^a	Particle size LoD_{size} , LoQ_{size} (nm)	Particle number concentration LoD_{number}^b , LoQ_{number}		Dissolved metal concentration LoD_{diss} , LoQ_{diss}		
		extract/water (x 10 ² mL ⁻¹)	meat ^c (x 10 ⁶ g ⁻¹)	extract/water (ng L ⁻¹)	meat ^c (ng g ⁻¹)	
Pancreatin+Lipase	LoD	10.9 ± 1.0	6.0 ± 2.3	4.8 ± 1.9	0.2 ± 0.2	2.0 ± 1.9
	LoQ	13.7 ± 1.2	10.9 ± 4.5	8.6 ± 3.4	0.9 ± 0.9	7.0 ± 6.8
TMAH	LoD	10.5 ± 1.7	11.5 ± 3.0	5.7 ± 1.5	0.43 ± 0.01	2.1 ± 0.1
	LoQ	13.2 ± 2.2	21.2 ± 5.4	10.6 ± 2.7	1.52 ± 0.05	7.6 ± 0.2

^a Uncertainties given are from 2 separate sample blanks that were prepared and analyzed 10 times each on 2 different days

^b Based upon a sample blank diluted 1:200 after extraction

^c Assuming a sample mass of 200 mg of lyophilized meat and a dilution factor of 1:200 prior to SP-ICP-MS analysis with an 8 mL extract volume for the enzymatic extract and 5 mL for TMAH

3.4 Material and Methods

3.4.1 Chemicals and lab equipment

Ag NP suspensions with nominal diameters of 20 nm and 40 nm (NanoXact, citrate coated) and 50 nm Au NP suspensions (Ultra-Uniform, PEG-carboxyl coated) were purchased from NanoComposix. Standard solutions of ionic Ag and Au (Inorganic Ventures) were used for calibrations, while multi element standards (QCS-27, High Purity Standards and QCP-QCS-3, Inorganic Ventures) were used for quality control. Ultrapure grades of HNO₃ (PlasmaPURE Plus, SCP Science), HCl (Fisher Chemicals), H₂O₂ (30% w/w, VWR) and TMAH (25% w/w, electronic

grade, Alfa Aesar #20932) were used for digestions and sample preparation. Ultrapure water ($R > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$; total organic carbon $< 2 \mu\text{g L}^{-1}$) was generated from a Milli-Q water purification system (Millipore Sigma). Lipase from *C. rugosa* (Type VII, $\geq 700 \text{ U mg}^{-1}$, lyophilized), Pancreatin from porcine pancreas (8 x USP spec., lyophilized) and SDS (sodium dodecyl sulfate, $\geq 99.0\%$) were purchased from Sigma-Aldrich while Proteinase K (recombinant, PCR grade, $\geq 600 \text{ U mL}^{-1}$), Nylon syringe filters (25 mm disk diameter, $0.45 \mu\text{m}$ pore size) and HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonate, sodium salt) were purchased from Thermo Fisher. A block digestion system (DigiPREP, SCP Science) was used for heating, when required, and ultrasonication was performed using a tip sonicator (3.2 mm tip size) on a 500W QSonica Q500 sonicator. A Heraeus Multifuge 3S-R was used to centrifuge samples.

3.4.2 Preparation of a meat reference material

Medium ground beef ($\sim 19\%$ w/w fat and $\sim 19\%$ w/w protein content, as indicated on the label) was purchased from a local grocery store. A reference material was prepared by homogenizing 50 g of fresh meat with an equal mass of Milli-Q water spiked with Ag NP (at a concentration of $\sim 250 \text{ ng g}^{-1}$ with respect to the non lyophilized meat), using a general-purpose food processor. The obtained meat paste was divided into $\sim 10 \text{ g}$ sub-samples and kept frozen at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until use. Lyophilized meat powder was prepared by first freeze drying frozen meat paste for 3 days and then mixing and grinding the meat flakes into a powder using a ceramic mortar and pestle, prior to storage at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Blank reference samples were prepared in a similar fashion, without the Ag spike. The Ag content in the reference samples was monitored periodically.

3.4.3 Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis for Ag NP extraction

The protocol used for the extraction procedure was adapted from the work of Tabaoda-López *et al.*¹¹¹. Matrix degradation and NP recovery was optimized by examining several parameters including the composition of the extraction solution (type of protease and use of surfactant), sample mass, handling of the supernatant and centrifugation speed and time (details provided above in Results and Discussion section).

Degradation of the fatty meat matrix was carried out by adding a precise volume (5 or 8 mL) of an extraction solution (1.5 mg mL^{-1} of protease and 1.5 mg mL^{-1} of Lipase in 5 mM HEPES buffer,

pH adjusted to 7.5) to a precisely weighed aliquot of reference sample (0.01 to 0.5 g) in a 15 mL polypropylene tube followed by vortexing for 30s. Ultrasonication was then carried out for 15 min with the sonication tip inserted ≈ 1.2 cm deep in a tube that was immersed in an ice bath (pulse mode: 60 s of sonication at a delivered output of 6-7 W, 10 s off).

3.4.4 Ultrasound assisted alkaline hydrolysis for Ag NP extraction

Degradation of the meat matrix was carried out by adding 5 mL of a TMAH solution (10% or 2.5% w/w in Milli-Q water) to 0.02 g of the lyophilized reference sample, followed by 15 min of ultrasonication, using identical parameters as above. In addition to processing the reference material containing the 40 nm Ag NP, an aliquot of unspiked meat was processed with TMAH containing $\approx 10 \mu\text{g L}^{-1}$ of ionic Ag (corresponding to $\approx 2500 \text{ ng g}^{-1}$ respective to the lyophilized sample mass) in order to investigate the possible formation of Ag NP under the alkaline conditions.

3.4.5 Stability of the processed samples

The stability of the enzymatic or alkaline extracts were tested by analyzing Ag content daily, for 4 days, after the initial sample preparation. Prior to analysis, the organic material in the extract was resuspended by vortexing the sample for 2 min followed by 3 min centrifugation at 500 x g. A 50 μL aliquot was digested in acid (10 mL of 2% HNO_3 for 6 hours at 85 °C) and total Ag was determined by ICP-MS. Another aliquot was sampled and diluted (1:200) for SP-ICP-MS analysis on days 1 and 4.

3.4.6 Mass balances of Ag NPs

Ag NP losses during sample preparation were investigated by separating selected enzyme processed samples into 3 fractions that were digested (**Figure 25**) for total Ag analysis: 4 mL of supernatant from the top of centrifuge tubes; the remaining (lower) supernatant; and Ag contained in the undigested pellet and/or adsorbed to the inner surface of the sample tubes.

3.4.7 Total Ag determination in samples

For solid organic samples, total acid digestion was achieved on 0.2 g (or less) of the sample by heating samples to 85°C for 6 h in 2 mL of Milli-Q water, 1 mL of 30% H_2O_2 and 1 mL of

concentrated HNO₃ in a digestion vial. The obtained solution was then diluted to 2% HNO₃ in Milli-Q water and then filtered using a 0.45 µm syringe filter prior to ICP-MS analysis. For liquid samples (from mass balance experiments), between 1 and 5 mL of solution was digested in 2 mL of 70% HNO₃ and 0.5 mL of 30% H₂O₂ for 6 hours at 85 °C.

3.4.8 ICP-MS and SP-ICP-MS sample analysis

Unless otherwise mentioned, 3 samples were prepared for every experiment. Data acquisition was performed on a triple-quadrupole ICP-MS (NexION 5000, Perkin Elmer). Signal intensity optimization was performed daily by adjusting torch alignment, nebulizer gas flow and ion optics while aspirating a multi-element ionic solution. During ICP-MS analysis, ¹⁰⁷Ag isotope was monitored, while using In as an internal standard. To evaluate losses to the introduction system in SP-ICP-MS mode, another 50 µL aliquot of every sample analyzed by SP-ICP-MS was digested for 6 hours at 85 °C in 10 mL of 2% HNO₃ before analysis for total Ag content.

For SP-ICP-MS analysis, transport efficiency was determined daily by analysing a suspension of 50 nm Au NP in Milli-Q water in addition to performing an ionic calibration for Au using freshly prepared standards in 2% HCl ⁶⁰. Transport efficiencies were validated by analyzing a freshly prepared suspension of 40 nm Ag NP in Milli-Q water with a known NP size and concentration and an ionic Ag reference standard (QCS-27 and/or QCP-QCS-3). Triplicate SP-ICP-MS data acquisitions were performed for each sample using a 50 s scan time and 50 µs dwell time. A 5σ criteria was used to discriminate between the ionic background signal and NP signals.

For SP-ICP-MS analysis, extract supernatants obtained after centrifugation were diluted (minimum of 1:100) in Milli-Q water. To minimize contamination and carryover between samples, the introduction system was washed with Milli-Q water for 60 s followed by 2% HNO₃ for 90 s and Milli-Q water again for 60 s. The Syngistix Nano module (V3.2.2111.0.759, Perkin Elmer) was used to acquire and process SP-ICP-MS data, while additional calculations of other analytical parameters that were not handled by the module (Ag NP mass concentrations and LODs) were performed manually based upon the recommendations of Laborda *et al.* ⁷⁰. Reported NP sizes correspond to the mean NP size determined by fitting a gaussian distribution over a given particle size distribution (PSD).

3.5 Conclusions

Two methods were optimized and compared for the analysis of Ag NP in medium ground beef using SP-ICP-MS. Optimization was performed using an in-house prepared reference material in order to identify the key steps that can contribute to the loss of Ag NP. Low sample preparation times (< 20 min) were achieved by using ultrasonication to provide mechanical degradation of the matrix and accelerate the overall degradation of the biological tissues. The best recoveries ($\approx 95\%$) and sample matrix degradation were obtained using an alkaline hydrolysis with TMAH. The enzymatic extractions were less efficient in degrading the high amount of adipose tissue in the samples, resulting in lower recoveries ($\approx 60\%$). With both procedures, no immediate alteration to the NP size (aggregation, dissolution, or creation of secondary NP from dissolved Ag) was observed, however, stability might be limited to a few days in the alkaline medium suggesting that samples should be analyzed as soon as possible following extraction. This study provides insights on the viable approaches to sample preparation for NP analysis involving animal matrices with a relatively higher fat content.

No difference in Ag recovery was observed when comparing two different proteases (Proteinase K and pork Pancreatin) in the enzymatic protocol. Considering the substantial difference in cost between the two enzymes with pork Pancreatin being easily accessible in bulk quantities, it might be an enzyme of choice involving many samples or on a limited budget.

3.6 Author Contributions

Conceptualization, KJW and MH; methodology, AC, NA; validation, AC, NA; formal analysis, AC; resources, KJW; data curation, AC, MH; writing—original draft preparation, AC; writing—review and editing, AC, MH, KJW; supervision, MH, KJW; funding acquisition, KJW. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

3.7 Funding

This research was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Prima Québec.

3.8 Data availability statement

Raw data has been archived and is available upon request.

3.9 Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

3.10 Supplementary information

Analysis of silver nanoparticles in ground beef by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS)

Alexandre Chalifoux¹, Madjid Hadioui¹, Nesrine Amiri¹, Kevin J. Wilkinson^{1*}

¹Department of Chemistry, Université de Montréal, 1375 Ave. Thérèse-Lavoie-Roux, Montreal, QC, H2V 0B3;

*Correspondence: kj.wilkinson@umontreal.ca

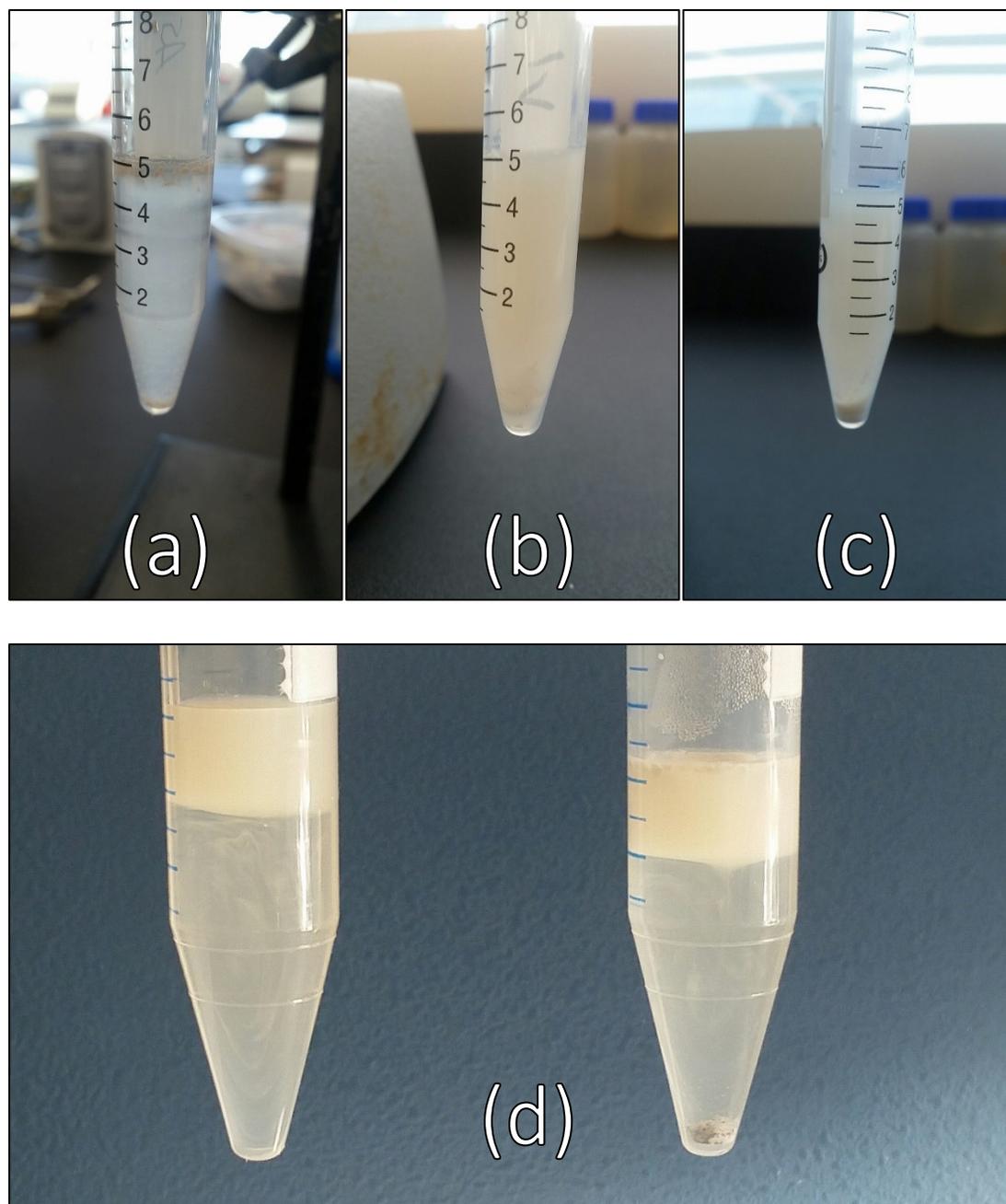


Figure 18 Representative images of sample preparation by the enzymatic extraction procedure; (a) before ultrasonication, (b) after ultrasonication, (c) after centrifugation, and (d) separation of colloidal lipids over time for storage at 4°C.

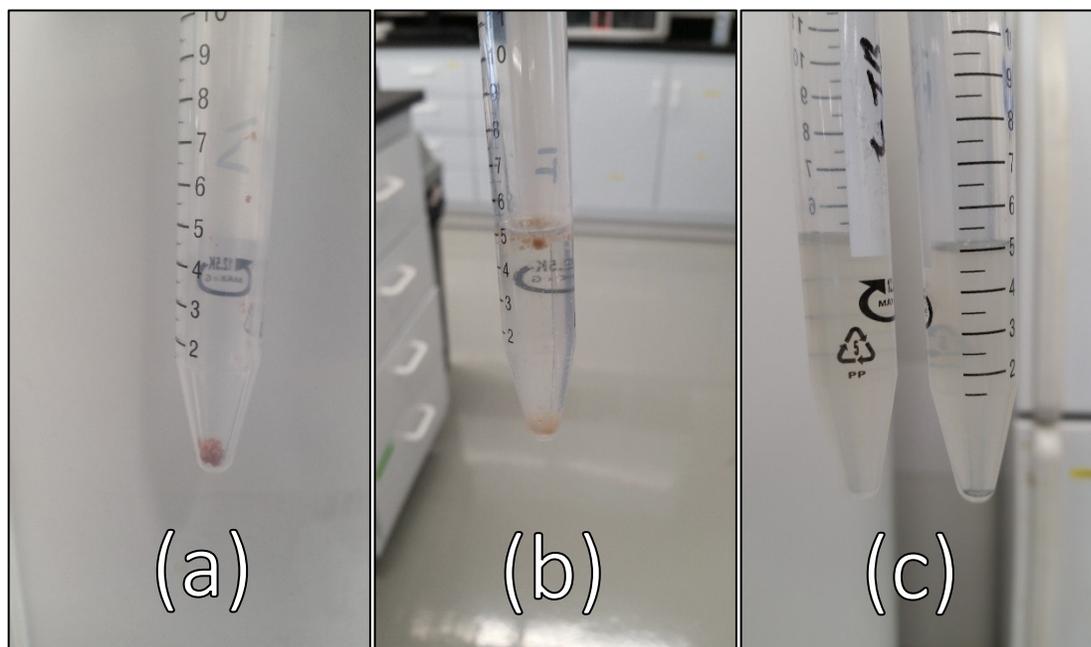


Figure 19 Representative images of sample preparation by the TMAH extraction procedure; (a) untreated sample, (b) before ultrasonication, and (c) after ultrasonication and centrifugation.

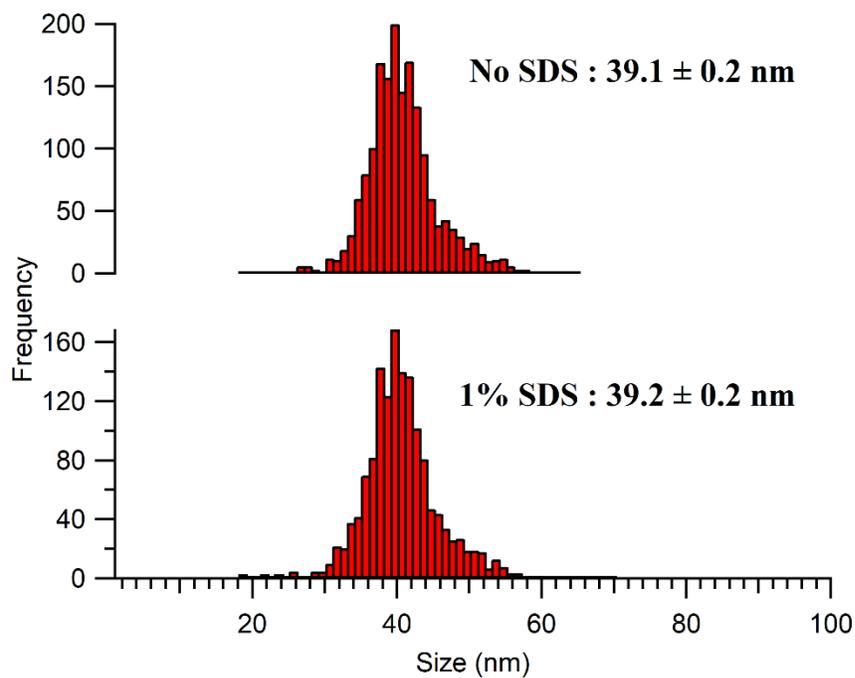


Figure 20 PSD of Ag NPs in enzymatic extracts (pancreatin + lipase) in the presence and absence of SDS added to the extraction solution. Sizes correspond to the calculated mean diameters (assuming a spherical particle) of 3 samples (each measured in triplicate) with their standard deviations.

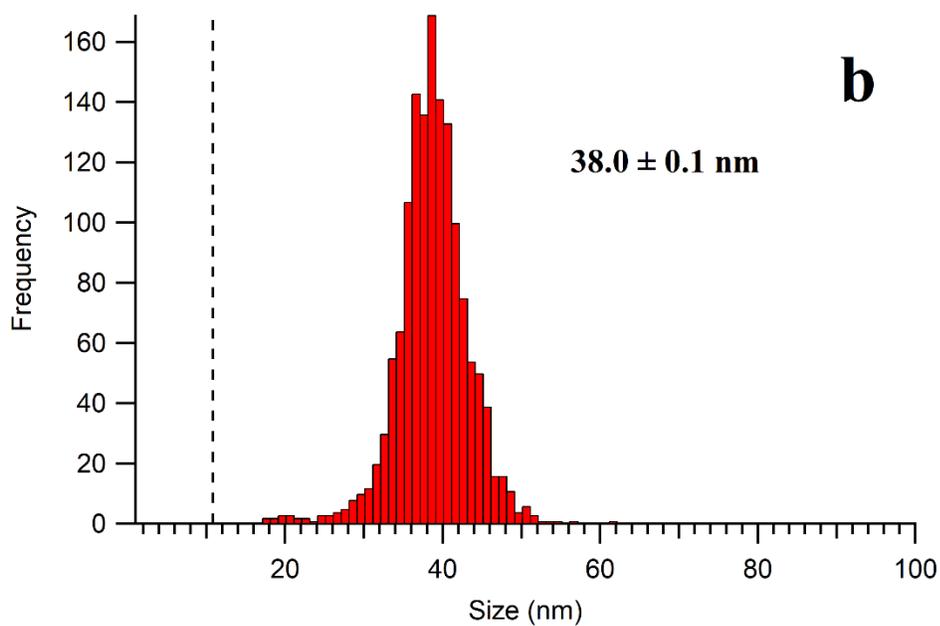
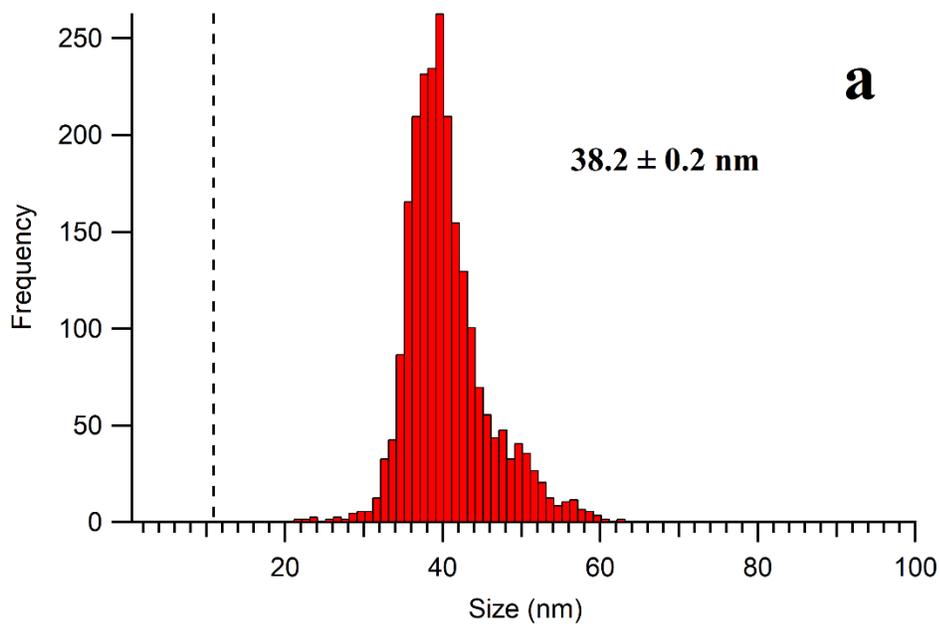


Figure 21 Particle size distributions of the 40 nm Ag NPs in (a) water; and (b) after alkaline extraction (10 % TMAH) from the meat matrix. The LoD_{size} is represented by a dashed line on the PSD.

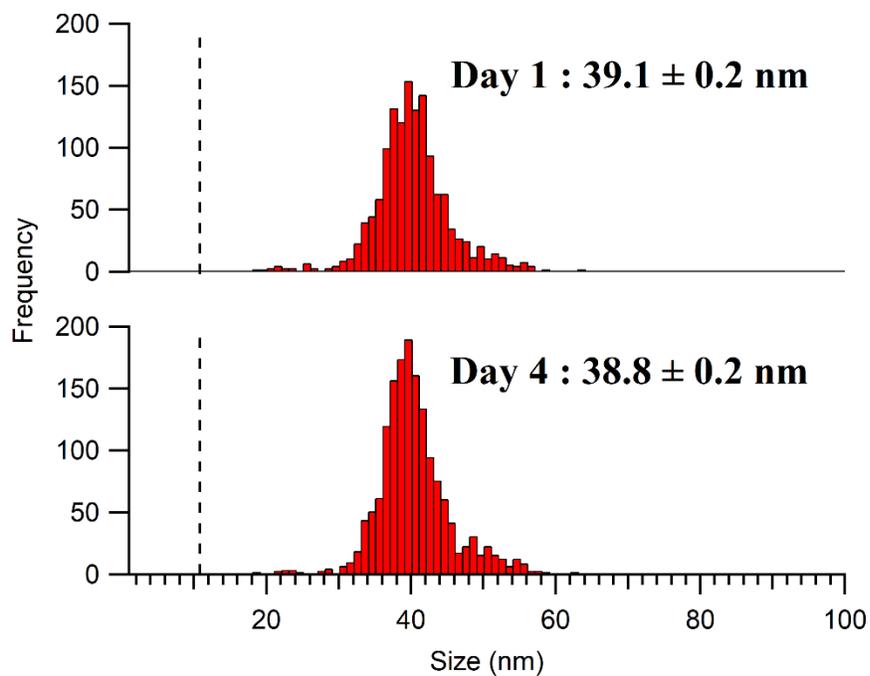


Figure 22 Aging of Ag NPs detected in the enzymatic extract (pancreatin + lipase) of a processed sample stored at 4 °C. The LoD_{size} is represented by a dashed line on the PSD

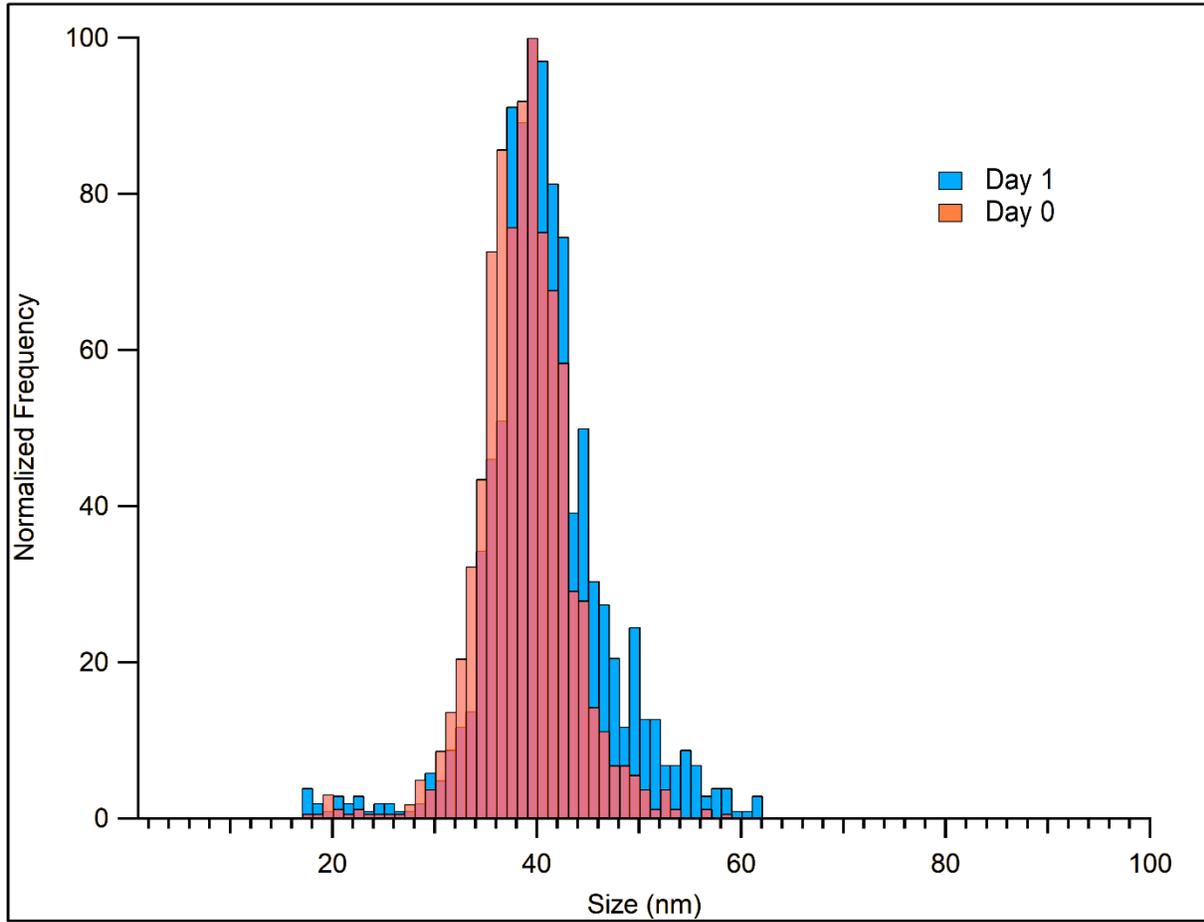


Figure 23 PSD of Ag NP detected in samples processed with 10 % TMAH and stored at room temperature for 24h.

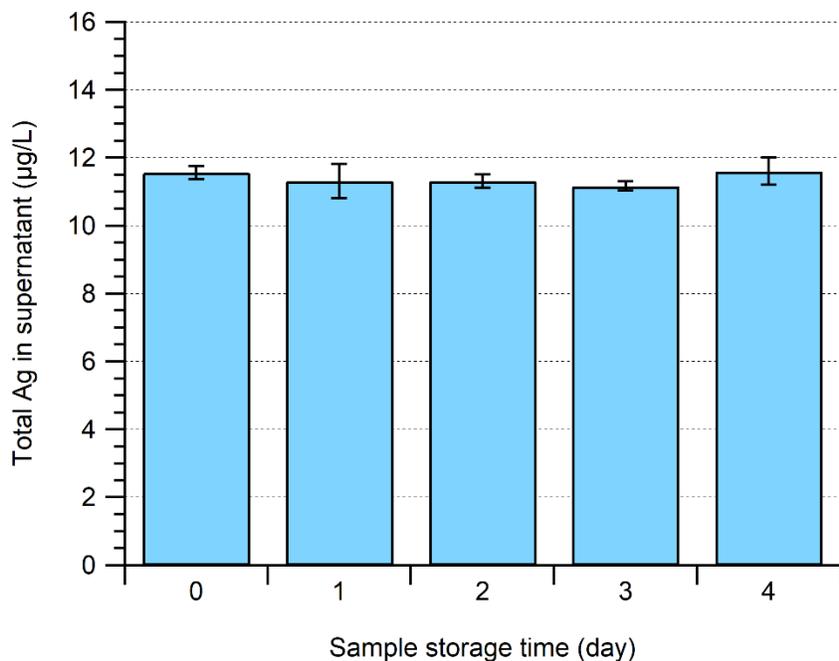


Figure 24 Ag concentration in the supernatant of samples digested in 2.5 % TMAH as a function a storage time at 4 °C.

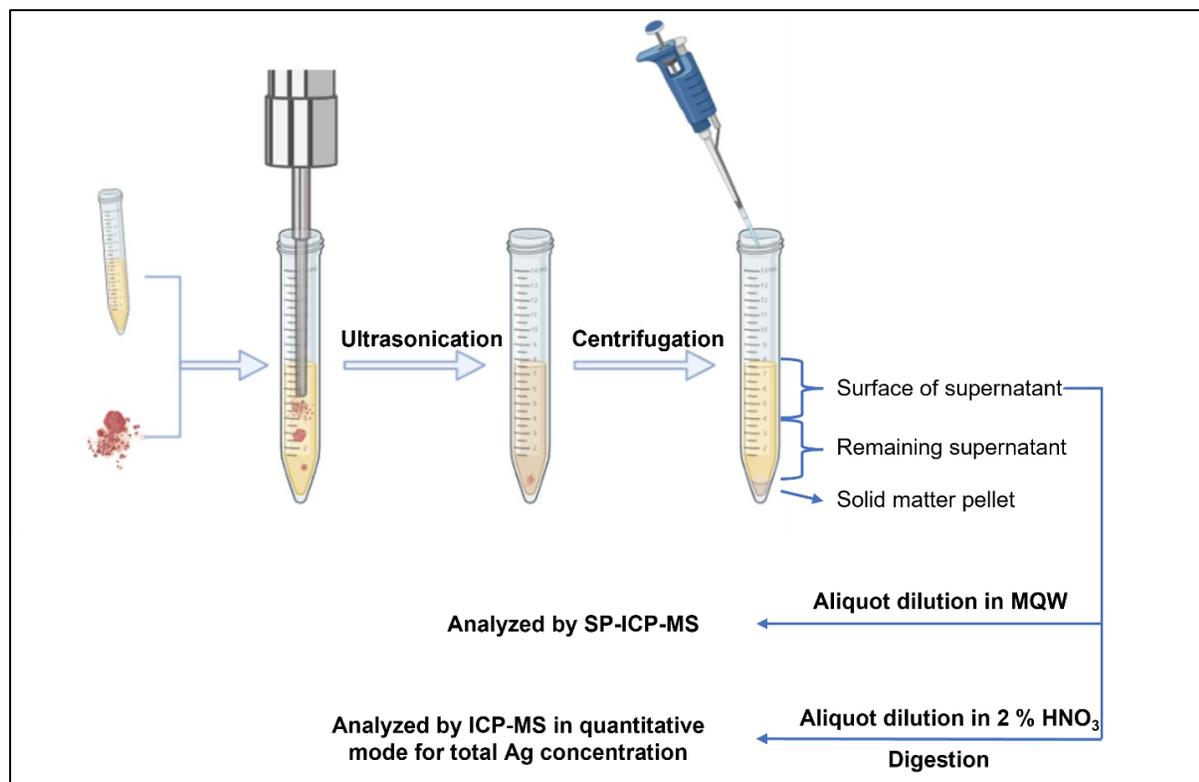


Figure 25 Schematic diagram of the extraction protocol and analysis of Ag NP content in processed samples. Graphical assets from BioRender.com were used.

3.10.1 Calculation of method limits of detection (LOD) and quantification (LOQ)

For further reading, equations used here are based on the works of Laborda and associates⁷⁰.

$$(1) LOD/LOQ_{size} = \left(\frac{6n_{\sigma}\sigma_B}{\frac{2}{w}\pi\rho F_p K_{ICPMS} K_m t_{dwell}} \right)^{1/3}$$

$$(2) LOD_{number} = \frac{5\sigma_{N,B} + 3}{\eta_{neb} Q_{sam} t_i}$$

$$(3) LOQ_{number} = \frac{10\sigma_{N,B} + 3}{\eta_{neb} Q_{sam} t_i}$$

$$(4) LOD_{diss} = \frac{2.821\sigma_{\bar{B}}}{K_R t_{dwell}}$$

$$(5) LOQ_{diss} = \frac{10\sigma_{\bar{B}}}{K_R t_{dwell}}$$

$$(6) K_{ICPMS} = \frac{K_R}{K_{intro} K_m}$$

$$(7) K_{intro} = \eta_{neb} Q_{sam}$$

$$(8) K_m = \frac{AN_{Av}}{M_M}$$

Where variables and constants are described as below:

n_{σ} = threshold coefficient (5 for LOD, 10 for LOQ)

σ_B = standard deviation of signal intensity of a blank (the average standard deviation of 10 blanks was used for calculations in this work)

w = base width of a transient particle event (400 μ s used in calculations)

ρ = particle density

F_p = mass fraction of an element in a particle

K_{ICPMS} = detection efficiency

K_R = ICP-MS analytical sensitivity

K_{intro} = sample introduction factor

η_{neb} = analyte transport efficiency

Q_{sam} = sample introduction flowrate

K_m = element factor

A = isotopic abundance of monitored isotope

N_{Av} = Avogadro number

M_M = atomic mass

t_{dwell} = dwell time

$\sigma_{N,B}$ = standard deviation of the number of particles events in 10 blanks

t_i = acquisition time

$\sigma_{\bar{B}}$ = standard deviation of the mean intensity of 10 blank baselines

Conclusions générales

Ce projet de recherche s'est penché sur l'analyse de l'argent sous forme de nanoparticules et sous forme dissoute dans une matrice de bœuf haché par ICP-MS en mode particule unique. La méthode analytique par SP-ICP-MS a été validée en premier lieu par, entre autres, l'évaluation de la répétabilité et des limites de détections et de quantification dans les matrices étudiées. Selon les résultats obtenus, la précision de l'analyse de Ag NP par SP-ICP-MS était de l'ordre de ≈ 1 nm tandis que les limites de détection instrumentales étaient de l'ordre du ng/L autant pour la fraction particulaire que dissoute, correspondant à des limites de détection de l'ordre du ng/g dans l'échantillon de bœuf haché étudié. Pour ce qui est de la limite de détection en taille, les plus petites Ag NP pouvant être détectées par SP-ICP-MS sont de 11 nm sur le Nexion 5000 pour les conditions discutées. Les limites de détection obtenues permettent l'analyse de NP à des tailles et concentrations pertinentes pour l'analyse environnementale et dans le cadre d'études d'évaluation du risque. L'ICP-MS utilisé ayant un analyseur de masse de type quadrupôle en tandem, des limites de détections inférieures à 10 nm pourraient être envisageable sur un appareil plus sensible (à secteur magnétique par exemple) ou par l'utilisation de stratégies pour améliorer l'efficacité de transport du système d'introduction (désolvatation, injection directe) ou l'utilisation de résines à échange d'ions.

L'extraction de Ag NP d'un échantillon de bœuf haché fortifié à une concentration de ≈ 250 ng/g a ensuite été optimisée et comparée entre 2 approches de dégradation de la matrice animale, soit une dégradation par hydrolyse enzymatique ou par hydrolyse alcaline. L'utilisation d'ultrasons a permis de réduire le temps de préparation d'un échantillon à moins de 20 minutes et un recouvrement presque quantitatif ($\approx 95\%$) a été obtenu sans altération de la taille des NP par l'approche alcaline (TMAH). Néanmoins, la stabilité observée des échantillons obtenus par hydrolyse alcaline est inférieure à celle des échantillons obtenus par traitement enzymatique où le recouvrement ($\approx 60\%$) semble être limité par la présence de matières grasses dans l'échantillon. Des investigations supplémentaires pourraient être envisagées afin de préciser les interactions entre les NP et les tissus adipeux et de potentiellement améliorer le traitement par

hydrolyse enzymatique par l'utilisation d'une étape de dégraissage ou par optimisation du type et de la quantité de lipase utilisée.

Les méthodes d'extraction et d'analyse de NP développées dans le cadre de ce projet pour l'analyse de NP dans des matrices alimentaires et animales complexes à haute teneur en gras telles que le bœuf haché ou le pancréas pourraient tout aussi être employées dans d'autres matrices d'intérêt à plus faible teneur en gras tel que la rate, le foie ou encore les tissus musculaires. Idéalement, l'analyse en parallèle par d'autres techniques (microscopie électronique par exemple) que la SP-ICP-MS permettrait aussi la caractérisation complète des NP par la détermination d'autres paramètres importants, tels que la morphologie ou de la chimie de surface, pour détailler l'interaction entre un organisme et un nanomatériau.

Plusieurs pistes d'investigations en continuité des objectifs de ce projet de recherche sont envisageables. Tout d'abord une évaluation de la linéarité de la méthode d'extraction, notamment à de plus hautes concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/g}$, serait pertinent considérant qu'il a été observé que chaque manipulation supplémentaire de l'échantillon après extraction peut entraîner des pertes de l'analyte par adsorption. Les échantillons plus concentrés nécessitant un facteur de dilution plus important pour l'analyse par SP-ICP-MS pourraient nécessiter un traitement après extraction différent de celui employé dans le cadre de ce projet de recherche. Dans le même ordre d'idée, considérant que les limites de détection obtenues étaient de l'ordre du ng/g dans la viande, l'efficacité de l'extraction devrait également être évaluée à des concentrations fortifiées plus faibles (25 ng/g par exemple).

Une application aux protocoles d'extraction développés au courant de ce projet de recherche serait l'étude de la migration potentielle de NPs depuis un contenant ou pellicule plastique dopée en NPs vers une matrice alimentaire afin d'identifier les paramètres influençant la migration de NPs comme la température, le temps de contact, composition de la membrane plastique ou encore la composition de la matrice animale. D'autres voies d'exploration pourraient se pencher sur l'influence de la cuisson d'un aliment quant aux propriétés physicochimiques des NPs (taille, composition chimique, distribution physique dans le tissu animal, etc.) pouvant avoir un impact sur l'exposition humaine aux NPs par la voie alimentaire.

Références bibliographiques

1. Santé Canada. Énoncé de politique sur la définition ad hoc de Santé Canada s'appliquant aux nanomatériaux. 2011. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/science-recherche/rapports-publications/nanomateriaux/enonce-politique-definition-sante-canada-appliquant.html> (consulté le 2023-08-20)
2. Environnement et Changement climatique Canada et Santé Canada. Cadre pour l'évaluation des risques associés aux nanomatériaux manufacturés, prescrite par la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999) (ébauche de juin 2022). 2022. <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/evaluation-substances-existantes/cadre-evaluation-risques-nanomateriaux-manufactures-lcpe-ebauche.html> (consulté le 2023-08-20)
3. Wu, L.; Zhu, H.; Chen, H.; Roco, M. C., Comparing nanotechnology landscapes in the US and China: a patent analysis perspective. *Journal of Nanoparticle Research* **2019**, *21* (8), 180.
4. Malik, S.; Muhammad, K.; Waheed, Y., Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules* **2023**, *28* (2), 661.
5. Martin, P.; Zhang, P.; Rodger, P. M.; Valsami-Jones, E., Simulations of morphological transformation in silver nanoparticles as a tool for assessing their reactivity and potential toxicity. *NanoImpact* **2019**, *14*, 100147.
6. Pinchuk, A. O., Size-Dependent Hamaker Constant for Silver Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (37), 20099-20102.
7. Sistani, M.; Böckle, R.; Falkensteiner, D.; Luong, M. A.; den Hertog, M. I.; Lugstein, A.; Weber, W. M., Nanometer-Scale Ge-Based Adaptable Transistors Providing Programmable Negative Differential Resistance Enabling Multivalued Logic. *ACS Nano* **2021**, *15* (11), 18135-18141.
8. Radamson, H. H.; Zhu, H.; Wu, Z.; He, X.; Lin, H.; Liu, J.; Xiang, J.; Kong, Z.; Xiong, W.; Li, J.; Cui, H.; Gao, J.; Yang, H.; Du, Y.; Xu, B.; Li, B.; Zhao, X.; Yu, J.; Dong, Y.; Wang, G., State of the Art and Future Perspectives in Advanced CMOS Technology. *Nanomaterials* **2020**, *10* (8), 1555.

9. El-Samak, A. A.; Rahman, H.; Ponnamma, D.; Hassan, M. K.; Zaidi, S. J.; Al-Maadeed, M. A. A., 8 - Role of metal oxide nanofibers in water purification. In *Metal Oxide-Based Nanofibers and Their Applications*, Esposito, V.; Marani, D., Eds. Elsevier: 2022; pp 173-190.
10. Pérez-Díaz, M. A.; Prado-Prone, G.; Díaz-Ballesteros, A.; González-Torres, M.; Silva-Bermudez, P.; Sánchez-Sánchez, R., Nanoparticle and nanomaterial involvement during the wound healing process: an update in the field. *Journal of Nanoparticle Research* **2023**, *25* (2), 27.
11. Cushen, M.; Kerry, J.; Morris, M.; Cruz-Romero, M.; Cummins, E., Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology* **2012**, *24* (1), 30-46.
12. dos Santos, C. A.; Ingle, A. P.; Rai, M., The emerging role of metallic nanoparticles in food. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2020**, *104* (6), 2373-2383.
13. Rippner, D. A.; Margenot, A. J.; Fakra, S. C.; Aguilera, L. A.; Li, C.; Sohng, J.; Dynarski, K. A.; Waterhouse, H.; McElroy, N.; Wade, J.; Hind, S. R.; Green, P. G.; Peak, D.; McElrone, A. J.; Chen, N.; Feng, R.; Scow, K. M.; Parikh, S. J., Microbial response to copper oxide nanoparticles in soils is controlled by land use rather than copper fate. *Environmental Science: Nano* **2021**, *8* (12), 3560-3576.
14. Saleh, A. A.; El-Magd, M. A., Beneficial effects of dietary silver nanoparticles and silver nitrate on broiler nutrition. *Environmental Science and Pollution Research* **2018**, *25* (27), 27031-27038.
15. Mohd Yusof, H.; Mohamad, R.; Zaidan, U. H.; Abdul Rahman, N. A., Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **2019**, *10* (1), 57.
16. Geiss, O.; Ponti, J.; Senaldi, C.; Bianchi, I.; Mehn, D.; Barrero, J.; Gilliland, D.; Matissek, R.; Anklam, E., Characterisation of food grade titania with respect to nanoparticle content in pristine additives and in their related food products. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2020**, *37* (2), 239-253.
17. Mustafa, F.; Andreescu, S., Nanotechnology-based approaches for food sensing and packaging applications. *RSC Advances* **2020**, *10* (33), 19309-19336.

18. Duncan, T. V., Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, 363 (1), 1-24.
19. Shankar, S.; Khodaei, D.; Lacroix, M., Effect of chitosan/essential oils/silver nanoparticles composite films packaging and gamma irradiation on shelf life of strawberries. *Food Hydrocolloids* **2021**, 117, 106750.
20. Zhao, X.; Tian, R.; Zhou, J.; Liu, Y., Multifunctional chitosan/grape seed extract/silver nanoparticle composite for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules* **2022**, 207, 152-160.
21. Guo, Z.; Chen, Y.; Wang, Y.; Jiang, H.; Wang, X., Advances and challenges in metallic nanomaterial synthesis and antibacterial applications. *Journal of Materials Chemistry B* **2020**, 8 (22), 4764-4777.
22. Kowsalya, E.; MosaChristas, K.; Balashanmugam, P.; Tamil Selvi, A.; Jaqueline Chinna Rani, I., Biocompatible silver nanoparticles/poly(vinyl alcohol) electrospun nanofibers for potential antimicrobial food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life* **2019**, 21, 100379.
23. Tankhiwale, R.; Bajpai, S. K., Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 90, 16-20.
24. Malini, M.; Thirumavalavan, M.; Yang, W.-Y.; Lee, J.-F.; Annadurai, G., A versatile chitosan/ZnO nanocomposite with enhanced antimicrobial properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, 80, 121-129.
25. Rai, M. K.; Deshmukh, S. D.; Ingle, A. P.; Gade, A. K., Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **2012**, 112 (5), 841-852.
26. Johnston, L. J.; Gonzalez-Rojano, N.; Wilkinson, K. J.; Xing, B., Key challenges for evaluation of the safety of engineered nanomaterials. *NanoImpact* **2020**, 18, 100219.
27. Levard, C.; Hotze, E. M.; Colman, B. P.; Dale, A. L.; Truong, L.; Yang, X. Y.; Bone, A. J.; Brown, G. E., Jr.; Tanguay, R. L.; Di Giulio, R. T.; Bernhardt, E. S.; Meyer, J. N.; Wiesner, M. R.; Lowry, G. V., Sulfidation of Silver Nanoparticles: Natural Antidote to Their Toxicity. *Environmental Science & Technology* **2013**, 47 (23), 13440-13448.

28. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces*. 3rd ed.; Elsevier: 2011; p 704.
29. Bourquin, J.; Milosevic, A.; Hauser, D.; Lehner, R.; Blank, F.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B., Biodistribution, Clearance, and Long-Term Fate of Clinically Relevant Nanomaterials. *Advanced Materials* **2018**, *30* (19), 1704307.
30. Musial, J.; Krakowiak, R.; Mlynarczyk, D. T.; Goslinski, T.; Stanisz, B. J., Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products—What Do We Know about Their Safety? *Nanomaterials* **2020**, *10* (6), 1110.
31. Kreyling, W. G.; Holzwarth, U.; Haberl, N.; Kozempel, J.; Hirn, S.; Wenk, A.; Schleh, C.; Schäffler, M.; Lipka, J.; Semmler-Behnke, M.; Gibson, N., Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intravenous injection in rats: Part 1. *Nanotoxicology* **2017**, *11* (4), 434-442.
32. Kreyling, W. G.; Holzwarth, U.; Schleh, C.; Kozempel, J.; Wenk, A.; Haberl, N.; Hirn, S.; Schäffler, M.; Lipka, J.; Semmler-Behnke, M.; Gibson, N., Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. *Nanotoxicology* **2017**, *11* (4), 443-453.
33. Kreyling, W. G.; Holzwarth, U.; Haberl, N.; Kozempel, J.; Wenk, A.; Hirn, S.; Schleh, C.; Schäffler, M.; Lipka, J.; Semmler-Behnke, M.; Gibson, N., Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intratracheal instillation in rats: Part 3. *Nanotoxicology* **2017**, *11* (4), 454-464.
34. Vila, L.; García-Rodríguez, A.; Cortés, C.; Marcos, R.; Hernández, A., Assessing the effects of silver nanoparticles on monolayers of differentiated Caco-2 cells, as a model of intestinal barrier. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *116*, 1-10.
35. Campagnolo, L.; Massimiani, M.; Vecchione, L.; Piccirilli, D.; Toschi, N.; Magrini, A.; Bonanno, E.; Scimeca, M.; Castagnozzi, L.; Buonanno, G.; Stabile, L.; Cubadda, F.; Aureli, F.; Fokkens, P. H. B.; Kreyling, W. G.; Cassee, F. R.; Pietroiusti, A., Silver nanoparticles inhaled during pregnancy reach and affect the placenta and the foetus. *Nanotoxicology* **2017**, *11* (5), 687-698.
36. Lee, Y.; Choi, J.; Kim, P.; Choi, K.; Kim, S.; Shon, W.; Park, K., A Transfer of Silver Nanoparticles from Pregnant Rat to Offspring. *Toxicological Research* **2012**, *28* (3), 139-141.

37. Wang, C.; Lu, J.; Zhou, L.; Li, J.; Xu, J.; Li, W.; Zhang, L.; Zhong, X.; Wang, T., Effects of Long-Term Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles on Development, Zinc Metabolism and Biodistribution of Minerals (Zn, Fe, Cu, Mn) in Mice. *PLOS ONE* **2016**, *11* (10), e0164434.
38. McCracken, C.; Dutta, P. K.; Waldman, W. J., Critical assessment of toxicological effects of ingested nanoparticles. *Environmental Science: Nano* **2016**, *3* (2), 256-282.
39. Tiwari, R.; Singh, R. D.; Binwal, M.; Srivastav, A. K.; Singh, N.; Khan, H.; Gangopadhyay, S.; Argaria, N.; Saxena, P. N.; Roy, S. K.; Kumar, M.; Sharma, V.; Srivastava, V., Perinatal exposure to silver nanoparticles reprograms immunometabolism and promotes pancreatic beta-cell death and kidney damage in mice. *Nanotoxicology* **2021**, *15* (5), 636-660.
40. Seiffert, J.; Buckley, A.; Leo, B.; Martin, N. G.; Zhu, J.; Dai, R.; Hussain, F.; Guo, C.; Warren, J.; Hodgson, A.; Gong, J.; Ryan, M. P.; Zhang, J.; Porter, A.; Tetley, T. D.; Gow, A.; Smith, R.; Chung, K. F., Pulmonary effects of inhalation of spark-generated silver nanoparticles in Brown-Norway and Sprague–Dawley rats. *Respiratory Research* **2016**, *17* (1), 85.
41. Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive. In *EFSA Journal*, EFSA Panel on Food Additives and Flavourings: 2021; Vol. 19, p e06585.
42. Règlement (UE) 2022/63 de la Commission du 14 janvier 2022 modifiant les annexes II et III du règlement (CE) no 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne l'additif alimentaire dioxyde de titane (E171). Commission européenne. Journal officiel de l'Union européenne: Bruxelles, 2022.
43. Pitkänen, L.; Striegel, A. M., Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *80*, 311-320.
44. Loeschner, K.; Navratilova, J.; Grombe, R.; Linsinger, T. P. J.; Købler, C.; Mølhave, K.; Larsen, E. H., In-house validation of a method for determination of silver nanoparticles in chicken meat based on asymmetric flow field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *Food Chem.* **2015**, *181*, 78-84.
45. Bednar, A. J.; Poda, A. R.; Mitrano, D. M.; Kennedy, A. J.; Gray, E. P.; Ranville, J. F.; Hayes, C. A.; Crocker, F. H.; Steevens, J. A., Comparison of on-line detectors for field flow fractionation analysis of nanomaterials. *Talanta* **2013**, *104*, 140-148.

46. López-Sanz, S.; Fariñas, N. R.; Zougagh, M.; Martín-Doimeadios, R. d. C. R.; Ríos, Á., AF4-ICP-MS as a powerful tool for the separation of gold nanorods and nanospheres. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2020**, *35* (8), 1530-1536.
47. Montaña, M. D.; Cuss, C. W.; Holliday, H. M.; Javed, M. B.; Shotyk, W.; Sobocinski, K. L.; Hofmann, T.; Kammer, F. v. d.; Ranville, J. F., Exploring Nanogeochemical Environments: New Insights from Single Particle ICP-TOFMS and AF4-ICPMS. *ACS Earth and Space Chemistry* **2022**, *6* (4), 943-952.
48. Cuss, C. W.; Grant-Weaver, I.; Shotyk, W., AF4-ICPMS with the 300 Da Membrane To Resolve Metal-Bearing “Colloids” < 1 kDa: Optimization, Fractogram Deconvolution, and Advanced Quality Control. *Analytical Chemistry* **2017**, *89* (15), 8027-8035.
49. Loeschner, K.; Navratilova, J.; Købler, C.; Møhlhave, K.; Wagner, S.; von der Kammer, F.; Larsen, E. H., Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405* (25), 8185-8195.
50. Gajdosechova, Z.; Mester, Z., Recent trends in analysis of nanoparticles in biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2019**, *411* (19), 4277-4292.
51. Makama, S.; Peters, R.; Undas, A.; van den Brink, N. W., A novel method for the quantification, characterisation and speciation of silver nanoparticles in earthworms exposed in soil. *Environmental Chemistry* **2015**, *12* (6), 643-651.
52. Peters, R. J. B.; Rivera, Z. H.; van Bommel, G.; Marvin, H. J. P.; Weigel, S.; Bouwmeester, H., Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406* (16), 3875-3885.
53. Ramos, K.; Gómez-Gómez, M. M.; Cámara, C.; Ramos, L., Silver speciation and characterization of nanoparticles released from plastic food containers by single particle ICPMS. *Talanta* **2016**, *151*, 83-90.
54. Urstoeger, A.; Wimmer, A.; Kaegi, R.; Reiter, S.; Schuster, M., Looking at Silver-Based Nanoparticles in Environmental Water Samples: Repetitive Cloud Point Extraction Bridges Gaps in Electron Microscopy for Naturally Occurring Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **2020**, *54* (19), 12063-12071.

55. Brar, S. K.; Verma, M., Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30* (1), 4-17.
56. Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R., Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* **2016**, *8* (4), 409-427.
57. Degueldre, C.; Favarger, P. Y., Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, *217* (1), 137-142.
58. Degueldre, C.; Favarger, P. Y.; Wold, S., Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *555* (2), 263-268.
59. Laborda, F.; Jiménez-Lamana, J.; Bolea, E.; Castillo, J. R., Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2011**, *26* (7), 1362-1371.
60. Pace, H. E.; Rogers, N. J.; Jarolimek, C.; Coleman, V. A.; Higgins, C. P.; 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), 9361-9369.
61. Thomas, R., *Practical Guide to ICP-MS*. 1st ed.; Marcel Dekker: New York, 2004; p 324.
62. Elci, S. G.; Yesilbag Tonga, G.; Yan, B.; Kim, S. T.; Kim, C. S.; Jiang, Y.; Saha, K.; Moyano, D. F.; Marsico, A. L. M.; Rotello, V. M.; Vachet, R. W., Dual-Mode Mass Spectrometric Imaging for Determination of *in Vivo* Stability of Nanoparticle Monolayers. *ACS Nano* **2017**, *11* (7), 7424-7430.
63. Suzuki, Y.; Matsunaga, K.; Yamashita, Y., Assignment of PM_{2.5} sources in western Japan by non-negative matrix factorization of concentration-weighted trajectories of GED-ICP-MS/MS element concentrations. *Environmental Pollution* **2021**, *270*, 116054.
64. Montañó, M. D.; Olesik, J. W.; Barber, A. G.; Challis, K.; Ranville, J. F., Single Particle ICP-MS: Advances toward routine analysis of nanomaterials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408* (19), 5053-5074.

65. Azimzada, A.; Jreije, I.; Hadioui, M.; Shaw, P.; Farner, J. M.; Wilkinson, K. J., Quantification and Characterization of Ti-, Ce-, and Ag-Nanoparticles in Global Surface Waters and Precipitation. *Environmental Science & Technology* **2021**, *55* (14), 9836-9844.
66. Tharaud, M.; Schlatt, L.; Shaw, P.; Benedetti, M. F., Nanoparticle identification using single particle ICP-ToF-MS acquisition coupled to cluster analysis. From engineered to natural nanoparticles. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2022**, *37* (10), 2042-2052.
67. Borovinskaya, O.; Hattendorf, B.; Tanner, M.; Gschwind, S.; Günther, D., A prototype of a new inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer providing temporally resolved, multi-element detection of short signals generated by single particles and droplets. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2013**, *28* (2), 226-233.
68. Moldovan, M.; Krupp, E. M.; Holliday, A. E.; Donard, O. F. X., High resolution sector field ICP-MS and multicollector ICP-MS as tools for trace metal speciation in environmental studies: a review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19* (7), 815-822.
69. Laborda, F.; Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J., Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (5), 2270-2278.
70. Laborda, F.; Gimenez-Ingalaturre, A. C.; Bolea, E.; Castillo, J. R., About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2020**, *169*, 105883.
71. Laborda, F.; Abad-Álvarez, I.; Jiménez, M. S.; Bolea, E., Catching particles by atomic spectrometry: Benefits and limitations of single particle - inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2023**, *199*, 106570.
72. Gimenez-Ingalaturre, A. C.; Ben-Jeddou, K.; Perez-Arantegui, J.; Jimenez, M. S.; Bolea, E.; Laborda, F., How to trust size distributions obtained by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2023**, *415* (11), 2101-2112.
73. Montañó, M. D.; Badiei, H. R.; Bazargan, S.; Ranville, J. F., Improvements in the detection and characterization of engineered nanoparticles using spICP-MS with microsecond dwell times. *Environmental Science: Nano* **2014**, *1* (4), 338-346.

74. Abad-Álvarez, I.; Peña-Vázquez, E.; Bolea, E.; Bermejo-Barrera, P.; Castillo, J. R.; Laborda, F., Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408* (19), 5089-5097.
75. Hadioui, M.; Peyrot, C.; Wilkinson, K. J., Improvements to Single Particle ICPMS by the Online Coupling of Ion Exchange Resins. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (10), 4668-4674.
76. Hadioui, M.; Knapp, G.; Azimzada, A.; Jreije, I.; Frechette-Viens, L.; Wilkinson, K. J., Lowering the Size Detection Limits of Ag and TiO₂ Nanoparticles by Single Particle ICP-MS. *Analytical Chemistry* **2019**, *91* (20), 13275-13284.
77. Candás-Zapico, S.; Kutscher, D. J.; Montes-Bayón, M.; Bettmer, J., Single particle analysis of TiO₂ in candy products using triple quadrupole ICP-MS. *Talanta* **2018**, *180*, 309-315.
78. Bolea-Fernandez, E.; Leite, D.; Rua-Ibarz, A.; Liu, T.; Woods, G.; Aramendia, M.; Resano, M.; Vanhaecke, F., On the effect of using collision/reaction cell (CRC) technology in single-particle ICP-mass spectrometry (SP-ICP-MS). *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1077*, 95-106.
79. Laycock, A.; Clark, N. J.; Clough, R.; Smith, R.; Handy, R. D., Determination of metallic nanoparticles in biological samples by single particle ICP-MS: a systematic review from sample collection to analysis. *Environmental Science: Nano* **2022**, *9* (2), 420-453.
80. Bao, D.; Oh, Z. G.; Chen, Z., Characterization of Silver Nanoparticles Internalized by Arabidopsis Plants Using Single Particle ICP-MS Analysis. *Frontiers in Plant Science* **2016**, *7*.
81. Kińska, K.; Jiménez-Lamana, J.; Kowalska, J.; Krasnodębska-Ostręga, B.; Szpunar, J., Study of the uptake and bioaccumulation of palladium nanoparticles by *Sinapis alba* using single particle ICP-MS. *Science of The Total Environment* **2018**, *615*, 1078-1085.
82. Dan, Y.; Ma, X.; Zhang, W.; Liu, K.; Stephan, C.; Shi, H., Single particle ICP-MS method development for the determination of plant uptake and accumulation of CeO₂ nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408* (19), 5157-5167.
83. Zhou, Q.; Liu, L.; Liu, N.; He, B.; Hu, L.; Wang, L., Determination and characterization of metal nanoparticles in clams and oysters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2020**, *198*, 110670.

84. Ishizaka, T.; Nagano, K.; Tasaki, I.; Tao, H.; Gao, J.-Q.; Harada, K.; Hirata, K.; Saito, S.; Tsujino, H.; Higashisaka, K.; Tsutsumi, Y., Optimization and Evaluation of Pretreatment Method for sp-ICP-MS to Reveal the Distribution of Silver Nanoparticles in the Body. *Nanoscale Research Letters* **2019**, *14* (1), 180.
85. Clark, N. J.; Clough, R.; Boyle, D.; Handy, R. D., Development of a suitable detection method for silver nanoparticles in fish tissue using single particle ICP-MS. *Environmental Science: Nano* **2019**, *6* (11), 3388-3400.
86. Vidmar, J.; Buerki-Thurnherr, T.; Loeschner, K., Comparison of the suitability of alkaline or enzymatic sample pre-treatment for characterization of silver nanoparticles in human tissue by single particle ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2018**, *33* (5), 752-761.
87. Sung, H. K.; Jo, E.; Kim, E.; Yoo, S.-K.; Lee, J.-W.; Kim, P.-J.; Kim, Y.; Eom, I.-C., Analysis of gold and silver nanoparticles internalized by zebrafish (*Danio rerio*) using single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Chemosphere* **2018**, *209*, 815-822.
88. Loeschner, K.; Brabrand, M. S. J.; Sloth, J. J.; Larsen, E. H., Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406* (16), 3845-3851.
89. Québec, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en Chimie (DR-12-VMC). 4e ed.; Bibliothèque et Archives nationales du Québec: Québec, 2021.
90. Gebauer, J. S.; Malissek, M.; Simon, S.; Knauer, S. K.; Maskos, M.; Stauber, R. H.; Peukert, W.; Treuel, L., Impact of the Nanoparticle-Protein Corona on Colloidal Stability and Protein Structure. *Langmuir* **2012**, *28* (25), 9673-9679.
91. Peters, R.; Herrera-Rivera, Z.; Undas, A.; van der Lee, M.; Marvin, H.; Bouwmeester, H.; Weigel, S., Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2015**, *30* (6), 1274-1285.
92. Barhoum, A.; García-Betancourt, M. L.; Jeevanandam, J.; Hussien, E. A.; Mekkawy, S. A.; Mostafa, M.; Omran, M. M.; S. Abdalla, M.; Bechelany, M., Review on Natural, Incidental,

Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations. *Nanomaterials* **2022**, *12* (2).

93. Hofmann, T.; Lowry, G. V.; Ghoshal, S.; Tufenkji, N.; Brambilla, D.; Dutcher, J. R.; Gilbertson, L. M.; Giraldo, J. P.; Kinsella, J. M.; Landry, M. P.; Lovell, W.; Naccache, R.; Paret, M.; Pedersen, J. A.; Unrine, J. M.; White, J. C.; Wilkinson, K. J., Technology readiness and overcoming barriers to sustainably implement nanotechnology-enabled plant agriculture. *Nature Food* **2020**, *1* (7), 416-425.

94. Jeevanandam, J.; Barhoum, A.; Chan, Y. S.; Dufresne, A.; Danquah, M. K., Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2018**, *9*, 1050-1074.

95. Vance, M. E.; Kuiken, T.; Vejerano, E. P.; McGinnis, S. P.; Hochella, M. F., Jr.; Rejeski, D.; Hull, M. S., Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2015**, *6*, 1769-1780.

96. He, X.; Hwang, H. M., Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *Journal of Food and Drug Analysis* **2016**, *24* (4), 671-681.

97. Souza, V. G. L.; Fernando, A. L., Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food—A review. *Food Packaging and Shelf Life* **2016**, *8*, 63-70.

98. Pompeu de Moraes, D.; Gonzalez-Morales, S.; Toledano-Serrabona, J.; Sanchez-Garces, M. A.; Bettmer, J.; Montes-Bayon, M.; Corte-Rodriguez, M., Tracking soluble and nanoparticulated titanium released in vivo from metal dental implant debris using (single-particle)-ICP-MS. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2023**, *77*, 127143.

99. Lu, H. Y.; Wang, Y. J.; Hou, W. C., Bioaccumulation and depuration of TiO₂ nanoparticles by zebrafish through dietary exposure: Size- and number concentration-resolved analysis using single-particle ICP-MS. *Journal of Hazardous Materials* **2022**, *426*, 127801.

100. Loeschner, K.; Navratilova, J.; Kobler, C.; Molhave, K.; Wagner, S.; von der Kammer, F.; Larsen, E. H., Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405* (25), 8185-95.

101. Gruszka, J.; Malejko, J.; Bajguz, A.; Godlewska-Zylkiewicz, B., Method development for speciation analysis of silver nanoparticles and silver ions in green algae and surface waters at environmentally relevant concentrations using single particle ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2022**, *37* (6), 1208-1222.
102. Taboada-Lopez, M. V.; Herbello-Hermelo, P.; Dominguez-Gonzalez, R.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Pineiro, A., Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS. *Talanta* **2019**, *195*, 23-32.
103. Sun, Y.; Yang, Y.; Tou, F. Y.; Niu, Z. S.; Guo, X. P.; Liu, C.; Yan, J.; Wu, J. Y.; Xu, M.; Hou, L. J.; Liu, M., Extraction and quantification of metal-containing nanoparticles in marine shellfish based on single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry technique. *Journal of Hazardous Materials* **2022**, *424* (Pt A), 127383.
104. Lopez-Mayan, J. J.; Del-Angel-Monroy, S.; Pena-Vazquez, E.; Barciela-Alonso, M. C.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Pineiro, A., Titanium dioxide nanoparticles assessment in seaweeds by single particle inductively coupled plasma - Mass spectrometry. *Talanta* **2022**, *236*, 122856.
105. Laughton, S.; Laycock, A.; Bland, G.; von der Kammer, F.; Hofmann, T.; Casman, E. A.; Lowry, G. V., Methanol-based extraction protocol for insoluble and moderately water-soluble nanoparticles in plants to enable characterization by single particle ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2021**, *413* (2), 299-314.
106. Jreije, I.; Hadioui, M.; Wilkinson, K. J., Sample preparation for the analysis of nanoparticles in natural waters by single particle ICP-MS. *Talanta* **2022**, *238*, 123060.
107. Fréchette-Viens, L.; Hadioui, M.; Wilkinson, K. J., Practical limitations of single particle ICP-MS in the determination of nanoparticle size distributions and dissolution: case of rare earth oxides. *Talanta* **2017**, *163*, 121-126.
108. Bajorath, J.; Hinrichs, W.; Saenger, W., The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium. *European Journal of Biochemistry* **1988**, *176* (2), 441-447.
109. Gunkel, F. A.; Gassen, H. G., Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry* **1989**, *179* (1), 185-194.

110. Gimenez-Ingalaturre, A. C.; Rubio, E.; Chueca, P.; Laborda, F.; Goñi, P., Contribution to optimization and standardization of antibacterial assays with silver nanoparticles: the culture medium and their aggregation. *Journal of Microbiological Methods* **2022**, *203*, 106618.
111. Taboada-López, M. V.; Alonso-Seijo, N.; Herbello-Hermelo, P.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A., Determination and characterization of silver nanoparticles in bivalve molluscs by ultrasound assisted enzymatic hydrolysis and sp-ICP-MS. *Microchemical Journal* **2019**, *148*, 652-660.
112. Chetwynd, A. J.; Lynch, I., The rise of the nanomaterial metabolite corona, and emergence of the complete corona. *Environmental Science: Nano* **2020**, *7* (4), 1041-1060.
113. Steinmetz, L.; Geers, C.; Balog, S.; Bonmarin, M.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Taladriz-Blanco, P.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A., A comparative study of silver nanoparticle dissolution under physiological conditions. *Nanoscale Advances* **2020**, *2* (12), 5760-5768.
114. Baccaro, M.; Undas, A. K.; de Vriendt, J.; van den Berg, J. H. J.; Peters, R. J. B.; van den Brink, N. W., Ageing, dissolution and biogenic formation of nanoparticles: how do these factors affect the uptake kinetics of silver nanoparticles in earthworms? *Environmental Science: Nano* **2018**, *5* (5), 1107-1116.
115. Gray, E. P.; Coleman, J. G.; Bednar, A. J.; Kennedy, A. J.; Ranville, J. F.; Higgins, C. P., Extraction and Analysis of Silver and Gold Nanoparticles from Biological Tissues Using Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology* **2013**, *47* (24), 14315-14323.