



HAL
open science

Vers une version 2.0 de la spICPMS pour mieux comprendre la biogéochimie des nanophases dans l'environnement.

Mickael Tharaud

► To cite this version:

Mickael Tharaud. Vers une version 2.0 de la spICPMS pour mieux comprendre la biogéochimie des nanophases dans l'environnement.. Ingénierie de l'environnement. Université de Paris, 2021. Français. NNT: . tel-03541310

HAL Id: tel-03541310

<https://hal.science/tel-03541310>

Submitted on 24 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse préparée à l'Institut de physique du globe de Paris
Université de Paris

École doctorale Sciences de la Terre et de l'environnement
et physique de l'Univers STEP'UP n°560

Équipe Biogéochimie à l'Anthropocène des éléments et contaminants émergents

Vers une version 2.0 de la spICP-MS pour mieux comprendre la biogéochimie des nanophases dans l'environnement

par Mickaël Tharaud

Thèse de doctorat de Sciences de la Terre et de l'environnement

- dirigée par

Marc F. Benedetti Professeur, Université de Paris / IPGP

- présentée et soutenue publiquement le

10 décembre 2021

- devant un jury composé de

Gaëtane Lespes	Professeure, Université de Pau et des Pays de l'Adour	Rapportrice
Nadine Mattielli	Professeure, Université Libre de Bruxelles	Rapportrice
Gaëlle Charron	Maîtresse de conférence, Université de Paris	Examinatrice
Jérôme Gaillardet	Professeur, Université de Paris / IPGP	Examineur
Kevin J. Wilkinson	Professeur, Université de Montréal	Examineur
Marc F. Benedetti	Professeur, Université de Paris / IPGP	Directeur de thèse

Table des matières générale

▪ CONTEXTE SCIENTIFIQUE	- 1 -
1. L'ANTHROPOCENE	- 3 -
2. LA ZONE CRITIQUE.....	- 4 -
3. DES COLLOÏDES AUX NANOPARTICULES	- 5 -
3.1. <i>La phase colloïdale</i>	- 5 -
3.2. <i>Les nanoparticules anthropiques – Anthropogenic NPs (ANPs)</i>	- 8 -
3.2.1. Les nanoparticules manufacturées – <i>Engineered NPs (ENPs)</i>	- 8 -
3.2.2. Les nanoparticules accidentelles – <i>Incidental NPs (INPs)</i>	- 9 -
3.3. <i>Les nanoparticules naturelles – Natural NPs (NNPs)</i>	- 10 -
4. LE TRANSPORT, LES FLUX ET LES CONCENTRATIONS ESTIMES.	- 11 -
4.1. <i>Les outils de prédiction</i>	- 11 -
4.2. <i>Les nanoparticules naturelles (NNPs)</i>	- 13 -
4.3. <i>Les nanoparticules accidentelles (INPs)</i>	- 13 -
4.4. <i>Les nanoparticules manufacturées (ENPs)</i>	- 13 -
5. LE COMPORTEMENT ET LA TRANSFORMATION DES NPs EN MILIEU NATUREL.	- 15 -
6. LES OUTILS ANALYTIQUES.....	- 19 -
7. LA SPECTROMETRIE DE MASSE A SOURCE PLASMA EN MODE PARTICULE UNIQUE (spICP-MS)	- 22 -
7.1. <i>Historique</i>	- 22 -
7.2. <i>Limitations</i>	- 24 -
8. LE CADRE ET LES OBJECTIFS DE LA THESE	- 26 -
9. BIBLIOGRAPHIE.....	- 30 -
▪ MATERIEL & METHODES	- 37 -
1. LES ANALYSEURS EN MASSE	- 39 -
1.1. <i>Quadripôle</i>	- 39 -
1.2. <i>Secteur magnétique</i>	- 40 -
1.3. <i>Temps de vol</i>	- 42 -
2. LE MODE PARTICULE UNIQUE EN ICP-MS (spICP-MS).....	- 44 -
3. LES EFFICACITES ET LES DISTRIBUTIONS GRANULOMETRIQUES.....	- 47 -
3.1. <i>Nombre d'ions détectés à partir d'une solution étalon ionique</i>	- 47 -
3.2. <i>Nombre d'ions détectés à partir de l'ionisation d'une nanoparticule</i>	- 48 -
3.3. <i>Détermination des efficacités en spICP-MS</i>	- 49 -
3.4. <i>Détermination des distributions granulométriques des NPs par spICP-MS</i>	- 51 -
4. LE TRAITEMENT DES DONNEES	- 53 -
4.1. <i>Seuil de coupure</i>	- 53 -
4.2. <i>Modélisation du bruit de fond</i>	- 54 -
4.3. <i>Apprentissage machine</i>	- 55 -
4.4. <i>Soustraction des histogrammes</i>	- 56 -
4.5. <i>Synthèse des méthodologies utilisées</i>	- 56 -
5. GLOSSAIRE	- 57 -
6. BIBLIOGRAPHIE.....	- 58 -

▪ CHAPITRE I	- 59 -
▪ TiO₂ NANOMATERIALS DETECTION IN CALCIUM RICH MATRICES BY SPICP-MS. A MATTER OF RESOLUTION AND TREATMENT	- 59 -
1. RESUME	- 61 -
2. ABSTRACT	- 62 -
3. INTRODUCTION	- 63 -
4. EXPERIMENTAL SECTION	- 65 -
4.1. Chemicals	- 65 -
4.2. Sample preparation and verification	- 65 -
4.3. Analytical methods	- 66 -
4.4. Data treatment	- 67 -
5. RESULTS AND DISCUSSION	- 69 -
5.1. Background, sensitivity and size detection limits (D_{min})	- 69 -
5.2. Detection of TiO ₂ NM104 in calcium matrix by spICP-MS	- 73 -
5.2.1. Experimental resolution of the background	- 73 -
5.2.2. Mathematical correction of the background (deconvolution method)	- 76 -
5.3. Method validation	- 79 -
6. CONCLUSION	- 81 -
7. REFERENCES	- 82 -
▪ CHAPITRE II	- 85 -
▪ DETECTION OF NANOPARTICLES BY SINGLE-PARTICLE ICP-MS WITH A COMPLETE TRANSPORT EFFICIENCY THROUGH DIRECT NEBULIZATION AT FEW MICROLITERS PER MINUTE UPTAKE-RATES	- 85 -
1. RESUME	- 87 -
2. ABSTRACT	- 88 -
3. INTRODUCTION	- 89 -
4. EXPERIMENTAL SECTION	- 92 -
4.1. Chemicals	- 92 -
4.2. Analytical procedure	- 92 -
4.3. Environmental matrices	- 93 -
4.4. Data processing	- 94 -
4.4.1. Calculation of the transport efficiency ($\eta_{Transport}$) using 40 nm Au-NPs	- 94 -
4.4.2. Determination of the particle size distribution (PSD), average diameter (d_{NPs}) and particle number concentration (PNC)	- 94 -
5. RESULTS AND DISCUSSION	- 96 -
5.1. Nebulizer liquid uptake rate versus displacement pump gas flow rate	- 96 -
5.2. Influence of the uptake rate on gold dissolved signal	- 97 -
5.3. Influence of the uptake rate on gold nanoparticle signal compared to dissolved	- 98 -
5.4. Complete transport efficiency with the μ -dDIHEN at $< 10 \mu\text{L min}^{-1}$ uptake rate	- 99 -
5.5. Measurement of Au-, Ag- and Pt-NP reference materials under optimal μ -dDIHEN conditions	- 100 -
5.6. Long-term stability under μ -dDIHEN optimal conditions	- 102 -
5.7. μ -dDIHEN measurement of Au-NPs in synthetic and natural matrices	- 104 -
6. CONCLUSION	- 105 -
7. REFERENCES	- 107 -

▪ CHAPITRE III	- 109 -
▪ ACCURATE METHODOLOGY FOR THE DETERMINATION OF IONIC AND NANOPARTICLE POPULATIONS IN NATURAL SAMPLES.....	- 109 -
1. RESUME	- 111 -
2. ABSTRACT	- 112 -
3. INTRODUCTION	- 113 -
4. EXPERIMENTAL SECTION	- 116 -
4.1. Chemicals	- 116 -
4.2. spICP-MS analysis	- 116 -
5. ALGORITHMS	- 118 -
5.1. Linear regression coefficient.....	- 118 -
5.2. Transport and nebulization efficiencies	- 118 -
5.3. Particle mass distribution	- 119 -
5.4. Ionic concentration.....	- 121 -
6. PROCESSING STEPS.....	- 123 -
7. RESULTS & DISCUSSION.....	- 125 -
7.1. External calibration	- 125 -
7.2. Calculation of transport and nebulization efficiencies	- 126 -
7.3. GMM clustering on suspensions with synthetic NPs.....	- 128 -
7.4. GMM clustering on NP-containing natural samples	- 130 -
8. CONCLUSION	- 132 -
9. GLOSSARY	- 133 -
10. APPENDIX	- 134 -
11. REFERENCE.....	- 135 -
▪ CHAPITRE IV.....	- 137 -
▪ NANOPARTICLE IDENTIFICATION USING SINGLE PARTICLE ICP-TOF-MS ACQUISITION COUPLED TO CLUSTER ANALYSIS. FROM MODEL TO NATURAL NPS ..-	- 137 -
1. RESUME	- 139 -
2. ABSTRACT	- 140 -
3. INTRODUCTION	- 141 -
4. MATERIAL & METHODS	- 144 -
4.1. Chemicals	- 144 -
4.2. Sample preparation	- 145 -
4.3. Scanning transmission electron microscopy	- 145 -
4.4. Single particle ICP-ToF-MS	- 145 -
4.5. Processing and post-processing procedures	- 146 -
4.5.1. spICP-MS raw data processing.....	- 146 -
4.5.2. Hierarchical agglomerative clustering.....	- 147 -
5. RESULTS & DISCUSSION	- 149 -
5.1. External calibration and size detection limits of the spICP-ToF-MS.....	- 149 -
5.2. Gold and/or silver NPs.....	- 151 -
5.3. Nickel/Zinc Cobalt Iron oxide NPs	- 154 -
5.4. Mixture of model NPs.....	- 157 -
5.5. Analogue of natural NPs	- 160 -
6. CONCLUSION.....	- 167 -
7. APPENDIX	- 168 -
8. REFERENCES	- 170 -

▪ CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	- 173 -
1. CONCLUSION	- 175 -
1.1. <i>Objectifs</i>	- 175 -
1.2. <i>Synthèse</i>	- 175 -
2. PERSPECTIVES.....	- 179 -
2.1. <i>Analytiques et méthodologiques</i>	- 179 -
2.2. <i>Biogéochimiques</i>	- 182 -
3. BIBLIOGRAPHIE.....	- 185 -

■ CONTEXTE SCIENTIFIQUE

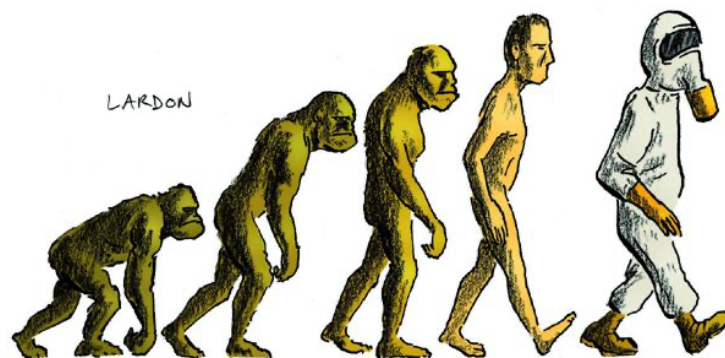


Figure 1: L'évolution (et la décadence) de l'homme^a

Il y a approximativement 3,7 millions d'années, l'être humain – bipède sous la forme *Hominidae* – a fait son apparition sur Terre (1^{ères} empreintes de pas découvertes à Laetoli (Afrique, Tanzanie) en 1972)) ¹. Chacune des Époques qu'il a traversées est séparée de phénomènes géologiques naturels induisant des modifications importantes de la faune, de la flore et de la surface terrestres. Alors qu'il était jusqu'ici spectateur de ces changements (ou acteur à petite échelle seulement), il semble évident qu'aujourd'hui, après environ 300 000 ans d'existence dans sa dernière « version » – *Homo sapiens* –, l'être humain est devenu un acteur majeur des bouleversements qui affectent la planète. Ces transformations ont ainsi marqué l'entrée de la Terre et ses habitants dans une nouvelle Époque – l'Ère de l'humain ou *Anthropocène* ².

^a <http://bouffonduroi.over-blog.fr/>

Table des matières

1.	L'ANTHROPOCENE	- 3 -
2.	LA ZONE CRITIQUE	- 4 -
3.	DES COLLOÏDES AUX NANOPARTICULES	- 5 -
3.1.	<i>La phase colloïdale</i>	- 5 -
3.2.	<i>Les nanoparticules anthropiques – Anthropogenic NPs (ANPs)</i>	- 8 -
3.2.1.	<i>Les nanoparticules manufacturées – Engineered NPs (ENPs)</i>	- 8 -
3.2.2.	<i>Les nanoparticules accidentelles – Incidental NPs (INPs)</i>	- 9 -
3.3.	<i>Les nanoparticules naturelles – Natural NPs (NNPs)</i>	- 10 -
4.	LE TRANSPORT, LES FLUX ET LES CONCENTRATIONS ESTIMES.....	- 11 -
4.1.	<i>Les outils de prédiction</i>	- 11 -
4.2.	<i>Les nanoparticules naturelles (NNPs)</i>	- 13 -
4.3.	<i>Les nanoparticules accidentelles (INPs)</i>	- 13 -
4.4.	<i>Les nanoparticules manufacturées (ENPs)</i>	- 13 -
5.	LE COMPORTEMENT ET LA TRANSFORMATION DES NPs EN MILIEU NATUREL	- 15 -
6.	LES OUTILS ANALYTIQUES	- 19 -
7.	LA SPECTROMETRIE DE MASSE A SOURCE PLASMA EN MODE PARTICULE UNIQUE (SPICP-MS) ..	- 22 -
7.1.	<i>Historique</i>	- 22 -
7.2.	<i>Limitations</i>	- 24 -
8.	LE CADRE ET LES OBJECTIFS DE LA THESE	- 26 -
9.	BIBLIOGRAPHIE	- 30 -

1. L'Anthropocène

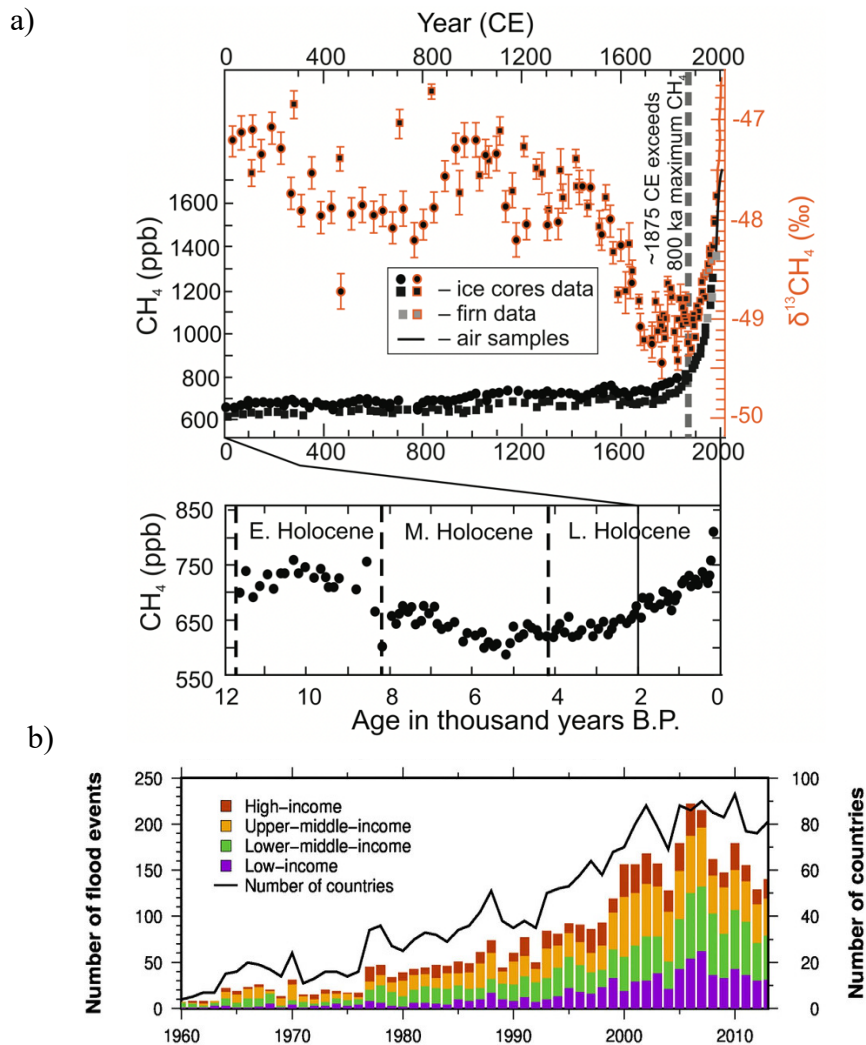


Figure 2: (a) Perturbations du cycle du carbone mises en évidence par les concentrations glacio-chimiques en CH_4 et les rapports isotopiques du carbone. Enregistrements de carottes de glace de l'Antarctique (carrés) et du Groenland (cercles) pour la concentration en CH_4 et $\delta^{13}\text{C}$ pour le CH_4 atmosphérique au cours des deux derniers millénaires (en haut), avec les données de carottes de glace du Groenland CH_4 pour l'Holocène (en bas) (modifiée de Waters et al. (2016))³. (b) Nombre de crues par an reportées par l'Emergency Event Database accompagné du nombre de pays touchés (modifiée de Tanoue et al. (2016))⁴

Bien que l'Anthropocène soit une Époque controversée tant sur sa date de commencement que sur la reconnaissance formelle de son existence par la Commission internationale de stratigraphie⁵, de nombreux marqueurs environnementaux tels que les concentrations en CH_4 (Figure 2 a) montrent une alarmante évolution en corrélation avec l'activité humaine depuis le milieu du XX^{ème} siècle et – la Grande Accélération –³. A titre d'exemple, l'être humain contribue aujourd'hui à l'érosion des sols via ses activités minières, agricoles et de construction. L'érosion liée à ces activités induit des changements dans la structure et la texture des sols facilitant davantage l'érosion naturelle par l'eau et le vent⁶. Sous l'effet de l'eau, et particulièrement en temps de crue, le déplacement des particules du sol vers les

écosystèmes aquatiques augmente la quantité de matière en suspension dans les rivières ⁷. Ceci a même un impact doublement négatif du fait de la sédimentation des plus grosses particules qui accroisse le dépôt sédimentaire qui à son tour favorise ces crues ⁸. Bien que la controverse porte également sur les causes et l'impact réel de l'être humain sur ces crues, une augmentation de leur fréquence est observé depuis le milieu du XX^{ème} siècle et la Grande Accélération (Figure 2 b) ⁴.

2. La Zone Critique

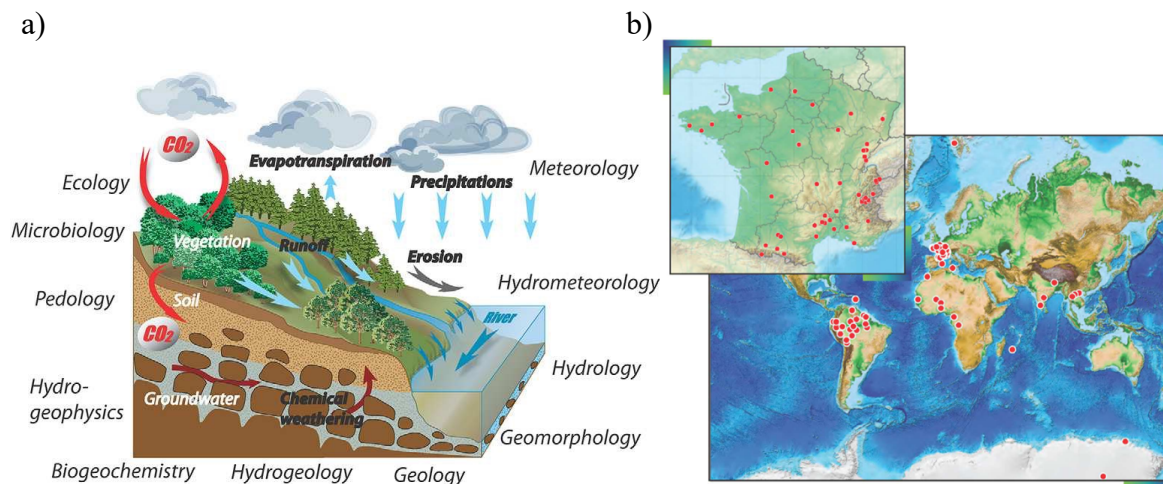


Figure 3: (a) Schéma de la zone critique à l'échelle d'un bassin versant mentionnant les différentes disciplines concernées. (b) Réseau d'observatoires de la zone critique - Application et recherche (OZCAR) (modifiées de Gaillardet et al. (2018))⁹

De manière directe ou indirecte, l'être humain a un impact sur sa zone de vie et d'action. Cette dernière, définie par l'US National Research Council (2001) comme la « couche mince de la surface de la Terre et de l'environnement terrestre proche de la surface » est également appelée – *Zone critique* –. Elle est définie comme *critique* à cause des changements d'états et de propriétés observés dans cette interface s'étendant *du haut de la végétation à la base de la zone d'altération* (Figure 3 a). Elle l'est également du fait qu'elle concentre les ressources nourrissant les êtres vivants et où s'organisent les écosystèmes. À l'échelle de la Terre cette couche apparaît comme superficielle. Cependant les composants impliqués sont nombreux, les processus à appréhender sont complexes, multiples et requièrent des savoirs interdisciplinaires tandis que les échelles de temps et d'espaces sont variables (Figure 3 a). Un réseau international d'observatoires de la zone critique – *Critical Zone Observatories* – (Figure 3 b) a donc été créé afin d'étudier sur le long terme et à plus ou moins haute fréquence les différents réservoirs de cette zone, à savoir les eaux souterraines et de surface, les glaces, les zones humides et les sols tout en tenant compte la biodiversité ⁹.

L'objectif de ces observatoires est de tenter de répondre à quatre questions fondamentales¹⁰:

i/ Quels processus contrôlent les flux d'éléments, de particules et de gaz réactifs à différentes échelles de temps ?

ii/ Comment les variations et les perturbations des processus d'altération chimiques et physiques affectent-elles la zone critique ?

iii/ Comment les processus biogéochimiques régissent-ils la durabilité à long terme des ressources en eau et en sol ? et

iv/ Comment les processus qui nourrissent les écosystèmes évoluent-ils à l'échelle humaine et géologique?

3. Des colloïdes aux nanoparticules

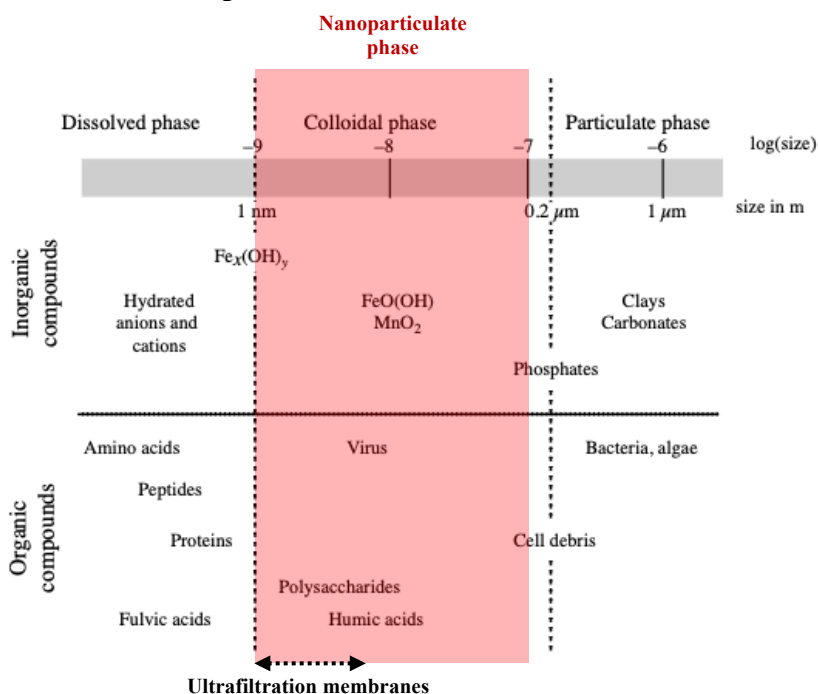


Figure 4: Répartition des colloïdes minéraux et organiques en fonction de la taille dans les systèmes aquatiques (modifiées de Gaillardet et al. (2003))¹¹

3.1. La phase colloïdale

Les processus et/ou cycles biogéochimiques sont donc prépondérants dans les toutes questions scientifiques liées à la zone critique. À l'heure de l'Anthropocène, l'impact de l'être humain ne peut être omis et a donc été intégré aux problématiques d'intérêt¹⁰. À titre d'exemple, il a été démontré depuis de nombreuses années que les éléments traces métalliques (ETM) tels que le Pb, le Cd, le Hg ou encore le Cr libérés lors de l'épandage de boues issues de station d'épuration, ont un impact sur la faune et la flore terrestres¹². De plus, – la spéciation de l'élément – (forme sous laquelle se trouve l'élément) influence grandement son transport, ses interactions avec les constituants de l'environnement et donc

son impact sur ce dernier. En effet, les ETM liés aux particules les plus grosses ($> 1 \mu\text{m}$) sédimentent rapidement et sont immobilisés. *A contrario*, les ETM sous forme libres et/ou labiles (liés aux ligands dissous) et donc plus facilement biodisponibles, séjournent plus longuement dans l'eau et migrent sur de plus longues distances. Le comportement des particules d'un diamètre compris entre 1 et 1000 nm – *les colloïdes*¹³ – est quant à lui plus complexe^{14,15}. La biogéochimie des ETM associés est de ce fait plus délicate à appréhender. En fonction du type de colloïdes et des conditions physico-chimiques du milieu, ils peuvent soit s'agréger puis sédimenter rapidement soit ne pas être affectés et migrer sur de longues distances¹⁶. Tel qu'illustré par la Figure 4, la littérature répertorie aujourd'hui deux classes de colloïdes¹⁷ :

- Les *colloïdes inorganiques*, comprenant les phyllosilicates d'aluminium tels que les argiles et les oxydes (hydratés ou non) comme l'hématite (Fe_2O_3), la pyrolusite (MnO_2) et les silicates.
- Les *macromolécules organiques ou matière organique naturelle*, regroupant les substances humiques telles que les acides humiques et les substances polymères extracellulaires comme les polysaccharides.

Afin de bien comprendre le devenir et le comportement des ETM, une des questions fondamentales à aborder est donc la phase dans laquelle ils se trouvent. Jusqu'à il y a une vingtaine d'années, lorsque l'élément étudié était détecté dans la phase submicronique (filtration sur membrane $< 0,22$ ou $0,45 \mu\text{m}$), il était considéré comme une espèce dissoute¹¹. En effet, ce type de membrane filtrante permet de retenir une grande majorité des particules en suspension, y compris la plupart des colloïdes¹⁸. Des membranes d'ultrafiltration (taille de pore $\leq 10 \text{ kDa}$; Figure 4) ont par la suite été développées afin d'isoler la phase dissoute de la phase colloïdale. Il a depuis été démontré qu'une large proportion des ETM peuvent être adsorbés sur les colloïdes¹⁹ et de ce fait voir leur transport influencé^{20,21}. Il a de plus été démontré que les plus petits de ces colloïdes ($\leq 50 \text{ nm}$) ont la capacité d'adsorber une proportion plus élevée d'ETM²². Ces colloïdes plus petits ont plus récemment été mis en lumière, particulièrement avec l'avènement des – *nanoparticules (NPs)* – synthétisées pour de nombreuses applications industrielles ou médicales²³.

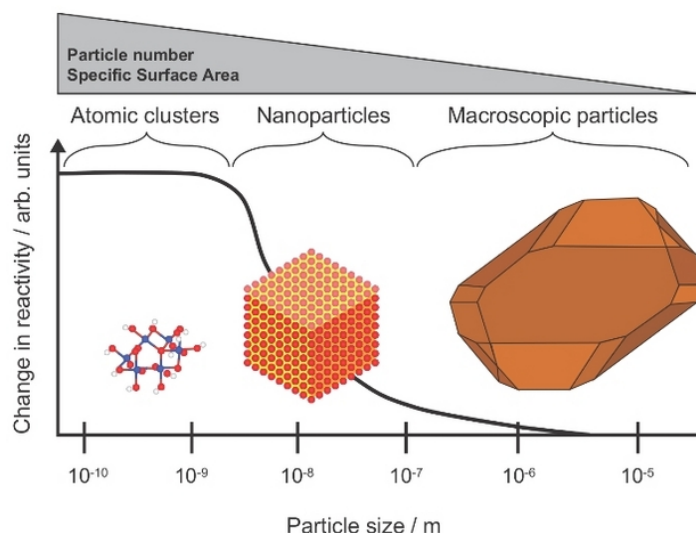


Figure 5: Illustration du changement de réactivité des particules dans le continuum dissous – macro-particules (de Wigginton et al.(2007))²⁴

Ces NPs, de par leur rapport surface – volume ou *surface spécifique* très élevée liée à leur petite taille (Figure 4), sont des particules très réactives²⁵. Cette réactivité, illustrée dans la Figure 5, est particulièrement variable dans cette gamme de taille en comparaison aux autres fractions. Il semble donc important d’apporter une attention particulière à cette sous-fraction des colloïdes pouvant jouer un rôle essentiel dans le devenir et le comportement des ETM.

Il est important de noter que dans la suite de ce manuscrit le terme générique de *nanoparticules* – *NPs* est utilisé pour simplifier son écriture et sa compréhension, bien que ce terme ne fasse normalement référence qu’à une particule de taille inférieure ou égale à 100 nm dans ses 3 dimensions^b. A l’instar des *nanoparticules manufacturées* ou *ENPs*, deux autres sources ont par la suite été répertoriées, à savoir les *nanoparticules accidentelles* ou *INPs* produites de manière fortuite suite aux activités humaines et les *nanoparticules naturelles* ou *NNPs*, sous-fraction des colloïdes précédemment mentionnés. Les ENPs et INPs, à la différence des NPs issues des phénomènes naturels (NNPs), sont également souvent regroupées dans une seule et même catégorie, les *nanoparticules anthropiques* ou *ANPs*.

^b Recommandation 2011/696/UE de la commission européenne (18 octobre 2011) relative à la définition des *nanomatériaux*

3.2. Les nanoparticules anthropiques – *Anthropogenic NPs (ANPs)*

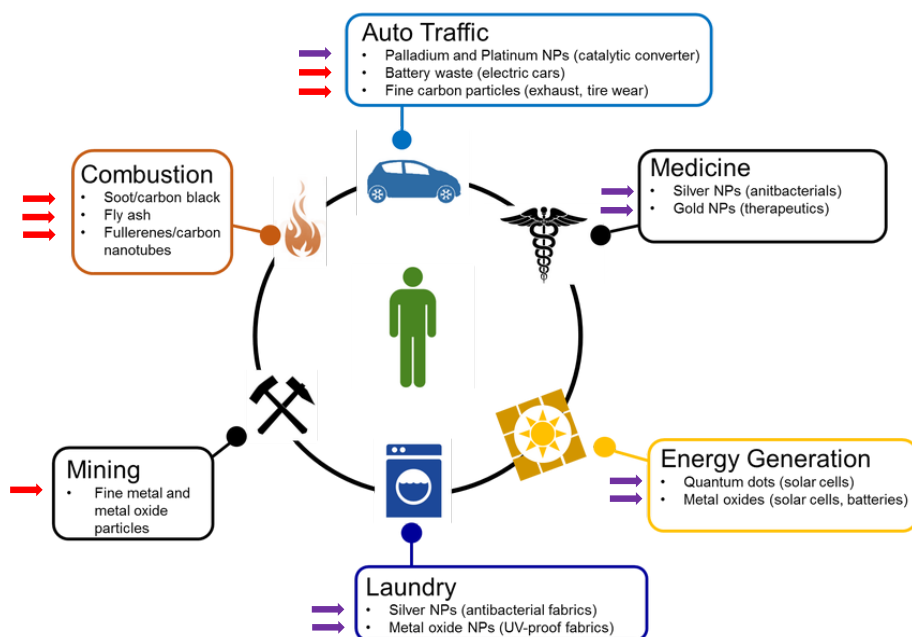


Figure 6: Exemples quant à l'origine de la production de ANPs. La couleur des flèches horizontales représente la catégorie dans laquelle peuvent être classées ces ANPs avec en rouge les INPs et en violet les ENPs (modifiée de <https://sustainable-nano.com/>)

3.2.1. Les nanoparticules manufacturées – *Engineered NPs (ENPs)*

La zone critique abrite toutes les industries qui produisent des ENPs. En effet, depuis de nombreuses années maintenant, les nanoparticules sont intégrées à notre vie quotidienne (flèches violettes Figure 6) dans les domaines de la médecine, de la cosmétique, de l'alimentation, de l'habillement et des produits électroniques²³. La plupart des procédés utilisés pour la synthèse de ces ENPs sont aujourd'hui largement connus et maîtrisés par l'industrie chimique. Ainsi, les conditions physico-chimiques de cette synthèse (phase gazeuse, liquide ou solide – température et temps plus ou moins élevés – etc...) conditionnent la forme, la taille, la composition élémentaire mais aussi les propriétés des ENPs résultantes²⁶. De plus, étant donné que les processus de fabrication des NNPs par les communautés bactériennes sont mieux contraints, des procédés de biomimétisme ont vu le jour ces dernières années, notamment pour une conception plus éco-compatible^{27, 28}. C'est ainsi que les ENPs d'origine bactérienne telles que les oxydes de fer sont par exemple utilisées pour la destruction ciblée de tumeurs au cerveau²⁹.

L'incorporation des ENPs dans des produits du quotidien, leur utilisation comme vecteur de médicament ou bien leur dispersion directement dans l'environnement comme composants d'assainissement, engendre une dispersion certaine dans les écosystèmes aquatiques est des plus probables. Les déchets de ces industries collectés le plus souvent en station de traitement des eaux usées contiennent également des ENPs. Une grande partie des ENPs sont entièrement ou partiellement

composées de métaux ou métalloïdes (Ag, Ti, Zn, Ce...). Leur dissémination croissante dans l'environnement du fait de leur utilisation en constante augmentation ³⁰ peut donc avoir un impact doublement important sur les écosystèmes aquatiques.

3.2.2. Les nanoparticules accidentelles – *Incidental NPs* (INPs)

Toutes les couches de la zone critique sont concernées par la production et le transport/transfert d'INPs (flèches rouges sur la Figure 6). En profondeur, au sein des exploitations minières, l'exploitation du minerai peut engendrer la production d'oxyhydroxydes, de sulfates et de nanoparticules métalliques puis leur dissémination dans les eaux souterraines ³¹. En surface, plus particulièrement au sein des villes et des zones industrielles et agricoles, les gaz d'échappement des moteurs à essence et diesel dégagent des INPs carbonées, métalliques et/ou d'oxydes métalliques ³². Plus en altitude, des quantités importantes de INPs, le plus souvent sous forme d'agrégats complexes de composés inorganiques et organiques, sont rejetées directement dans la troposphère. Celles-ci peuvent notamment être produites suite à des feux de forêt ou encore dans des fumées industrielles ou agricoles ³³.

Des INPs se forment également suite à l'émission accidentelle de molécules ou d'ions précurseurs. Il est estimé que 74% des INPs atmosphériques proviennent de la nucléation de ces précurseurs ³⁴. A titre d'exemple, des NPs de sulfure métallique peuvent être formées directement dans la haute atmosphère par l'action photochimique du rayonnement solaire^c à partir d'ions métalliques émis accidentellement et d'acide sulfurique produit naturellement. Il est également possible d'observer la présence de NPs de sulfure métallique dans des écosystèmes anaérobiques. Celles-ci sont engendrées par la modification d'oxydes métalliques en présence de soufre ³⁶. De même, les stations de traitement des eaux usées vont relarguer de potentiels précurseurs qui, en contact avec d'autres espèces seront susceptible de former des INPs ³⁷.

^c Ces INPs atmosphériques se transforment en particules plus grosses qui agissent comme des noyaux de condensation nuageuse et/ou contribuent à l'absorption et à la diffusion de la lumière, ce qui affecte les processus de réchauffement planétaire (35. D. Pal, A. Dastoor and P. A. Ariya, *Urban Climate*, 2020, **34**, 100713.)

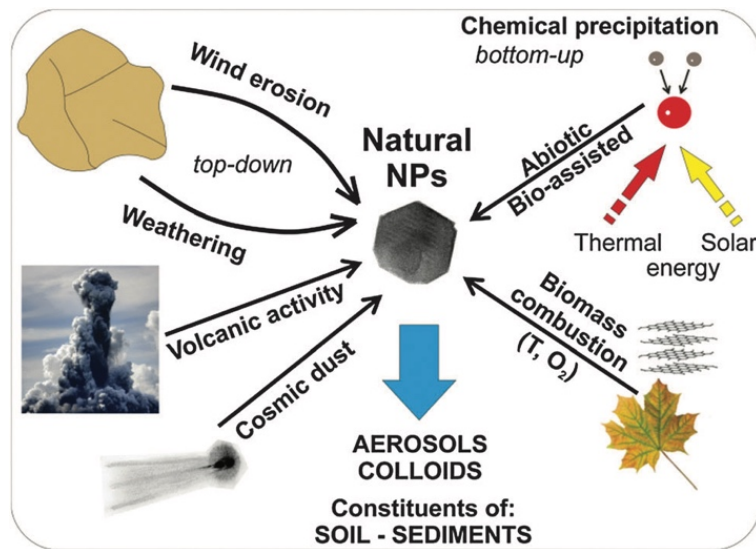
3.3. Les nanoparticules naturelles – *Natural NPs* (NNPs)

Figure 7: Les processus naturels à l'origine de la production de NNPs (de Sharma et al. (2015))³⁶

Comme mentionné précédemment, l'érosion des sols qu'elle soit éolienne ou hydrique facilite la production et le transport/transfert de particules au sein de la zone critique (Figure 7). Parmi l'ensemble des particules générées naturellement suite à des phénomènes d'érosion se trouvent des NNPs³⁸. Ces mêmes types de NNPs sont par exemple retrouvées dans les émissions volcaniques³⁸⁻⁴⁰, les tempêtes de sable ou encore les poussières cosmiques⁴¹. Bien que le transport se fasse préférentiellement par voie aérienne, ces NNPs se retrouvent dans les sols pour *in fine* migrer vers les écosystèmes aquatiques notamment suite à des précipitations. A l'instar des phénomènes d'origine « géogéniques », les phénomènes « biologiques » entrent également en compte dans la production de ces NNPs (Figure 7). En effet, certaines communautés microbiennes sont en mesure de créer des conditions favorables à la production de NNPs. Parmi celles-ci, les bactéries magnétotactiques (MTB) produisent des oxydes de fer pour s'orienter de manière directionnelle dans les sols et/ou les sédiments⁴².

Dès lors, afin de prédire les conséquences biogéochimiques/environnementales de ces différents types de NPs, il apparaît important :

i/ d'évaluer leurs flux au sein des écosystèmes environnementaux

ii/ de comprendre leur rôle (vecteur d'ETM) et leur transformation (homo- vs hétéro-agrégation, passivation, dissolution...)

4. Le transport, les flux et les concentrations estimés.

Les courants éoliens dans la troposphère et hydriques *via* les rivières agissent comme des porteurs/vecteurs principaux des NPs. *In fine*, les NPs s'accumulent au sein de réservoirs artificiels tels que les décharges, les étangs de rétention mais aussi dans des réservoirs géologiques naturels tels que les sols, les sédiments, l'atmosphère et les océans ⁴³. Des structures artificielles de type stations de traitement des eaux usées servent aussi de vecteur *via* les eaux épurées mais aussi d'accumulateurs dans les boues résiduelles. En effet, ces stations n'étant pas forcément équipées pour l'élimination de toutes les NPs dans les eaux usées, la partie déversée dans les rivières après le traitement risque de contenir des NPs. Phalyvong et *al.* (2020) ⁴⁴ ont par exemple constaté une augmentation de la concentration en Ti- et Ce-NPs dans la Loire à l'aval du point de rejet d'une station de traitement des eaux usées. Pour d'autres types de NPs telles que les Ag-NPs ³⁷, elles sont généralement captées et concentrées dans les boues qui vont ensuite majoritairement servir de l'épandage ou être incinérées ⁴⁵. Par conséquent, les NPs se retrouveront ensuite soit dispersées/accumulées dans les sols agricoles soit transférées dans les écosystèmes aquatiques ou l'atmosphère et donc plus largement dans la zone critique.

4.1. Les outils de prédiction

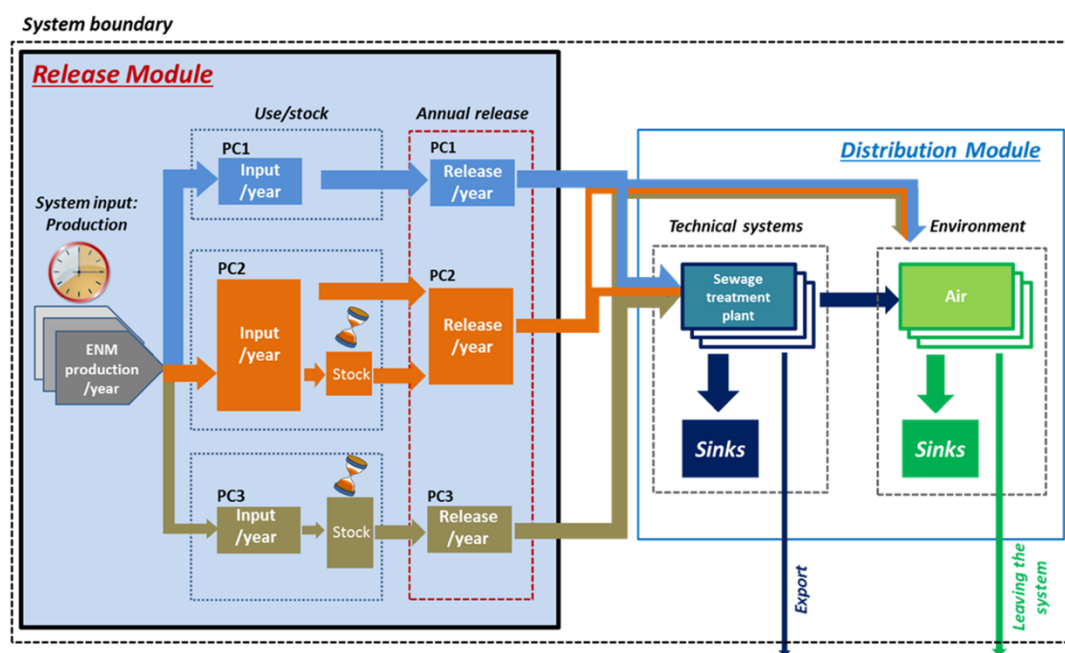


Figure 8: Schéma du modèle de flux de matières dynamique probabiliste pour les ENPs (de Sun et al. (2016))⁴⁶

Une première approche consiste à estimer les concentrations environnementales à l'aide de modèles probabilistes ^{46,47} ou – *Model Flow Analysis (MFA)* –. Ces modèles s'appuient sur la production annuelle d'ENPs comme « entrées » dans le système au cours d'une période donnée. Ils utilisent également la cinétique de libération de ces ENPs en fonction du temps d'une catégorie de produit

spécifique sur l'ensemble de son cycle de vie. Comme le montre la Figure 8, ils se composent de deux modules avec :

- Le *module de libération* qui se concentre sur le comportement dynamique du système, décrivant à la fois la dynamique d'entrée et la dynamique de libération
- Le *module de distribution* qui décrit les distributions d'ENPs au sein et entre les systèmes après leur utilisation.

A l'aide des MFA, Sun *et al.* (2016)⁴⁶ ont été en mesure d'estimer les concentrations en TiO₂, ZnO et Ag-NPs dans différents compartiments techniques (station d'épuration) et environnementaux. Il est notamment reporté que les concentrations estimées de ces 3 types d'ENPs varient entre 10⁻⁶ et 10⁻⁴ mg L⁻¹ dans les eaux de surfaces pour le TiO₂ et le ZnO alors qu'elles sont environ 100 fois plus faibles pour les Ag-NPs (10⁻⁸ à 10⁻⁶ mg L⁻¹).

Dans une synthèse bibliographique publiée récemment, Hochella *et al.* (2019)³⁴ ont modélisé le transport et les flux des NPs au sein de la zone critique qu'elles soient d'origine naturelle ou anthropique. La Figure 9 ainsi que les 3 paragraphes suivants reprennent les chiffres publiés auxquels s'ajoutent des chiffres tirés ou estimés d'autres études.

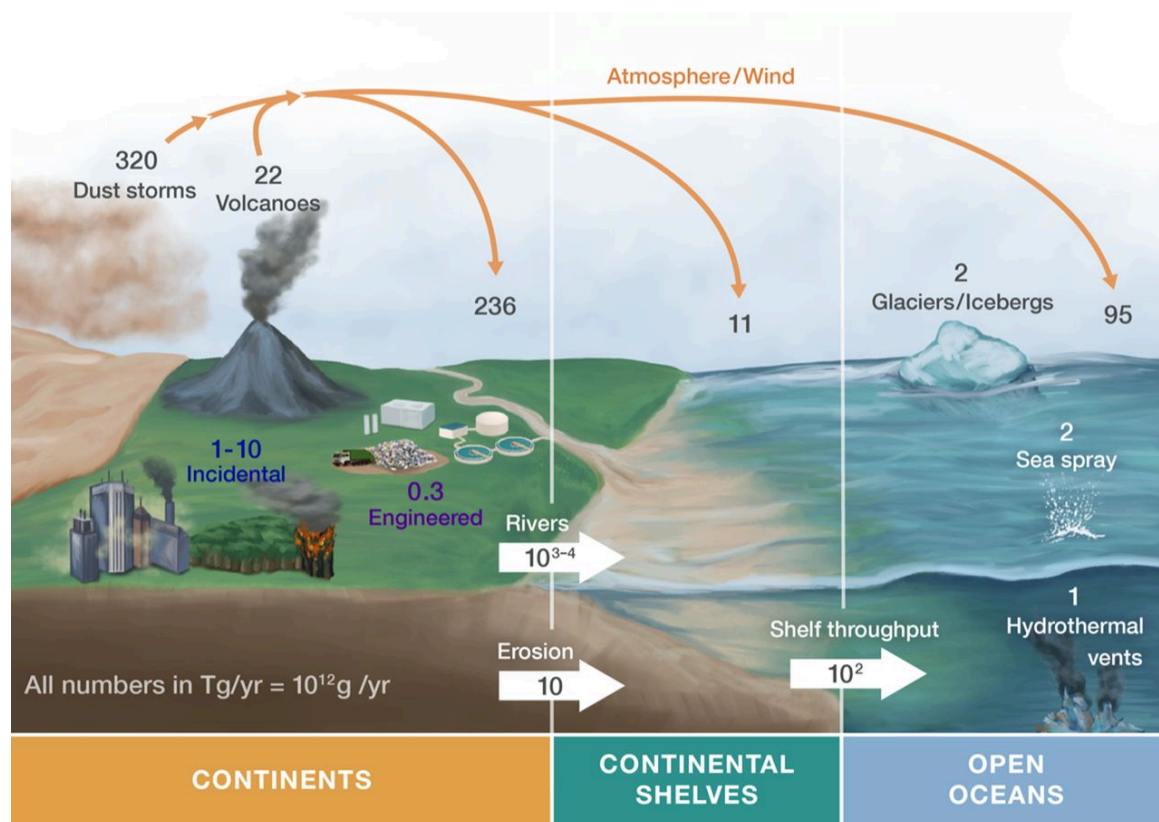


Figure 9: Estimation globale (x 10¹² g/an) des NPs naturelles (nombres en noir et blanc), accidentelles (nombre en bleu) et manufacturées (nombre en violet) dans la zone critique (de Hochella *et al.* (2019))³⁴

4.2. Les nanoparticules naturelles (NNPs).

Les NPs d'argiles produites essentiellement suite à l'érosion des sols constituent la grande majorité du réservoir naturel de NNPs terrestres. Leur quantité est estimée entre 10^7 et 10^8 Tg. S'ensuivent d'autres types de NNPs, telles que les oxydes de fer, également produites par des processus d'altération dans la zone critique³⁶. En termes de flux, Hochella et al. (2019)³⁴ ont évalué que les rivières voire les glaciers transfèrent chaque année environ 10^3 à 10^4 Tg de NNPs dans les écosystèmes aquatiques (rivières, océans) (Figure 9).

4.3. Les nanoparticules accidentelles (INPs)

Les pratiques minières et agricoles sont connues pour produire des sols riches en particules/colloïdes/nanoparticules dites accidentelles. Ces particules accidentelles sont transportées et leur quantité peut notamment varier en fonction des phénomènes naturels (précipitations, crues...) ⁸. Bien que le flux d'INPs transportées *via* les rivières vers les océans soit peu contraint, l'apport d'INPs par les zones inondables va clairement influencer les quantités totales d'INPs dispersées dans les océans. Pimentel et al. (2006)⁸ reportent notamment qu'aux USA, en Chine et en Inde, la perte en masse de sol dans les zones agricoles à la fin des années 1990 était respectivement de 3 – 5,5 – et 6,6 Tg/an. En s'appuyant sur une étude de Seta et al. (1996)⁴⁸ où il est mentionné que la fraction colloïdale dispersible dans l'eau représente entre 1 et 30% des sols (en fonction du type de sol), il est possible de faire une 1^{ère} approximation des flux de INPs dans les 3 pays mentionnés. Ces flux d'INPs pourraient donc varier entre 0,03 et 2 Tg/an.

Concernant la troposphère, en faisant l'inventaire des émissions de particules provenant de sources industrielles, des incendies de forêt, des transports et de l'agriculture, ainsi que des distributions granulométriques typiques des INPs urbaines, rurales et marine, Hochella et al. (2019)³⁴ ont estimé que le rejet atmosphérique annuel est compris entre 1 et 10 Tg (Figure 9).

4.4. Les nanoparticules manufacturées (ENPs)

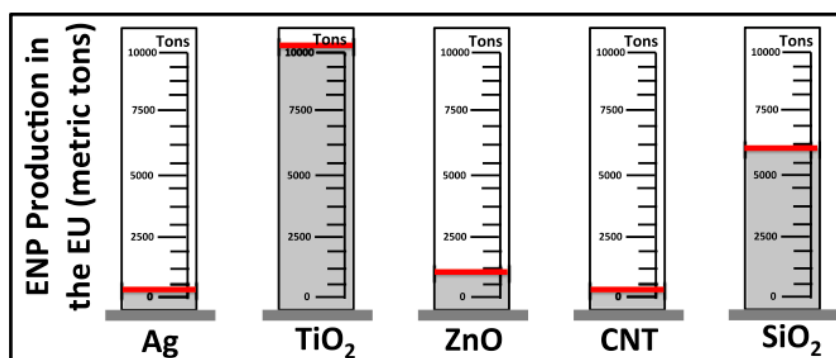


Figure 10: Production annuelle des ENPs les plus utilisées en Union Européenne (en tonne) (de Mitrano et al. (2015))⁴⁹

Les estimations de la production mondiale totale d'ENPs varient d'au moins un ordre de grandeur suivant les études. En effet, suivant les bases de données utilisées (R-Nano^d par exemple), les informations en entrée du modèle ne seront pas les mêmes. De plus en fonction des pays, ces informations, renseignées par les fabricants et importateurs, sont soumises à des règles variables^e. A titre d'exemple, alors qu'en France une exception est faite pour les masses inférieures à 100 g/an d'ENPs, en Belgique les ENPs utilisées comme pigment sont également exemptées. Plus surprenant, au Danemark, la liste des produits non concernés est beaucoup plus importante : produits alimentaires et matériaux en contact avec les aliments, aliments pour animaux, médicaments, produits cosmétiques, pesticides, déchets, pigments et encres, textiles, peintures, colles, caoutchouc (usage du noir de carbone) et usage privé. Malgré cela, concernant l'Union Européenne, Mitrano et *al.* (2015)⁴⁹ ont estimé la production annuelle de différentes ENPs (Figure 10). Celle-ci s'avère être en accord avec le tonnage approximatif croissant donné par Hochella et *al.* (2019)³⁴, à savoir le TiO₂, le SiO₂, le ZnO, l'Ag puis les nanotubes et graphènes de carbone. Toujours d'après Hochella et *al.* (2019)³⁴, les experts estiment que jusqu'à 0,3 Tg d'ENPs pénètrent chaque année dans les réservoirs naturels et artificiels (Figure 9). Très récemment, Zhao et *al.* (2021)⁵⁰ ont synthétisé les résultats d'une quinzaine d'études sur quatre types d'ENPs dans différents compartiments. La Figure 11 présente les concentrations environnementales prédites dans les eaux de surface. Malgré une forte disparité, il est clairement exposé qu'en moyenne (trait orange horizontal), le TiO₂ représente la principale source d'ENPs dans le monde.

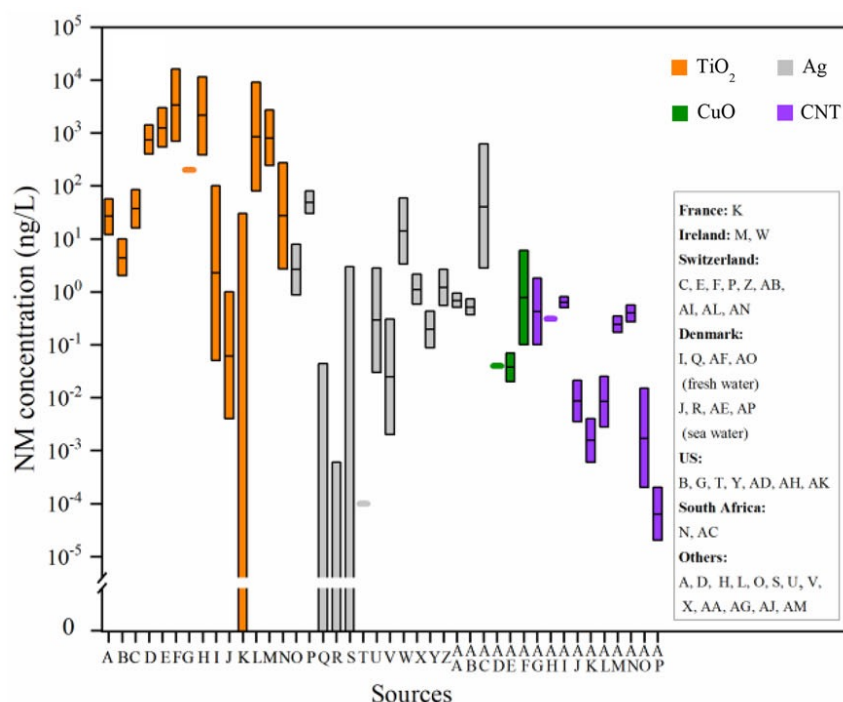


Figure 11: Boîtes à moustaches pour les concentrations environnementales modélisées de TiO₂, Ag, CuO et NM à base de carbone dans l'eau. Le trait gras horizontal représente la concentration moyenne par type d'ENPs (de Zhao et al. (2021))⁵⁰

^d <https://www.r-nano.fr>

^e <https://euon.echa.europa.eu/fr/national-reporting-schemes>

5. Le comportement et la transformation des NPs en milieu naturel.

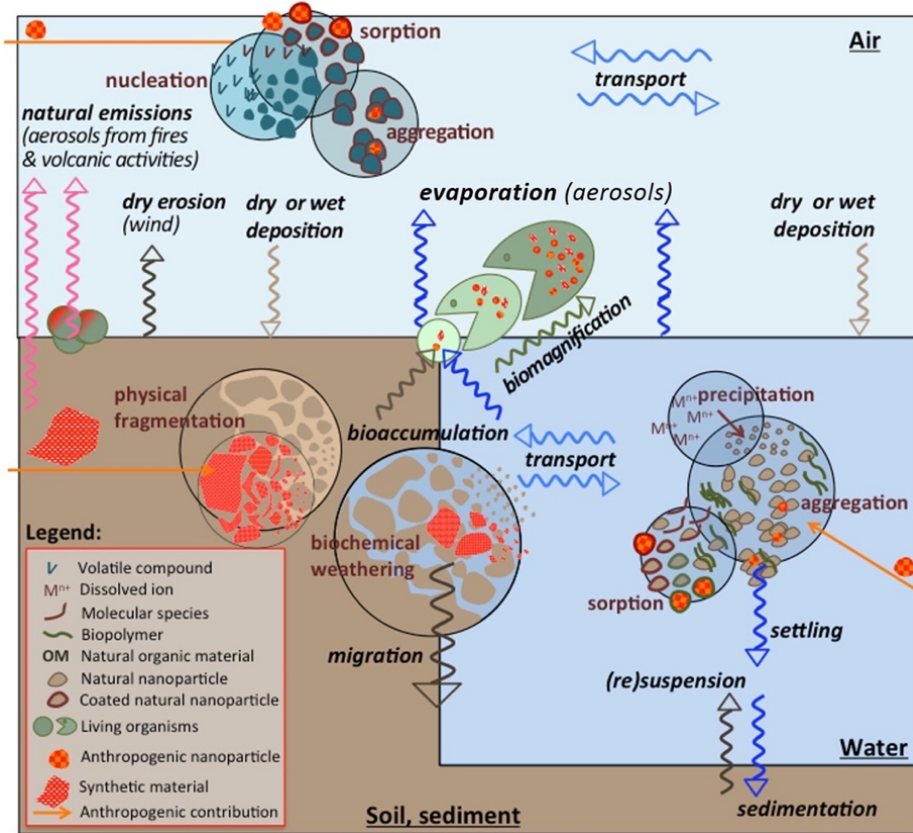


Figure 12: Les NPs dans les compartiments environnementaux (en gras souligné). Les processus régissant leur répartition entre les compartiments environnementaux (en italique), leur formation et leur transformation (en cercles). Les ANPs (en rouge) issus de macroscopiques ou de nanomatériaux, une fois libérés dans l'environnement participent aux mêmes processus de distribution et de transformation (de Lespes et al. (2020))⁵¹

Les NPs sont donc depuis toujours produites au sein de la zone critique comme par exemple au cours d'éruptions volcaniques générant des NNPs. D'après les chiffres exposés dans la section précédente, il apparaît de façon évidente que les flux globaux nanoparticulaires semblent majoritairement dominés par ceux des NNPs. Cependant, Lespes et al. (2020)⁵¹ attirent l'attention sur le fait qu'au sein de la zone critique, les vraies NNPs ne sont peut-être pas si nombreuses. En effet, l'exploitation de la zone critique par l'être humain est de plus en plus étendue. Il est donc fort probable que les NPs dites naturelles comportent en réalité une signature anthropique, notamment après interaction avec des contaminants (in)organiques rejetés dans les milieux (eaux, sols, air). Cela conférerait aux NPs initialement naturelles de nouvelles propriétés et, par conséquent, un comportement et un impact biogéochimique distincts⁵¹. Il en est de même pour les ANPs qu'elles soient accidentelles ou manufacturées. En effet, la présence dans les milieux environnementaux et biologiques d'espèces naturelles telles que la matière organique naturelle peut impliquer une modification des ANPs²⁵. De ce fait et malgré la provenance anthropique de ces NPs, elles acquièrent une signature naturelle qui risque de fortement bouleverser leur comportement et leur impact. La Figure 12 extraite de Lespes et al. (2020)

⁵¹ résume les processus pouvant gouverner le comportement des NPs au sein des compartiments de la zone critique. Il apparaît clairement que leur transformation et donc leur comportement peut varier en fonction de la présence d'autres contaminants, de composés naturels voire d'une combinaison des deux. De nombreuses études visent à expliquer et prédire la transformation et le comportement des NPs dans les milieux naturels à l'aide d'expérience en laboratoire. Bien que l'échelle nanométrique touche à l'infiniment petit, les définitions des colloïdes (1 à 1000 nm) et des nanoparticules (1 à 100 nm) couvrent une large plage qui cache une grande complexité de par les différences de taille, structure, composition, morphologie...^{41, 52}. Une telle complexité implique inévitablement une différence de comportement de ces NPs (ou colloïdes).

D'après une synthèse publiée par Louie et al. (2014)⁵³, les transformations susceptibles d'affecter les NPs dispersées dans l'environnement sont résumées de la façon suivante :

- *Transformations chimiques* : phénomènes de dissolution, de complexation et/ou d'oxydo-réduction (Figure 13 a).
- *Transformations physiques* : phénomènes d'agrégation – désagrégation (Figure 13 b) et/ou d'interactions avec des macromolécules organiques (Figure 13 d)
- *Transformations biologiques* : interaction avec des biofilms (Figure 13 c).

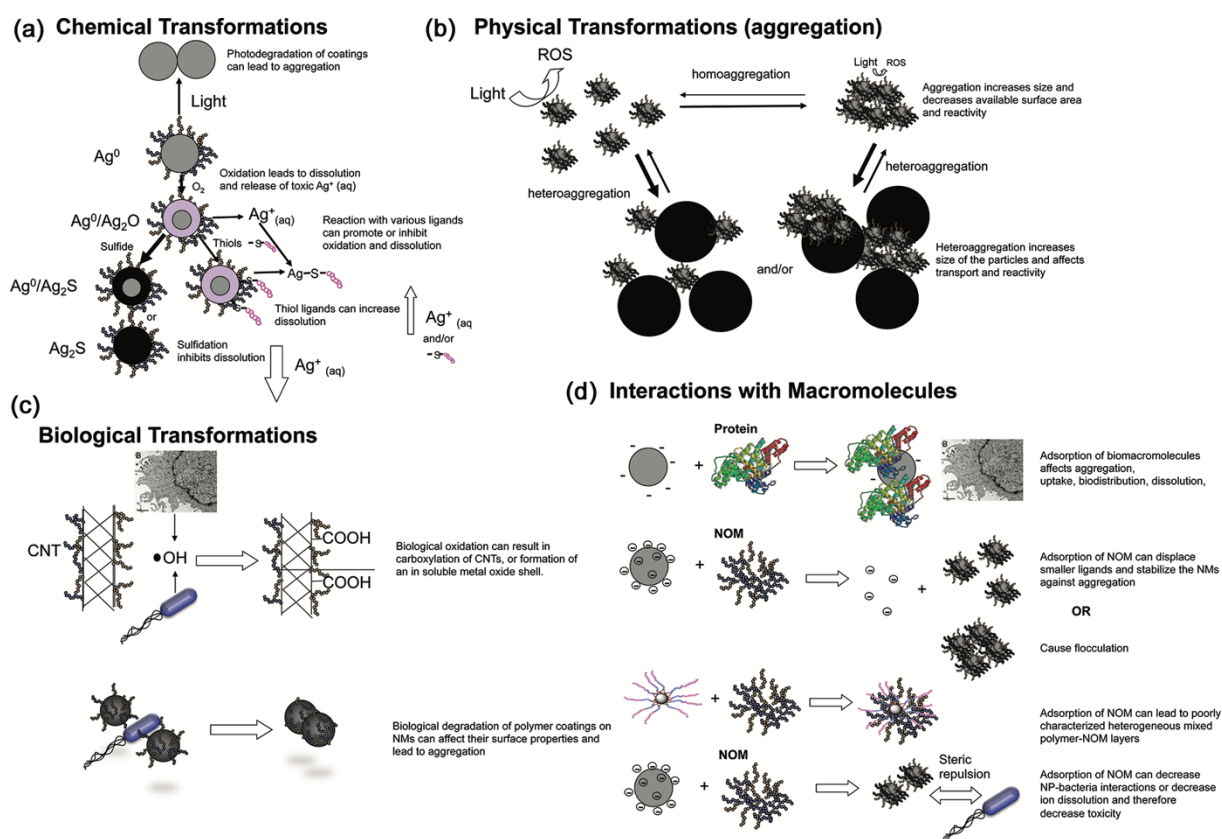


Figure 13: Exemples de transformation (a) chimique, (b et d) physique et (c) biologique des NPs dans les systèmes aquatiques (de Lowry et al. (2012))²⁵

La première de ces transformations implique donc plusieurs phénomènes. Les NPs constituées d'ETM tels que l'argent, le zinc, le cuivre... y sont particulièrement exposées. En effet, ces ETM sont les plus susceptibles de former des oxydes métalliques partiellement solubles. A la suite de cette mise en solution, ces ETM peuvent être complexés s'ils présentent une forte affinité pour les ligands (in)organiques. A l'inverse, certains ligands limitent l'oxydation et donc la dissolution de ces NPs par la formation d'une enveloppe métal-ligand. D'autres types de NPs telles que celles composées de fer, manganèse, cérium... sont quant à elles exposées aux réactions d'oxydo-réduction du fait que leur(s) élément(s) constitutifs présentent plusieurs états d'oxydation (Fe(0)/Fe(II)/Fe(III), Ce(III)/Ce(IV)...). Les conséquences de l'oxydation de NPs métalliques sont notamment la formation d'une enveloppe d'oxyde métallique ou bien une dissolution totale ou partielle des NPs influençant ainsi la biogéochimie de l'ETM en question.

Des phénomènes potentiellement réversibles d'agrégation/désagrégation entrent en jeu dans le deuxième type de transformation. Ce type d'assemblage/désassemblage de NPs est lié à une interaction des NPs entre elles appelée *homo-agrégation* ou avec des particules de nature différente appelée *hétéro-agrégation*. Le plus généralement, au sein des écosystèmes aquatiques, il est peu probable que l'homo-agrégation contrôle les interactions entre particules car les colloïdes naturels sont généralement présents dans des concentrations de plusieurs ordres de grandeur supérieures aux NPs⁵⁴. Dans les deux cas, la réactivité des NPs décroît du fait de la diminution de leur surface spécifique. L'augmentation de la masse liée à l'agrégation joue quant à elle un rôle dans le transport des NPs. Initialement, du fait de leur faible masse le transport des NPs est gouverné par le mouvement brownien^f. En s'agrégeant, les NPs sont en proie à une sédimentation plus rapide limitant leur temps de résidence dans l'eau. L'accumulation des agrégats dans les sédiments est en revanche plus importante. L'adsorption de molécules de poids moléculaire élevé, ou *macromolécules*, en surface des NPs est également impliqué dans les transformations physiques des NPs. Ces macromolécules ont la capacité d'altérer les propriétés de surface des NPs entraînant une modification du comportement des NPs dans les écosystèmes aquatiques⁵⁵. A titre d'exemple, en interagissant avec la matière organique naturelle les NPs sont stabilisées et sont ainsi moins soumises aux phénomènes d'agrégation. *A contrario*, cette interaction NPs – macromolécules peut engendrer une floculation et de ce fait une sédimentation des agrégats.

La troisième transformation possible met en jeu les organismes vivants (biofilms) présents dans les écosystèmes aquatiques. Ces transformations sont donc légèrement à la marge du cadre de cette thèse. Il est cependant important de noter que ces transformations se déroulent en surface ou directement dans les cellules. À l'instar des transformations physiques, en surface, les bactéries peuvent dégrader les enveloppes organiques des NPs et engendrer l'agrégation puis la sédimentation des agrégats. En interne, les conditions physico-chimiques (pH, force ionique...) particulières sont à l'origine de la dissolution

^f Mouvement aléatoire d'une particule dans un fluide sans aucune autre interaction qu'avec les molécules de ce fluide

des NPs les plus solubles (ZnO par exemple) ou de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) suite à l'internalisation de petites NPs non soluble (TiO₂)⁵⁶.

En complément, il est important de noter que l'ensemble de ces transformations et des phénomènes impliqués sont influencés par les conditions physico-chimiques du milieu et sont en réalité partiellement liés entre eux. La dégradation de certaines enveloppes organiques nécessaires à la stabilisation des ENPs peut par exemple être entraînées par l'action du rayonnement solaire. Cela favorise ensuite l'agrégation et donc la sédimentation de ces agrégats⁵⁷. Dans d'autres cas, l'adsorption de macromolécules à la surface des NPs peut engendrer une oxydation de celles-ci, entraînant une dissolution⁵⁵.

Comme l'ont démontré Louie et *al.* (2014)⁵³, ces informations sont nécessaires pour permettre la compréhension de la dynamique des NPs. Cependant, la diversité des NPs ainsi que les échelles de concentration, de temps et d'espace étant peu prises en compte dans ces expériences de laboratoire, l'extrapolation des résultats aux milieux naturels est limitée. Les conditions physico-chimiques et la quantité d'autres composés anthropiques et espèces naturelles sont amenées à varier en fonction du temps et de la zone étudiée. Les eaux de surfaces sont par exemple des milieux préférentiellement oxydants tandis que les eaux souterraines où la quantité d'O₂ est faible sont essentiellement des environnements réducteurs²⁵. Également, il existe une multitude de macromolécules pouvant affecter la transformation des NPs dans les écosystèmes aquatiques²⁵. Tout ceci augmente donc l'hétérogénéité de la nature des NPs dont les tailles, propriétés et réactivités vont être différentes des NPs initialement dispersées dans l'environnement.

Également, bien que les outils prédictifs mentionnés plus haut soient une 1^{ère} approche pour estimer les concentrations en NPs, ils se limitent principalement à l'étude des risques et ne fournissent aucune information sur le comportement et/ou la transformation des NPs.

Il convient donc de comprendre les différentes façons dont les NPs interagissent et influencent les écosystèmes. À plus grande échelle, cela permet de mieux contraindre l'impact potentiel des NPs sur la biogéochimie de la zone critique. Pour y parvenir, l'accent doit être mis sur l'étude de leur transformation ainsi que sur la détermination de leurs concentration et caractéristiques (taille, morphologie, composition...) dans les différents réservoirs environnementaux. Cela implique entre autres le développement et l'utilisation de techniques analytiques *ad hoc*.

6. Les outils analytiques

Tableau 1: Liste non-exhaustive des techniques analytiques disponibles pour la caractérisation des NPs dans des échantillons naturels sous forme liquide. D_{Min} et $Conc.Min$ représente respectivement le diamètre et la concentration minimum détectable. N.A. signifie « non applicable ». Les références utilisées présentes des études en lien avec l'analyse des NPs dans des écosystèmes naturels ou artificiels.

[#] D_{Min} et $Conc.Min$ ainsi que les informations extraites varient en fonction du système de séparation couplé. Parmi ceux-ci, on peut par exemple trouver le FFF et l'HDC ⁵⁸.

* D_{Min} et $Conc.Min$ ainsi que les informations extraites varient en fonction du système de détection couplé. Parmi ceux-ci, on peut par exemple trouver l'UV-Visible, le MALS et l'ICP-MS ⁵⁸.

Technique	Acronyme	D_{Min}	$Conc.Min$	Information	Réf.
Microscopie électronique					
• à transmission	TEM	1-5 nm	N.A.	- Distribution en taille	59-61
• à balayage	SEM			- Forme - Structure chimique / cristalline (+ EELS / SAED) - Composition (+EDX)	
Spectrométrie					
• optique / de masse à source plasma	ICP-OES/MS	N.A.	$\mu\text{g L}^{-1}$ - ng L^{-1}	- Concentration massique NPs couplage à une extraction au point trouble (CPE) ou à une ultrafiltration ($\leq 10\text{kDa}$)	62-64
• de masse à source plasma en mode particule unique	spICP-MS	5-10 nm	ng L^{-1}	- Concentration massique totale vs ionique vs NPs - Distribution en masse (et/ou taille) - Concentration en nombre - Composition élémentaire	65-70
Diffusion de la lumière					
• suivi individuel de NP	NTA	5-10 nm	$\mu\text{g L}^{-1}$	- Distribution en taille (diamètre hydrodynamique)	71-73
• dynamique	DLS				
• multi-angle [#]	MALS			- Concentration en nombre	
Techniques séparatives *					
• fractionnement flux-force	FFF	1-5 nm	$\mu\text{g L}^{-1}$	- Concentration massique totale vs NPs vs ionique (complexé pour FFF)	73-76
• électrophorèse capillaire	EC				
• chromatographie hydrodynamique	HDC			- Distribution en masse (et/ou taille) - Concentration en nombre	

Actuellement, les techniques analytiques à disposition (Tableau 1) permettent d'accéder à des informations différentes mais complémentaires ⁷⁷. Cependant, leur application à des échantillons naturels complexes avec des concentrations en NPs relativement faibles peut s'avérer laborieuse dans certains cas ⁷⁸. La présence de composés naturels ou artificiels de différentes natures peut également affecter les résultats ⁷⁹. En s'appuyant sur les points forts des techniques, le défi actuel pour les chercheurs est donc de développer des approches innovantes pour la détection, la caractérisation et la quantification des NPs dans l'environnement. A ce jour, aucune des techniques analytiques existantes ne permet d'avoir accès à la totalité des informations fondamentales. De ce fait, la communauté scientifique convient que les études en lien avec le devenir et le comportement des NPs au sein des réservoirs environnementaux doivent être réalisées à l'aide de plusieurs outils techniques ^{77, 78}.

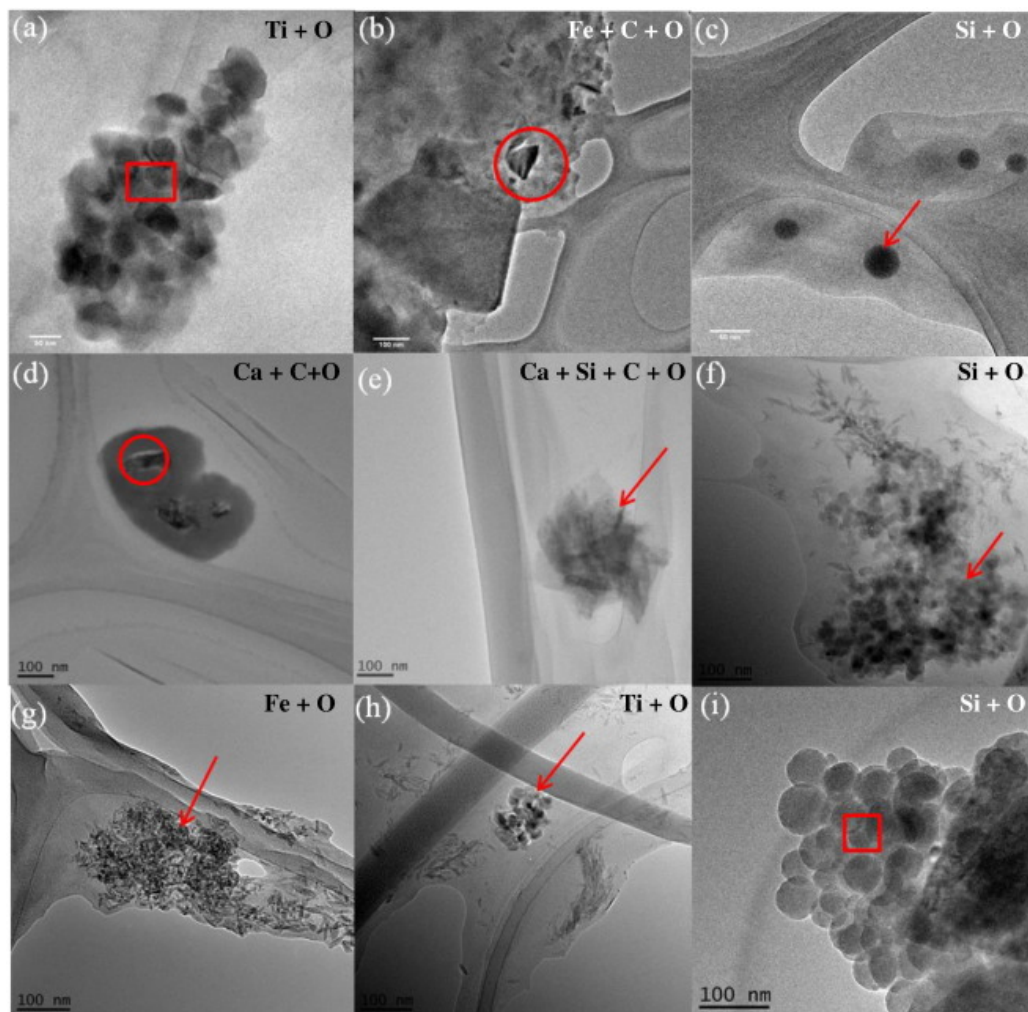


Figure 14: Caractérisation par microscopie électronique à transmission (TEM) et spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX) sur des nanoparticules extraites des eaux environnementales : (a) TiO_2 à Salt River, (b) nanoparticule de type carbonate de fer à Verde River, (c) SiO_2 dans le canal Tempe, (d) nanoparticule de type CaCO_3 dans l'affluent d'une STEP, (e) nanoparticule de type CaO et SiO_2 dans l'affluent d'une STEP, (f) SiO_2 amorphe dans l'affluent d'une STEP, (g) nanoparticule d'oxyde de fer dans l'affluent d'une STEP, (h) TiO_2 dans l'affluent d'une STEP, et (i) nano SiO_2 dans l'effluent d'une STEP. La barre d'échelle représente 100 nm dans toutes les images sauf les images a et c (50 nm). La zone avec le cercle/rectangulaire/flèche rouge est l'endroit où l'EDX a été réalisé, et les principaux éléments détectés par l'EDX sont présentés sur chaque image (de Yang et al. (2017))⁵⁹

Depuis plusieurs années, une des approches multi-techniques les plus citées pour l'analyse de NPs dans échantillons environnementaux et/ou biologiques combine l'utilisation de la *microscopie électronique à transmission* (TEM) ou à balayage (SEM) et de la *spectrométrie de masse à source plasma en mode particule unique* (spICP-MS)⁶¹. Petersen et al. (2019) ont d'ailleurs démontré dans une inter-comparaison multi-technique que ces deux techniques fournissent les résultats les plus justes et précis pour des Au-NPs certifiées⁸⁰. La 1^{ère} technique citée offre une information tout d'abord visuelle^g, permettant aux chercheur.e.s d'observer les NPs et certains autres composants de l'échantillon (matière organique naturelle). Comme le montre la Figure 14, elle permet également de déterminer leur taille, leur morphologie et leur potentielle transformation⁵⁹. En complément, cette observation, couplée à des analyses spectroscopiques plus poussées telles que la spectroscopie à dispersion d'énergie (EDX), la spectroscopie de perte d'énergie des électrons (EELS) et la diffraction d'électrons en aire sélectionnée (SAED), donnera respectivement accès à la composition et la structure chimique ainsi qu'à la structure cristalline des NPs. Cependant, pour la détermination de la distribution granulométrique (voire la composition élémentaire individuelle des NPs), bien qu'il existe des logiciels de traitement d'images automatisé tels que ImageJ (<https://imagej.net>), ce type d'analyse peut s'avérer fastidieux car il est nécessaire de multiplier les observations. En effet, à des concentrations environnementales relativement faibles, les temps d'observation peuvent être très longs (de l'ordre de plusieurs dizaines de minutes). C'est pour ces raisons que les observations TEM sont généralement combinées avec la spICP-MS qui offre la possibilité de déterminer plus facilement et rapidement certaines caractéristiques des NPs telles que leur concentration en nombre, leur distribution granulométrique et leur composition (multi-)élémentaire⁸¹. Comparée aux techniques de diffusion de la lumière de type dynamique (DLS, NTA) ou multi-angle (MALS) couplées ou non aux techniques séparatives telles que le fractionnement par couplage flux-force (FFF), cette 2^{nde} technique présente notamment l'avantage de permettre d'atteindre des concentrations plus faibles. Il est également possible de citer la cadence d'analyse plus élevée (de l'ordre de plusieurs dizaines d'échantillons par heure) de la spICP-MS. Elle s'appuie notamment sur la robustesse, la sélectivité et la sensibilité de la spectrométrie de masse à source plasma (ICP-MS)^{82, 83}. Ainsi, en mode particule unique, ces caractéristiques en font une des techniques les plus adaptées pour la détection, la caractérisation et la quantification des NPs dans des échantillons naturels complexes⁴⁴, de même que pour le suivi de l'évolution spatio-temporelle des caractéristiques des NPs dans ces milieux⁸⁴.

^g L'œil étant un des meilleurs détecteurs qui soient. De plus, d'après Jiddu Krishnamurti, sage et penseur indien (1895 – 1986) : *L'art de voir est la seule vérité* (L'Eveil de l'intelligence (1975))

7. La spectrométrie de masse à source plasma en mode particule unique (spICP-MS)

7.1. Historique

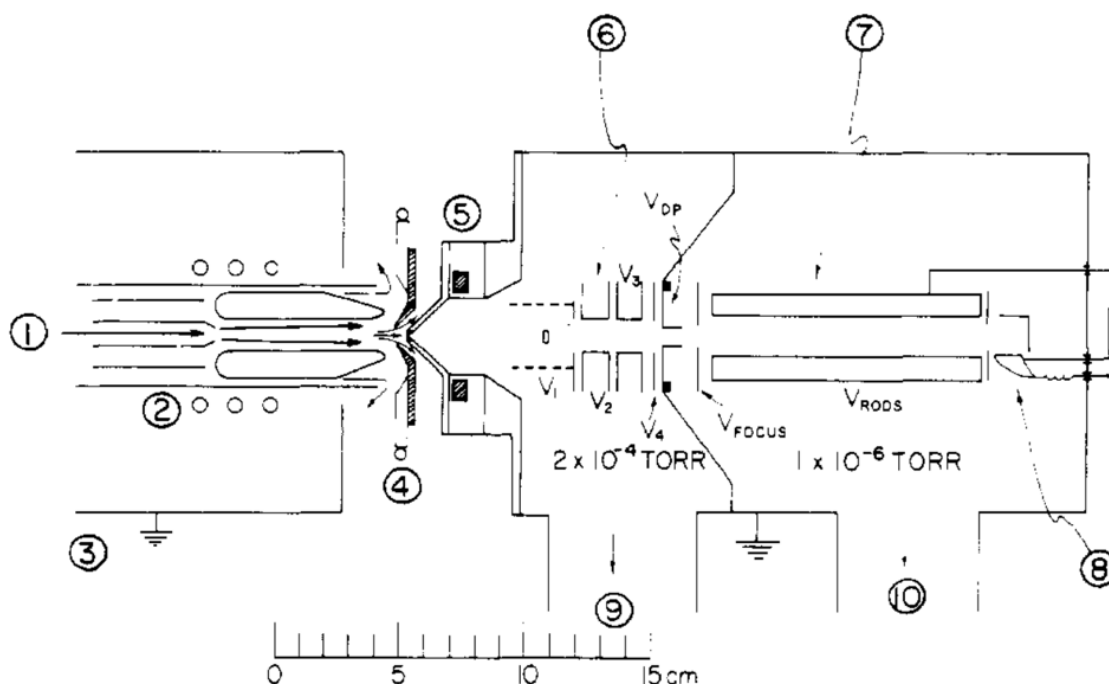


Figure 15: Schéma d'une source plasma (ICP), de l'interface d'échantillonnage d'ions et du système de vide : (1) aérosol d'analyte provenant du nébuliseur ; (2) torche ICP et bobine de charge ; (3) électrode de garde ; (4) cône échantillonneur ; (5) cône écréteur ; (6) ensemble de lentilles ioniques électrostatiques ; (7) analyseur en masse de type quadripolaire ; (8) multiplicateur d'électrons ; (9) et (10) orifice de pompage (de Houk et al. (1980))⁸⁵

La spectrométrie de masse à couplage plasma inductif (ou à source plasma) – ICP-MS – a vu le jour au tout début des années 1980⁸⁵. À l'origine utilisées pour la spectroscopie d'émission atomique (AES), les sources plasma couplées à la spectrométrie de masse ont petit à petit montré leur efficacité. Au cours des 40 dernières années, l'ionisation (et l'analyse) des éléments chimiques a notamment été utilisée dans le cadre de très nombreuses et diverses applications⁸⁶⁻⁸⁸. Particulièrement en raison de ses limites de détection basses et de ses véritables capacités multi-élémentaires⁸⁹, l'ICP-MS s'est imposée comme un instrument indispensable au sein de la communauté scientifique, notamment pour l'analyse d'éléments traces en solution⁹⁰. De plus, les sources plasma sont suffisamment résistantes pour recevoir des solutions très complexes et ce malgré la potentielle formation d'interférences. Ceci permet donc l'analyse directe de concentrations élémentaires dans des matrices dites chargées^{91,92}.

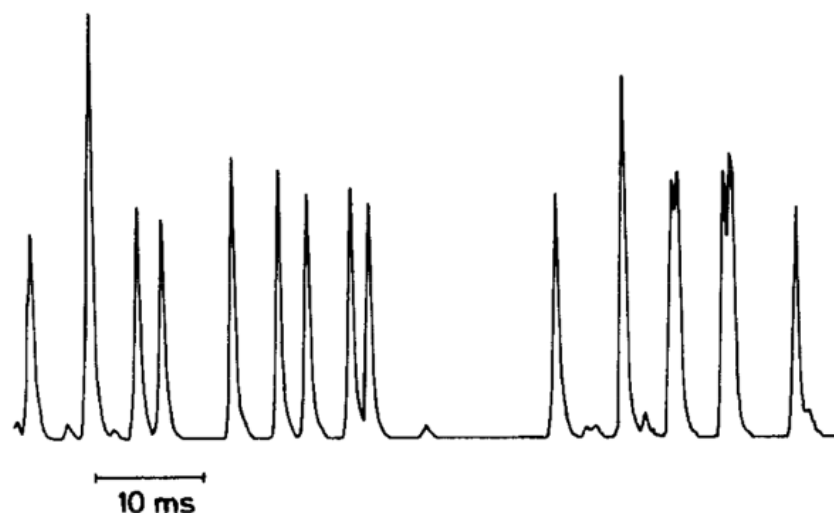


Figure 16: Oscillogrammes de la raie d'émission Ca II à 393,36 nm obtenue en introduisant un aérosol de chlorure de calcium monodispersé dans une source plasma (de Kawaguchi et al. (1986))⁹³

L'histoire et l'évolution de la détection et de la quantification des particules par spectrométrie de masse est corrélée à l'évolution des sources plasma, mais aussi au besoin des sciences de l'atmosphère de caractériser individuellement des particules dans les aérosols. Dans un article publié en 1986, Kawaguchi et al. (1986)⁹³ ont, pour la 1^{ère} fois, utilisé une source plasma pour l'excitation de particules de taille micrométrique générées après la désolvatation de gouttelettes monodispersées de composés inorganiques solubles (NaCl, Ca(NO₃)₂ et Cu(NO₃)₂). L'enregistrement des signaux a été réalisé à l'aide d'un oscilloscope numérique à la fréquence de 1 kHz (équivalent à un temps d'intégration de 1 ms) de manière à distinguer les particules individuellement (Figure 16). A la fin des années 1980, d'autres études⁹⁴ ont montré qu'il était possible de déterminer la distribution granulométrique de particules sub-microniques par spectrométrie d'émission optique à source plasma – ICP-OES. Puis, au cours des années 1990, l'avènement des ICP-MS avec de meilleures limites de détection (LD) comparées à l'ICP-AES, a poussé Kawaguchi et ses collaborateurs à réaliser d'autres travaux⁹⁵⁻⁹⁷. Au cours de ces derniers, des aérosols de compositions diverses (notamment Zn et Pb) ont été caractérisés à des teneurs de l'ordre du femtogramme par particules atteignant ainsi des LD quinze fois plus faibles qu'en ICP-OES. Ce n'est qu'au cours des années 2000, que Degueldre et ses collaborateurs ont appliqué cette analyse particule par particule sur des suspensions colloïdales modèles (Th, Zr, U et Au)⁹⁸⁻¹⁰¹ mais également sur des échantillons naturels¹⁰² à des concentrations en nombre de l'ordre de 10⁵-10⁶ particules mL⁻¹. Ces études ont ainsi établi les bases de la spectrométrie de masse à source plasma en mode particule unique – *spICP-MS* – et mis en évidence qu'elle était une alternative ou un complément à l'observation microscopique. Depuis, certaines études ont permis d'assoir la méthodologie¹⁰³⁻¹⁰⁵. Par la suite, la *spICP-MS* s'est avérée être un outil puissant pour un grand nombre d'applications dans les domaines biologiques¹⁰⁶, environnementaux¹⁰⁷ et/ou de santé publique¹⁰⁸ (avec ou sans prétraitement de la matrice). A ce jour, le nombre total d'études faisant mention de la *spICP-MS* a augmenté de manière exponentielle,

démontrant ainsi l'utilité d'une telle méthodologie pour la caractérisation des NPs. De plus, plusieurs normes telles que l'ISO/TS 19590:2017 et rapports gouvernementaux comme celui de l'US-EPA^{109,110}, ont vu le jour depuis une dizaine d'année afin de tenter d'harmoniser l'utilisation de la spICP-MS.

7.2. Limitations

La spICP-MS, en s'appuyant sur la robustesse, la sélectivité, la rapidité et la sensibilité de la spectrométrie de masse à source plasma (ICP-MS), a donc la capacité de surmonter les effets de matrice tout en minimisant le pré-traitement de l'échantillon (dans le cas d'échantillons aqueux). Elle permet également de fournir une information relativement complète concernant la taille des NPs et leur distribution granulométrique ainsi que la concentration de l'analyte présent sous forme dissoute et (nano-)particulaire dans l'échantillon. Parmi toutes les études mentionnées précédemment, un nombre important concerne la détection, la caractérisation et la quantification des NPs dans des milieux naturels complexes¹¹¹⁻¹¹³. Une autre partie est, quant à elle, focalisée sur des développements métrologiques et analytiques nécessaires au perfectionnement de toutes techniques analytiques¹¹⁴⁻¹¹⁸. Cependant, bien que de nombreux progrès aient été fait depuis les prémices de la spICP-MS, la récente littérature fait encore état de quelques limitations. Aux côtés du principe de la technique (développé ici dans le prochain chapitre *Matériel et méthodes*) et de ces points forts (mentionnés plus haut), ces limitations ont récemment été récapitulées dans deux revues synthétiques^{119,120}. En s'appuyant sur ces deux synthèses plutôt focalisées sur les ENPs et en les transposant aux systèmes naturels visés ainsi qu'aux NPs ciblées (à la fois anthropiques et naturelles), il est encore possible et souhaitable d'améliorer la méthodologie de la spICP-MS. En effet, bien que celle-ci soit très prometteuse pour la caractérisation des NPs, dans certains cas la taille minimum détectable est encore trop élevée (> 20 nm) pour combler entièrement l'écart entre l'élément dissous et l'élément sous forme « nanoparticulaire ». L'évolution de l'échantillon au cours du temps est également une question importante. En effet, les échantillons naturels provenant d'un environnement dynamique, les changements d'état d'agrégation/d'agglomération dus à la préparation (incluant souvent la sonication, modifiant ainsi considérablement celui-ci), le stockage et l'étape d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse doivent être pris en compte. Cette dernière étape est à considérer d'autant plus sérieusement qu'elle implique généralement une perte en nombre d'atomes/d'ions et de NPs plus ou moins importante suivant le système utilisé. Ces pertes, quantifiées par des calculs d'efficacité sur des ENPs de référence en milieu aqueux simple (voir le prochain chapitre *Matériel et méthodes* pour plus de détails), sont ensuite appliquées aux échantillons naturels complexes pour recalculer les tailles, distributions granulométrique et concentrations en nombre des NPs. Ceci suppose donc que tous les types de NPs dans tous les types de matrices se comportent à l'identique durant l'analyse. Or, les effets liés à la matrice naturelle complexe, préalablement mentionnés et bien connus en ICP-MS, peuvent affecter l'introduction de l'échantillon et la mesure qui en découle. Enfin à ce jour, les ICP-MS les plus communément utilisés, sont basées sur l'enregistrement

du signal d'un seul élément. Ainsi, dans un système naturel, il est très compliqué de tirer des conclusions sur la composition ou bien la transformation des NPs. Plus marginalement, des ICP-MS à temps de vol (ICP-ToF-MS) sont utilisés pour la mesure spICP-MS¹²¹⁻¹²³. Il a été prouvé que ces instruments ont la capacité d'enregistrer simultanément le signal de multiples éléments constitutifs des NPs, rendant l'information beaucoup plus juste et complète. Cependant, en contrepartie, le traitement statistique des signaux multi-élémentaires s'avère être plus délicat.

Dans une étude antérieure aux deux préalablement citées, Montoro Bustos et *al.* (2015)¹²⁴ concluent suite à une comparaison inter-laboratoire multi-techniques, que dans l'ensemble, des améliorations sur la méthodologie spICP-MS sont hautement souhaitables. Ils résumant celles-ci en 3 points essentielles :

- la réduction de la limite de détection de la taille des NPs
- la mise en œuvre de nouveaux outils logiciels pour un traitement plus automatisé des données
- la détermination plus robuste des pertes liées à l'introduction.

Sur ce dernier point, Mozhayeva et *al.* (2019)¹²⁰ encouragent les recherches futures dans le domaine de l'introduction des échantillons pour la spICP-MS, soit de manière autonome soit interfacée avec des méthodes de séparation (par exemple couplage chromatographie – spICP-MS¹²⁵), dans l'ultime but de réaliser une mesure robuste, dynamique et reproductible particule par particule.

8. Le cadre et les objectifs de la thèse

L'illustration des avantages et des inconvénients de l'application de la spICP-MS aux systèmes naturels peut être faite en faisant une critique objective de quatre articles récemment publiés par notre équipe. Ces études portent sur le questionnement de l'origine, du devenir, du comportement et du flux de NPs dans divers bassins versants à des échelles d'espaces et de temps différentes. Les deux études de Wang *et al.* (2020)⁸⁴ et (2022)¹²⁶ se focalisent sur trois ruisseaux de la région parisienne affectés par différents types d'utilisation des sols (agricole, forestier et urbain). L'observation s'est faite en un point de prélèvement par ruisseau et s'est étalée sur une année. Les NPs contenant de l'argent puis celles contenant du titane ont respectivement été ciblées. A l'inverse, Phalyvong *et al.* (2020)⁴⁴ et (2021)¹²⁷ ont respectivement mené leurs études sur de plus grands bassins versants, à savoir la Loire aux alentours d'Orléans et sur la Seine et trois de ces affluents (La Marne, l'Oise et l'Orge) aux alentours de Paris. L'échantillonnage de ces fleuves et rivières a été fait en une journée sur plusieurs localisations. Au cours de ces deux études, l'attention s'est portée sur les NPs contenant du cérium ou du titane.

Les isotopes sélectionnés pour les mesures spICP-MS sont les suivants : ⁴⁷Ti, ¹⁰⁷Ag and ¹⁴⁰Ce. Les deux derniers ne présentent pas particulièrement de challenge analytique du fait qu'il s'agit de l'isotope majoritaire et que celui-ci n'est pas affecté par un autre élément/isotope. De plus, leur énergie de 1^{ère} ionisation étant relativement faible en comparaison avec le gaz servant à l'ionisation (Argon), le signal qu'ils produisent est donc élevé. Par conséquent, la masse théorique la plus faible pouvant être détectée pour ces deux éléments est très basse. A titre d'exemple, Phalyvong *et al.* (2020)⁴⁴ mentionnent le fait qu'en convertissant le signal de ¹⁴⁰Ce en un équivalent sphérique de CeO₂, la taille minimum détectable est d'environ 5 nm. En comparaison, Lee *et al.* (2014)¹²⁸ rapportent que la taille minimum détectable en CeO₂ sur des ICP-MS de type quadripolaires réputés moins sensibles est d'environ 20 nm. *A contrario*, le titane est un élément relativement ardu à mesurer, notamment dans les systèmes aquatiques. Le signal de son isotope majoritaire, le ⁴⁸Ti, est en effet affecté par le signal du ⁴⁸Ca souvent présent dans des quantités élevées (de l'ordre de plusieurs dizaines de μmol L⁻¹)¹²⁹. Les scientifiques menant des études sur les Ti-NPs en milieu naturel par spICP-MS se tournent donc généralement vers un isotope minoritaire, le ⁴⁷Ti¹¹³ ou le ⁴⁹Ti¹¹². Cela a pour effet de diminuer le signal généré, ce qui engendre une augmentation de la taille minimum théoriquement détectable. Phalyvong *et al.* (2021)¹²⁷ reportent par exemple une taille minimum théorique en équivalent sphérique de TiO₂ de l'ordre de 60 nm. Bien que plus faible que celles reportées dans de précédentes études^{111, 112}, cette limite élevée empêche de mesurer l'entière de la distribution granulométrique des NPs. Dans une étude portant sur les TiO₂-NPs dans le Danube, Gondikas *et al.* (2014)¹¹³ ont volontairement exclus les distributions granulométriques de la discussion, préférant se focaliser sur le nombre de NPs. Or, les NPs les plus petites étant les plus réactives/toxiques, notamment en ce qui concerne le TiO₂¹³⁰, il est important de diminuer les limites de détection instrumentales.

En plus de la limite théorique liée à l'instrument utilisé, il existe une limite expérimentale liée à la concentration sous forme ionique de l'élément constitutif de la NPs. De manière à soustraire la composante du signal « ionique » au signal total afin d'en extraire le signal « nanoparticulaire », les quatre études mentionnées ont isolé la fraction ionique du reste de l'échantillon à l'aide d'une ultrafiltration. Cette étape réalisée sur une membrane de taille de pore $\leq 1\text{kDa}$ (environ 1,3 nm) permet en effet de retenir la quasi-totalité des NPs. Elle offre ainsi la possibilité de ne mesurer que le signal lié à l'ion en solution. Dans la littérature, ce signal est en majorité distingué du signal des NPs visuellement ou bien déterminé en se basant sur la limite théorique mentionnée plus haut. Ceci n'est donc pas représentatif de l'échantillon naturel. Il existe également d'autres méthodologies plus poussées et toutes sont détaillées dans le prochain chapitre *Matériel et méthodes*. Phalyvong *et al.* (2020)⁴⁴ et (2021)¹²⁷ utilisent le signal « ionique » de l'ultrafiltrat pour fixer un seuil. En deçà de ce seuil, les intensités mesurées sont considérées comme du signal « ionique » tandis que les intensités supérieures à celui-ci sont vues comme des signaux « nanoparticulaires ». Cependant, cela ne permet pas de faire ressortir les signaux « nanoparticulaires » relativement faibles confondu dans le signal « ionique ». Wang *et al.* (2020)⁸⁴ et (2022)¹²⁶ améliorent l'approche en soustrayant directement la distribution du signal « ionique » au signal total. De cette manière, la distribution du signal « nanoparticulaire » est obtenu. Cette méthode dite de « soustraction des histogrammes » permet d'extraire le signal des NPs les plus petites initialement mélangé au signal « ionique ». En comparaison avec d'autres études de terrain¹³¹ utilisant une approche différente pour faire la distinction ionique vs NPs, Wang *et al.* (2020)⁸⁴ et (2022)¹²⁶ trouvent des concentrations en Ag- et Ti-NPs jusqu'à cent fois supérieures. Bien que les zones étudiées soient différentes, il est mentionné qu'un des facteurs favorisant cet écart non-négligeable est la manière dont les signaux « ionique » et « nanoparticulaire » sont séparés. De ce fait, la séparation de ces deux distributions doit être réalisée de manière juste, robuste et reproductible afin de pouvoir comparer les résultats d'études sur les systèmes naturels.

La détermination des pertes liées au système d'introduction se fait généralement à l'aide de NPs modèles de taille connue⁸¹ (voir le prochain chapitre *Matériel et méthodes* pour plus de détails). Alors que Peters *et al.* (2018)¹³¹ et Wang *et al.* (2020)⁸⁴ et (2022)¹²⁶ déterminent ces pertes à l'aide d'une suspension d'Au-NPs de référence de taille nominale de 60 nm (NIST RM8013), Phalyvong *et al.* (2020)⁴⁴ et (2021)¹²⁷ utilisent une suspension d'Au-NPs de référence de taille nominale de 15 nm (BBI Solutions). A titre de comparaison, Azimzada *et al.* (2021)¹³² et Reed *et al.* (2017)¹¹² se servent de suspension d'Au-NPs de taille nominale respectivement de 30 nm (NanoComposix, AUXU30-1M) et 60 nm (BBI Solutions). Au même titre que les Au-NPs utilisées, les matrices dans lesquelles elles sont dispersées sont différentes. Peters *et al.* (2018)¹³¹, Azimzada *et al.* (2021)¹³² et Reed *et al.* (2017)¹¹² dispersent les Au-NPs dans de l'eau ultrapure. Phalyvong *et al.* (2020)⁴⁴ et (2021)¹²⁷ réalisent l'évaluation des pertes à l'aide d'un échantillon d'eau de Seine ultrafiltrée (500 Da) dans lequel ils dispersent les Au-NPs de référence tandis que Wang *et al.* (2020)⁸⁴ et (2022)¹²⁶ les calculent en dispersant les Au-NPs dans un ultrafiltrat de chacun des ruisseaux observés. Ces dernières études

assument donc que la taille et la composition des NPs ainsi que la matrice dans laquelle elles se trouvent n'a aucune influence sur les pertes dans le système d'introduction. La fiabilisation des analyses spICP-MS passe donc par l'injection des NPs directement dans le plasma. Cela représente un avantage conséquent afin d'éviter les hypothèses sur leur comportement dans le système d'introduction.

Les analyses spICP-MS sur les différents échantillons de l'équipe ont permis de montrer l'impact de l'être humain sur les concentrations en NPs en fonction des zones observées (zone de baignade, sortie de station d'épuration, exploitations des sols). Les questions sur l'origine et la transformation des NPs restent cependant en suspens. L'analyse spICP-MS a donc été couplée à de l'analyse en microscopie électronique à balayage (MEB), à des mesures des paramètres physico-chimiques (pH, carbone organique dissous...) mais aussi des concentrations élémentaires après minéralisation des échantillons. Dans le sous-bassin agricole, Wang *et al.* (2020)⁸⁴ exposent par exemple l'hypothèse de l'origine anthropique des Ag-NPs. Ils observent une corrélation entre leur concentration en nombre et la concentration totale en antimoine. Cette hypothèse s'appuie sur le fait qu'une étude précédente de Le Pape *et al.* (2012)¹³³ démontre le lien entre l'urbanisation et la concentration totale en Sb. Phalyvong *et al.* (2020)⁴⁴ et (2021)¹²⁷ font le lien entre les rapports élémentaire cérium – lanthane dans les échantillons et le nombre de Ce-NPs pour déterminer leur origine. Dans les sols et sédiments français Ce/La est environ égal à 2¹³⁴ et les zones échantillonnées sur la Loire présentent des rapports moyens de 2,1 ce qui ne permet pas de nier l'origine naturelle des Ce-NPs. Des exceptions sont observées avec les échantillons prélevés au niveau de la zone de baignade avec une augmentation de Ce/La jusqu'à 2,9. Cette augmentation significative combinée à celle de la concentration en Ce-NPs permet de faire l'hypothèse d'une origine anthropique dans la zone de baignade. Les rapports élémentaires semblent être la clé pour mieux contraindre l'origine voire les transformations des NPs. L'approche utilisée dans les études citées montre cependant des limitations lors de la distinction entre les NPs naturelles et anthropiques. La solution la plus prometteuse pour favoriser cette distinction est l'utilisation d'un ICP-MS à temps de vol (ICP-ToF-MS). Utilisé en mode particule unique, ce type de spectromètre de masse présente en effet l'avantage de pouvoir mesurer la composition élémentaire des NPs individuellement¹²¹.

Ainsi, après une description détaillée du matériel et des méthodes utilisés au cours de ces travaux, le Chapitre I est axé sur la mesure des TiO₂-NPs dans des matrices riches en calcium. Pour diminuer le signal « ionique » et ainsi améliorer les limites de détection (D_{min}), plusieurs approches expérimentales ont été testées *via* l'utilisation d'un HR-ICP-MS ou d'un ICP-MS/MS combiné à une cellule de réaction. Dans un second temps, une méthode de déconvolution développée par Cornelis et Hasselöv (2014)¹³⁵ est appliquée pour retirer le signal résiduel de l'interfèrent. Le présent Chapitre évalue enfin de manière critique les options utilisées pour éliminer les interférences, compare ces

approches à la mesure des isotopes traditionnels et propose la meilleure façon de quantifier et caractériser les TiO₂-NPs en présence de fortes concentrations de calcium.

Le Chapitre II propose l'utilisation d'un système d'injection directe des NPs *via* le μ -dDIHEN initialement présenté par Louvat et *al.* (2019) ¹³⁶. Tout d'abord l'efficacité de transport est déterminée à débit variable à l'aide d'une suspension d'Au-NPs de référence de 40 nm. Ensuite, les capacités analytiques uniques du μ -dDIHEN sont démontrées. Enfin, la justesse de la méthode est exposée pour des NPs de différentes tailles (de 10 à 80 nm) et compositions (Au-, Ag- et Pt-NPs) dans divers matrices complexes (échantillons environnementaux synthétiques et une eau de rivière).

L'objectif du Chapitre III est de fournir une méthodologie robuste pour le traitement des données spICP-MS. Cette étude se concentre tout d'abord sur le développement d'une procédure pour calculer directement et avec précision les efficacités de transport et de nébulisation à l'aide d'une méthodologie robuste. L'intérêt d'utiliser un algorithme d'apprentissage automatique tel que le modèle de mélange gaussien pour la détermination directe et robuste de la distribution de NP synthétique est ensuite démontré. La combinaison des deux approches est finalement utilisée pour le calcul des concentrations « ioniques » et « nanoparticulaires » dans un échantillon naturel.

Pour relever le défi de l'identification de l'origine des NP, le Chapitre IV se concentre d'abord sur le développement d'une méthodologie robuste et précise basée sur la mesure de NPs multi-métalliques modèles en utilisant la spICP-ToF-MS. Ensuite, une approche automatisé basée sur le clustering agglomératif hiérarchique est utilisée pour l'identification des populations de NPs ¹³⁷. Après avoir testé et approuvé cette méthodologie sur des NPs de composition connue, des analogues de NPs naturels (alumine et minéraux argileux) sont analysés et caractérisés. Les résultats présentés fournissent ainsi des informations pour de futures études sur l'origine et/ou la transformation des NPs dans l'environnement.

Afin de conclure cette thèse, les différents chapitres sont synthétisés et des pistes exploratoires à la fois analytiques et scientifiques sont proposées pour les futures études.

9. Bibliographie

1. M. H. Day and E. H. Wickens, *Nature*, 1980, **286**, 385-387.
2. W. Steffen, R. Leinfelder, J. Zalasiewicz, C. N. Waters, M. Williams, C. Summerhayes, A. D. Barnosky, A. Cearreta, P. Crutzen and M. Edgeworth, *Earth's Future*, 2016, **4**, 324-345.
3. C. N. Waters, J. Zalasiewicz, C. Summerhayes, A. D. Barnosky, C. Poirier, A. Gałuszka, A. Cearreta, M. Edgeworth, E. C. Ellis, M. Ellis, C. Jeandel, R. Leinfelder, J. R. McNeill, D. d. Richter, W. Steffen, J. Syvitski, D. Vidas, M. Wagemreich, M. Williams, A. Zhisheng, J. Grinevald, E. Odada, N. Oreskes and A. P. Wolfe, *Science*, 2016, **351**, aad2622.
4. M. Tanoue, Y. Hirabayashi and H. Ikeuchi, *Scientific Reports*, 2016, **6**, 36021.
5. M. J. Black, A. L. Borrión and O. Mwabonje, in *Life Cycle Assessment: A Metric for the Circular Economy*, The Royal Society of Chemistry, 2021, pp. 1-26.
6. A. Cerdà, I. N. Daliakopoulos, E. Terol, A. Novara, Y. Fatahi, E. Moradi, L. Salvati and M. Pulido, *Journal of Environmental Management*, 2021, **282**, 111965.
7. V. Roussiez, A. Probst and J.-L. Probst, *Journal of hydrology*, 2013, **499**, 71-81.
8. D. Pimentel, *Environment, Development and Sustainability*, 2006, **8**, 119-137.
9. J. Gaillardet, I. Braud, L. Gandois, A. Probst, J.-L. Probst, J. M. Sanchez-Pérez and S. Simeoni-Sauvage, *Vadose Zone Journal*, 2018, **17**, 1-24.
10. J. Minor, J. K. Pearl, M. L. Barnes, T. R. Colella, P. C. Murphy, S. Mann and G. A. Barron-Gafford, *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, 2020, **44**, 50-69.
11. J. Gaillardet, J. Viers and B. Dupré, *Treatise on Geochemistry*, 2003, **5**, 605.
12. M. Tytła, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, **16**, 2430.
13. D. Everett, *Pure Appl. Chem.*, 1972, **31**, 577-638.
14. J. Buffle and G. G. Leppard, *Environmental science & technology*, 1995, **29**, 2169-2175.
15. J. Buffle and G. Leppard, *Environmental science & technology*, 1995, **29**, 2176-2184.
16. C. Guéguen and J. Dominik, *Applied Geochemistry*, 2003, **18**, 457-470.
17. M. Baalousha, J. Lead, Y. Ju-Nam and P. Wilderer, *Treatise on water science*, 2011, **3**, 89-129.
18. M. F. Hochella, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2002, **66**, 735-743.
19. B. Lyvén, M. Hasselöv, D. R. Turner, C. Haraldsson and K. Andersson, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2003, **67**, 3791-3802.
20. E. Neubauer, F. von der Kammer, K.-H. Knorr, S. Peiffer, M. Reichert and T. Hofmann, *Chemical Geology*, 2013, **352**, 81-91.
21. M. A. Gomez-Gonzalez, M. Villalobos, J. F. Marco, J. Garcia-Guinea, E. Bolea, F. Laborda and F. Garrido, *Chemosphere*, 2018, **197**, 759-767.
22. J. Mayo, C. Yavuz, S. Yean, L. Cong, H. Shipley, W. Yu, J. Falkner, A. Kan, M. Tomson and V. Colvin, *Science and technology of advanced materials*, 2007, **8**, 71.

23. A. K. Singh, in *Engineered Nanoparticles*, ed. A. K. Singh, Academic Press, Boston, 2016, pp. 515-525.
24. N. S. Wigginton, K. L. Haus and M. F. Hochella Jr, *Journal of Environmental Monitoring*, 2007, **9**, 1306-1316.
25. G. V. Lowry, K. B. Gregory, S. C. Apte and J. R. Lead, *Environmental Science & Technology*, 2012, **46**, 6893-6899.
26. F. J. Heiligtag and M. Niederberger, *Materials Today*, 2013, **16**, 262-271.
27. P. Mohanpuria, N. K. Rana and S. K. Yadav, *Journal of Nanoparticle Research*, 2008, **10**, 507-517.
28. N. I. Hulkoti and T. C. Taranath, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, **121**, 474-483.
29. E. Alphanbéry, *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, **586**, 119472.
30. A. A. Keller and A. Lazareva, *Environmental Science & Technology Letters*, 2014, **1**, 65-70.
31. A. L. Duarte, K. DaBoit, M. L. S. Oliveira, E. C. Teixeira, I. L. Schneider and L. F. O. Silva, *Geoscience Frontiers*, 2019, **10**, 927-939.
32. T. Rönkkö and H. Timonen, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2019, **72**, 15-28.
33. P. Sanderson, J. M. Delgado-Saborit and R. M. Harrison, *Atmospheric Environment*, 2014, **94**, 353-365.
34. M. F. Hochella, D. W. Mogk, J. Ranville, I. C. Allen, G. W. Luther, L. C. Marr, B. P. McGrail, M. Murayama, N. P. Qafoku, K. M. Rosso, N. Sahai, P. A. Schroeder, P. Vikesland, P. Westerhoff and Y. Yang, *Science*, 2019, **363**, eaau8299.
35. D. Pal, A. Dastoor and P. A. Ariya, *Urban Climate*, 2020, **34**, 100713.
36. V. K. Sharma, J. Filip, R. Zboril and R. S. Varma, *Chemical Society Reviews*, 2015, **44**, 8410-8423.
37. R. Kaegi, A. Voegelin, B. Sinnet, S. Zuleeg, H. Hagendorfer, M. Burkhardt and H. Siegrist, *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**, 3902-3908.
38. W. G. Ernst, *Journal of Asian Earth Sciences*, 2012, **59**, 108-126.
39. E. M. Trejos, L. F. Silva, J. C. Hower, E. M. Flores, C. M. González, J. E. Pachón and B. H. Aristizábal, *Geoscience Frontiers*, 2021, **12**, 746-755.
40. M. S. Ermolin, P. S. Fedotov, N. A. Malik and V. K. Karandashev, *Chemosphere*, 2018, **200**, 16-22.
41. J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne and M. K. Danquah, *Beilstein journal of nanotechnology*, 2018, **9**, 1050-1074.
42. M. Amor, M. Tharaud, A. Gélabert and A. Komeili, *Environmental microbiology*, 2020, **22**, 823-831.
43. A. Malakar, S. R. Kanel, C. Ray, D. D. Snow and M. N. Nadagouda, *Science of the Total Environment*, 2020, 143470.

44. K. Phalyvong, Y. Sivry, H. Pauwels, A. Gélabert, M. Tharaud, G. Wille, X. Bourrat and M. F. Benedetti, *Frontiers in Environmental Science*, 2020, **8**.
45. K. Fijalkowski, A. Rorat, A. Grobelak and M. J. Kacprzak, *Journal of Environmental Management*, 2017, **203**, 1126-1136.
46. T. Y. Sun, N. A. Bornhöft, K. Hungerbühler and B. Nowack, *Environmental Science & Technology*, 2016, **50**, 4701-4711.
47. F. Gottschalk, T. Sun and B. Nowack, *Environmental Pollution*, 2013, **181**, 287-300.
48. A. K. Seta and A. D. Karathanasis, *Geoderma*, 1996, **74**, 255-266.
49. D. M. Mitrano, S. Motellier, S. Clavaguera and B. Nowack, *Environment International*, 2015, **77**, 132-147.
50. J. Zhao, M. Lin, Z. Wang, X. Cao and B. Xing, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2021, **51**, 1443-1478.
51. G. Lespes, S. Faucher and V. I. Slaveykova, *Frontiers in Environmental Science*, 2020, **8**, 71.
52. T. Echigo, D. M. Aruguete, M. Murayama and M. F. Hochella, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2012, **90**, 149-162.
53. S. M. Louie, R. Ma and G. V. Lowry, in *Frontiers of Nanoscience*, eds. J. R. Lead and E. Valsami-Jones, Elsevier, 2014, vol. 7, pp. 55-87.
54. D. Shevlin, N. O'Brien and E. Cummins, *Science of The Total Environment*, 2018, **621**, 1033-1046.
55. I. L. Gunsolus, M. P. S. Mousavi, K. Hussein, P. Bühlmann and C. L. Haynes, *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**, 8078-8086.
56. T. Tong, C. M. Wilke, J. Wu, C. T. T. Binh, J. J. Kelly, J.-F. Gaillard and K. A. Gray, *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**, 8113-8123.
57. Y. Cheng, L. Yin, S. Lin, M. Wiesner, E. Bernhardt and J. Liu, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011, **115**, 4425-4432.
58. G. Lespes and J. Gigault, *Analytica Chimica Acta*, 2011, **692**, 26-41.
59. Y. Yang, R. Reed, J. Schoepf, K. Hristovski, P. Herckes and P. Westerhoff, *Science of The Total Environment*, 2017, **584-585**, 515-522.
60. X. Li and J. J. Lenhart, *Environmental Science & Technology*, 2012, **46**, 5378-5386.
61. A. Urstoeger, A. Wimmer, R. Kaegi, S. Reiter and M. Schuster, *Environmental Science & Technology*, 2020, **54**, 12063-12071.
62. Y. Yang, X. Liu, L. Luo, W. Wei, Q. Wang and J. Zhang, *Adsorption Science & Technology*, 2021, **2021**, 9958422.
63. J. López-Mayan, M. C. Barciela-Alonso, M. R. Domínguez-González, E. Peña-Vázquez and P. Bermejo-Barrera, *Microchemical Journal*, 2020, **152**, 104264.
64. A. A. Markus, P. Krystek, P. C. Tromp, J. R. Parsons, E. W. M. Roex, P. d. Voogt and R. W. P. M. Laane, *Science of The Total Environment*, 2018, **631-632**, 485-495.

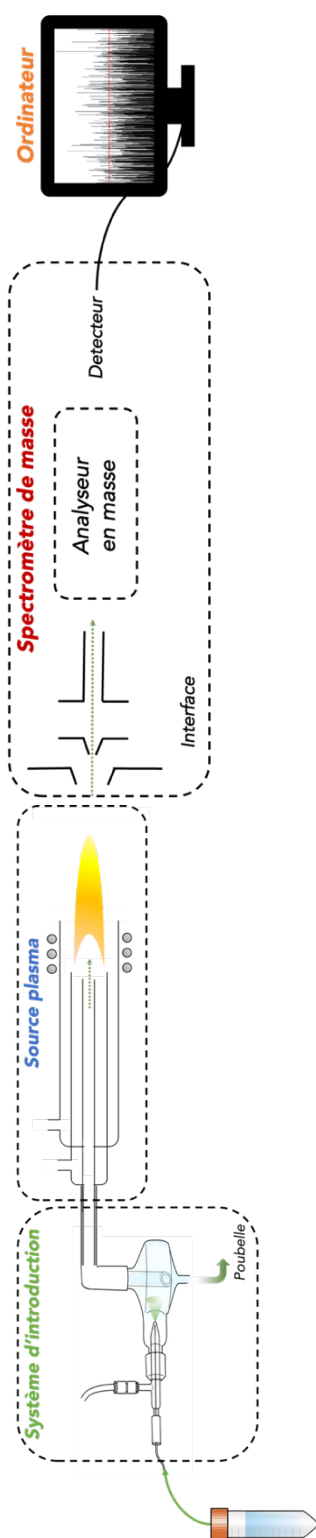
65. A. Azimzada, J. M. Farner, I. Jreije, M. Hadioui, C. Liu-Kang, N. Tufenkji, P. Shaw and K. J. Wilkinson, *Frontiers in Environmental Science*, 2020, **8**.
66. S. P. Bitragunta, S. G. Palani, A. Gopala, S. K. Sarkar and V. R. Kandukuri, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 2017, **98**, 595-600.
67. A. R. Donovan, C. D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz and H. Shi, *Chemosphere*, 2016, **144**, 148-153.
68. K. Flores, R. S. Turley, C. Valdes, Y. Ye, J. Cantu, J. A. Hernandez-Viezcas, J. G. Parsons and J. L. Gardea-Torresdey, *Applied Spectroscopy Reviews*, 2021, **56**, 1-26.
69. A. Gondikas, F. von der Kammer, R. Kaegi, O. Borovinskaya, E. Neubauer, J. Navratilova, A. Praetorius, G. Cornelis and T. Hofmann, *Environmental Science: Nano*, 2018, **5**, 313-326.
70. Y. Huang, A. A. Keller, P. Cervantes-Avilés and J. Nelson, *ACS ES&T Water*, 2021, **1**, 205-213.
71. D. Wang, P. Wang, C. Wang and Y. Ao, *Environmental Pollution*, 2019, **248**, 834-844.
72. P. Luo, A. Roca, K. Tiede, K. Privett, J. Jiang, J. Pinkstone, G. Ma, J. Veinot and A. Boxall, *Journal of Environmental Sciences*, 2018, **64**, 62-71.
73. S. Faucher, G. Charron, E. Lützen, P. Le Coustumer, D. Schaumlöffel, Y. Sivry and G. Lespes, *Analytica Chimica Acta*, 2018, **1028**, 104-112.
74. K. Proulx, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2016, **408**, 5147-5155.
75. Y.-j. Chang, Y.-h. Shih, C.-H. Su and H.-C. Ho, *Journal of Hazardous Materials*, 2017, **322**, 95-104.
76. S. Alsudir and E. P. C. Lai, *Talanta*, 2017, **169**, 115-122.
77. F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M. T. Gómez, M. S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui and J. R. Castillo, *Analytica chimica acta*, 2016, **904**, 10-32.
78. R. F. Domingos, M. A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M. M. Reid, N. Tufenkji, J. R. Lead, G. G. Leppard and K. J. Wilkinson, *Environmental Science & Technology*, 2009, **43**, 7277-7284.
79. H. Qu, S. W. Linder and T. K. Mudalige, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, **409**, 979-988.
80. E. J. Petersen, A. R. M. Bustos, B. Toman, M. E. Johnson, M. Ellefson, G. C. Caceres, A. L. Neuer, Q. Chan, J. W. Kemling and B. Mader, *Environmental Science: Nano*, 2019, **6**, 2876-2896.
81. H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Analytical chemistry*, 2011, **83**, 9361-9369.
82. R. Allabashi, W. Stach, A. de la Escosura-Muñiz, L. Liste-Calleja and A. Merkoçi, *Journal of Nanoparticle Research*, 2009, **11**, 2003-2011.
83. B. Meermann and V. Nischwitz, *Journal of analytical atomic spectrometry*, 2018, **33**, 1432-1468.

84. J.-L. Wang, E. Alasonati, M. Tharaud, A. Gelabert, P. Fiscaro and M. F. Benedetti, *Water Research*, 2020, **176**, 115722.
85. R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, A. L. Gray and C. E. Taylor, *Analytical Chemistry*, 1980, **52**, 2283-2289.
86. M. Alam, E. Snow and A. Tanaka, *Science of the total environment*, 2003, **308**, 83-96.
87. J. Arunachalam, C. Mohl, P. Ostapczuk and H. Emons, *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 1995, **352**, 577-581.
88. M. Chudzinska, A. Debska and D. Baralkiewicz, *Accreditation and Quality Assurance*, 2012, **17**, 65-73.
89. N. Jakubowski, L. Moens and F. Vanhaecke, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 1998, **53**, 1739-1763.
90. C. A. Bonnot, A. Gélabert, P. Louvat, G. Morin, O. Proux and M. F. Benedetti, *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, **25**, 23383-23403.
91. G. Caumette, C.-P. Lienemann, I. Merdrignac, H. Paucot, B. Bouyssiere and R. Lobinski, *Talanta*, 2009, **80**, 1039-1043.
92. B. Bouyssiere, Y. N. Ordóñez, C.-P. Lienemann, D. Schaumlöffel and R. Łobiński, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2006, **61**, 1063-1068.
93. H. Kawaguchi, N. Fukasawa and A. Mizuike, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 1986, **41**, 1277-1286.
94. U. K. Bochert and W. Dannecker, *Journal of Aerosol Science*, 1989, **20**, 1525-1528.
95. T. Nomizu, S. Kaneco, T. Tanaka, T. Yamamoto and H. Kawaguchi, *Analytical sciences*, 1993, **9**, 843-846.
96. S. Kaneco, T. Nomizu, T. Tanaka, N. Mizutani and H. Kawaguchi, *Analytical Sciences*, 1995, **11**, 835-840.
97. T. Nomizu, H. Nakashima, Y. Hotta, T. Tanaka and H. Kawaguchi, *Analytical Sciences*, 1992, **8**, 527-531.
98. C. Degueldre, P. Y. Favarger and S. Wold, *Analytica Chimica Acta*, 2006, **555**, 263-268.
99. C. Degueldre and P. Y. Favarger, *Talanta*, 2004, **62**, 1051-1054.
100. C. Degueldre, P. Y. Favarger and C. Bitea, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **518**, 137-142.
101. C. Degueldre, P. Y. Favarger, R. Rossé and S. Wold, *Talanta*, 2006, **68**, 623-628.
102. C. Degueldre and P. Y. Favarger, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003, **217**, 137-142.
103. H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, E. P. Gray, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Environmental science & technology*, 2012, **46**, 12272-12280.
104. F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea and J. R. Castillo, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2013, **28**, 1220-1232.

105. D. M. Mitrano, E. K. Leshar, A. Bednar, J. Monserud, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, **31**, 115-121.
106. I. Abad-Alvaro, D. Leite, D. Bartczak, S. Cuello-Nunez, B. Gomez-Gomez, Y. Madrid, M. Aramendia, M. Resano and H. Goenaga-Infante, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2021, **36**, 1180-1192.
107. D. Mitrano, J. F. Ranville, A. Bednar, K. Kazor, A. S. Hering and C. P. Higgins, *Environmental Science: Nano*, 2014, **1**, 248-259.
108. A. K. Venkatesan, B. T. Rodríguez, A. R. Marcotte, X. Bi, J. Schoepf, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2018, **4**, 1923-1932.
109. E. M. Heithmar and S. A. Pergantis, *Characterizing concentrations and size distributions of metal-containing nanoparticles in waste water*, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development ..., 2010.
110. E. M. Heithmar, *Screening methods for metal-containing nanoparticles in water*, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development ..., 2011.
111. L. N. Rand and J. F. Ranville, *Environmental science & technology*, 2019, **53**, 11214-11222.
112. R. Reed, D. Martin, A. Bednar, M. Montaña, P. Westerhoff and J. Ranville, *Environmental Science: Nano*, 2017, **4**, 69-77.
113. A. P. Gondikas, F. v. d. Kammer, R. B. Reed, S. Wagner, J. F. Ranville and T. Hofmann, *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**, 5415-5422.
114. J. Tuoriniemi, G. Cornelis and M. Hassellöv, *Analytical chemistry*, 2012, **84**, 3965-3972.
115. J. Tuoriniemi, G. Cornelis and M. Hassellöv, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, **29**, 743-752.
116. J. Tuoriniemi, G. Cornelis and M. Hassellöv, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2015, **30**, 1723-1729.
117. W.-W. Lee and W.-T. Chan, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2015, **30**, 1245-1254.
118. R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. van der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester and S. Weigel, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2015, **30**, 1274-1285.
119. M. D. Montaña, J. W. Olesik, A. G. Barber, K. Challis and J. F. Ranville, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2016, **408**, 5053-5074.
120. D. Mozhayeva and C. Engelhard, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2020, **35**, 1740-1783.
121. A. Praetorius, A. Gundlach-Graham, E. Goldberg, W. Fabienke, J. Navratilova, A. Gondikas, R. Kaegi, D. Günther, T. Hofmann and F. von der Kammer, *Environmental Science: Nano*, 2017, **4**, 307-314.
122. O. Borovinskaya, B. Hattendorf, M. Tanner, S. Gschwind and D. Günther, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2013, **28**, 226-233.

123. O. Borovinskaya, S. Gschwind, B. Hattendorf, M. Tanner and D. Günther, *Analytical chemistry*, 2014, **86**, 8142-8148.
124. A. R. Montoro Bustos, E. J. Petersen, A. Possolo and M. R. Winchester, *Analytical chemistry*, 2015, **87**, 8809-8817.
125. M. Hadioui, C. Peyrot and K. J. Wilkinson, *Analytical Chemistry*, 2014, **86**, 4668-4674.
126. J.-L. Wang, E. Alasonati, P. Fiscaro and M. F. Benedetti, *Journal of Hazardous Materials*, 2022, **422**, 126695.
127. K. Phalyvong, Y. Sivry, H. Pauwels, A. Gélabert, M. Tharaud, G. Wille, X. Bourrat, J. F. Ranville and M. F. Benedetti, *Frontiers in Environmental Science*, 2021.
128. S. Lee, X. Bi, R. B. Reed, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Environmental science & technology*, 2014, **48**, 10291-10300.
129. J. Gaillardet, B. Dupré, P. Louvat and C. J. Allègre, *Chemical Geology*, 1999, **159**, 3-30.
130. X. Lin, J. Li, S. Ma, G. Liu, K. Yang, M. Tong and D. Lin, *PloS one*, 2014, **9**, e110247.
131. R. J. B. Peters, G. van Bommel, N. B. L. Milani, G. C. T. den Hertog, A. K. Undas, M. van der Lee and H. Bouwmeester, *Science of The Total Environment*, 2018, **621**, 210-218.
132. A. Azimzada, I. Jreije, M. Hadioui, P. Shaw, J. M. Farner and K. J. Wilkinson, *Environmental Science & Technology*, 2021.
133. P. Le Pape, S. Ayrault and C. Quantin, *Journal of Hydrology*, 2012, **472-473**, 99-110.
134. C. Reimann, K. Fabian, M. Birke, P. Filzmoser, A. Demetriades, P. Négrel, K. Oorts, J. Matschullat, P. de Caritat, S. Albanese, M. Anderson, R. Baritz, M. J. Batista, A. Bel-Ian, D. Cicchella, B. De Vivo, W. De Vos, E. Dinelli, M. Ďuriš, A. Dusza-Dobek, O. A. Eggen, M. Eklund, V. Ernsten, D. M. A. Flight, S. Forrester, U. Fügedi, A. Gilucis, M. Gosar, V. Gregorauskiene, W. De Groot, A. Gulan, J. Halamić, E. Haslinger, P. Hayoz, J. Hoogewerff, H. Hrvatovic, S. Husnjak, F. Jähne-Klingberg, L. Janik, G. Jordan, M. Kaminari, J. Kirby, V. Klos, P. Kwećko, L. Kutu, A. Ladenberger, A. Lima, J. Locutura, P. Lucivjansky, A. Mann, D. Mackovych, M. McLaughlin, B. I. Malyuk, R. Maquil, R. G. Meuli, G. Mol, P. O'Connor, R. T. Ottesen, A. Pasnieczna, V. Petersell, S. Pflaiderer, M. Poňavič, C. Prazeres, S. Radusinović, U. Rauch, I. Salpeteur, R. Scanlon, A. Schedl, A. Scheib, I. Schoeters, P. Šefčík, E. Sellersjö, I. Slaninka, J. M. Soriano-Disla, A. Šorša, R. Svrkota, T. Stafilov, T. Tarvainen, V. Tendavilov, P. Valera, V. Verougstraete, D. Vidojević, A. Zissimos, Z. Zomeni and M. Sadeghi, *Applied Geochemistry*, 2018, **88**, 302-318.
135. G. Cornelis and M. Hassellöv, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, **29**, 134-144.
136. P. Louvat, M. Tharaud, M. Buisson, C. Rollion-Bard and M. F. Benedetti, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2019, **34**, 1553-1563.
137. K. Mehrabi, R. Kaegi, D. Günther and A. Gundlach-Graham, *Environmental Science: Nano*, 2021, **8**, 1211-1225.

■ MATERIEL & METHODES



Au cours de cette thèse, le travail de développement analytique et méthodologique pour la caractérisation des nanoparticules s'est appuyé sur la détection par spectrométrie de masse à source plasma – l'ICP-MS –. De manière générale, les ICP-MS sont agencés de la façon suivante : un *système d'introduction* des échantillons connecté à une *source plasma* – ICP – avec, dans la continuité, un *spectromètre de masse* – MS – couplé à un détecteur d'ions lui-même connecté à un *système d'acquisition et de lecture de données* (Figure 17). En résumé, la solution est aérosolisée/nébulisée dans une chambre de nébulisation qui permet de n'envoyer que les plus fines gouttelettes dans l'ICP. A cette étape, les éléments contenus dans les gouttelettes sont successivement désolvatés, vaporisés, atomisés puis ionisés. Les ions ainsi produits dans le plasma (à pression atmosphérique) sont envoyés dans la partie MS (sous vide) pour être séparés à l'aide du spectromètre de masse ou – *analyseur en masse* –. Il s'agit essentiellement d'un filtre conçu pour isoler un ion spécifique à un rapport masse/charge – m/z – particulier du faisceau multi-ions. Après séparation, les faisceaux d'ion individuel sont séquentiellement ou simultanément (en fonction de l'analyseur en masse) dirigés vers un détecteur conçu pour mesurer leur courant ionique individuel. L'amplitude de ces courants ioniques est proportionnelle à la quantité d'ions de l'élément ciblé dans le faisceau d'ions provenant de l'ICP. Par conséquent, la mesure du m/z de l'ion permet d'identifier qualitativement l'élément ciblé, tandis que l'amplitude du courant ionique est utilisée pour quantifier l'élément ciblé dans l'échantillon d'origine.

Figure 17: Vue éclatée d'un spectromètre de masse à source plasma (ICP-MS)

Table des matières

1.	LES ANALYSEURS EN MASSE	- 39 -
1.1.	<i>Quadripôle</i>	- 39 -
1.2.	<i>Secteur magnétique</i>	- 40 -
1.3.	<i>Temps de vol</i>	- 42 -
2.	LE MODE PARTICULE UNIQUE EN ICP-MS (spICP-MS)	- 44 -
3.	LES EFFICACITES ET LES DISTRIBUTIONS GRANULOMETRIQUES	- 47 -
3.1.	<i>Nombre d'ions détectés à partir d'une solution étalon ionique</i>	- 47 -
3.2.	<i>Nombre d'ions détectés à partir de l'ionisation d'une nanoparticule</i>	- 48 -
3.3.	<i>Détermination des efficacités en spICP-MS</i>	- 49 -
3.4.	<i>Détermination des distributions granulométriques des NPs par spICP-MS</i>	- 51 -
4.	LE TRAITEMENT DES DONNEES.....	- 53 -
4.1.	<i>Seuil de coupure</i>	- 53 -
4.2.	<i>Modélisation du bruit de fond</i>	- 54 -
4.3.	<i>Apprentissage machine</i>	- 55 -
4.4.	<i>Soustraction des histogrammes</i>	- 56 -
4.5.	<i>Synthèse des méthodologies utilisées</i>	- 56 -
5.	GLOSSAIRE	- 57 -
6.	BIBLIOGRAPHIE	- 58 -

1. Les analyseurs en masse

1.1. Quadripôle

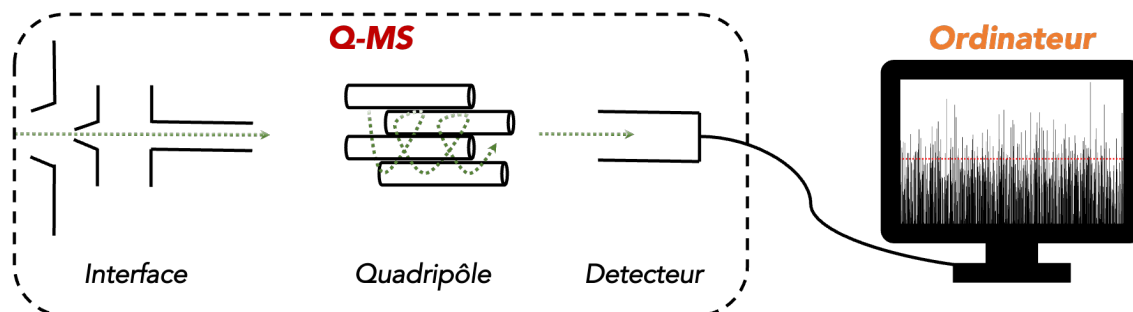


Figure 18: Vue éclatée d'un analyseur en masse de type "quadripôle"

Un quadripôle ou ***Q-MS*** – est constitué de quatre électrodes parallèles de section cylindrique (ou hyperbolique) (Figure 18). Le fonctionnement de ce type d'analyseur en masse nécessite l'application conjointe d'un potentiel de courant continu – U – et d'un potentiel de courant alternatif radiofréquence (RF) – $V \cdot \cos(2\pi ft)$ – de haute fréquence – f –. Les électrodes opposées, distantes de – r_0 –, sont reliées entre elles et soumises au même potentiel, tandis que les électrodes voisines sont portées à des potentiels de même valeur absolue, mais de valeur relative opposée. Cet écart de potentiel crée ainsi un champ électrostatique entre chaque paire d'électrode. En prenant les coordonnées (x_i, y_i, z_i) d'un ion situé dans ce champ électrostatique (entre les 4 barreaux sur la Figure 18), sa trajectoire dans le *Q-MS* sera donc circulaire selon les deux axes x et y avec une amplitude liée aux champs créés par les potentiels appliqués. La trajectoire selon l'axe horizontal z est uniforme ce qui confère une trajectoire elliptique à l'ion à travers l'analyseur en masse^h. Une zone dite de stabilité, où les coordonnées (x_i, y_i) de l'ion de rapport masse/charge spécifique égale m/z restent strictement inférieures à r_0 (soit à l'intérieur du *Q-MS*), est définissable en fonction de U et f . Ainsi, en modifiant de manière uniforme U et/ou f , des ions avec différentes valeurs m/z peuvent être sélectivement transportés à travers le *Q-MS* vers le détecteur. Un balayage du spectre de masse du faisceau d'ions échantillonnés à partir du plasma peut donc être réaliséⁱ.

^h Cette trajectoire est précisément décrite par les équations de E. L. Mathieu mais non développées ici car hors du cadre de cette thèse.

ⁱ A noter qu'initialement, ce balayage ne pouvait se faire que de manière séquentielle car le passage d'une masse à une autre – le *peak-jumping* – demandait un temps de latence – le *settling-time* – nécessaire pour stabiliser U et/ou f . Depuis peu, avec l'émergence de la spICP-MS multi-élémentaire nécessaire pour déterminer la signature élémentaire des NPs, les fabricants de *Q-MS* se sont tournés vers une électronique plus sophistiquée. Ainsi, le *peak-jumping* peut dorénavant se faire de manière continue sans *settling-time*. Couplé à la capacité qu'à un *Q-MS* à enregistrer les signaux avec des $t_d \leq 100 \mu s$, cela permet de faire de l'analyse multi-élémentaire en déconvoluant les pics de NP. Cependant, la mesure étant faite grâce à un balayage en masse et non simultanément, cette analyse est limitée à ≤ 3 éléments.

A ce jour, la plupart des Q - MS disponible sur le marché fonctionnent avec un pouvoir de résolution (R) aux alentours de 300. Ce pouvoir de résolution représente la capacité de l'analyseur en masse à séparer des masses adjacentes (interférences) dans le spectre de masse. Il est déterminé de la manière suivante : $R = \bar{M}/\Delta M$ avec \bar{M} – la masse moyenne de l'élément ciblé et son interférence et ΔM – la différence de masse entre ces 2 espèces. Cette résolution est suffisante pour mesurer la plupart des éléments étant donné que les interférences (notamment polyatomiques) sont résolues grâce à l'utilisation d'une cellule remplie d'un gaz de collision (He) ou de réaction (NH_3).

Au cours d'une des études de cette thèse, un ICP - MS/MS – *Agilent 8800* (Agilent) également nommé – *tandem-MS* – est utilisé. Il permet la résolution des interférences polyatomiques et isobariques grâce à l'utilisation de deux Q - MS séparés par une cellule de réaction (octopole reaction cell – ORC). Les différences dans les cinétiques et/ou les produits de réaction entre l'élément ciblé, son/ses interférence(s) et le gaz de la cellule peuvent être utilisées afin de s'affranchir de l'effet des interférences. En principe, le 1^{er} Q - MS est configuré de manière à ne laisser passer qu'un m/z spécifique. Ainsi, l'élément ciblé mais également ses interférences se retrouve dans l'ORC. A cette étape, soit les interférences sont chimiquement résolues et le 2nd Q - MS est réglé pour laisser passer le même m/z que le 1^{er}, soit c'est l'élément ciblé qui réagit avec le gaz de la cellule et le 2nd Q - MS est donc configuré de façon à ne laisser passer que le m/z spécifique au composé secondaire créé. Plus de détails spécifiques à l'analyse des NPs contenant du titane dans des matrices riches en calcium sont fournis dans le chapitre I.

1.2. Secteur magnétique

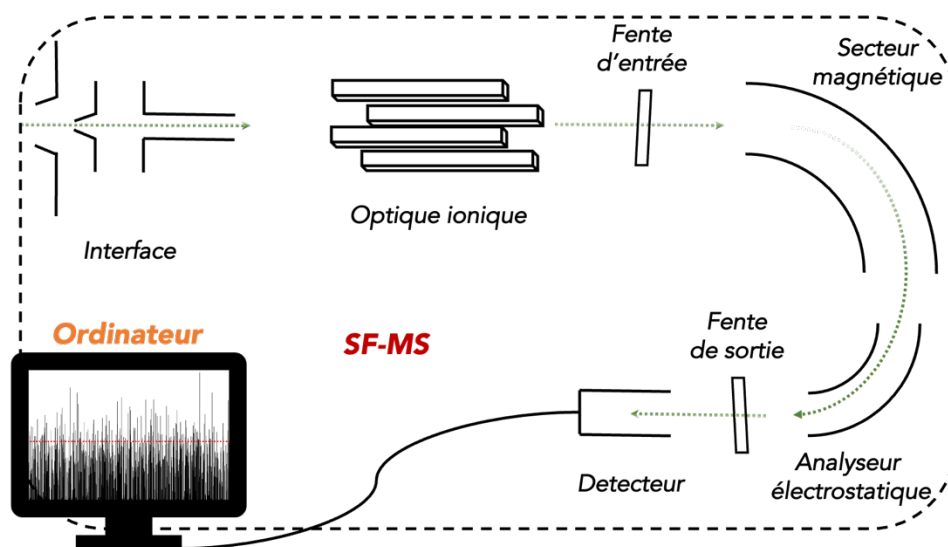


Figure 19: Vue éclatée d'un analyseur en masse de type "secteur magnétique"

Dans certains cas, l'efficacité des cellules de collision/réaction est limitée et par conséquent un autre type de spectromètre de masse est requis pour la résolution des interférences. La Figure 19 détaille ce type de spectromètre de masse haute-résolution (HR) à double focalisation ou plus communément nommé secteur magnétique – *SF-MS* –. En combinant un analyseur en masse à secteur magnétique avec un analyseur électrostatique (ESA), une amélioration significative de la résolution est obtenue, étant donné qu'un tel instrument peut atteindre une résolution théorique $R \leq 10000$. Le faisceau d'ions provenant de l'ICP est d'abord accéléré par un potentiel électrique – V_0 – puis focalisé par un système de lentille ionique puis traverse une fente d'entrée. Le *SF-MS* couple donc l'utilisation :

i/ d'un champ magnétique : en voyageant dans un tube de vol incurvé et placé perpendiculairement aux lignes de force (force de Lorentz) du champ magnétique – B –, les ions vont être déviés de leur trajectoire en fonction de leur m/z . Le rayon de courbure – r_{magnet} – suivi par les ions de m/z spécifique est décrit selon la formule :

$$r_{magnet} = \sqrt{(m/z) \cdot (2 \cdot V_0 / B^2)}$$

ii/ d'un champ électrostatique : placé dans un champ électrostatique – E – créé par une différence de potentiel – δV – entre deux plaques parallèles incurvées distantes de – d –, les ions se déplacent suivant une trajectoire circulaire de rayon – r_{ESA} –. A cette étape, la force électrostatique (force de Coulomb) équilibre la force centrifuge utilisé pour filtrer les ions en fonction de leur énergie cinétique. Ainsi, quel que soit leur m/z , les ions suivront une trajectoire de rayon :

$$r_{ESA} = 2 \cdot V_0 / E$$

Le faisceau d'ions passe ensuite à travers une fente de sortie avant d'arriver au détecteur.

L'instrument utilisé dans deux études de cette thèse, un *HR-ICP-MS – Element II* (ThermoScientific) permet de travailler avec différents modes de résolution. En effet, en faisant varier la taille des fentes d'entrée (située avant le champ magnétique) et de sortie (située avant le détecteur), la largeur du faisceau d'ions est ajustée de manière à pouvoir réaliser les analyses avec trois résolutions différentes : la basse résolution – $LR \approx 400$; la moyenne résolution – $MR \approx 4000$; et la haute résolution – $HR \approx 10000$. Ainsi, en choisissant correctement la résolution, le courant ionique de l'élément ciblé est exempt de courants ioniques liés aux interférences. Plus de détails concernant la/les résolution(s) utilisée(s) aux cours des analyses sont disponibles dans les différents chapitres.

1.3. Temps de vol.

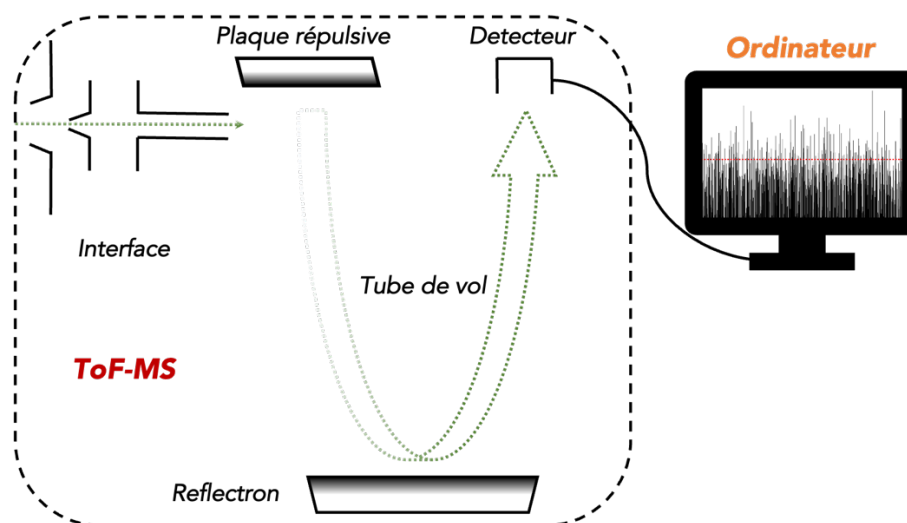


Figure 20: Vue éclatée d'un analyseur en masse de type "temps de vol"

Comparé aux autres analyseurs en masse, celui de type temps de vol – **ToF-MS** – ne dépend pas d'un champ magnétique, électrostatique ou radio-fréquence pour disperser ou filtrer les ions pour la détection des différents m/z . En effet, comme schématisé sur la Figure 20, grâce à une plaque répulsive le faisceau multi-ions généré dans l'ICP est accéléré à l'énergie potentielle constante d'une particule dans un champ électrique : $E_{el} = z.V$, où z est la charge de l'ion et V est le potentiel d'accélération appliqué. Les ions se déplacent ensuite librement dans le tube de vol de sorte que l'énergie électrique précédente soit convertie en une énergie cinétique caractéristique : $E_k = \frac{1}{2}.m.v^2$, où m est la masse de l'ion et v sa vitesse. Dès lors que $E_{el} = E_k$, les ions de masse différente parcourent le tube de vol à des vitesses différentes selon : $v = \sqrt{2.z.V/m}$. Étant donné que la distance d entre la plaque répulsive et le détecteur est fixe, le temps mis par les ions à parcourir cette distance est exprimé selon la formule :

$$t = \frac{d}{\sqrt{2.V}} \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Ainsi, les ions légers voyageant plus vite atteignent le détecteur en un temps plus court que les plus lourds. Par conséquent, ce processus de discrimination temporelle peut être utilisé pour séparer des ions de masse différente. En complément, un réflecteur d'ions également appelé – *réflectron* – est souvent utilisé pour inverser la direction (trajet complet en forme de U) et ainsi doubler la distance de parcours des ions, ce qui engendre une amélioration de la résolution. Ce réflectron réduit également la distribution d'énergie cinétique des ions. Ceci se traduit par une arrivée des ions d'une même masse dans un temps plus restreint engendrant une meilleure résolution en masse. Ordinairement, le temps nécessaire à l'ion le plus lourd pour parcourir la distance entre le réflectron et le système de détection est de quelques dizaines de micro-secondes (environ 25 μ s). Ce court temps d'acquisition spectrale

présente l'un des avantages majeurs du *ToF-MS*. Il permet notamment d'enregistrer les courants ioniques de tous les m/z dans le spectre de masse (quasi-)simultanément (avec un décalage de quelques nano-secondes entre chaque m/z), tout en décomposant le signal produit par le nuage d'ions provenant de chaque NP. La durée totale du signal – $t_{\text{nuage-NP}}$ – est d'environ 200-600 μs . Des études antérieures^{1,2} rapportent ainsi que plus de 30 000 spectres de masse par seconde peuvent être obtenus par cette technique. L'ensemble de ces particularités rend cette technique appropriée pour l'acquisition de signaux transitoires rapides tels que demandé en spICP-MS, avec l'atout majeur de pouvoir suivre la signature élémentaire des NPs individuellement.

Dans le cadre de cette thèse, l'analyse spICP-MS multi-élémentaire est réalisée à l'aide d'un *ICP-ToF-MS – Vitesse* (Nu Instrument). Cet instrument est capable d'enregistrer le spectre de masse de ^{23}Na à ^{238}U en quelques dizaines de micro-secondes pendant plusieurs minutes sans interruption. Cependant, pour des acquisitions plus précises, il offre également la possibilité d'accumuler des spectres successifs sans altérer la collecte ininterrompue des données. Plus de détails spécifiques à l'analyse multi-élémentaire des NPs sont données dans le chapitre IV.

2. Le mode particule unique en ICP-MS (spICP-MS)

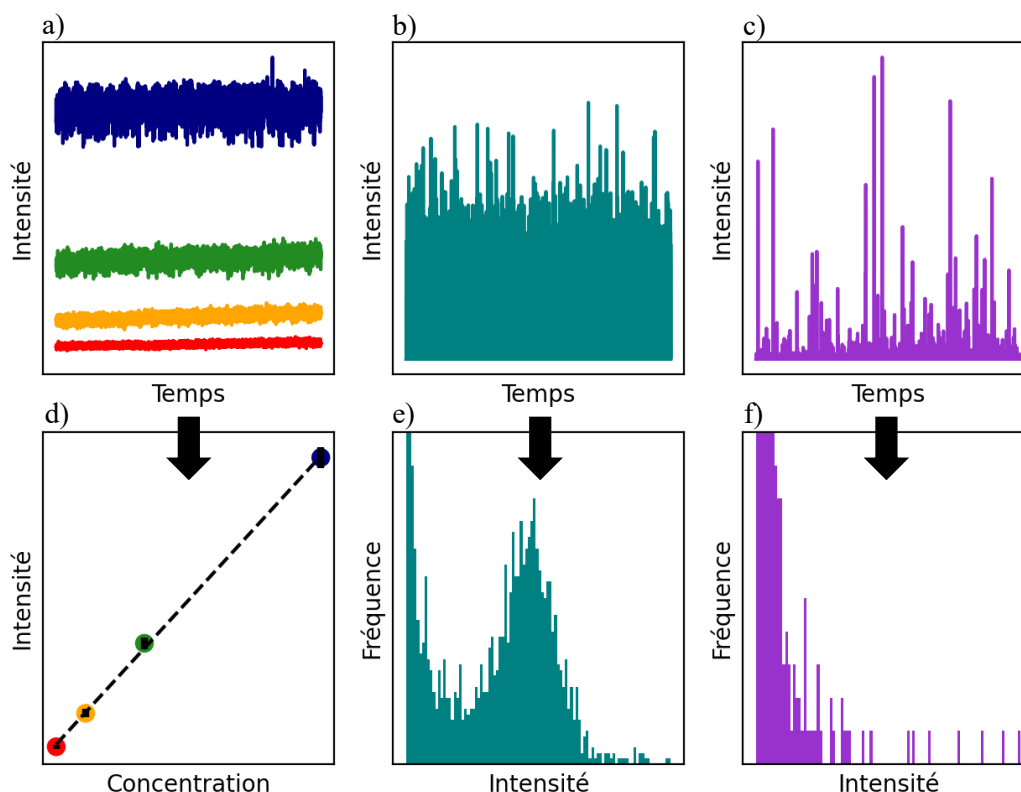


Figure 21: Étapes de l'analyse ICP-MS en mode particule unique (spICP-MS). (a) étalonnage externe (ici $n = 4$; $m/z = 197$); (b) analyse des NPs de référence (ici AuNPs 40 nm ; $m/z = 197$); (c) analyse d'un échantillon d'eau de Seine (ici $m/z = 140$). Il peut être nécessaire de répéter l'étape (a), notamment si l'élément ciblé dans l'échantillon « inconnu » est différent de celui utilisé pour les 2 premières étapes (comme dans ce cas présent). Les 3 graphiques du haut représentent les données temporelles acquises par spICP-MS tandis que les 3 graphiques du bas sont des représentations sous forme de droite d'étalonnage (a) et d'histogrammes (b et c)

La spectrométrie de masse à source plasma en mode particule unique (spICP-MS) est une méthode capable de détecter individuellement des (nano)particules à des concentrations très faibles ($\geq 10^3$ (particules) mL^{-1})³⁻⁵. En principe, une suspension de NPs en milieu généralement aqueux est introduite en continu dans l'ICP à l'aide d'un nébuliseur *via* une chambre de nébulisation. A ce stade, seulement une fraction des NPs présentes dans la solution entre dans le plasma où elles sont atomisées et où chaque atome est ensuite ionisé. Chaque particule atomisée, initialement constituée d'un grand nombre d'atome produit ainsi un nuage d'ions. Le spectromètre de masse est configuré de manière à faire l'acquisition des données avec une résolution temporelle élevée (c'est-à-dire un temps d'intégration très court ou – *dwell-time* – typiquement ≤ 10 ms) d'un m/z particulier (fonction de l'élément ciblé et de l'ICP-MS utilisé (*cf* section analyseur en masse)). Au final, chaque nuage d'ions est individuellement collecté par le détecteur. La densité ionique de l'élément ciblé dans ce nuage étant généralement élevée (proportionnelle au nombre d'atome de ce même élément initialement dans la NP), l'intensité résultante est supérieure au bruit de fond. L'intensité de ce dernier est proportionnelle à la quantité sous forme ionique de l'élément ciblé. Également, le nombre d'impulsions détectées au cours de l'acquisition

(généralement une à plusieurs minutes) est directement proportionnel au nombre de NPs dans la suspension. Les Figure 21 a, b et c montrent respectivement l'acquisition temporelle à $m/z = 197$ (^{197}Au) de solutions étalons d'or ionique (AuCl_3) à 500, 1000, 2000 et 5000 ng L^{-1} ainsi qu'une suspension de nanoparticules d'or (AuNPs) de référence de 40 nm et à $m/z = 140$ (^{140}Ce) celle d'une eau de Seine non filtrée avec un temps d'intégration $t_d = 2$ ms. Les deux types de solutions (ionique vs NPs) sont clairement distinguables du fait de l'apparition d'impulsions courtes significatives de la présence de NPs dans les solutions en contenant. A l'inverse, le signal constant des solutions d' AuCl_3 montre l'absence de NPs.

Comme pour la quantification en ICP-MS utilisé de manière conventionnelle, la réponse (courant ionique individuel) en mode particule unique de l'ICP-MS doit en premier lieu être défini dans la gamme de masse attendue/estimée. Un étalonnage à l'aide de suspensions de NPs de composition et taille identiques aux NPs mesurées serait optimal. Cependant, notamment dans le cadre d'études sur les NPs dans l'environnement, l'existence de ce type de NPs modèles est peu probable. De ce fait, un étalonnage externe à l'aide d'étalons de/des élément(s) ciblé(s) sous forme ionique est généralement réalisé (Figure 21 a). Ceci permet ainsi de déterminer la réponse de l'appareil, la sensibilité – S – en $\text{cps ng}^{-1} \text{L}$ pour l'élément ciblé (Figure 21 d). Les suspensions de NPs peuvent ensuite être analysées. Pour leur analyse, il est particulièrement nécessaire d'être attentif à certains paramètres, afin d'éviter l'arrivée conjointe de NPs (< une NP par dwell-time). En effet ceci fausserait le résultat, notamment en donnant un nombre de NPs plus faible avec une intensité moyenne plus élevée (et par conséquent une concentration en nombre sous-évaluée et un.e diamètre/masse surévalué.e). Laborda et al. (2013) ⁶ ont estimé cette probabilité de coïncidence (arrivée conjointe de NPs) à l'aide d'une loi de Poisson de la forme : $P(k) = (\lambda^k/k!) \cdot e^{-\lambda}$, avec λ – représentant le nombre de NPs arrivant au détecteur au cours d'un temps d'intégration et k – le nombre de NP pouvant être détectée simultanément. Ce paramètre λ est calculé de la manière suivante : $\lambda = N_{NPs} \cdot q_{liq} \cdot t_d$, avec le *dwell-time* – t_d – en seconde, la concentration en nombre de NPs dans la suspension – N_{NPs} – en NP mL^{-1} et le débit d'introduction – q_{liq} – en mL sec^{-1} . Ainsi, à débit constant ^j, l'utilisation d'un temps d'intégration court permet donc de travailler à des concentrations en nombre de NPs plus élevées, favorisant le comptage d'événements « mono-nanoparticulaires ». A l'inverse, un temps d'intégration long nécessite de diminuer la concentration en nombre de NPs afin d'éviter le comptage d'évènements « multi-nanoparticulaires ». Il est également nécessaire de quantifier les pertes en nombre d'ions et/ou de NPs tout au long du parcours des ions/NPs depuis la solution jusqu'au détecteur. En effet, au niveau de chaque partie de l'ICP-MS (Figure 17), ce qui « ressort » n'est pas égal à l'intégralité de ce qui « entre ». Ceci se fait notamment au travers de 2 efficacités : l'efficacité de transport – $\eta_{Transport}$ – et l'efficacité de nébulisation – $\eta_{Nebulisation}$

^j Le débit est généralement optimisé de manière à avoir un signal élevé et stable en début d'analyse et qu'il est donc préférable d'adapter la concentration en nombre de NPs et/ou le temps d'intégration plutôt que de modifier celui-ci pour chaque échantillon.

. La 1^{ère} efficacité englobe la perte totale en nombre d'ions par NP par rapport à ceux de solutions étalons ionique tandis que la 2^{nde} efficacité décrit la perte en nombre de NPs. Ces efficacités sont généralement déterminées avec un matériau de référence (tel que des AuNPs) de taille et de concentration en NP connues puis appliquées aux échantillons « inconnus » pour déterminer leur distribution en taille et leur concentration en nombre de NP, en supposant un comportement identique de toutes les NPs dans la chambre de nébulisation et l'ICP-MS. Enfin, la représentation sous forme d'histogramme (Figure 21 e et f) des intensités enregistrées pour les solutions contenant des NPs (Figure 21 b et c) est fondamentale. Cette transformation est en effet nécessaire de manière à :

i/ discriminer les événements dits « nanoparticulaires » des événements dits « ioniques » à l'aide d'une des méthodologies décrites dans la section traitement des données

ii/ convertir la distribution du signal mesuré pour les NPs en distribution en masse (et/ou taille si la morphologie et la densité des NPs sont connues), à l'aide des équations développées dans la section suivante.

3. Les efficacités et les distributions granulométriques

3.1. Nombre d'ions détectés à partir d'une solution étalon ionique

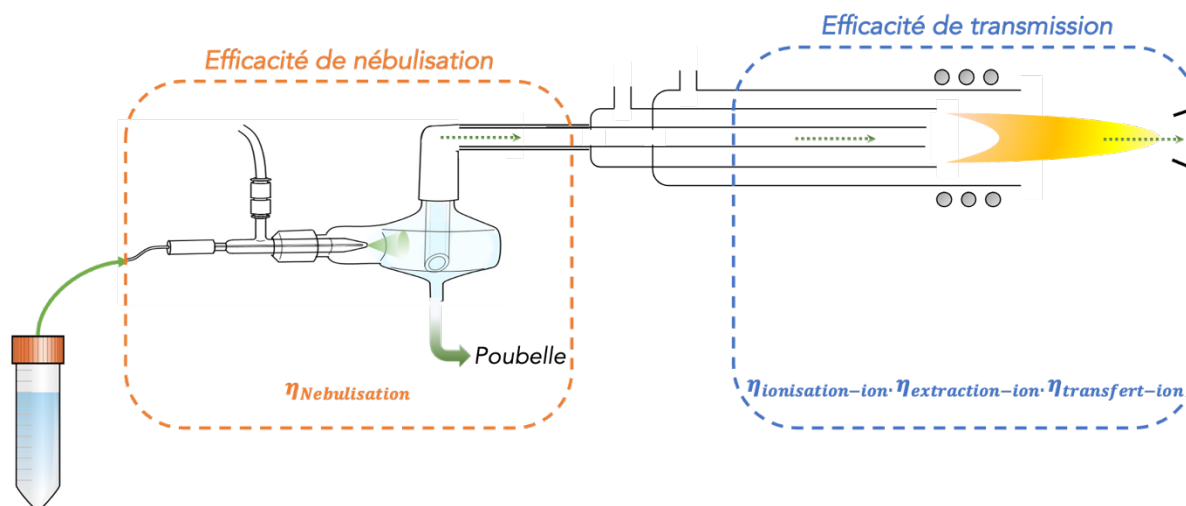


Figure 22: Vue éclatée de l'introduction d'une solution étalon ionique dans l'ICP via une chambre de nébulisation

Comme expliqué plus haut et présenté dans la Figure 22, lors de l'aérosolisation dans la chambre de nébulisation, une partie de la solution est perdue car seules les gouttelettes les plus fines sont transportées vers le plasma et cette perte est exprimée en *efficacité de nébulisation*. Dans le plasma, les gouttelettes de solution subissent une désolvatation, une vaporisation, une atomisation et enfin une ionisation, mais tous les atomes introduits dans le plasma ne seront pas ionisés. Cette perte au cours du processus d'ionisation est exprimée comme l'*efficacité d'ionisation*. Le centre même du nuage d'ions est alors échantillonné par les cônes et seule une fraction des ions initialement produits dans le plasma entrera dans le spectromètre de masse. Cette perte est exprimée en *efficacité d'extraction*. Les ions sont ensuite focalisés et échantillonnés à nouveau par la fente d'entrée et/ou de résolution, dans le cas d'un ICP-MS à secteur magnétique ou introduits dans une cellule de collision/réaction pour ICP-MS quadripolaire. Ainsi, seule une fraction des ions ayant traversé les cônes sera finalement détectée et cette perte au sein du MS est synthétisée en *efficacité de transfert*. Toutes ces efficacités, du plasma au détecteur, peuvent être résumées en une efficacité globale à savoir l'*efficacité de transmission*.

Le nombre d'ions détectés peut être exprimé en fonction du nombre de moles nébulisées et des différentes efficacités :

$$N_{ion-déte\text{ct}\acute{e}} = n_{ion} \cdot \mathcal{N}_A \cdot \mathcal{A}_{iso} \cdot (\eta_{Nébulisation} \cdot \eta_{ionisation-ion} \cdot \eta_{extraction-ion} \cdot \eta_{transfert-ion}) \quad (1)$$

Le nombre de moles nébulisées étant :

$$n_{ion} = \frac{C_{ion} \cdot t_d \cdot q_{liq}}{\mathcal{M}_{ion}} \quad (2)$$

En combinant l'équation (2) et l'équation (1), le nombre d'ions détectés est alors :

$$N_{ion-déte\text{ct}\acute{e}} = \frac{C_{ion} \cdot t_d \cdot q_{liq} \cdot \mathcal{N}_A \cdot \mathcal{A}_{iso}}{\mathcal{M}_{ion}} \cdot (\eta_{Nebulisation} \cdot \eta_{ionisation-ion} \cdot \eta_{extraction-ion} \cdot \eta_{transfert-ion}) \quad (3)$$

3.2. Nombre d'ions détectés à partir de l'ionisation d'une nanoparticule

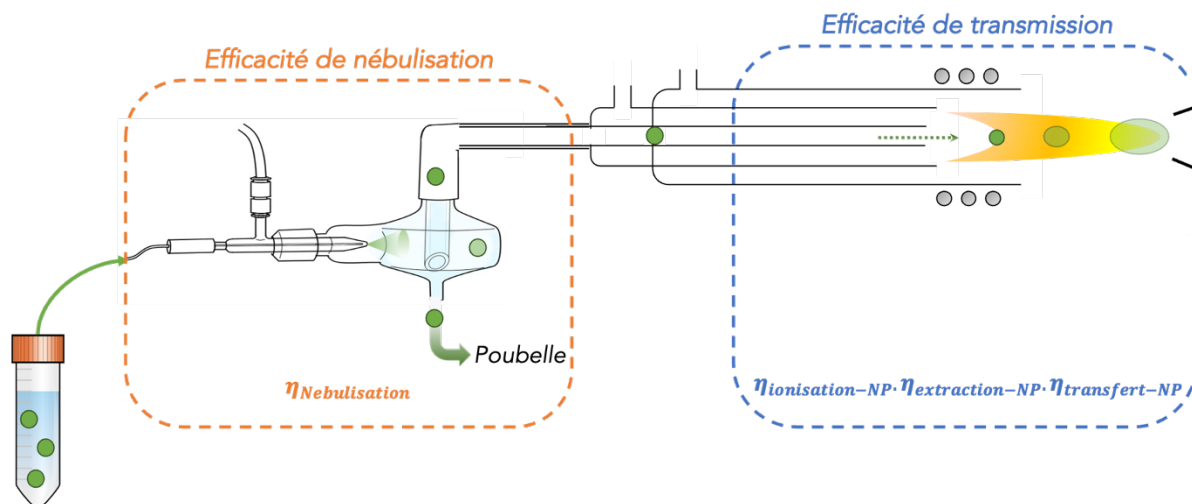


Figure 23: Vue éclatée de l'introduction d'une suspension de nanoparticules dans l'ICP via une chambre de nébulisation

Dans le cas d'un échantillon contenant des NPs (Figure 23), le nombre d'ions qui sont mesurés par le spectromètre de masse peut être exprimé indépendamment en fonction du nombre d'atomes par NP qui ont été introduits dans le nébuliseur ainsi que des efficacités précédemment définies. La différence ici par rapport à un étalon ionique est que le signal créé par chaque NP est bref et (plus ou moins) intense. A noter que pour les équations suivantes, nous supposons une forme sphérique des NP.

Le processus de nébulisation pour les NPs est le même que pour les étalons ioniques et ainsi, le nombre de NPs détectés peut être exprimé en fonction de l'efficacité de nébulisation tel que :

$$D_{NPs} = N_{NPs} \cdot q_{liq} \cdot D \cdot t_d \cdot \eta_{Nebulisation} \quad (4)$$

Ici, il est également important de noter que contrairement aux analyses d'un étalon ionique, la perte de matière dans le système d'introduction n'a aucun effet sur l'intensité du signal NP. En d'autres termes, la nébulisation n'a aucun effet sur le nombre de moles détectées par NP. En effet, ce nombre de moles n'est influencé que par les efficacités combinées du plasma et du spectromètre de masse et peut être exprimé par :

$$N_{NP-d\acute{e}te\text{ct}\acute{e}} = n_{NP} \cdot \mathcal{N}_A \cdot \mathcal{A}_{iso} \cdot (\eta_{ionisation-NP} \cdot \eta_{extraction-NP} \cdot \eta_{transfert-NP}) \quad (5)$$

Où, considérant des NPs de forme sphérique, le nombre de moles par NP nébulisé est :

$$n_{NP} = \frac{d_{NP}^3 \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho_{ion}}{6 \cdot \mathcal{M}_{ion}} \quad (6)$$

En combinant l'équation (5) et l'équation (6), le nombre d'ions détectés par NP est alors :

$$N_{NP-déteectée} = \frac{d_{NP}^3 \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho_{ion} \cdot \mathcal{N}_A \cdot \mathcal{A}_{iso}}{6 \cdot \mathcal{M}_{ion}} \cdot (\eta_{ionisation-NP} \cdot \eta_{extraction-NP} \cdot \eta_{transfert-NP}) \quad (7)$$

3.3. Détermination des efficacités en spICP-MS

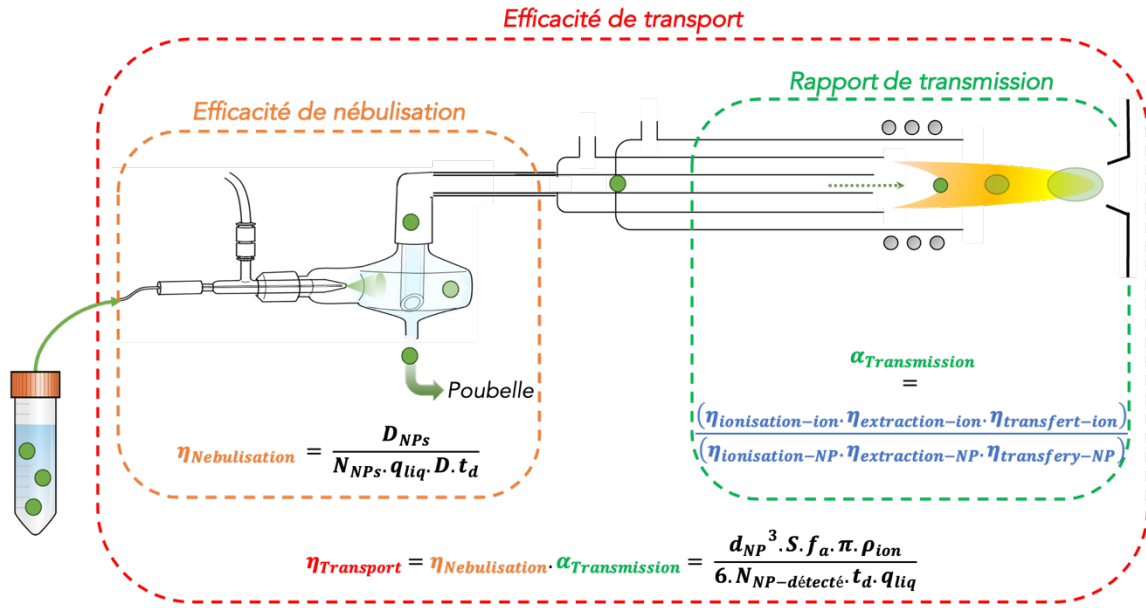


Figure 24: Synthèse des efficacités en spICP-MS à chaque étape après introduction d'une suspension de nanoparticules

Les pertes au cours de l'analyse par spICP-MS étant différentes pour des ions en solution et pour des NPs, il apparaît essentiel de les quantifier. Ces pertes, ou efficacités, sont synthétisées dans la Figure 24 et sont en pratique déterminées à l'aide d'un étalonnage externe *via* des étalons ionique (Figure 21 d), suivi par l'analyse d'une suspension de NP de référence (de taille et de nombre connus) (Figure 21 e). La suite de cette section démontre comment les équations nécessaires au calcul de ces efficacités sont établies.

En se basant sur les équations (3) et (7), le seul paramètre commun constant est la masse molaire M_{ion} . En combinant ces équations exprimant M_{ion} , on obtient :

$$C_{ion} \cdot t_d \cdot q_{liq} \cdot \eta_{Nebulisation} \cdot \frac{(\eta_{ionisation-ion} \cdot \eta_{extraction-ion} \cdot \eta_{transfert-ion})}{N_{ion-déteecté}} = \frac{d_{NP}^3 \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho_{ion}}{6} \cdot \frac{(\eta_{ionisation-NP} \cdot \eta_{extraction-NP} \cdot \eta_{transfert-NP})}{N_{NP-déteectée}} \quad (8)$$

Ensuite, nous pouvons exprimer l'*efficacité de nébulisation* comme :

$$\eta_{Nebulisation} = \frac{d_{NP}^3 \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho_{ion}}{6 \cdot N_{NP-déetectée} \cdot t_d \cdot q_{liq}} \cdot \frac{N_{ion-déetecté}}{C_{ion}} \cdot \frac{(\eta_{ionisation-NP} \cdot \eta_{extraction-NP} \cdot \eta_{transfert-NP})}{(\eta_{ionisation-ion} \cdot \eta_{extraction-ion} \cdot \eta_{transfert-ion})} \quad (9)$$

Pour simplifier l'équation (9), on sait que la sensibilité mesurée à partir de l'étalonnage de l'ICP-MS avec des étalons ionique, est la pente $S = \frac{N_{ion-déetecté}}{C_{ion}}$ (en cps ng⁻¹ L). Ce qui donne :

$$\eta_{Nebulisation} \cdot \frac{(\eta_{ionisation-ion} \cdot \eta_{extraction-ion} \cdot \eta_{transfert-ion})}{(\eta_{ionisation-NP} \cdot \eta_{extraction-NP} \cdot \eta_{transfert-NP})} = \frac{d_{NP}^3 \cdot S \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho_{ion}}{6 \cdot N_{NP-déetectée} \cdot t_d \cdot q_{liq}} \quad (10)$$

Les efficacités d'ionisation, d'extraction et de transfert ne sont pas connues *a priori*. Elles sont donc difficilement calculables et ne peuvent pas être supposées égales pour les ions en solution et les ions dans les NPs. Ainsi, il est possible de simplifier l'équation (10) en introduisant ici le terme *rapport de transmission* : $\alpha_{Transmission}$. Celui-ci est défini comme « le rapport de l'*efficacité de transmission* d'un étalon ionique (Figure 22) sur l'*efficacité de transmission* d'une NP (Figure 23) » (c'est-à-dire un facteur de correction des différences de transmission entre les 2 espèces) :

$$\alpha_{Transmission} = \frac{\eta_{transmission-ion}}{\eta_{transmission-NP}} = \frac{(\eta_{ionisation-ion} \cdot \eta_{extraction-ion} \cdot \eta_{transfert-ion})}{(\eta_{ionisation-NP} \cdot \eta_{extraction-NP} \cdot \eta_{transfert-NP})} \quad (11)$$

Par conséquent, l'équation (10) devient :

$$\eta_{Nebulisation} \cdot \alpha_{Transmission} = \frac{d_{NP}^3 \cdot S \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho_{ion}}{6 \cdot N_{NP-déetectée} \cdot t_d \cdot q_{liq}} \quad (12)$$

En définissant le terme à gauche de l'équation (12) comme étant l'*efficacité de transport* – $\eta_{Transport}$ – soit « le rapport du nombre de moles par NP au nombre d'ions finalement détectés », on obtient :

$$\eta_{Transport} = \eta_{Nebulisation} \cdot \alpha_{Transmission} \quad (13)$$

Ainsi, $\eta_{Transport}$ devient :

$$\eta_{Transport} = \frac{d_{NP}^3 \cdot S \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho_{ion}}{6 \cdot N_{NP-déetectée} \cdot t_d \cdot q_{liq}} \quad (14)$$

Également, en inversant simplement l'équation (4), $\eta_{Nebulisation}$ défini comme « le rapport du volume entrant dans le plasma au volume prélevé par la pompe d'introduction de l'échantillon » s'exprime simplement comme :

$$\eta_{Nebulisation} = \frac{D_{NPs}}{N_{NPs} \cdot q_{liq} \cdot D \cdot t_d}$$

(15)

A noter qu'alternativement $\eta_{Nebulisation}$ peut être déterminée par la collecte de la fraction non introduite dans le plasma ⁷ (c'est-à-dire le volume collecté en direction de la poubelle soustrait au volume total de l'échantillon nébulisé). Cependant, cette méthode conduit à des incohérences car elle ne prend pas en compte la probable évaporation d'une partie de la solution d'échantillon dans la chambre de nébulisation.

3.4. Détermination des distributions granulométriques des NPs par spICP-MS

Après avoir déterminé les efficacités, une nouvelle sensibilité – S' – de l'élément ciblé peut également être déterminée à l'aide d'un étalonnage externe de ce même élément sous forme ionique ^k. La distribution granulométrique des NPs dans un échantillon « inconnu » peut être ensuite calculé à partir de la distribution du signal mesuré (Figure 21 c) en utilisant $\eta_{Transport}$ pour le calcul des tailles et $\eta_{Nebulisation}$ pour le calcul de la concentration en nombre (Figure 25). Pour une composition chimique connue et en supposant une forme sphérique, en utilisant l'équation (13), le diamètre de la $i^{ème}$ classe peut être calculé en utilisant I_{i-NPs} , l'intensité de la $i^{ème}$ classe provenant de l'histogramme des intensités (Figure 21 c (bas)) :

$$d_{i-NPs} = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot (I_{i-NPs} - I_{bdf}) \cdot t_d \cdot q_{liq} \cdot \eta_{Transport}}{S' \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho}}$$

(16)

Ensuite, le diamètre moyen est calculé en utilisant $\overline{I_{NPs}}$, soit l'intensité moyenne de la distribution du signal :

$$\overline{d_{NPs}} = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot (\overline{I_{NPs}} - I_{bdf}) \cdot t_d \cdot q_{liq} \cdot \eta_{Transport}}{S' \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho}}$$

(17)

^k A noter que si l'élément ciblé dans l'échantillon inconnu est le même que celui utilisé pour le calcul des efficacités, il est possible d'utiliser la sensibilité – S' – préalablement déterminée.

Sur la base de l'équation (14), la concentration en nombre pour chaque $i^{\text{ème}}$ classe peut être calculée avec D_{i-NPs} , le nombre d'événements de la $i^{\text{ème}}$ classe de l'histogramme des intensités :

$$N_{i-NPs} = \frac{D_{i-NPs}}{\eta_{nebulisation} \cdot q_{liq} \cdot D \cdot t_d} \quad (18)$$

Enfin, la concentration totale en nombre est calculée de la manière suivante :

$$\overline{N}_{NPs} = \frac{\overline{D}_{NPs}}{\eta_{nebulisation} \cdot q_{liq} \cdot D \cdot t_d} \quad (19)$$

La Figure 25 synthétise la méthode de calcul de la distribution granulométrique des NPs à l'aide des équations 16 et 18.

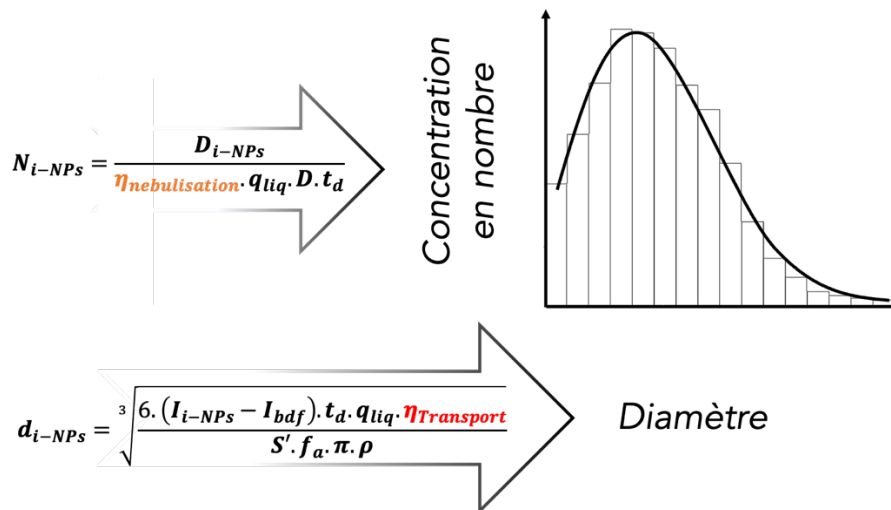


Figure 25: Synthèse de la détermination de la distribution granulométrique des NPs par spICP-MS

Les équations 14 à 19 sont donc les équations majoritairement utilisées dans les différentes études de cette thèse pour la détermination des distributions granulométriques, de la taille et de la concentration en nombre moyennes de NPs. Cependant, le développement analytique permettant la nébulisation des NPs directement au sein du plasma simplifie ces calculs. En effet, un système d'injection direct, le μ -dDIHEN⁸, est utilisé pour introduire les NPs en vue de l'analyse en mode particule unique. La démarche méthodologique ainsi que les équations simplifiées sont présentées dans le Chapitre II.

4. Le traitement des données

Afin de déterminer la distribution granulométrique des NPs dans un échantillon, la distribution du signal spICP-MS de l'élément sous forme NP doit être dissociée de celle du signal de l'élément sous forme ionique. Initialement, afin de déterminer la limite entre ces distributions, Pace et al. (2011)⁷ ont arbitrairement appliqué un seuil de coupure (ou cut-off). Cependant, cette méthode est adaptée lorsque les différentes populations de NP sont bien supérieures à la partie ionique (Figure 21 e). En effet, dans le cas d'un chevauchement entre les parties ionique et NPs (Figure 21 f), utiliser cette méthodologie rend la méthode subjective et conduit à une sous-évaluation des petites NPs. De fait, plusieurs méthodologies ont consécutivement été développées de manière à fiabiliser la détermination de la distribution granulométrique des NPs.

4.1. Seuil de coupure

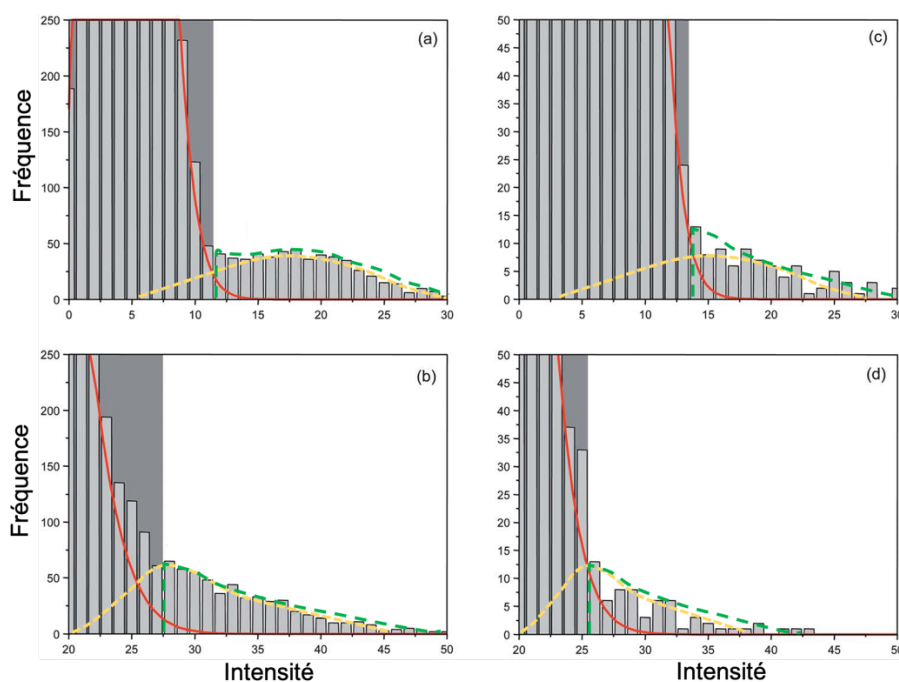


Figure 26: Effet du "n x sigma" ($n = 3$) sur différentes distributions d'intensités (en coups). En rouge, la distribution du signal ionique ; en jaune, la distribution « vraie » du signal NPs ; en vert, la distribution résultante du signal NPs après application du « 3 x sigma » (aire grisée) (modifiée de Larborda et al. (2013))⁶

La méthode « n x sigma » (sigma étant l'écart type du signal « ionique ») décrite par Tuoriniemi et al. (2012)⁹ permet une définition directe du seuil de coupure à partir de l'échantillon lui-même. Les événements de NPs sont isolés du signal ionique en fonction du nombre de fois où des valeurs aberrantes apparaissent dans l'ensemble de données. Ainsi, tous les événements supérieurs au « n x sigma » sont considérés comme des particules. Cependant, cette méthodologie de coupure stricte conduit généralement à sous-évaluer le nombre de petites NPs dans le cas où les signaux « ioniques » et « nanoparticulaire » se chevauchent. La Figure 26 montre différentes configurations. Dans le cas a), le

signal « nanoparticulaire » étant peu confondu avec le signal « ionique », la distribution résultante après application du « n x sigma » n'est que peu impactée. A l'inverse, dans les autres cas (b, c et d), plus la différence signal « nanoparticulaire » - signal « ionique » est faible, plus la distribution résultante s'éloigne de la distribution « vraie ».

4.2. Modélisation du bruit de fond

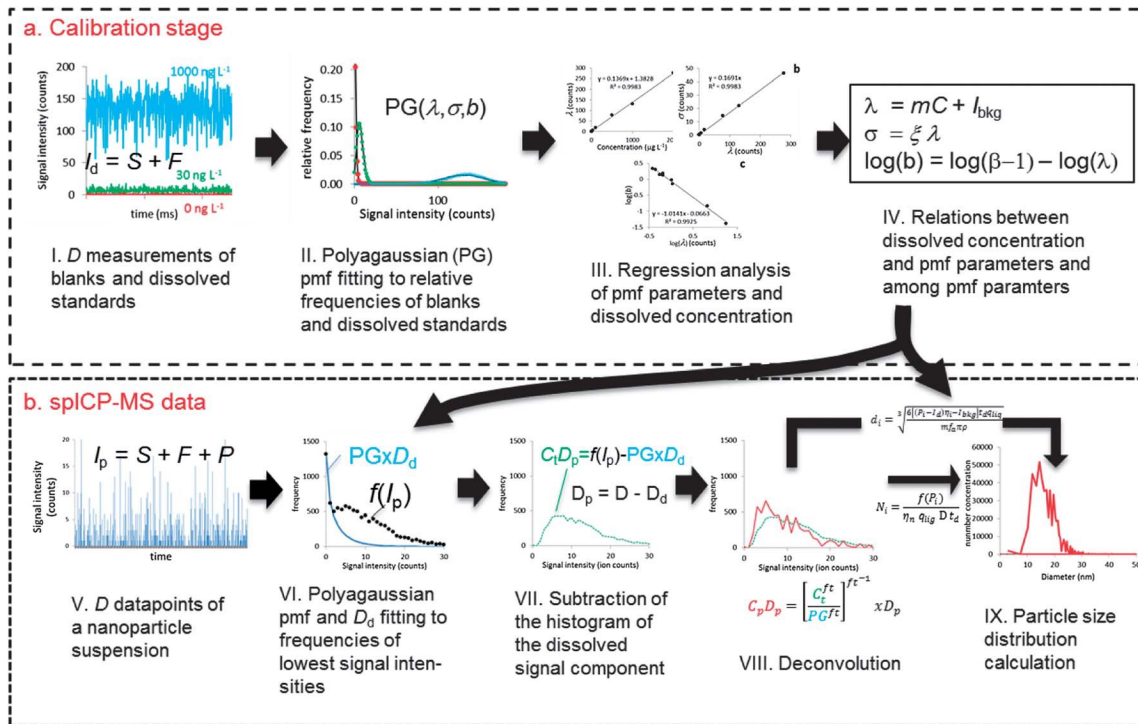


Figure 27: Vue d'ensemble de la méthode de convolution montrant les différentes étapes de (a) l'étape d'étalonnage à l'aide de blancs et d'étalons dissous et (b) l'analyse des données des mesures spICP-MS de suspensions de particules. Les flèches transversales montrent à quelles étapes de l'analyse des données spICP-MS sont utilisées les informations obtenues lors de l'étape d'étalonnage (reproduite de Cornelis et Hasselöv (2013))¹⁰

Afin de mieux discriminer les plus petites NPs, Cornelis et Hasselöv (2013)¹⁰ ont développé une méthode de déconvolution du signal qui consiste en différentes étapes de correction mathématique. Premièrement, des fonctions de masse de probabilité poly-gaussiennes (PG-pmf) sont ajustées aux distributions des signaux de blancs (sans l'élément ciblé) et d'étalons ioniques. Ensuite, les relations entre la concentration ionique et les paramètres pmf (moyenne, écart type et forme) et entre les paramètres pmf sont établies lors d'une analyse de régression. Deuxièmement, une PG-pmf est ajustée aux fréquences relatives des plus faibles intensités de la distribution du signal des échantillons avec des NPs. La composante du signal « ionique » est ensuite soustraite au signal total et déconvoluée du signal résultant. La distribution du signal uniquement « nanoparticulaire » est ainsi obtenue. En comparaison des méthodes précédentes, cette méthode permet de discriminer des NPs relativement petites de la partie ionique. Néanmoins, un seuil de coupure doit encore être défini entre les deux espèces afin de définir le nombre point à modéliser rendant cette méthode encore légèrement subjective.

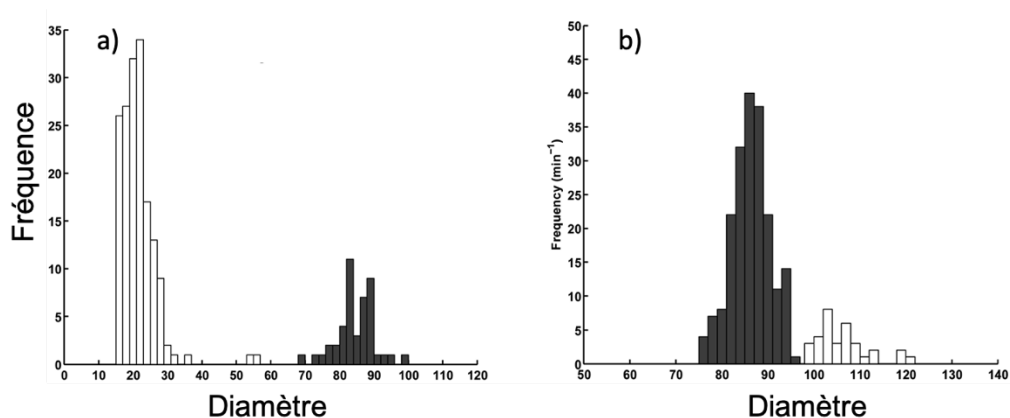
4.3. Apprentissage machine

Figure 28: Distributions granulométriques d'un mélange a) d'AuNPs de tailles théoriques de 20 et 80 nm et b) d'AuNPs de tailles théoriques de 80 et 100 nm (Bi et al. (2014))¹¹

En 2014, Bi et al. (2014)¹¹ ont pour la 1^{ère} fois présenté une méthode d'apprentissage automatique appliquée aux données spICPMS, le clustering par la méthode des k-moyennes – le *k-means* –. Cette méthodologie utilise un algorithme qui permet un partitionnement des données en « k » groupes/clusters. La définition de chaque groupe est effectuée à l'aide d'un écart type minimisé dans le cluster, et les points de données sont ensuite attribués au centroïde (la moyenne) le plus proche. De la même façon que la méthode « n x sigma », le *k-means* n'utilise que les données de l'échantillon lui-même pour déterminer le seuil entre événements NPs et ioniques et/ou entre de groupes de NPs (Figure 28) mais avec l'avantage d'être non supervisée (aucun seuil n'est renseigné par l'expérimentateur.trice). Cependant, la méthode s'est avérée limitée une fois qu'un chevauchement entre les parties NPs et ioniques se produit. En effet, cet algorithme suppose que les clusters sont présents dans les mêmes proportions et possèdent la même variance et aucune covariance.

Une nouvelle approche d'apprentissage machine se basant sur le modèle de mélange gaussien (GMM) est décrite en détails dans le Chapitre III. En résumé, considérant une somme de plusieurs gaussiennes, les paramètres de chacune d'elles sont estimés en s'appuyant sur la distribution du signal global. Chaque paramètre (la variance, la moyenne et l'amplitude) est évalué de manière itérative suivant l'algorithme d'espérance-maximisation (EM) et optimisé selon le critère de maximum de vraisemblance. Le GMM permet ainsi de distinguer les signaux « ioniques » et « nanoparticulaires » et de reconstruire leur distribution même dans le cas où ces deux composantes empiètent l'une sur l'autre. Cependant, comme toute approche itérative liée à l'algorithme d'EM, il est possible que celui-ci converge vers un minimum dit local et non sur l'optimum global.

4.4. Soustraction des histogrammes

Plus récemment, Wang et al. (2020)¹² ont développé une nouvelle approche pour se prémunir des artefacts liés à la discrimination du signal NPs dans le signal global. Cette méthode est basée sur la soustraction des histogrammes. Il est ici nécessaire de faire la mesure spICP-MS de l'échantillon après ultra-filtration (taille de pore = 1 kDa). Par exemple dans le cas d'échantillons d'eau naturelle, l'ultrafiltrat, échantillon résultant sans NPs, représente ainsi de façon réaliste le bruit de fond ionique. En pratique, l'histogramme de la fréquence en fonction de l'intensité de l'ultrafiltrat est soustrait à celui de l'échantillon d'eau brute (non ultrafiltrée) en utilisant la même largeur de classe (même plage d'intensité pour chaque classe des deux histogrammes). L'histogramme résultant est ensuite utilisé pour calculer la distribution granulométrique des NPs. Cette dernière méthodologie apparaît comme la plus avancée pour la détermination de la distribution granulométrique de NPs dans des échantillons naturelles, du fait qu'elle utilise l'échantillon en lui-même tout en évitant que l'expérimentateur.trice n'ait à définir de paramètres. Cependant, cette méthodologie est encore à améliorer du fait que la soustraction d'un histogramme par un autre n'a pas de rigueur statistique. Des classes avec des événements négatifs résultent par exemple de cette soustraction et sont arbitrairement supprimées.

4.5. Synthèse des méthodologies utilisées

Au cours de ces travaux de thèse, plusieurs de ces méthodologies sont utilisées :

i/ Pour l'analyse des TiO₂-NPs dans des échantillons riches en calcium présenté dans le Chapitre I, le signal obtenu est déconvolué à l'aide du logiciel *Nancount*. Lors de l'acquisition des données une composante liée à la matrice (⁴⁸Ca) est toujours présente à $m/z = 48$ malgré l'utilisation de la haute-résolution. Il est donc nécessaire de retirer cette composante non-désirée au signal global afin d'obtenir la distribution du signal du ⁴⁸Ti pour en déduire la distribution en masse des TiO₂-NPs.

ii/ Le développement d'un système d'injection directe des NPs dans le plasma exposé dans le Chapitre II fait appel à la méthodologie du seuil de coupure. Des NPs modèles ont servi au cours de ce développement analytique et celles-ci produisent un signal supérieur au bruit de fond. De plus, le signal de ces NPs étant gaussien du fait de leur monodispersité, il est donc simple de l'isoler à l'œil nu du bruit fond.

iii/ Le Chapitre III présente une nouvelle approche plus complète et robuste pour le traitement des données. Cette approche met en application les deux méthodologies d'apprentissage machine décrite ci-dessus. Le k-means sert tout d'abord pour le calcul des efficacités à l'aide de NPs modèles monodispersées. La fiabilité et la précision du modèle de mélange gaussien (GMM) est ensuite démontré pour différentes configurations signal « ionique » vs signal « nanoparticulaire ».

iv/ L'approche finale du traitement des données développé dans le Chapitre IV est différente des trois précédentes. Cependant, la 1^{ère} étape réalisée dans le logiciel embarqué de l'ICP-ToF-MS consiste à extraire le signal des NPs du signal « ionique » à l'aide une approche identique au « $n \times \sigma$ »¹³.

5. Glossaire

$\eta_{Nebulisation}$ – *efficacité de nébulisation* – le rapport entre le nombre de moles arrivant dans le plasma et le nombre de moles nébulisées,

$\eta_{Transport}$ – *efficacité de transport* – le rapport du nombre de moles par NP au nombre d'ions finalement détectés,

$\eta_{ionisation}$ – *efficacité d'ionisation* – le rapport du nombre d'ions créés sur le nombre de moles arrivant dans le plasma,

$\eta_{extraction}$ – *efficacité d'extraction* – le rapport du nombre d'ions créés sur le nombre de moles arrivant dans le plasma,

$\eta_{transfert}$ – *efficacité de transfert* – le rapport entre le nombre d'ions détectés et le nombre d'ions extraits vers le MS,

$\eta_{transmission}$ – *efficacité de transmission* – la multiplication des efficacités d'ionisation, d'extraction et de transfert,

$\alpha_{Transmission}$ – *rapport de transmission* – le rapport de l'efficacité de transmission d'un étalon ionique sur l'efficacité de transmission d'une NP.

 A_{iso} , l'abondance isotopique (en %) de l'isotope mesuré,

C_{ion} , la concentration de l'ion dans l'étalon ionique (en ng L⁻¹),

D , le nombre total de données (soit le nombre de dwell-time),

d_{NP} , le diamètre d'une NP (en nm),

D_{NPs} , le nombre total d'évènements « nanoparticulaires »,

f_a , la fraction massique dans la NP de l'élément analysé (en %),

I_{bdf} , l'intensité du bruit de fond (ou la partie ionique d'un échantillon contenant des NPs) (en cps),

I_{NPs} , l'intensité des NPs (en cps),

M_{ion} , la masse molaire (en ng mole⁻¹) de l'élément ciblé,

m_{NP} , la masse d'une NP (sphérique) (en ng) exprimée sous la forme $m_{NP} = \frac{d_{NP}^3 \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho_{ion}}{6}$,

N_A , la constante d'Avogadro (en mole⁻¹),

$N_{ion-déteecté}$, le nombre d'ions détectés (en cps),

n_{ion} , le nombre de mole nébulisé (en mole),

$N_{NP-déteecté}$, le nombre d'ion détecté par NPs (en cps),

n_{NP} , le nombre de mole nébulisée par NPs (en mole) initialement exprimé sous la forme $n_{NP} = \frac{m_{NP}}{M_{ion}}$,

N_{NPs} , la concentration totale en nombre de particule (en NP mL⁻¹),

q_{liq} , le débit d'aspiration de l'échantillon (en L min⁻¹),

ρ_{ion} , la masse volumique (en ng nm⁻³) et

t_d , le temps d'intégration (ou dwell-time) (en min).

6. Bibliographie

1. O. Borovinskaya, B. Hattendorf, M. Tanner, S. Gschwind and D. Günther, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2013, **28**, 226-233.
2. O. Borovinskaya, S. Gschwind, B. Hattendorf, M. Tanner and D. Günther, *Analytical chemistry*, 2014, **86**, 8142-8148.
3. A. Scheffer, C. Engelhard, M. Sperling and W. Buscher, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, **390**, 249-252.
4. K. Proulx, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2016, **408**, 5147-5155.
5. M. Mansor, S. r. Drabesch, T. Bayer, A. Van Le, A. Chauhan, J. Schmidtman, S. Peiffer and A. Kappler, *Environmental Science & Technology Letters*, 2021.
6. F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea and J. R. Castillo, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2013, **28**, 1220-1232.
7. H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Analytical chemistry*, 2011, **83**, 9361-9369.
8. P. Louvat, M. Tharaud, M. Buisson, C. Rollion-Bard and M. F. Benedetti, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2019, **34**, 1553-1563.
9. J. Tuoriniemi, G. Cornelis and M. Hassellöv, *Analytical chemistry*, 2012, **84**, 3965-3972.
10. G. Cornelis and M. Hassellöv, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, **29**, 134-144.
11. X. Bi, S. Lee, J. F. Ranville, P. Sattigeri, A. Spanias, P. Herckes and P. Westerhoff, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, **29**, 1630-1639.
12. J.-L. Wang, E. Alasonati, M. Tharaud, A. Gelabert, P. Fiscaro and M. F. Benedetti, *Water Research*, 2020, **176**, 115722.
13. P. Shaw and A. Donard, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2016, **31**, 1234-1242.

■ CHAPITRE I

TiO₂ nanomaterials detection in calcium rich matrices by spICP-MS. A matter of resolution and treatment

Mickael Tharaud*, Andreas P. Gondikas^{§,β}, Marc F. Benedetti*, Frank von der Kammer[§], Thilo Hofmann[§], Geert Cornelis[†].

* Université de Paris, Institut de physique du globe de Paris, CNRS, F-75005 Paris, France

§ University of Vienna, Department of Environmental Geosciences and Environmental Science Research Network, Althanstr. 14, UZA II, 1090 Vienna, Austria

^β Department of Marine Sciences, University of Gothenburg, Kristineberg 566, 45178 Fiskebäckskil, Sweden

[†] Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

Ce chapitre est issu d'un article publié dans *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.

La version publiée (DOI : 10.1039/c7ja00060j) ainsi que les informations complémentaires sont disponibles à l'adresse suivante :

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ja/c7ja00060j>

Table des matières

1.	RESUME.....	- 61 -
2.	ABSTRACT.....	- 62 -
3.	INTRODUCTION.....	- 63 -
4.	EXPERIMENTAL SECTION.....	- 65 -
4.1.	<i>Chemicals</i>	- 65 -
4.2.	<i>Sample preparation and verification</i>	- 65 -
4.3.	<i>Analytical methods</i>	- 66 -
4.4.	<i>Data treatment</i>	- 67 -
5.	RESULTS AND DISCUSSION.....	- 69 -
5.1.	<i>Background, sensitivity and size detection limits (D_{min})</i>	- 69 -
5.2.	<i>Detection of TiO_2 NM104 in calcium matrix by spICP-MS</i>	- 73 -
5.2.1.	Experimental resolution of the background.....	- 73 -
5.2.2.	Mathematical correction of the background (deconvolution method).....	- 76 -
5.3.	<i>Method validation</i>	- 79 -
6.	CONCLUSION.....	- 81 -
7.	REFERENCES.....	- 82 -

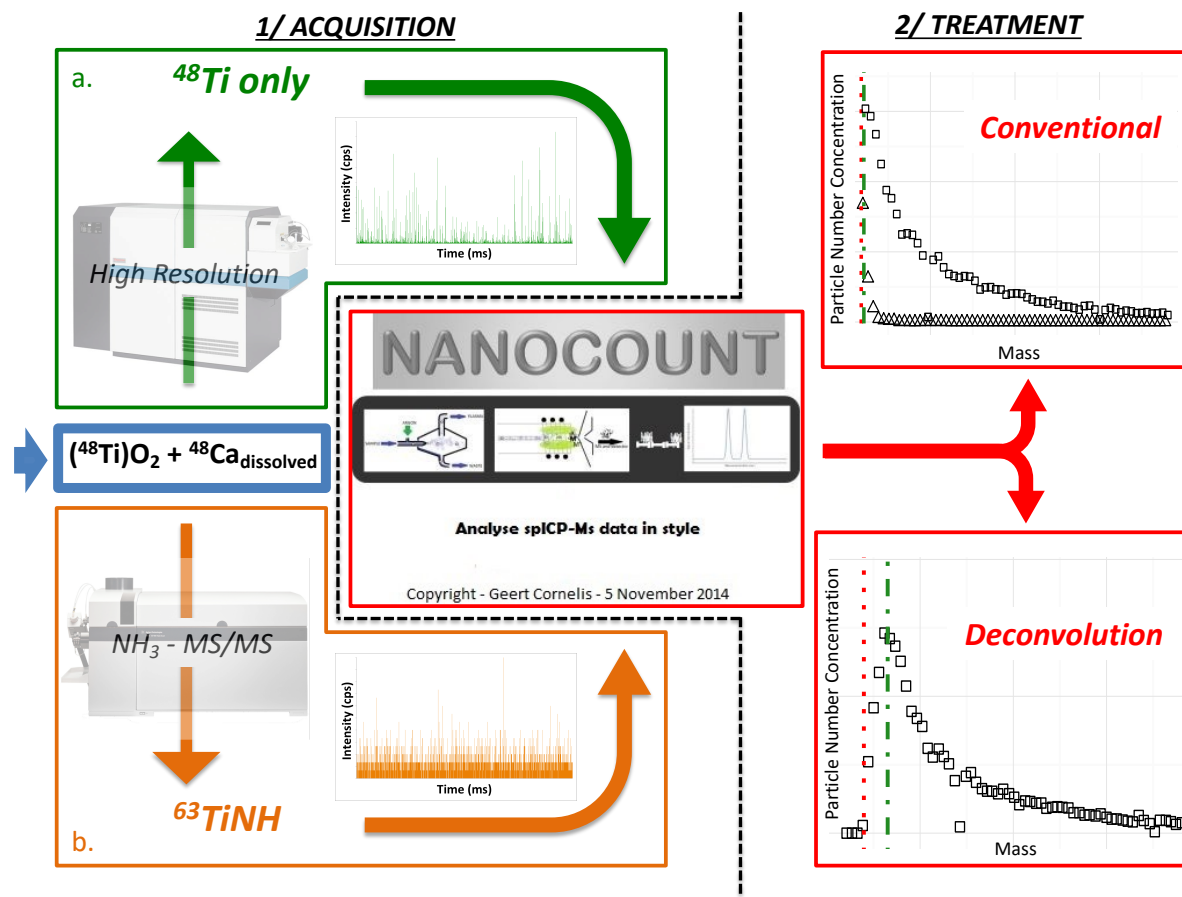
1. Résumé

Les nanoparticules à base de titane (TiO₂-NPs) ont des propriétés particulières qui sont exploitées dans le cadre de nombreuses applications industrielles. Ses propriétés en font l'une des NPs les plus produites au monde. Le devenir, le comportement et la toxicité potentielle des TiO₂-NPs après leur libération probable dans l'environnement font encore débat. Il a cependant été démontré que les plus petites NPs d'or par exemple sont potentiellement plus toxiques que les plus grandes en raison d'une biodisponibilité plus élevée. Il est donc nécessaire de développer des méthodes de détection pour les TiO₂-NPs relativement petites *a minima* du point de vue de l'évaluation des risques. En utilisant la rapidité, la sélectivité et la sensibilité de la spectrométrie de masse à source plasma (ICP-MS), l'ICP-MS en mode particule unique (spICP-MS) est devenue une technique puissante pour la détermination de la concentration en nombre, de la taille et de la composition des NPs. En effet, cette technique permet une détection précise et rapide des NPs dans des échantillons environnementaux complexes où l'on peut trouver une faible concentration de NPs et des concentrations élevées en espèce dissoute. Un des enjeux majeurs de la spICP-MS est de déterminer la taille des NPs dont la taille est proche de la limite de détection (D_{min}), cette dernière étant influencée par la concentration de l'élément sous forme dissoute. Des concentrations élevées en calcium dans des matrices complexes telles que les eaux de rivière entravent également la détection des TiO₂-NPs par spICP-MS, en raison de l'interférence isobarique du ⁴⁸Ca sur l'isotope le plus abondant du Ti (⁴⁸Ti).

Plusieurs approches ont été utilisées ici afin de réduire cette interférence pour déterminer de manière plus robuste et précise la taille de TiO₂-NPs même en présence de fortes concentrations de Ca (jusqu'à 100 mg L⁻¹). L'ICP-MS/MS a été utilisé avec de l'ammoniac comme gaz de cellule de réaction et l'ICP-MS à haute résolution (HR) a été utilisé dans différentes résolutions. Ces approches ont été comparées à l'approche habituellement utilisée, à savoir la mesure des isotopes minoritaires du Ti (⁴⁷Ti et ⁴⁹Ti). Les données spICP-MS ont ensuite été traitées avec une méthode de déconvolution pour filtrer les signaux dissous résiduels et identifier la meilleure approche pour détecter la taille correspondante (en équivalent sphérique) la plus faible possible (D_{min}). L'utilisation de l'ICP-MS/MS a permis une diminution à 64 nm du D_{min} théorique par rapport à l'utilisation d'ICP-MS quadripolaire standard. La sensibilité a cependant été réduite par le gaz de réaction et l'augmentation des concentrations en Ca a également augmenté la valeur du D_{min} . La sensibilité comparativement plus élevée du HR-ICP-MS a permis de diminuer à 10 nm le D_{min} théorique en haute-résolution. Son utilisation apparaît donc comme étant le meilleur compromis résolution – sensibilité. En présence de fortes concentrations de Ca, une augmentation du D_{min} de 10 à 43 nm est cependant toujours observée. En combinant cette approche avec la déconvolution, l'augmentation de la concentration en Ca ne présente plus aucun effet négatif sur les distributions en masse de TiO₂-NPs. Cela rend donc possible une détermination plus précise des distributions en masse/taille des TiO₂-NPs dans les écosystèmes aquatiques riches en Ca.

2. Abstract

High Ca concentrations in complex matrices such as river waters often hamper detection of titanium nanomaterials (TiO₂ NPs) by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (spICP-MS), because of isobaric interferences of ⁴⁸Ca on the most abundant Ti isotope (⁴⁸Ti). Several approaches were used to reduce this interference while measuring TiO₂ in solutions with different Ca concentrations up to 100 mg L⁻¹. ICP-MS/MS was used with ammonia as reaction cell gas and high resolution (HR) ICP-MS was used at different resolution settings. These approaches were compared with measuring different Ti isotopes (⁴⁷Ti, ⁴⁹Ti). spICP-MS data was then treated with a deconvolution method to filter out dissolved signals and identify the best approach to detect the lowest possible corresponding spherical size of TiO₂ NP (D_{min}). ICP-MS/MS allowed for an important decrease of the theoretical D_{min} compared to standard quadrupole ICP-MS, down to 64 nm in ultrapure water, however the sensitivity was reduced by the reaction gas and increasing Ca concentrations also increased the D_{min} . The comparably higher sensitivity of HR-ICP-MS allowed for theoretically measuring D_{min} of 10 nm in ultrapure water. Combined with the deconvolution analysis, the highest resolution mode in HR-ICP-MS leads to the lowest D_{min} at high Ca concentrations, even though significant broadening of the measured mass distributions occurred for TiO₂ NPs at Ca concentrations up to 100 mg L⁻¹.



3. Introduction

Titanium based nanomaterials (TiO₂ NPs) have properties for many applications such as cosmetic products, medication, pigments¹. More than 50,000 tons of these materials were produced in 2010, a value expected to rise to 201,000 tons by 2015 and thus, becoming one of the most produced NPs in the world². The fate, behaviour and potential toxicity of TiO₂ NPs after being released in the environment are under debate³. It was shown for NPs other than TiO₂, that relatively smaller NPs potentially exert more toxicity than larger ones because of a higher bioavailability⁴. There is thus a need to develop methods of detection for relatively small TiO₂ NPs, both from a risk assessment point of view and quality control in production.

Most of the common techniques used for determination of particle number concentration, size and composition present several limitations such as extensive time investment (*i.e.* transmission electron microscopy), limitations with regards to lowest detectable size and number concentration (nanoparticle tracking analysis) and the impossibility to analyse number concentrations of polydisperse suspensions (dynamic light scattering)^{5,6}. Moreover, the principal weakness of all these methods is the impossibility to determine all 3 parameters simultaneously⁷. Thus, using the rapidity, selectivity and sensitivity of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), single particle ICP-MS (spICP-MS) is becoming a powerful technique for the simultaneous determination of the number concentration, the size and the composition of NPs⁸. Indeed, this technique allows a precise and rapid detection of NPs without much sample treatment⁹ in complex environmental samples where low NP concentration and high dissolved concentrations can be found¹⁰.

The concept of spICP-MS is well explained by Degueldre *et al.*¹¹. Briefly, a solution containing NPs is nebulized into the plasma. NPs form an ion cloud that is sampled by the mass spectrometer and finally collected by the detector. At millisecond dwell times, the ion cloud produces a signal pulse, whose intensity is directly proportional to the number of ions in the cloud and therefore to the NP size, if the particle shape, density and composition are known. As these are often not completely known, a spherical size and a particular composition (e.g. TiO₂) are usually assumed leading to a metric that can be described as the corresponding spherical size, which will shortly be referred to as “size” in this work. An external calibration (intensity vs mass) using corresponding dissolved metal standards of known concentration is necessary. First, the intensity of the pulse is converted to mass using the slope, the y-intercept and the transmission efficiency and, supposing a spherical shape, a size is determined. Then, assuming a constant nebulisation efficiency, the number of detected pulses is directly proportional to the particle number concentration in the sample¹². Note that, the transmission efficiency equals the proportion of ions generated in the plasma that is eventually detected and the nebulisation (*i.e.* transport) efficiency is the ratio of the number of NPs that enter the plasma to the total number aspirated. Both are calculated using Au NPs as reference NPs.

The two major challenges of spICP-MS for the purpose of determining particle sizes are the measurement of particles whose size is close to the limit of detection (D_{min}) and the assumptions that have to be made in terms of particle shape and composition. In spICP-MS two detection limits are of importance: the D_{min} which is the lowest detectable particle size and ($LOD_{numberconcentration}$) which is the lowest detectable particle number concentration above background particle counts and shot noise and must not be confused with detection limits of ICP-MS for detection of dissolved ions (LOD_{ion}). This work focuses on D_{min} , *i.e.* the lowest NP size calculated from the lowest intensity distinguishable from the background and the associated noise. D_{min} is influenced by the composition and stoichiometry of the particle and eventually the isotope measured and the ionization potential of the element that is measured as these determine the number of ions that can be generated from each particle in the plasma as well as the transmission efficiency of ions from the plasma to the detector. However, the baseline also plays an important role. The baseline is composed of the instrument noise (*i.e.* flicker and shot noises), isobaric and polyatomic interferences, and the signal emerging from the dissolved part of the measured isotope¹³. D_{min} of TiO₂ NPs is relatively large because the mass fraction of Ti in TiO₂ is only 59.93% and the total mass of Ti is distributed over several isotopes, with one major (⁴⁸Ti) and several minor abundances. In addition, all isotopes of Ti (⁴⁶Ti, ⁴⁷Ti, ⁴⁸Ti, ⁴⁹Ti and ⁵⁰Ti) may be interfered by polyatomic compounds (*i.e.* ³²S¹⁶O, ³⁶Ar¹²C on ⁴⁸Ti). In this work we focus on isobaric interferences; specifically, the most abundant isotope, ⁴⁸Ti (73.72 %), is interfered by an isotope of calcium (⁴⁸Ca; 0.19 %). While in pure samples this interference would be negligible, in most natural waters Ca appears at orders of magnitude above the concentration of Ti, making this isobaric interference important. Although ⁴⁸Ti could provide the best D_{min} , the ⁴⁸Ca signal will dominate the signal at m/z 48 at insufficient mass resolution, increasing the baseline in spICP-MS when measuring ⁴⁸Ti and thus decreasing the accuracy of the measurement. Therefore, in the presence of Ca, the isotopes ⁴⁷Ti or ⁴⁹Ti are commonly chosen instead in presence of Ca¹⁴. Nevertheless, these have much lower abundance (7.44% and 5.41%, respectively) and in combination with the aforementioned factors result in relatively large D_{min} for TiO₂ (*ie* > 90 nm)¹⁵.

The aim of this study is to decrease the D_{min} of TiO₂ NPs, especially in the presence of high calcium concentrations, as is typical for natural waters. Indeed, Gaillardet *et al.* (1999)¹⁶ have shown that, in natural river water, [Ca] varied from *ca.* 2 mg L⁻¹ to *ca.* 110 mg L⁻¹. Additionally, Westerhoff *et al.* (2011)¹⁷ have indicated the presence of TiO₂ NPs between 4 and 30 nm in diameter in WWTP effluents that are particularly released into lakes, rivers and streams. Thereby, in this kind of sample, the concentration-translated signal of Ti compared to the concentration of Ca can be insignificant. So, to reduce the D_{min} , we focused on measuring the ⁴⁸Ti isotope¹⁸. To differentiate the NPs signal from the background, we proceeded: i) experimentally using either the high or medium resolution mode of an HR-ICP-MS or the tandem MS combined to a reaction cell of an ICP-MS/MS and ii) mathematically using a deconvolution method developed by Cornelis and Hasselöv¹³. The present paper finally critically evaluates the options used to eliminate the interferences, compares these approaches to

measuring the ⁴⁷Ti or ⁴⁹Ti isotopes instead and proposes the best way to quantify and characterize TiO₂ in the presence of high Ca concentrations.

4. Experimental Section

4.1. Chemicals

Ultrapure water (resistivity $\approx 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) from a Millipore Integral 5 (Millipore, Milford, MA, USA) was used throughout the work for dilutions. Mono-elemental standards of Ti and Au at 1 mg mL^{-1} were obtained from SCP Science (Quebec, Canada). Normapure nitric acid (VWR, Radnor, PA, USA) was purified into a sub-boiler DST 1000 (Savillex, Eden Prairie, MN, USA). For the external calibration, all standards were diluted in ultrapure water containing 1% distilled HNO₃.

Synthetic calcium matrix solutions were prepared from a SigmaUltra powder (Ca(NO₃)₂·4H₂O; purity > 99.0%, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). A 1 L-batch of both solutions at around 5 and 50 mg(Ca) L⁻¹ were prepared by dissolution of the precisely weighted powder in Ultrapure water.

Citrate capped AuNPs with a nominal diameter of 60 nm were obtained from British Biocell International (Cardiff, UK). The mean diameter and the concentration provided by the supplier were 59.9 nm with a coefficient of variation of $\leq 8\%$ and $2.60 \cdot 10^{10}$ particles mL⁻¹, respectively. Before spICP-MS measurements, a suspension diluted 10⁵ times (NPs number $\approx 2.60 \cdot 10^5$ particles mL⁻¹) was freshly prepared to calculate the nebulisation efficiency of each ICP-MS using the size method based on the TEM-measured median size of the 60 nm particles. At millisecond dwell times the probability of coincidence decreases by decreasing the concentration. Thus, several AuNPs concentrations have been studied and this concentration was preferred, as it is the highest concentration without particle coincidence.

4.2. Sample preparation and verification

A hydrophilic TiO₂ NP powder consisting of rutile coated with an aluminium oxide layer (NM104; Joint Research Centre, IHCP, Ispra, Italy) was used in this study. In order to obtain a stable suspension, 10 mg of the powder was precisely weighted and suspended in 10 mL of ultrapure water in a 15 mL polypropylene centrifugation tube. The suspension was subsequently sonicated for 20 minutes at maximum amplitude with 15 seconds intervals and 1-minute breaks using a sonication probe, Vibracell 100 W (Sonics and Materials Inc., Newton, CT, USA) equipped with a 6 mm microtip. Ice was used to cool down the tube while sonicating. The tube was subsequently centrifuged at 1,750 g for 90 minutes to remove remaining aggregates and large particles (cut-off diameter 40 nm for spheres at 4.23 g cm^{-3} density). Finally, the top 5 mL of the resulting suspension was retained as stock suspension (dispersion methodology development in paragraph SI1 in supporting information). The stock

suspension was diluted at several concentrations in both ultrapure water and synthetic calcium matrix solutions previously prepared.

Immediately prior to spICP-MS analysis, the Z-average hydrodynamic diameter of the stock suspensions, diluted 10 times in solutions of different Ca concentrations was measured by Dynamic Light Scattering (Nano ZS; Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) to verify that the hydrodynamic diameter remains the same in presence of Ca (data in Table SI2 in supporting information).

4.3. Analytical methods

Table 1 : ICP-MS operating conditions and spICP-MS parameters

Parameter (unit)	HR-ICP-MS	ICP-MS/MS
Spray chamber type	Quartz cyclonic	Quartz cyclonic
Nebulizer type	PFA MicroFlow	PFA MicroFlow
Plasma power (W)	1315	1550
Cool Gas (L min ⁻¹)	16	15
Auxiliary Gas (L min ⁻¹)	1	1
He gas (mL min ⁻¹)	NA	1
NH ₃ gas (%)	NA	10
Sample Gas (L min ⁻¹)	0.95	0.80
Sample uptake (μL min ⁻¹)	220	210
Monitored isotope	⁴⁷ Ti, ⁴⁸ Ti and ⁴⁹ Ti	⁴⁷ Ti and ⁶³ (TiNH)
Dwell time (ms)	5	3
Number of dwell time	10000	35713
Transmission efficiency (%)	MR = 7 ; HR = 1	7

The measurements by spICP-MS were performed on 2 different Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometers. The ICP-MS/MS (Agilent 8800, Santa Clara, CA, USA) is a tandem-MS that allows a chemical resolution of polyatomic and isobaric interferences by using two quadrupoles separated by an octopole reaction cell (ORC). Differences in the reaction kinetics and products between the polyatomic clusters or isobaric isotopes and the gas in the ORC can be used to minimize isobaric interferences. In principle the first quadrupole selects the target m/z where also the specific interference molecules and isotopes will pass together with the target isotope, then in the ORC either the (few) remaining interferences are chemically resolved and the second quadrupole is set to the same m/z as the first or the target isotope is selectively reacted with the cell gas and the second quadrupole is set to the adduct m/z thereby removing the remaining interferences. Two reaction gases were tested, oxygen and ammonia. The former gas did not produce ions that were selectively reacting with ⁴⁸Ti and not with ⁴⁸Ca

(paragraph SI3 in supporting information), whereas ammonia selectively produced reaction product ions with ⁴⁸Ti. The flow rate of ammonia gas in the ORC was optimized based on the detector response to various Ti concentrations and the intensity of a blank, where the goal was to attain the highest sensitivity, with the lowest background. The reaction product ion ⁶³(TiNH) was chosen for the analysis of TiO₂ NPs. Overall, the ⁴⁸Ti and ⁴⁸Ca isotopes are isolated by the first quadrupole and lead in the ORC, where they react with ammonia. The reaction product ⁶³(TiNH) is then isolated with the second quadrupole and collected into the detector, thus eliminating ⁴⁸Ca. It has to be noted that the ammonia gas used in this system was a mix of ammonia with Helium, in order to minimize risk of damaging the instrumentation due to the corrosive nature of ammonia; an additional 1 mL min⁻¹ flow of He gas was also a prerequisite. It is therefore likely that signal suppression occurred due to the presence of He and higher sensitivities can be achieved with a higher purity ammonia gas.

The HR-ICP-MS (Element II, ThermoScientific, Bremen, Germany) enables working in different resolution modes by varying the entrance (*i.e.* before the magnetic field) and the exit (*i.e.* before the detector) ion beam width (Resolution = $M/\Delta M$ (*i.e.* average mass on mass difference); Low Res. = *ca.* 400, Medium Res. = *ca.* 4,000, and High Res. = *ca.* 10,000). In our case, the theoretical resolution needed to separate ⁴⁸Ti ($m/z = 47.948$) from ⁴⁸Ca ($m/z = 47.953$) is at least 9,590. Thereby, the separation power of the Element II in high resolution mode is high enough to separate both isotopes.

Daily, both ICP-MS machines were first tuned to ensure maximum sensitivity and stability while also maintaining low uranium oxide formation ($UO/U \leq 5\%$) and secondly, high-resolution lenses were optimized in order to reach the best separation of ⁴⁸Ti and ⁴⁸Ca on the HR-ICP-MS (screen-shot in Figure SI4 in supporting information) as well as the octopole settings on the ICP-MS/MS. Then, nebulisation and transmission efficiencies were determined. Table 1 gives representative operating conditions and spICP-MS parameters for both instruments. Note that millisecond dwell-times were used in this study, meaning that NPs samples were carefully diluted in order to avoid coincidence.

Standards of dissolved Ti were prepared using the same Ca concentration in which the TiO₂ NPs were measured.

4.4. Data treatment

As mentioned in the introduction, the D_{min} increases when the baseline (*i.e.* instrument noise, polyatomic and isobaric interferences and signal emerging from the dissolved element) and particulate signals are of the same order of magnitude. In order to distinguish relatively small NPs from the baseline, first the “conventional data treatment” following the procedure of Pace *et al.* (2011)¹² was applied using the D_{min} as the limit between both signals and secondly the “deconvolution method” was applied to monitored data to reach a better definition of the NPs peak. This method consists of different mathematical correction steps¹³ on:

- i) *External calibration.* Polya-Gaussian probability mass functions (PG-pmf) are fitted to signal distributions of blanks and dissolved standards. Next, relations between dissolved concentration and pmf parameters (mean, standard deviation and shape) and amongst pmf parameters are established during a regression analysis.
- ii) *NPs data.* A PG-pmf is fitted to the relative frequencies of the lowest-intensities of the signal distribution of NP containing samples. The assumption is that these signal intensities stem predominantly from dissolved ions and/or background. Then, the dissolved signal component is subtracted from the total signal and deconvoluted from the resulting signal, effectively arriving at a signal distribution that emerged only from particulate signals and not from dissolved/background ions. Finally, using the established spICP-MS theory¹², the particle size distribution is calculated from this signal distribution.

Finally, using the established spICP-MS theory¹², the particle mass distribution is calculated from this signal distribution. It was chosen to show distributions of mass per particle instead of size distributions, because the latter requires some assumption of the shape. A spherical shape is usually assumed, but it will be shown that this does not apply to the TiO₂ NPs studied here. Mass distributions were calculated by using the dissolved standards calibration curve to calculate mass per particle from the signal intensities of particle events. The spherical size is proportional to the measured signal intensity with the third root. Direct calculation of spherical size distributions from mass distributions thus results in larger size bins for relatively lower sizes and thus a lower resolution at lower sizes. Some studies choose to rebin size distributions to have equally distributed bins (e.g. of 1 nm). The numbers of relatively larger sizes increase in this process, because numbers previously assigned to smaller bins are taken together and this occurs more for bins of larger sizes. Size bins were left as is in the present study. Smaller sizes are thus somewhat overrepresented when calculating median sizes compared to larger sizes compared to mass distributions with equally distributed bins.

All these steps were previously programmed in Matlab in the *Nanocount* software. This software is freely available for download at <http://blogg.slu.se/nanocount>.

5. Results and discussion

5.1. Background, sensitivity and size detection limits (D_{min})

The D_{min} is usually calculated according to the formula from Lee et al.¹⁵, assuming a spherical shape of NPs.

$$D_{min} = \left(\frac{6 \times (3\sigma)}{R \times f_a \times \rho \times \pi} \right)^{1/3} \quad (1)$$

where f_a is the mass fraction of the analysed metallic element in the NP and ρ is the density of the NP, σ (cps) is the standard deviation of the dissolved background signal in the “blank” and R (cps/ μ g) is the sensitivity of the instrument. Because only one type of NPs is used in our case (TiO₂), the former two parameters can be defined as constants ($f_a = 0.5993$; $\rho = 4.23 \text{ g cm}^{-3}$). Thereby, D_{min} is essentially determined by R and by the 3σ criterion, assuming that the signal of a particle is detectable above 3 times the standard deviation of the background. Note that D_{min} is inversely proportional to R , because an increase in sensitivity also results in an increase in the average dissolved background intensity.

In the current study, the 3σ in ultra-pure water and at different calcium concentration as well as the sensitivity (R) measuring the intensity ⁴⁷Ti, ⁴⁸Ti and ⁴⁹Ti using titanium dissolved standards having different background concentrations of Ca were experimentally determined (Table 2). First, a conventional calibration curve (mass vs average intensity) was used in order to determine the slope of ionic Ti standards solution (K). Then, R was calculated for each condition using the relation $R = K / \eta$, where η is the nebulisation efficiency¹⁵ (see an example calculation in supporting information SI9). It will be argued later that equation (1) is not appropriate when using a deconvolution method to distinguish dissolved and particulate signals, but it is still deemed appropriate for the purpose of comparing different instrumental approaches to measure Ti.

Table 2 shows that, as expected, ⁴⁸Ti sensitivity is much higher than for other isotopes due to its higher abundance. Also, the sensitivity of the HR-ICP-MS is higher compared to the response of the ICP-MS/MS. Nevertheless, regardless the isotope measured, both ICP-MS sensitivities are not affected by the rise of calcium concentration. Conversely, the increase of calcium concentration produces an increasing background for ⁴⁸Ti. In medium resolution (MR), even if polyatomic interferences (*i.e.* ³²S¹⁶O, ³⁶Ar¹²) are correctly resolved because of the quite large mass difference, ⁴⁸Ca is not sufficiently separated from ⁴⁸Ti. Indeed, a resolution of 4,000 is sufficient for polyatomic interferences when a resolution higher than 9,590 is needed to fully resolve the ⁴⁸Ca isobaric interference. The Ti signal intensities therefore overlap significantly with background signals that are mainly caused by Ca ions. In high resolution (HR > 10,000 (screen-shot in Figure SI4 in supporting information)) the resolution is higher than MR resulting in lower background counts, but the broad ⁴⁸Ca peak still interferes significantly with the ⁴⁸Ti signals and more so as the Ca concentration increases. Thus, the raise of

calcium concentration produces an increase of the background signal and hence its noise leading to a rise of the 3σ . Note also that the standard deviation of background signals is also increased in some cases by drift of the signal and accidentally measured nanoparticle events in blank samples because of carry-over of previous measurements.

On the ICP-MS/MS, the gas addition in the ORC effectively removes the Ca interference, even at calcium concentrations up to 50 mg L⁻¹. For other isotopes, the average background intensity does increase with the Ca concentration. Nevertheless, in all ICP-MS/MS conditions and for ⁴⁷Ti and ⁴⁹Ti in HR-ICP-MS, even if the background signal is not affected, the higher the concentration of calcium, the poorer is the stability and so, higher is the 3σ . Gillson *et al.*¹⁹ assign this so called “matrix effect” to changes in the flux and the composition of the ion beam that cause space charges after the skimmer cone and thus perturbations for all measured isotopes.

Table 2 : Calculated background (cps +/- 3σ) and sensitivity (cps/μg) of each isotope for both ICP-MS at different Calcium concentrations. NA means that the data was not acquired. Signal to Background ratios are available in supporting information (SIS)

[Ca] mg/L	• HR-ICP-MS						• ICP-MS/MS					
	⁴⁷ Ti (MR)		⁴⁸ Ti (MR)		⁴⁹ Ti (MR)		⁴⁸ Ti (HR)		⁴⁷ Ti (No Gas)		⁴⁸ Ti (NH ₃)	
	Background cps +/- 3σ	Sensitivity cps/μg	Background cps +/- 3σ	Sensitivity cps/μg	Background cps +/- 3σ	Sensitivity cps/μg	Background cps +/- 3σ	Sensitivity cps/μg	Background cps +/- 3σ	Sensitivity cps/μg	Background cps +/- 3σ	Sensitivity cps/μg
0	13 +/- 228	1.2x10 ¹³	1399 +/- 5981	1.8x10 ¹⁴	81 +/- 1511	1.0x10 ¹³	25 +/- 815	1.4x10 ¹⁴	35 +/- 424	2.2x10 ¹¹	13 +/- 264	1.1x10 ¹²
5	75 +/- 667	1.7x10 ¹³	129542 +/- 101895	2.1x10 ¹⁴	57 +/- 3196	1.3x10 ¹³	2414 +/- 8037	1.5x10 ¹⁴	35 +/- 419	2.4x10 ¹¹	16 +/- 375	1.2x10 ¹²
50	NA	NA	892794 +/- 552998	2.1x10 ¹⁴	NA	NA	29361 +/- 36471	1.0x10 ¹⁴	NA	NA	52 +/- 973	1.4x10 ¹²
100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	52914 +/- 57691	1.6x10 ¹⁴	NA	NA	NA	NA

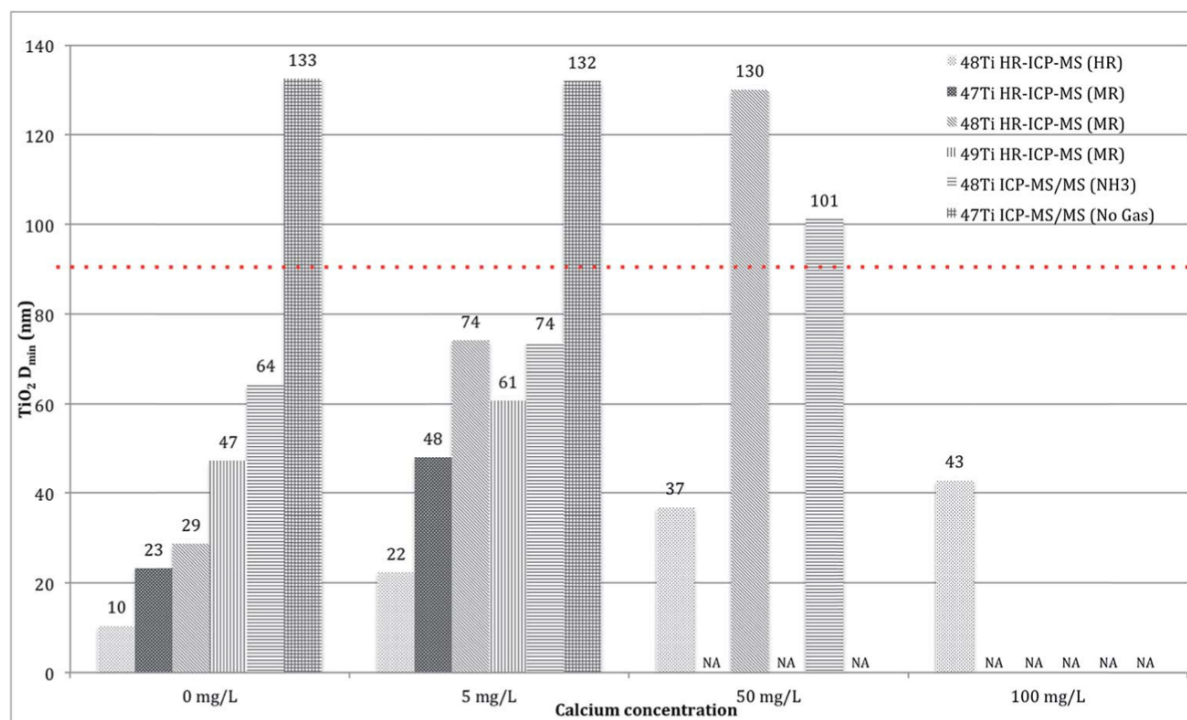


Figure 29: Theoretical size detection limit (D_{min}) for each isotope on both ICP-MS at different Calcium concentrations. Black dots bar: ⁴⁸Ti (HR) on HR-ICP-MS; White dots bar: ⁴⁷Ti (MR) on HR-ICP-MS; Oblique lines bar: ⁴⁸Ti (MR) on HR-ICP-MS; Vertical lines bar: ⁴⁹Ti (MR) on HR-ICP-MS; Horizontal lines bar: ⁴⁸Ti (NH₃) on ICP-MS/MS; Gridded bar: ⁴⁷Ti (No Gas) on ICP-MS/MS. The red dotted line represents the size detection limit calculated by Lee et al. on ⁴⁷Ti in ultrapure water. NA means that the data was not acquired

All size detection limits (D_{min}) calculated using the equation (1) are presented in Figure 29 as a function of the Ca concentration. Because sensitivities remain constant at different calcium concentrations, D_{min} are all evaluated using R at $[Ca] = 0 \text{ mg L}^{-1}$. This means that calculated D_{min} values are only dependant on the value of 3σ in our case. As explained above, it appears that the complication of the matrix affects the background signal and thus the background noise causing an increase of the standard deviation of the background. Thereby, regardless the isotope, the D_{min} increases as the calcium concentration rises. However, the sensitivity of the HR-ICP-MS or the low background of the ICP-MS/MS almost always lead to better D_{min} compared to that from Lee et al. for TiO₂ NPs¹⁵. D_{min} is higher to that found in the latter publication in the case of ⁴⁷Ti without gas addition on the ICP-MS/MS, which is thus far the most used method to analyse Ti in a Ca containing matrix¹⁴. Similarly, measuring ⁴⁸Ti in MR on the HR-ICP-MS and ⁴⁸Ti adding NH₃ on the ICP-MS/MS, both at $[Ca] = 50 \text{ mg L}^{-1}$, leads to higher D_{min} . Thus, using these latter conditions at a higher calcium concentration (*i.e.* $[Ca] = 100 \text{ mg L}^{-1}$) would have led to D_{min} higher than 90 nm. Also, irrespectively of the ICP-MS instrument used, lower size detection limits are achieved when measuring ⁴⁸Ti, due to the lower abundance of ⁴⁷Ti or ⁴⁹Ti, compared to ⁴⁸Ti. Moreover, although the HR-ICP-MS background increases rapidly in presence of calcium, it appears that measuring ⁴⁸Ti in high resolution allows measuring smaller TiO₂ NPs than in any other conditions at concentration up to $[Ca] = 100 \text{ mg L}^{-1}$.

Thereby, only ⁴⁸Ti data using either the high-resolution mode or the ammonia addition was used for further analysis, due to the improved detection limits attained measuring this isotope.

5.2. Detection of TiO₂ NM104 in calcium matrix by spICP-MS

5.2.1. Experimental resolution of the background.

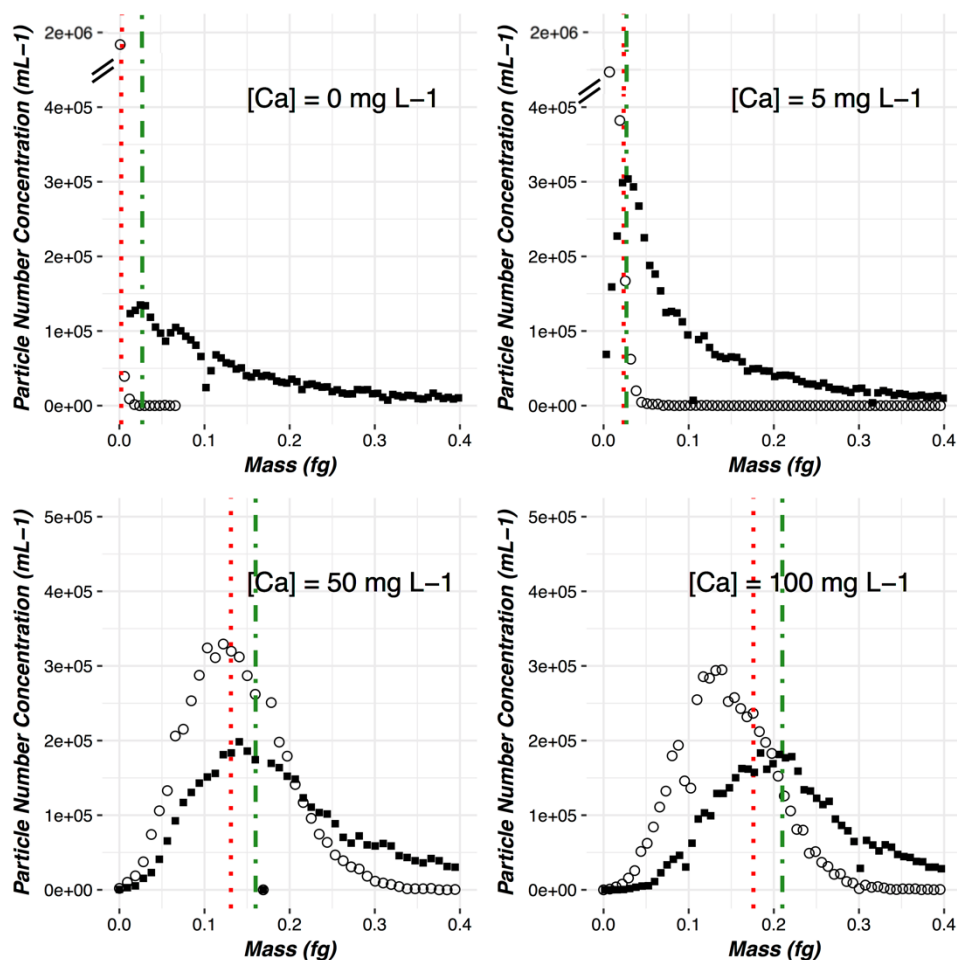


Figure 30: Graphs of particle number concentration (mL^{-1}) vs. mass (g) measured with the HR-ICP-MS instrument. Circles represent the particle mass distribution of blanks and squares represent the particle mass distribution of TiO₂ NM104 solutions in Ultrapure water (top left), 5 mg(Ca) L⁻¹ (top right), 50 mg(Ca) L⁻¹ (bottom left) and 100 mg(Ca) L⁻¹ (bottom right). The red dotted line represents Mass_{min} calculated based on equation (1) and the green dotted line represents the mode mass (m_{MassMin} in Table 3)

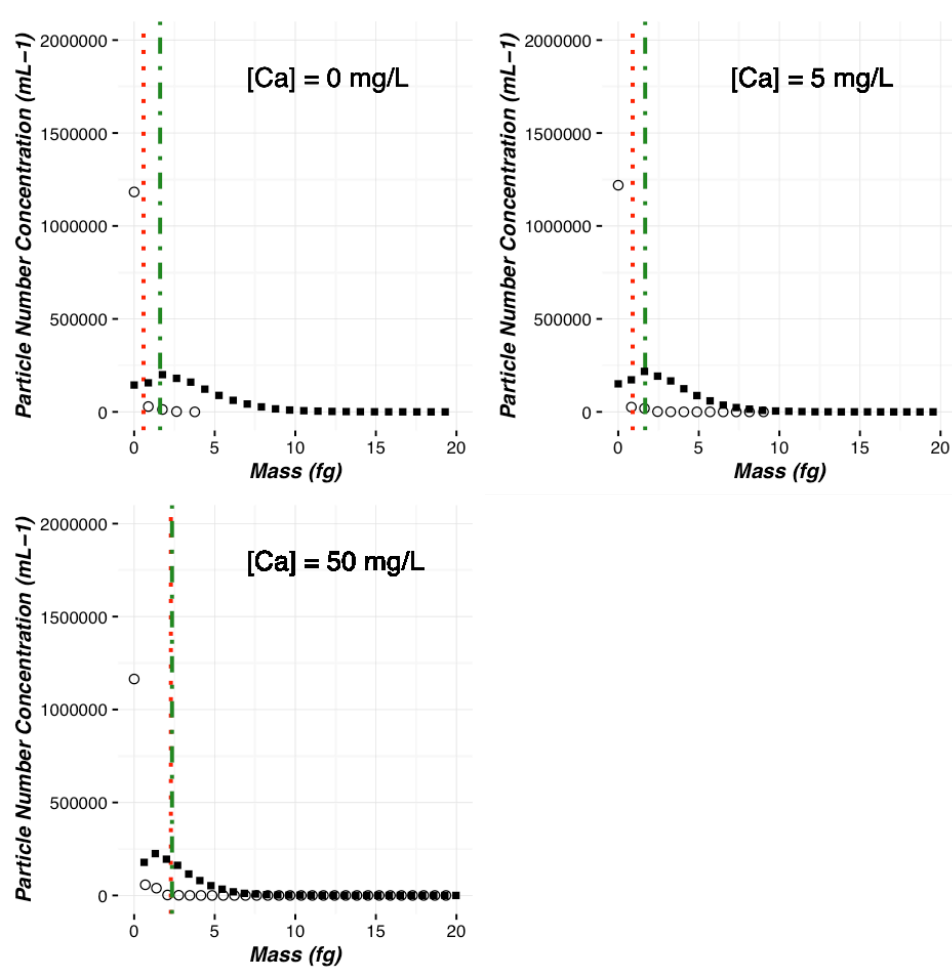


Figure 31: Graphs of particle number concentration (mL^{-1}) vs. mass (g) using the ICP-MS/MS instrument. Circles represent the particle mass distribution of blanks and squares represent the particle mass distribution of TiO₂ NM104 solutions in Ultrapure water (top left), 5 mg(Ca) L⁻¹ (top right), and 50 mg(Ca) L⁻¹ (bottom). The red dotted line represents the $Mass_{min}$ calculated based on equation (1) and the green dotted line represents the mode mass ($m_{MassMin}$ in Table 3)

Figure 30 shows the mass distribution of blanks and NM104 suspensions measured with the HR-ICP-MS instrument. Also shown is $Mass_{min}$, (*i.e.* the mass corresponding to the D_{min} (3σ of the blank)). As explained in the paragraph above, even if ⁴⁸Ti is separated from ⁴⁸Ca using the high-resolution mode, the mode intensity (*i.e.* the intensity that appears most often in the set of data) of the blank clearly increases with Ca concentration. It also appears that increasing the Ca concentration also increases the mode signal intensity of the NM104 containing samples. Distinction of dissolved and particulate signals is straightforward if all particulate signals are larger than all dissolved signals so that separate peaks emerge in the signal distribution histograms. However, Figure 30 shows that none of the particle containing samples exhibits multiple peaks. Dissolved and particulate signals therefore overlap in all cases, even at 0 mg L⁻¹ Ca. In addition, the difference in signal intensities between blank and NM104 signals reduces as the Ca concentration increases. Indeed, while the concentration of calcium rises, NPs become more and more included with the dissolved fraction. A data analysis method commonly used to separate dissolved background from particle events consists of using the standard deviation of the baseline²⁰. The NPs signal is calculated based on the number of outliers and is then

applied on the sample histogram, where all events higher than the “n x sigma” are considered as particles. The main issue with this method is that the algorithm biases the “cut-off” value by randomly taking particle events as false negative (*i.e.* part of the baseline) or taking baseline instability as false positive (*i.e.* particle event) (values in Table SI5 in supporting information). In this study, the $Mass_{Min}$ “cut-off” *i.e.* the mass detection limit in each condition is applied. In Figure 30, compared to the reference mass distribution at $Ca = 0 \text{ mg L}^{-1}$, it seems that the mass distribution at $Ca = 5 \text{ mg L}^{-1}$ is almost not affected. Indeed, the mass distributions for both calcium concentrations follow an identical log-normal evolution and show a constant mode mass (*i.e.* the mass that appears most often in the set of data) (Table 3). Conversely, at $Ca = 50 \text{ mg L}^{-1}$ and 100 mg L^{-1} , even if the log-normal evolution is still observable (Figure 2), the higher cut-off hides the majority of the particle population and results in higher mode masses (Table 3). Moreover, the total particle number concentrations are constant for $Ca = 0 \text{ mg L}^{-1}$ and $Ca = 5 \text{ mg L}^{-1}$ but decrease at higher concentrations (Table 3), showing that, in our study, the “conventional data treatment” only works up to $Ca \leq 5 \text{ mg L}^{-1}$ on the HR-ICP-MS. In order to better discriminate the signal of ⁴⁸Ti from the ⁴⁸Ca background, a deconvolution data treatment method was applied.

Table 3: Data ($n = 1$) obtained with the HR-ICP-MS at the different calcium concentrations. The mode mass ($\times 10^{-16} \text{ g}$), its equivalent diameter for sphere “eds” (nm) and the total particle number concentration $[TiO_2]$ ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) calculated using the $Mass_{Min}$ cut-off and the Deconvolution, respectively. The instrumental error associated to the mode mass and to sizes is ca. 10%

$[Ca]$ (mg/L)	$m_{MassMin}$ ($\times 10^{-16} \text{ g}$)	$eds_{MassMin}$ (nm)	$[TiO_2]_{MassMin}$ ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	$m_{Deconv.}$ ($\times 10^{-16} \text{ g}$)	$eds_{Deconv.}$ (nm)	$[TiO_2]_{Deconv.}$ ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	$z_{Ellipsoid}$ (nm)
0	0.27	23	3.38	0.44	27	3.83	35
5	0.27	23	4.10	0.54	29	5.21	38
50	1.60	41	1.18	0.53	29	3.00	38
100	2.29	47	2.35	0.48	28	3.94	39

Table 4: Data ($n = 1$) obtained with the ICP-MS/MS at the different calcium concentrations. The mode mass ($\times 10^{-16} \text{ g}$), its equivalent diameter for sphere “eds” (nm) and the total particle number concentration $[TiO_2]$ ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) calculated using the $Mass_{Min}$ cut-off and the Deconvolution, respectively. The instrumental error associated to the mode mass and to sizes is ca. 10%

$[Ca]$ (mg/L)	$m_{MassMin}$ ($\times 10^{-16} \text{ g}$)	$eds_{MassMin}$ (nm)	$[TiO_2]_{MassMin}$ ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	$m_{Deconv.}$ ($\times 10^{-16} \text{ g}$)	$eds_{Deconv.}$ (nm)	$[TiO_2]_{Deconv.}$ ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	$z_{Ellipsoid}$ (nm)
0	16.14	90	1.04	7.60	70	0.41	570
5	16.69	91	0.92	6.66	67	0.38	550
50	23.50	102	0.49	6.96	68	0.40	480

Figure 31 shows the mass distribution for blanks and the TiO₂ NM104 suspensions dispersed in different calcium solutions obtained using ICP-MS/MS. The lower sensitivity of the ICP-MS/MS results in a poorer resolution in terms of the mass distribution (larger mass bins, compared to the HR-ICP-MS data). Compared to the HR-ICP-MS, a similar log-normal evolution is still noticeable but the high cut-off prevents the observation of the smallest TiO₂ NPs. The mode mass is also higher in this case, resulting in higher equivalent size (Table 3 and Table 4) and the total particle number concentration decreases as calcium concentration increases. Here, we also applied the deconvolution data treatment method to improve the quality of the distribution.

5.2.2. Mathematical correction of the background (deconvolution method).

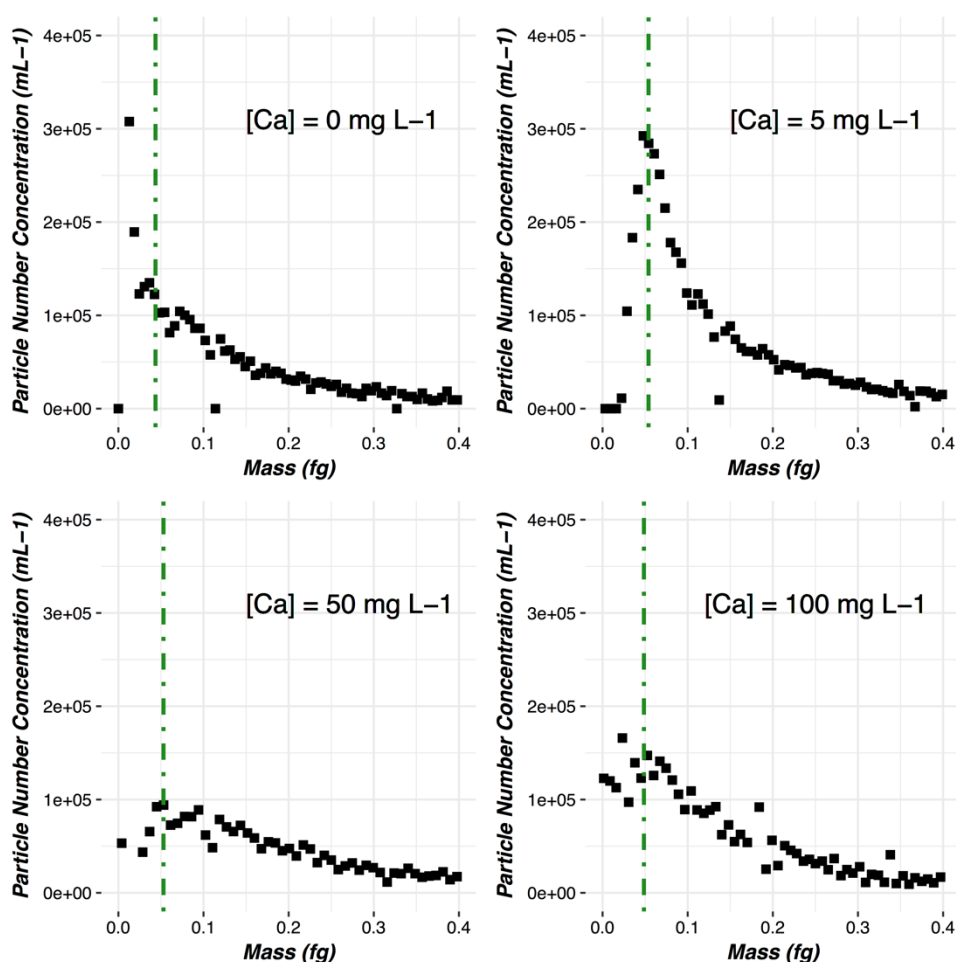


Figure 32: Graphs of particle number concentration (mL^{-1}) vs. mass (g) using the HR-ICP-MS instrument determined with the deconvolution method. Squares represent the particle mass distribution of TiO₂ NM104 solutions in Ultrapure water (top left), 5 $\text{mg}(\text{Ca}) \text{L}^{-1}$ (top right), 50 $\text{mg}(\text{Ca}) \text{L}^{-1}$ (bottom left) and 100 $\text{mg}(\text{Ca}) \text{L}^{-1}$ (bottom right). The green dotted line represents the mode mass ($m_{\text{Deconvolution}}$ in Table 3)

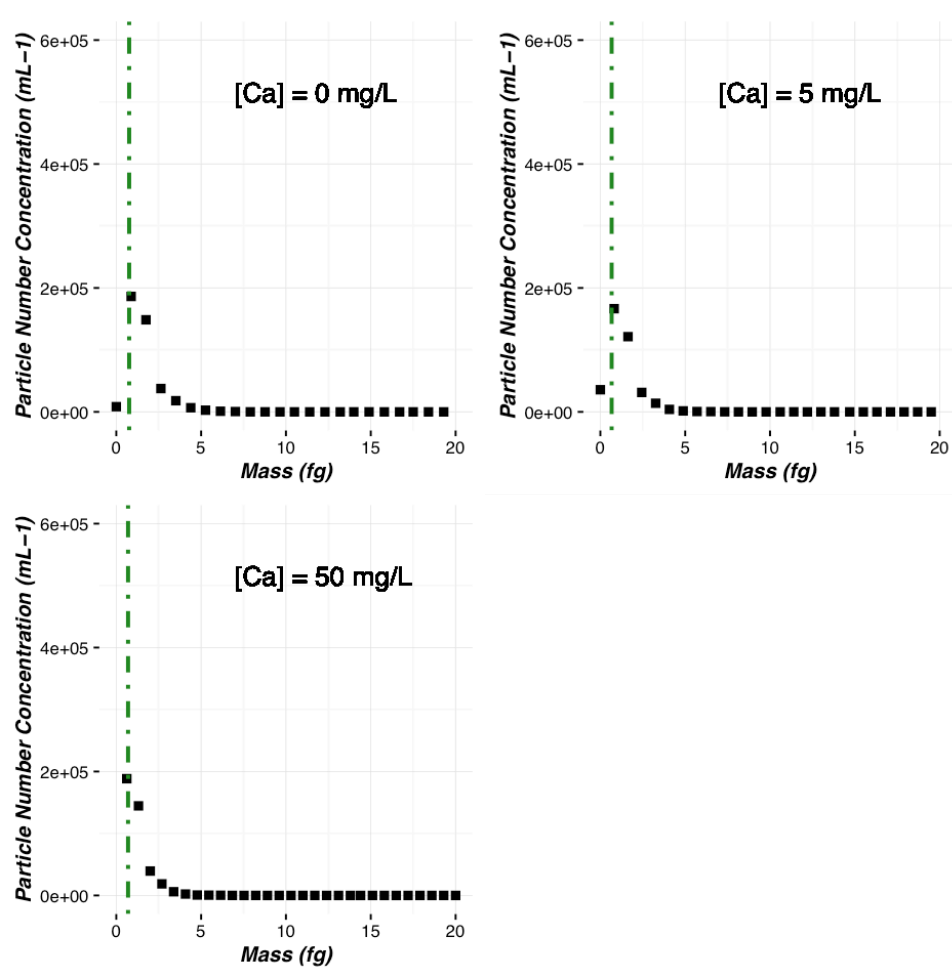


Figure 33: Graphs of particle number concentration (mL^{-1}) vs. mass (g) using the ICP-MS/MS instrument, determined with the deconvolution method. Squares represent the particle mass distribution of TiO₂ NM104 solutions in Ultrapure water (top left), 5 mg(Ca) L⁻¹ (top right), and 50 mg(Ca) L⁻¹ (bottom). The green dotted line represents the mode mass ($m_{\text{Deconvolution}}$ in Table 3)

Figure 4 shows the TiO₂ mass distribution for NM 104 suspensions in calcium matrixes for the HR-ICP-MS measurements and Figure 5 shows the TiO₂ mass distribution for the ICP-MS/MS measurements after deconvolving data (deconvolution fits in Figure SI6a and SI6b in supporting information). It clearly appears that using the deconvolution method, particle events previously lower than Mass_{min} are retained in the mass distributions obtained on both instruments. Indeed, for all $\text{Ca} \geq 5 \text{ mg L}^{-1}$ the particle mass distribution remains the same as with $\text{Ca} = 0 \text{ mg L}^{-1}$. Moreover, the total particle number concentration is more constant when regarding the results of both ICP-MS instruments separately (Table 3 and Table 4). This confirms that the deconvolution data treatment allows a better discrimination between Ca background and Ti signal and thus, reduces the confounding effect of the rise of Ca concentrations.

However, both ICP-MS instruments do not give the same mass distribution. Indeed, the ICP-MS/MS results give a considerably higher equivalent spherical median size and an order of magnitude lower total particle number concentrations (Table 3 and Table 4). These differences are due to the lower sensitivity and thus higher size detection limits of the ICP-MS/MS (Figure 1) regardless of Ca

concentration (Table 2). Thus, the smallest sized TiO₂ population cannot be detected by the ICP-MS/MS causing an under-estimation of the number concentrations and an over-estimation of the mode particle size. However, using the deconvolution, Table 4 shows a lower total particle number concentration than the one using the D_{min} , an observation that shows that the deconvolution method also removes particulate signals by misrepresenting the dissolved data at low sensitivity. Equation (1) is appropriate when discerning dissolved and particulate signals using a single cut-off value such as the one produced by the D_{min} or by the more commonly used “n x sigma method”²⁰. However, Figure 32 and Figure 33 show at least a part of the intensities lower than $Mass_{min}$ are identified as particles using the deconvolution approach, leading to a lower D_{min} compared to Figure 30 and Figure 31¹³. The D_{min} is not determined by the standard deviation of the blank when using a deconvolution, because this standard deviation is modelled based on the calibration standards when fitting the PG-pmf model to a particle containing sample. The D_{min} is rather determined by the accuracy of this fitting process. The accuracy decreases with drift or other noise sources that cannot be predicted by the PG-pmf model²¹ and increases with the number of fit points that can be used to establish the signal distribution of the dissolved background in a particulate sample. The number of fit points had to be limited to two in this case, the theoretical minimum¹³, because it is clear that even some of the lowest intensity signals are caused by particles, especially in the case of the ICP-MS/MS data. Rigorous calculation of the D_{min} in this case would have to rely on a bootstrap procedure to quantify how the intrinsic data variability may result in different PG-pmf models. Bootstrapping involves randomly selecting smaller subsets of data from a larger dataset with replacement. This procedure thus creates resampled replicate particle size distributions from the larger dataset allowing quantifying the standard deviation introduced by the subsequent deconvolution algorithm steps. The D_{min} would then correspond to the signal intensity where average bootstrapped dissolved frequency fitted to the total histogram is significantly different from the average bootstrapped particle histogram frequency. This calculation is beyond the scope of the current publication, but the consistency of the total particle number concentration supports the claim that applying the deconvolution method improves the calculation of D_{min} and the lowest detectable particle size was achieved by combining ⁴⁸Ti measurements using the HR-ICP-MS in HR mode and the deconvolution algorithm.

5.3. Method validation

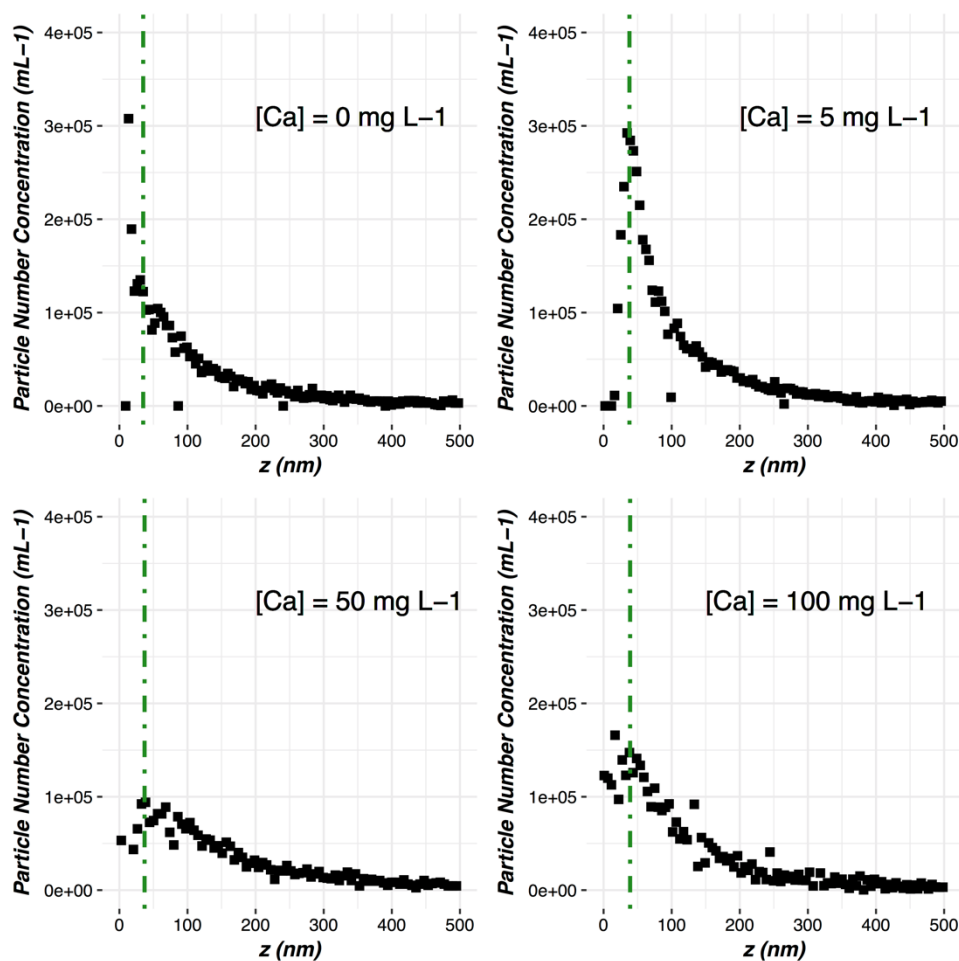


Figure 34: Graphs of particle number concentration (mL^{-1}) vs. 3rd dimension of the ellipsoid (nm) based on data measured with HR-ICP-MS. Squares represent the 3rd dimension size distribution of TiO₂ NM104 solutions in Ultrapure water (top left), 5 mg(Ca) L⁻¹ (top right), 50 mg(Ca) L⁻¹ (bottom left) and 100 mg(Ca) L⁻¹ (bottom right). The green dotted line represents the 3rd dimension mode size ($z_{\text{Deconvolution}}$ in Table 3)

In order to assess the quality of the results obtained after deconvolution, ⁴⁸Ti (HR) data acquired on the HR-ICP-MS were compared to NM104 characterisation using several different methods by several European laboratories participating to the NANOGENOTOX Joint Action, as well as by the JRC²². Indeed, the spICP-MS technique does not provide all information about the particle and another analytical tool is useful especially to determine its morphology. Undeniably, the determination of the particle size distribution is correct only if the shape of the particles is known, otherwise the size calculated is biased ($\text{eds}_{\text{Deconvolution}}$ in Table 3 and Table 4) and only an equivalent diameter for sphere can be established (Figure SI7a and SI7b in the supporting information). Nevertheless, in this report, the particle morphology is described varying from equidimensional euhedral to elongated. Thereby, a first assumption can be made by assuming a prolate ellipsoid shape and thus, using the following formula for the calculation of the volume:

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times x^2 \times z \quad (2)$$

where V is the volume of the particle in nm³ and x is the short dimension and z is the long dimension in nm. The primary particles of TiO₂ NM-104 have been shown based on TEM data to be *ca.* 25 nm along the smaller dimension (*i.e* the 1st dimension: x)²². Then, a second assumption is made by assuming a prolate ellipsoidal shape, fixing the x dimension at 25 nm and using the mass distribution shown in Figure 34, a size distribution of the 3rd dimension (z) can be estimated from equation (3):

$$z_i = \frac{3 \times m_i}{4 \times \rho \times x^2} \quad (3)$$

where m_i is the mass of the TiO₂ mass distribution in g in the i^{th} bin, ρ is the density of the nanoparticle ($\rho_{\text{TiO}_2} = 4,23 \times 10^{-21}$ g nm⁻³) and x is equal to 25 nm.

Previous characterisation using TEM²² of the median aspect ratio of NM104 is *ca.* 1.6. Using 25 nm for the smallest dimension, the median largest dimension should be 40 nm. Figure 34 displays the calculated size distribution for the 3rd dimension (z) at the different calcium concentrations. It clearly appears in Table 3 that the largest dimension size distributions calculated with HR-ICP-MS data are realistic for all calcium solutions especially because the mode size at the maximum particle concentration in all conditions does not vary, whereas the median z dimension calculated using ICP-MS/MS measurements is unrealistic (Table 4).

6. Conclusion

The application of HR-spICP-MS and spICP-MS/MS for the calculation of D_{min} used here allowed for a decrease of the limit between dissolved and particulate signals. This method can be readily applied to natural samples by removing particles from the sample (using an ultra-filtration or ultra-centrifugation) and thus measuring only the dissolved signal as the “blank”. D_{min} would then be calculated based on the dissolved signal in the sample itself. However, this method induces false negatives as it does not count small NPs when the background is high and in our case a data analysis method (*i.e.* deconvolution) had to be applied. Lower detection limits were achieved in this work for TiO₂ NPs in a highly concentrated background of calcium using single-particle ICP-MS by combining i) the measurement of the ⁴⁸Ti isotope instead of ⁴⁷Ti or ⁴⁹Ti, ii) the use of the high-resolution mode of a HR-ICP-MS to separate ⁴⁸Ti from ⁴⁸Ca, and iii) the application of a deconvolution method to separate the truly nanoparticulate signal from the residual background of ⁴⁸Ca when calcium concentrations are high (>50 mg L⁻¹). Alternatively, for particles above 64 nm, a spICP-MS/MS instrument can be used in the reaction mode with ammonia as a reaction gas. This approach resolves the majority of ⁴⁸Ca interference on ⁴⁸Ti, however sensitivity is reduced by the need to introduce He along with ammonia, to protect equipment against the corrosive nature of the ammonia.

Another way to resolve NPs signal from the baseline needs to be investigated by using microsecond dwell-time even if, there is no guarantee that the detection limits will be improved. Indeed, as Montano *et al.* (2014)²³ have shown, the NPs data at the boundary of the baseline could be lost due to a decrease of the intensity of the decomposed event. Nevertheless, the combination of a high sensitivity ICP-MS with microsecond dwell-times could be promising.

Another step forward in the detection of TiO₂ NPs would be to distinguish engineered and natural ones using another element present in engineered NPs. For instance, manufactured TiO₂ NPs usually have a layer of alumina in order to improve their stability. So, by simultaneously measuring Al and Ti using either an ICP-TOF-MS²⁴ or a Mattauch-Herzog geometry ICP-MS²⁵, the distinction between natural and engineered TiO₂ NPs would be facilitated. However, ion extraction and detection of this kind of ICP-MS must be improved in order to reach lower detection limits.

7. References

1. H. Shi, R. Magaye, V. Castranova and J. Zhao, *Particle and fibre toxicology*, 2013, **10**, 1-33.
2. A. A. Keller, S. McFerran, A. Lazareva and S. Suh, *Journal of nanoparticle research*, 2013, **15**, 1-17.
3. X. Lin, J. Li, S. Ma, G. Liu, K. Yang, M. Tong and D. Lin, *PloS one*, 2014, **9**, e110247.
4. L. Shang, K. Nienhaus and G. U. Nienhaus, *Journal of nanobiotechnology*, 2014, **12**, 1-11.
5. R. F. Domingos, M. A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M. M. Reid, N. Tufenkji, J. R. Lead, G. G. Leppard and K. J. Wilkinson, *Environmental Science & Technology*, 2009, **43**, 7277-7284.
6. A. López-Serrano, R. M. Olivas, J. S. Landaluze and C. Cámara, *Analytical Methods*, 2014, **6**, 38-56.
7. B. F. da Silva, S. Pérez, P. Gardinalli, R. Singhal, A. A. Mozeto and D. Barceló, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, **30**, 528-540.
8. A. R. Donovan, C. D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz and H. Shi, *Chemosphere*, 2016, **144**, 148-153.
9. J. Tuoriniemi, G. Cornelis and M. Hassellöv, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2015, **30**, 1723-1729.
10. D. Mitrano, J. F. Ranville, A. Bednar, K. Kazor, A. S. Hering and C. P. Higgins, *Environmental Science: Nano*, 2014, **1**, 248-259.
11. C. Degueldre, P. Y. Favarger and S. Wold, *Analytica Chimica Acta*, 2006, **555**, 263-268.
12. H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Analytical chemistry*, 2011, **83**, 9361-9369.
13. G. Cornelis and M. Hassellöv, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, **29**, 134-144.
14. A. P. Gondikas, F. v. d. Kammer, R. B. Reed, S. Wagner, J. F. Ranville and T. Hofmann, *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**, 5415-5422.
15. S. Lee, X. Bi, R. B. Reed, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Environmental science & technology*, 2014, **48**, 10291-10300.
16. J. Gaillardet, B. Dupré, P. Louvat and C. J. Allègre, *Chemical Geology*, 1999, **159**, 3-30.
17. P. Westerhoff, G. Song, K. Hristovski and M. A. Kiser, *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, **13**, 1195-1203.
18. Y. Dan, H. Shi, C. Stephan and X. Liang, *Microchemical Journal*, 2015, **122**, 119-126.
19. G. R. Gillson, D. J. Douglas, J. E. Fulford, K. W. Halligan and S. D. Tanner, *Analytical Chemistry*, 1988, **60**, 1472-1474.
20. J. Tuoriniemi, G. Cornelis and M. Hassellöv, *Analytical chemistry*, 2012, **84**, 3965-3972.
21. G. Cornelis and S. Rauch, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**, 5075-5087.
22. K. Rasmussen and J. Mas, *Journal*, 2014.

23. M. Montano, H. Badiei, S. Bazargan and J. Ranville, *Environmental Science: Nano*, 2014, **1**, 338-346.
24. A. Praetorius, A. Gundlach-Graham, E. Goldberg, W. Fabienke, J. Navratilova, A. Gondikas, R. Kaegi, D. Günther, T. Hofmann and F. von der Kammer, *Environmental Science: Nano*, 2017, **4**, 307-314.
25. J. H. Barnes IV, G. D. Schilling, R. Sperline, M. B. Denton, E. T. Young, C. J. Barinaga, D. W. Koppenaal and G. M. Hieftje, *Analytical chemistry*, 2004, **76**, 2531-2536.

■ CHAPITRE II

Detection of nanoparticles by single-particle ICP-MS with a complete transport efficiency through direct nebulization at few microliters per minute uptake-rates

Mickaël Tharaud[§], Pascale Louvat[§], Marc F. Benedetti[§]

[§]Université de Paris, Institut de physique du globe de Paris, CNRS, F-75005 Paris, France

Ce chapitre est issu d'un article publié dans *Analytical & Bioanalytical Chemistry*.

La version publiée (DOI : 10.1007/s00216-020-03048-y) ainsi que les informations complémentaires sont disponibles à l'adresse suivante :

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-020-03048-y>

Table des matières

1.	RESUME.....	- 87 -
2.	ABSTRACT.....	- 88 -
3.	INTRODUCTION.....	- 89 -
4.	EXPERIMENTAL SECTION.....	- 92 -
4.1.	<i>Chemicals</i>	- 92 -
4.2.	<i>Analytical procedure</i>	- 92 -
4.3.	<i>Environmental matrices</i>	- 93 -
4.4.	<i>Data processing</i>	- 94 -
4.4.1.	Calculation of the transport efficiency ($\eta_{\text{Transport}}$) using 40 nm Au-NPs.....	- 94 -
4.4.2.	Determination of the particle size distribution (PSD), average diameter (d_{NPs}) and particle number concentration (PNC).....	- 94 -
5.	RESULTS AND DISCUSSION	- 96 -
5.1.	<i>Nebulizer liquid uptake rate versus displacement pump gas flow rate</i>	- 96 -
5.2.	<i>Influence of the uptake rate on gold dissolved signal</i>	- 97 -
5.3.	<i>Influence of the uptake rate on gold nanoparticle signal compared to dissolved</i>	- 98 -
5.4.	<i>Complete transport efficiency with the μ-dDIHEN at $< 10 \mu\text{L min}^{-1}$ uptake rate</i>	- 99 -
5.5.	<i>Measurement of Au-, Ag- and Pt-NP reference materials under optimal μ-dDIHEN conditions</i>	- 100 -
5.6.	<i>Long-term stability under μ-dDIHEN optimal conditions</i>	- 102 -
5.7.	<i>μ-dDIHEN measurement of Au-NPs in synthetic and natural matrices</i>	- 104 -
6.	CONCLUSION	- 105 -
7.	REFERENCES.....	- 107 -

1. Résumé

Depuis son introduction, la spectrométrie de masse à source plasma (spICP-MS) s'est imposée comme une méthode sensible et robuste pour caractériser les NPs et devient une technique de référence pour la détermination directe de la taille et le nombre de nanoparticules inorganiques. La spICP-MS nécessite cependant que la perte de matériel se produisant entre l'introduction de l'échantillon et le système de détection soit déterminée. L'efficacité de transport, $\eta_{Transport}$, tient compte des pertes de matière se produisant à différents endroits pendant le transport des NPs dans l'ICP-MS, par rapport à celles d'une solution étalon de l'élément ciblé sous forme dissoute. $\eta_{Transport}$ est généralement déterminée avec un matériau de référence de NPs d'or (Au-NPs) de taille et de concentration en nombre connues. Elle est ensuite appliquée aux analyses d'échantillons de NPs inconnus pour déterminer leur taille et leurs concentrations en nombre, en supposant un comportement identique de toutes les NPs dans le système d'introduction et l'ICP-MS. Cependant, en fonction de la taille et de la composition des NPs ou du milieu dans lesquels elles sont dispersées, $\eta_{Transport}$ peut varier. Toutes ces hypothèses peuvent ainsi conduire à des écarts entre les valeurs certifiées/vraies et les résultats expérimentaux. De nombreuses études ont tenté d'approcher $\eta_{Transport} = 100\%$ de manière à supprimer ces hypothèses. Cependant, bien que certains développements analytiques aient permis de s'en approcher aucun n'a à ce jour réussi. La piste explorée dans cette étude est l'utilisation d'un nébuliseur permettant l'injection des NPs directement dans le plasma. Le résultat de l'utilisation d'un tel nébuliseur est que la totalité des NPs entre dans le plasma permettant ainsi d'atteindre une efficacité de nébulisation, $\eta_{Nebulisation} = 100\%$.

Dans ce travail, le système d'introduction μ -*DDIHEN* couplant un nébuliseur démontable à haute efficacité à injection directe (*DDIHEN*) à une vanne d'injection et à une pompe volumétrique a été utilisé. Pour la première fois avec un nébuliseur à flux continu, une efficacité de transport complète, c'est-à-dire $\eta_{Transport} = 100\%$ a été atteinte. A l'aide d'Au-NPs de 40 nm, il a été tout d'abord démontré que $\eta_{Nebulisation} = 100\%$ ne garantit pas $\eta_{Transport} = 100\%$. Il a en effet été nécessaire de travailler à débit très faible ($8 \mu\text{L min}^{-1}$) pour obtenir $\eta_{Nebulisation} = \eta_{Transport} = 100\%$. A ce même débit, l'utilisation du μ -*DDIHEN* a permis de déterminer avec précision et de manière reproductible les tailles d'Au-, Ag- et Pt-NPs de référence sans étape de calcul de $\eta_{Transport}$ au préalable. La robustesse du μ -*DDIHEN* a ensuite été testé avec succès pour l'analyse d'Au-NPs dans des matrices complexes telles que les eaux de surface. Les analyses spICP-MS à l'aide du μ -*DDIHEN* offrent ainsi la possibilité d'une caractérisation directe, robuste, précise et reproductible des NPs dans l'environnement. Ce développement analytique permet en effet de s'abstenir du calcul des efficacités et simplifie la détermination de la taille (d_{NPs} en nm) et la concentration en nombre (N_{NPs} en mL^{-1}) des NPs à l'aide des équations suivantes¹ :

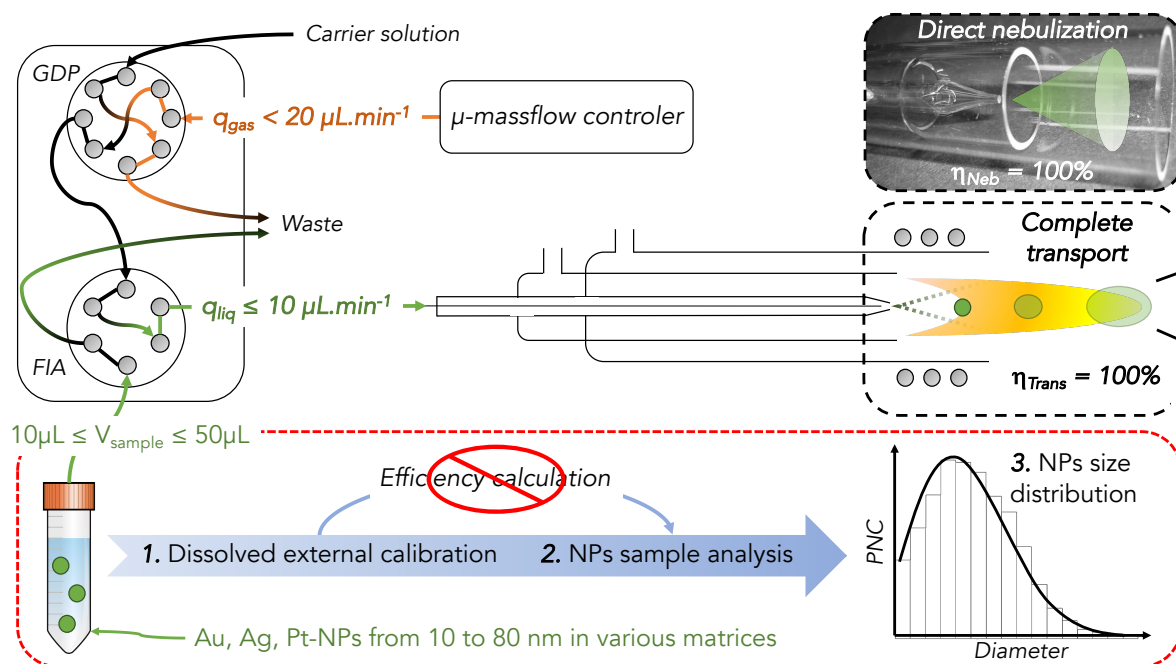
$$\overline{d_{NPs}} = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot (\overline{I_{NPs}} - I_{bckgd}) \cdot t_d \cdot q_{liq}}{S \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho}} \quad \text{et} \quad \overline{N_{NPs}} = \frac{\overline{D_{NPs}}}{q_{liq} \cdot D \cdot t_d}$$

¹ Les différentes variables sont définies dans le paragraphe 4.4

2. Abstract

Measurement of nanoparticle (NP) concentration and size by single particle ICP-MS (spICP-MS) usually requires the use of a NP reference material to determine the loss of NPs and/or ions during their transport from the sample solution to the detection system. The determination of this loss, qualified as nebulization efficiency ($\eta_{Nebulization}$) and/or transport efficiency ($\eta_{Transport}$), is time-consuming, costly and lacks reliability. Nebulization of the NPs directly into the plasma (without a spray chamber) results in $\eta_{Nebulization} = 100\%$ and is thus a promising strategy to avoid these calibration steps. In this work, we used the μ -dDIHEN introduction system: a demountable direct injection high efficiency nebulizer (dDIHEN) hyphenated to a flow-injection valve and a gas displacement pump. For the first time with a continuous flow nebulizer, complete transport efficiency was reached (*i.e.* $\eta_{Transport} = 100\%$). Operated at very low uptake rate (as low as $8 \mu\text{L min}^{-1}$), the μ -dDIHEN accurately and reproducibly determined average diameters of Au-, Ag- and Pt-NPs, in full agreement with their reference values. It was also successfully tested for Au-NPs in complex matrices, such as surface waters. spICP-MS analyses with the μ -dDIHEN sample introduction system only require a dissolved standard calibration to determine NP average diameter (d_{NPs} in nm) and number concentration (N_{NPs} in ml^{-1}) from the simplified set of equations^m:

$$\overline{d_{NPs}} = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot (\overline{I_{NPs}} - I_{bckgd}) \cdot t_d \cdot q_{liq}}{S \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho}} \quad \text{and} \quad \overline{N_{NPs}} = \frac{\overline{D_{NPs}}}{q_{liq} \cdot D \cdot t_d}$$



^m All variables are defined in section 4.4

3. Introduction

In addition to nanoparticles (NPs) that are naturally present (*i.e.* volcanic ashes, clays, magnetotactic bacteria...) and accidentally produced by human activities (*i.e.* engine exhausts, mining...), NPs are also increasingly manufactured for targeted applications such as cosmetics and medicine. As a consequence, increasing NP spread in the environment is becoming a growing health concern and methodologies for characterizing their origin, tracking their fate and understanding their behaviour in various media (*i.e.* water, soils, biological fluids...) need to be developed. Classical NP analysis techniques (*i.e.* Dynamic Light Scattering, Transmission Electron Microscopy...) still suffer from matrix effects, slowness, large sample volume consumption or high detection limits that hamper a reliable characterization and/or quantification of the NPs in complex media^{1,2}. Since its introduction by Degueldre *et al* (2006)³, single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (spICP-MS) has emerged as a sensitive and robust method to characterize NPs and is becoming a reference technique for the direct determination of the size and the number of inorganic (*i.e.* metallic) nanoparticles. The mono- or multi-elemental composition of NPs (*i.e.* depending on the ICP-MS used) can be determined in aqueous solutions at low environmental concentrations ($< 10^6$ particles mL⁻¹) with the need of only limited pre-treatment of the sample (*i.e.* dilution)^{4,5}. The spICP-MS technique requires that the loss of material occurring between the sample introduction and the detection system be determined. The so-called “transport efficiency” ($\eta_{Transport}$)⁶ accounts for material losses occurring at different places during NP transport in the ICP-MS, as compared to those from a dissolved standard solution of the targeted element. This transport efficiency is commonly determined with a gold NP reference material of known particle size and concentration and applied to the unknown NP sample analyses to determine their NP size and number concentrations, assuming identically behaviour of all NPs in the spray chamber and ICP-MS. Though, depending on the NP size, composition or media in which NPs are dispersed, the transport efficiency can also change. All these assumptions can *de facto* lead to discrepancies between the certified/true values and experimental results⁷.

In the literature^{8,9}, $\eta_{Transport}$ between 1 and 10% is usually reported for spICP-MS with conventional concentric nebulizers at uptake rates ranging from 0.1 to 1 mL min⁻¹: most of the liquid sample flows to waste from the cyclonic or double-pass spray chambers. Reaching higher $\eta_{Transport}$, and ideally 100% (*i.e.* complete transport efficiency), would improve the reliability of NP measurements, reduce the analytical costs, and allow the self-reliance of the method, by removing the $\eta_{Transport}$ calculation which requires a reference standard. Improvement in the introduction of the sample is the key to this problem as $\eta_{Transport}$ is function of the ratio of the sensitivity on the uptake rate (Equation 1 in the next section). Although decreasing the uptake rate would increase the ratio, the sensitivity would be negatively affected, as the number of ions reaching the detector is lower, preventing complete transport efficiency. Higher $\eta_{Transport}$ is, thus, the result of a low uptake rate applied to a high sensitivity introduction system. Franze *et al.* (2012)¹⁰, with a three-stage Peltier cooled desolvation system (APEX Q) and a low uptake rate (*i.e.* 0.1 mL min⁻¹), obtained $\eta_{Transport} \geq 90\%$, the aerosol being “dried” before

its introduction into the plasma. A miniaturized single-pass spray chamber, such as “total consumption (TC) sample introduction system” (originally called “Torch Integrated Sample Introduction System” – TISIS¹¹), also led to a significant improvement of the transport efficiency ($\eta_{Transport} \approx 93\%$), with sample uptake rates $\leq 10 \mu\text{L min}^{-1}$ ¹². At such low uptake rates the evaporation process is boosted and the probability of droplet-droplet collisions is reduced⁷. Despite these important improvements, the gap to complete transport efficiency is still not filled, as droplets are still sprayed into a chamber with inevitable losses, and the $\eta_{Transport}$ calculation cannot be fully avoided. Lately, Lin *et al.* (2019)¹³, combining APEX and the TC introduction system, both with a high-performance concentric nebulizer, claimed to reach complete transport efficiency for platinum NPs. However, in their study, the calibration was not performed using dissolved standard solutions but with nanoparticle reference materials of known size, distorting the calculated $\eta_{Transport}$. Although it is an improvement, such a calibration requires reference materials of known sizes, and of composition identical to the NPs dispersed in the samples (*i.e.* surface water, saliva, food...), that are often not available. Another way to increase $\eta_{Transport}$ could be to use direct injection systems, for which, by construction, the nebulization efficiency is 100%, as the sample containing NPs is directly nebulized in the plasma (*i.e.* without a spray chamber).

The micro Droplet Generator (μDG)^{10, 14} is one such direct injection techniques. It consists of a piezo-electric head dispensing fine droplets containing the NPs in a flux of helium toward the plasma. Each droplet is subjected to the same fate in the plasma as the aerosol produced with a conventional introduction system. The mentioned main advantages are that it does not require a reference material to determine the transport efficiency and that it consumes very small amounts of sample (*e.g.* droplet volume *ca.* 0.1 nL)¹⁵. However, the analysis throughput is limited, as the system is not connected to an autosampler¹⁰. To circumvent this drawback, Mehrabi *et al.* (2019)¹⁶ recently coupled the μDG to a spray chamber. Differences between the nebulized aerosols and NP containing μ -droplets were nonetheless still observed and hampered the reliability of the measurements. This is a good example that direct and total nebulization is not a guarantee of complete transport efficiency.

Direct injection nebulizers (DIN) also allow a complete nebulization of the sample into the plasma as they are directly fitted into the torch in place of the injector¹⁷. Such pneumatic concentric nebulizers were previously developed for low uptake rate analysis of complex matrices (*i.e.* biological or petroleum samples)^{18, 19}. At the Institut de physique du globe de Paris (IPGP), the demountable Direct Injection High Efficiency Nebulizer (dDIHEN)²⁰ is commonly used for high-throughput Multi-Collection (MC)-ICP-MS measurements of boron isotope ratios in geological samples^{21, 22}. Compared to other DINs, the dDIHEN presents several advantages such as smaller void volume leading to lower detection limits, but, more importantly, higher sensitivity and enhanced signal stability²³. This is because the dDIHEN can be tuned to obtain a fine droplet distribution²⁰, leading to improved transport and ionization of the sample in the plasma. Moreover, when a DIN is clogged or melted, the entire nebulizer has to be replaced, whereas the capillary or needle of the dDIHEN can be dismantled and replaced at low cost. Our newly developed direct injection system, the “ μ -dDIHEN”²⁴, combines the automated dDIHEN²² to a gas displacement pump and allows spICP-MS micro-analysis at stable micro-

uptake rates down to $8 \mu\text{L min}^{-1}$, without a spray chamber. By design, DINs have a nebulization efficiency of 100%, since the whole aerosol is nebulized directly in the plasma. However, in preliminary tests²⁴, despite complete nebulization, the transport efficiency only reached about 85% for 40 nm Au-NPs in ultrapure water. This again demonstrates that direct nebulization does not ensure complete transport efficiency. Consequently, the question of whether or not complete transport efficiency can be achieved with a direct introduction system remains open. In the present paper we used the μ -dDIHEN, a fully automatized low-uptake rate direct injection system, on a sector field inductively coupled plasma mass spectrometer (SF-ICP-MS) at different uptake rates. We first investigate transport efficiencies at variable uptake rate with a 40 nm Au-NPs reference solution. Then we demonstrate the unique analytical capacities of the μ -dDIHEN, and the effectiveness of the optimized analytical method to NPs of different sizes (*i.e.* 10 to 80 nm) and compositions (*i.e.* Au-, Ag- and Pt-NPs) in various complex matrices (*i.e.* synthetic environmental samples and a river water).

4. Experimental section

4.1. Chemicals

Ultrapure water (resistivity $\approx 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) from a Millipore Integral 5 (Millipore, USA) was used throughout the work for dilutions. Single-element standards (Au, Ag and Pt) at 1000 mg L^{-1} were obtained from SCP Science (Canada). Normapure nitric and hydrochloric acid (VWR, USA) were purified in a sub-boiler DST 1000 (Savillex, USA). Au-NP reference materials with a nominal diameter of *ca.* 10, 15, 20, 40, 60 and 80 nm were obtained from British Biocell International (UK). Ag-NP reference materials with a nominal diameter of *ca.* 20, 30 and 40 nm as well as *ca.* 50 nm Pt-NP reference material were obtained from nanoComposix (USA). All NPs are spherical and citrate capped. Average diameters and particle number concentrations provided by suppliers on the certificate of analysis (CofA) are listed in Table 5. The different NP solutions were sonicated in a bath (60 seconds at 42 kHz) and freshly diluted prior to spICP-MS analysis. Concentrations were adapted for each flow-rate to avoid coincidences of NP occurrence at millisecond dwell-time.

Table 5: Reference and experimental average diameters (nm) and associated standard deviation ($n = 5$) of Au, Ag and Pt-NPs. Experimental determination was done with the at $8 \mu\text{L min}^{-1}$

	Ref. diameter (nm)	Ref. SD (nm)	Exp. diameter (nm)	Exp. SD (nm)
Au-NPs	10.0	1.0	9.7	0.3
	15.0	1.5	17.5	0.4
	20.3	1.6	21.0	0.1
	40.8	3.3	40.7	0.3
	60.8	4.9	53.5	0.2
	79.8	6.4	59.5	0.1
Ag-NPs	19.7	3.6	23.1	0.4
	31.0	3.0	29.0	0.3
	41.0	5.0	40.0	0.2
Pt-NPs	46.0	5.0	47.6	0.4

4.2. Analytical procedure

Measurements were performed on a SF-ICP-MS (Element II, ThermoScientific, Bremen, Germany) daily tuned to ensure maximum sensitivity and stability, and low uranium oxide formation ($\text{UO/U} \leq 7 \%$). Also, trapezium-like peak shape was verified at each flow-rate using a 1000 ng L^{-1} dissolved gold solution. Table 6 gives representative operating conditions and spICP-MS parameters. Note that the minimum/default settling time usable for spICP-MS using the SF-ICP-MS is 1 ms since the magnet needs to stabilize between two measurements.

Table 6: Operating parameters of the SF-ICP-MS

	<i>system</i>	<i>Conventional spray chamber</i>
<i>Cones</i>	Ni: « H » skimmer and sampler	
<i>Uptake rate</i>	8 to 38 $\mu\text{L min}^{-1}$	180 $\mu\text{L min}^{-1}$
<i>RF power</i>	1360 W	1285 W
<i>Ar Cool gas</i>	16 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	
<i>Ar auxiliary gas</i>	1.46 to 1.58 L min^{-1}	1.00 L min^{-1}
<i>Ar nebulization gas</i>	0.390 to 0.395 L min^{-1}	0.975 L min^{-1}
<i>Monitored isotopes</i>	^{197}Au , ^{107}Ag & ^{195}Pt in low resolution	^{197}Au in low resolution
<i>NPs measurement</i>	20000 runs of 1 pass with a 1 ms dwell-time + 1 ms settling-time	
<i>Oxides</i>	UO/U \leq 7%	

Most of the measurements were achieved using the μ -dDIHEN system developed by Louvat et al. (2019). It is assembled as i) a dual-loop gas displacement pump (GDP) (8-port valve, Elemental Scientific, USA) fed by an argon (Ar) micro-Mass-Flow Controller ($17 \leq q_{Ar-MCF} \leq 75 \mu\text{L min}^{-1}$, El-flow, Bronkhorst, Netherlands) delivering a stable low velocity flow of carrier solution (2% HNO_3 or HCl) to ii) a Flow-Injection Analysis valve (6-port FAST valve, Elemental Scientific, USA) connected to an autosampler (SC-DX, Elemental Scientific, USA) and equipped with a micro-volume loop (of 50 μL) linked to iii) a demountable high efficiency direct injection nebulizer (dDIHEN, Analab, France) plugged in the torch, nebulizing the sample directly into the plasma. The GDP valve is toggled every 30 seconds, which is long enough to have the GDP loops filled with the carrier solution and quick enough to avoid Ar being pushed towards the nebulizer since any disruption of the liquid flow rate (Ar or air bubbles) induces the extinction of the ICP-MS plasma^{21, 22}. Another program (Elemental Scientific, USA) controls the filling of the sample loop from the auto-sampler on the FIA valve and synchronizes MS measurements and sample injections. All these parameters were optimized in a previous study²⁴. Note that 17 $\mu\text{L min}^{-1}$ is the lowest possible stable gas rate dispensed by the mass-flow controller of the GDP.

4.3. Environmental matrices

In order to evaluate potential matrix effects on μ -dDIHEN measurements, 40 nm Au-NPs were added to four different media, of increasing complexity: i) ultra-pure water; ii) 5 mg L^{-1} fulvic acid (IHSS Pahokee Peat) solution; iii) solution ii with 100 mg L^{-1} CaCO_3 and iv) an ultra-filtered (1 kDa membrane pore size) Seine river water (SRW) ($[\text{Ca}] = 123 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{Na}] = 80 \text{ mg L}^{-1}$; $[\text{K}] = [\text{Mg}] = 16 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{DOC} = 2.5 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{pH} = 7.2$; $\sigma = 195 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Additional measurements with a conventional spray chamber were performed using a μ flow-PFA nebulizer connected to a Peltier cooling PC³ system (Elemental Scientific, USA) at 20°C. Operating parameters are listed in Table 6.

4.4. Data processing

The following steps were programmed in MATLAB (R2018b) using the raw data exported from the SF-ICP-MS sequence. Size distributions were calculated using the dissolved Au, Ag and Pt standards calibration curves to calculate a mass per particle from the signal intensities of particle events, which were then converted to a size, assuming a spherical shape for the NPs.

4.4.1. Calculation of the transport efficiency ($\eta_{Transport}$) using 40 nm Au-NPs

The dissolved Au standard calibration is used here, but an accurately diluted solution of standard Au-NPs is also needed, as $\eta_{Transport}$ compares the signal effectively measured for this solution to the signal that can be calculated with the dissolved Au calibration only. As the signal produced by Au-NPs is very distinct from the dissolved threshold, with and without dissolved gold, the method of the 3σ cut-off (D_{min} , calculated as Lee et al. (2014)²⁵) is applied for the definition of the threshold between dissolved and NP signals. Using the established spICP-MS theory (the size method from Pace et al. (2011)⁶) and the full demonstration given in the Supplementary Information section, $\eta_{Transport}$ is calculated as:

$$\eta_{Transport} = \frac{d_{Au-NPs}^3 \cdot S \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho}{6 \cdot (I_{NPs} - I_{bckgd}) \cdot t_d \cdot q_{liq}} \quad (1)$$

where d_{Au-NPs} is the Au-NP average diameter (in nm, here 40.8 nm), S is the slope of the external dissolved calibration (in cps ng⁻¹ L), f_a is the mass fraction of gold in the Au-NPs (here $f_{Au-NPs} = 1$, pure Au-NPs), ρ is the density of the NPs ($\rho_{Au-NPs} = 19.32 \times 10^{-12}$ ng nm⁻³), I_{NPs} is the average measured signal produced by Au-NPs (in cps), I_{bckgd} is the average background signal of gold (in cps), t_d is the dwell-time (in min) and q_{liq} is the liquid flow-rate (in L min⁻¹). Note that the y-intercept of the calibration curve does not appear in Equation 1 as it is included into I_{bckgd} that contains both instrumental and dissolved ion backgrounds.

4.4.2. Determination of the particle size distribution (PSD), average diameter (d_{NPs}) and particle number concentration (PNC)

We distinguish below the transport and nebulization efficiencies (respectively noted $\eta_{Transport}$ and $\eta_{Nebulization}$) for the calculation of the particle size and number concentration. Details about the difference between these efficiencies are provided in the “Result and discussion” section and in Supplementary Information (which includes also a demonstration of the equations).

By inverting Equation 1, PSD is calculated from the signal distribution of each NP suspension solution. For a known chemical composition and assuming a spherical shape, the diameter of the i^{th} bin (with I_{i-NPs} the intensity of the i^{th} bin) is given by:

$$d_{i-NPs} = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot (I_{i-NPs} - I_{bckgd}) \cdot t_d \cdot q_{liq} \cdot \eta_{Transport}}{S \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho}} \quad (2)$$

Then, the average diameter can be calculated as:

$$\overline{d_{NPs}} = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot (\overline{I_{NPs}} - I_{bkgd}) \cdot t_d \cdot q_{liq} \cdot \eta_{Transport}}{S \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho}} \quad (3)$$

The number concentration for each i^{th} bin is :

$$N_{i-NPs} = \frac{D_{i-NPs}}{\eta_{Nebulization} \cdot q_{liq} \cdot D \cdot t_d} \quad (4)$$

where D_{i-NPs} is the i^{th} bin number of NP events, D the total number of data point (*i.e.* 20000 in this study) and $\eta_{Nebulization}$, the nebulization efficiency, taken equal to 1 as 100% of the solution is directly nebulized into the plasma.

And the total number concentration is:

$$\overline{N_{NPs}} = \frac{\overline{D_{NPs}}}{\eta_{Nebulization} \cdot q_{liq} \cdot D \cdot t_d} \quad (5)$$

where D_{NPs} the total number of NP events.

5. Results and discussion

5.1. Nebulizer liquid uptake rate versus displacement pump gas flow rate

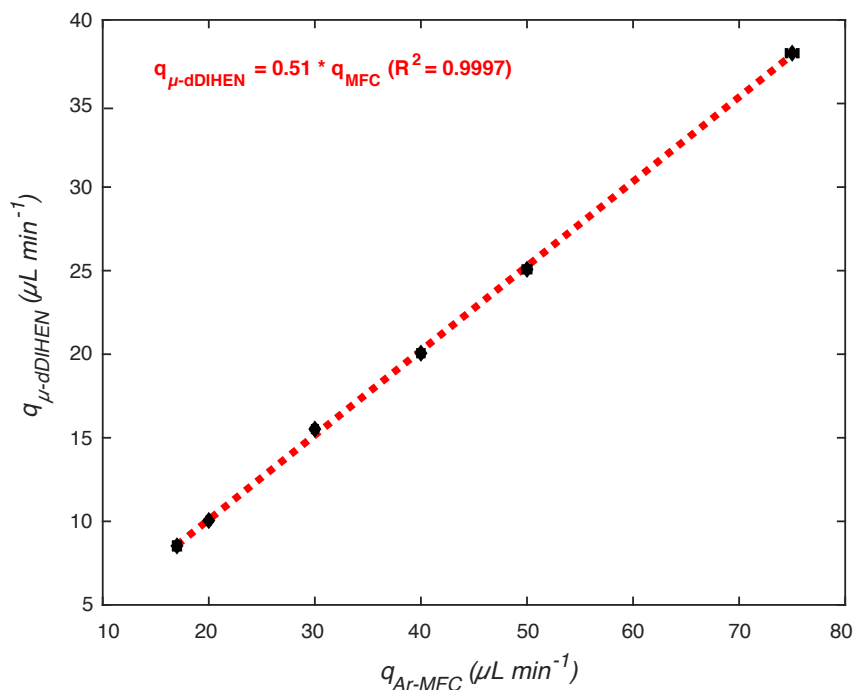


Figure 35: liquid uptake rate ($q_{\mu-dDIHEN}$) as a function of gas flow-rate (q_{Ar-MFC}) from the massflow controller (MFC). The dashed red line represents the linear fit determined using the least square method

To guarantee a stable and reproducible signal, at microliters/minute uptake rates ($\leq 30\text{-}50 \mu\text{L min}^{-1}$), the μ -*dDIHEN* system uses a gas displacement pump (GDP) with a micro-mass-flow controller (MFC), which was tested between 17 and 75 $\mu\text{L min}^{-1}$ of Ar. The corresponding liquid uptake rates for the μ -*dDIHEN* were calculated by dividing the known sample loop volume (here 50 μL) by the peak duration (between the beginning of the signal increase and the beginning of its decrease as defined in Louvat *et al.* (2019)²⁴). For the system used in this study, liquid uptake rates are always half the gas flow rates (*i.e.* 8 to 38 $\mu\text{L min}^{-1}$, respectively, Figure 35). This difference between gas flow rates and liquid uptake rates is due to the small inner diameter of the capillaries used (*i.e.* few hundreds of μm) and, more importantly, to the strong counter-pressure at the tip of the nebulizer generated by the large difference of surface area between the entrance and the outlet of the nebulizer²⁶ (the nebulizer needle inner diameter goes from 5 mm to 0.3 mm). Moreover, the compressible gas partly absorbs the liquid pressure after the mass flow controller, reducing its volume, thus slowing the flow. The μ -*dDIHEN* system needs about one hour at the beginning of the session (*i.e.* after plasma ignition) to stabilize pressure and flow²⁴.

5.2. Influence of the uptake rate on gold dissolved signal

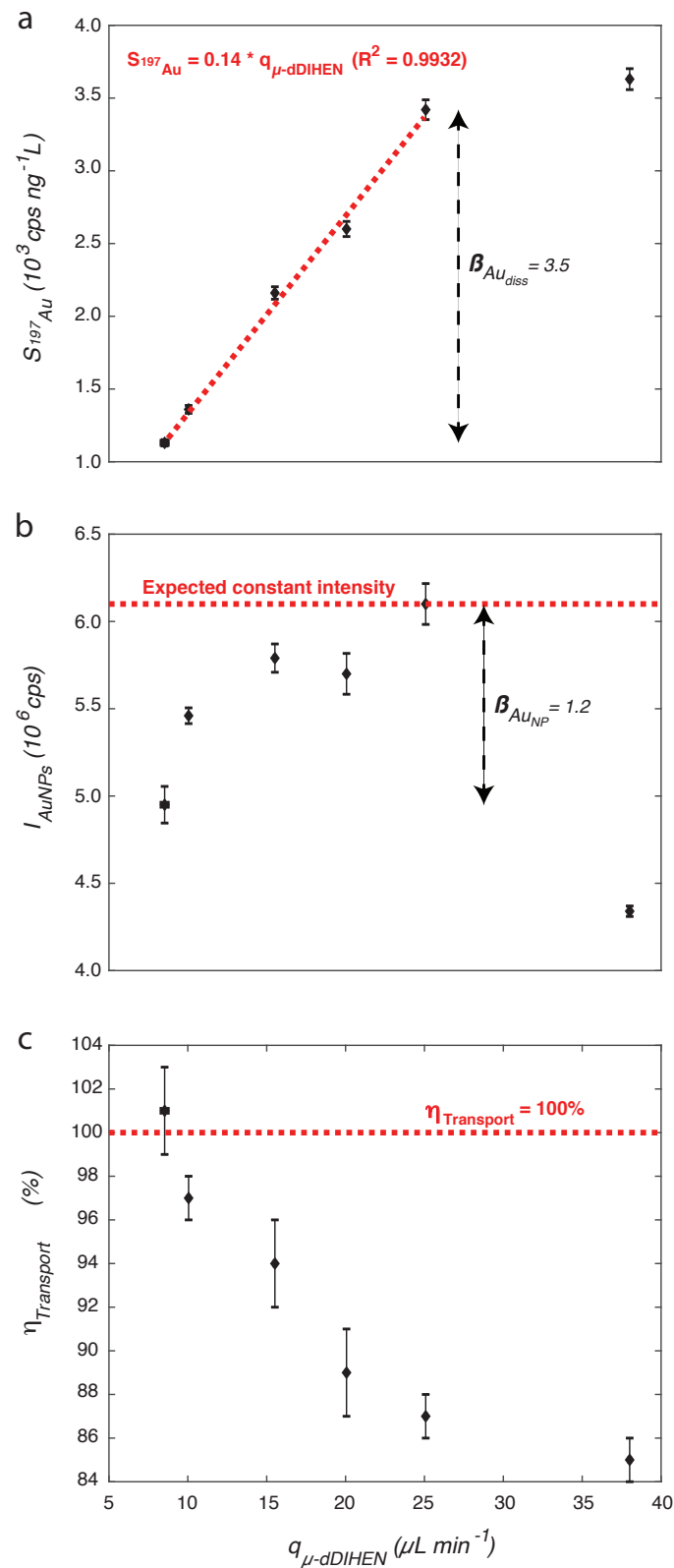


Figure 36: liquid uptake ($q_{\mu\text{-dDIHEN}}$) influence on a) dissolved ^{197}Au sensitivity ($S_{197\text{Au}}$), b) Au-NPs intensity (I_{AuNPs}) and c) transport efficiency ($\eta_{\text{Transport}}$). ^{197}Au sensitivity is the slope of the dissolved Au calibration at each liquid uptake. Dashed red lines represent a) linear fit from the least square method, b) constant intensity and c) complete nebulization efficiency. Dashed black arrows represent sensitivity decrease factor β for a) dissolved Au and b) Au-NP. Green stars are data previously published in Louvat et al. (2019)²⁴

Within the gas flow range 17-75 $\mu\text{L min}^{-1}$ the signal sensitivity for dissolved gold was measured at six different rates (17, 20, 30, 40, 50 and 75 $\mu\text{L min}^{-1}$), sensitivity being the slope of an external calibration curve with 6 solutions of known $[\text{Au}]$ between 10 and 10000 ng L^{-1} . At each flow rate, the coefficient of determination – R^2 – was calculated to verify the linearity of the external calibration and no significant variation was observed with flow rate (*i.e.* $R^2 = 0.9989 \pm 0.0005$). However, as previously observed for ^{11}B or ^{238}U ²⁴, the ^{197}Au sensitivity linearly increases with the uptake rate between 8 and 25 $\mu\text{L min}^{-1}$, as more atoms are introduced per unit of time, until 25 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Figure 36 a) and then it plateaus beyond 25 $\mu\text{L min}^{-1}$. This is because too high of a liquid to gas ratio lowers the quality of the aerosol by spreading larger and polydisperse droplets, with heterogeneous velocities, leading to extra-wet conditions that hamper a correct ionisation of the sample ²⁷. Increasing the nebulization gas flow-rate would allow smaller droplets to be produced, even at high liquid uptake rates, but would reduce the droplet residence time within the plasma, and thus the sensitivity. Ideally, the generated aerosol should be composed of small and monodisperse droplets with uniform (and not too high) velocities to improve their ionization. Note that in this study, for each liquid uptake rate, the nebulization gas flow-rate was carefully optimized for highest sensitivity and best stability of the ICP-MS signal. The variation in nebulization gas flow-rate was however negligible (0.390 to 0.395 $\mu\text{L min}^{-1}$, Table 6). Because of the good correlation between sensitivities and uptake rates between 8 and 25 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Figure 36 a), we can state that the size and velocity distributions of the $\mu\text{-dDIHEN}$ aerosol are stable over this range of uptake rates.

5.3. Influence of the uptake rate on gold nanoparticle signal compared to dissolved

For 40 nm Au-NPs, the sensitivity drops for uptake rates exceeding 25 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Figure 36 b), because the water content is too high and droplet velocity is heterogeneous, preventing a full ionization of the NPs, as was observed for dissolved gold. Compared to dissolved gold, varying the uptake rate between 8 and 25 $\mu\text{L min}^{-1}$ should not affect the sensitivity for the Au-NPs: the number of Au atoms (and thus ions) being constant for a given NP size, the average intensity produced by the NP spikes should be constant. Contrary to this, we observe a decrease in the NP Au signal when the uptake rate decreases. This is due to longer residence times of the NPs in the plasma at lower uptake rates ²⁸. The sampling of the ion beam by the cones occurs further from the point where a single NP is completely vaporized/ionized. Due to the diffusion of the ions produced by a single NP as they travel through the plasma, the ion beam width (in time) is larger when the uptake rate decreases, and its signal, sampled by the cones, is smaller (in intensity). Increasing the nebulization gas flow-rate would probably shorten the ion beam residence time in the plasma and increase the NP signal. However, Bings *et al.* (2014) ²⁶ mentioned that increasing the nebulization gas affects the stability of the signal, as it conflicts with the plasma channel gas. To further investigate these competing effects, it would be interesting to operate spICP-MS at microsecond dwell-times in order to decompose the signal of a single NP spike and calculate its peak area and duration. The produced ion cloud should last longer at smaller uptake rates

²⁸. However, it is technically difficult to run microsecond dwell-times with the SF-ICP-MS Element II, since it was not designed for fast-spICP-MS.

Interestingly, the difference in sensitivity between dissolved ions and NPs increases with decreasing uptake rates (*i.e.* from 38 to 8 $\mu\text{L min}^{-1}$): the dissolved gold signal drops by a factor 3.5 ($\beta_{diss-Au}$, Figure 36 a), when the AuNP signal only decreases by a factor 1.2 (β_{Au-NP} , Figure 36 b). Ultimately, this allows for better discrimination of the NP signal from the dissolved signal at lower uptake rates, which can be very valuable for the characterisation of NPs in matrices with high dissolved background (*i.e.* geological, biological, environmental samples) since the detection level of NPs (D_{min}) is lowered.

5.4. Complete transport efficiency with the μ -dDIHEN at $< 10 \mu\text{L min}^{-1}$ uptake rate

As shown in the introduction and in the Supplementary Information, the transport efficiency ($\eta_{Transport}$) designates the efficiency with which an atom coming from a NP is transported from the solution to the detection system relative to an atom coming from a dissolved sample. $\eta_{Transport}$ calculated for the 40 nm Au-NP solution at the different uptake rates, based on Equation 1, increases from $87 \pm 1\%$ to $101 \pm 2\%$ ($n = 5$) for uptake rate decreasing from 38 to 8 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Figure 36 c). Thus, as previously shown in a preliminary study ²⁴, despite a nebulization efficiency of 100% using a direct injection system, $\eta_{Transport}$ can be incomplete. As shown in the Supplementary Information and in Equation 6, the transport efficiency covers the material losses in the introduction system ($\eta_{Nebulization}$) and the losses in the ICP-MS for NPs relative to dissolved sample ($\alpha_{Transmission}$):

$$\eta_{Transport} = \eta_{Nebulization} \cdot \alpha_{Transmission} \quad (6)$$

$\alpha_{Transmission}$ is here the ratio of the “transmission efficiencies” for a dissolved standard ($\eta_{Transmission-diss}$) and for a NP ($\eta_{Transmission-NP}$). The cases where $\eta_{Transport} \neq \eta_{Nebulization}$ (*i.e.* $\neq 100\%$) show that ions coming from a solute or from a NP do not behave identically in the ICP-MS and that during the transport of NPs towards the detection system downstream to the nebulization, other phenomena occur. Particularly, the density of ions coming from solute or from NPs might be different, creating different ion transit bias effects. Also, the ion flux to the detection system is continuous for solute while it is discrete for NPs. Altogether, this allows us to affirm that transport and nebulization efficiencies must be considered independently for the calculation of the NP size/mass and of the particle number concentration, respectively.

We demonstrate here that $\alpha_{Transmission} = 1$ can be achieved using a direct injection nebulizer with continuous liquid uptake rate at $< 10 \mu\text{L min}^{-1}$. Indeed, with the μ -dDIHEN operated at $\mu\text{L min}^{-1}$ uptake rates for the measurement of 40 nm Au-NPs, we reached, for the first time, both $\eta_{Nebulization} = 100\%$ and $\eta_{Transport} = 100\%$. Although, as described in the introduction, other studies have shown potential improvements towards complete transport efficiency, introduction systems are still nebulizing through a spray chamber into the plasma leading to unavoidable losses, or the calibration method is not adapted to the analysis of NPs with a complex composition (*i.e.* multiple elements within the same NP). For

example, concerning the most recent μ DG methodology¹⁶, the vaporization/ionization differences observed between the aerosol nebulized from a spray chamber and the μ -droplets from the μ DG system are, basically, similar to the incomplete transport efficiency we witnessed here for uptake rates exceeding $10 \mu\text{L min}^{-1}$. Consequently, in all above studies the calculation of the transport efficiency is still mandatory for spICP-MS analysis. The use of the μ -*dDIHEN* at its lowest uptake rate (*i.e.* $8 \mu\text{L min}^{-1}$) does not require calculation of the nebulization or the transport efficiency, as $\eta_{Nebulization}$ and $\eta_{Transport}$ are equal to 100%. Thereby, the μ -*dDIHEN* system, operated below $10 \mu\text{L min}^{-1}$ makes spICP-MS analysis much more straightforward. Note that the increase of $\eta_{Transport}$ also leads to a noticeable decrease of the minimum detectable NP diameter D_{min} from 8 nm at $38 \mu\text{L min}^{-1}$ to 6.5 nm at $8 \mu\text{L min}^{-1}$. This is mainly due to the fact that the signal from the blank, and consequently its 3σ used for the calculation²⁵, is decreasing with the flow-rate.

To further validate the μ -*dDIHEN* measurement method, we tested if complete transport was achieved independently of the NP size or composition, and if measurements were reproducible over 12 hours and between measurement sessions months apart.

5.5. Measurement of Au-, Ag- and Pt-NP reference materials under optimal μ -*dDIHEN* conditions

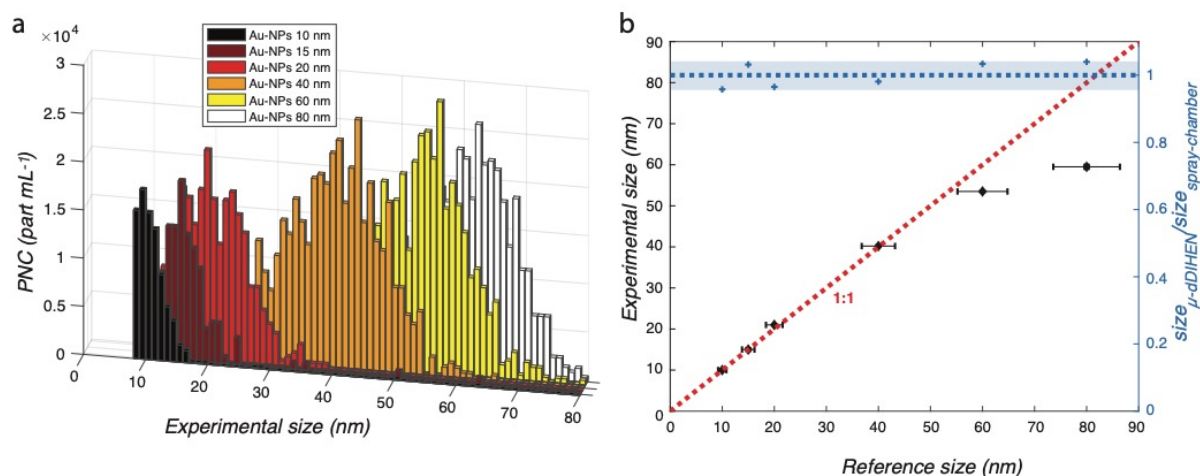


Figure 37: Analysis of Au-NP reference materials with sizes between 10 and 80 nm using the system. a) Nanoparticle size distributions b) experimental average sizes against reference sizes in black diamonds (left y-axis) and “conventional spray chamber sizes” (right y-axis). Horizontal and vertical error bars on the black diamonds represent the standard deviation of the reference material and of the triplicate measurement, respectively. Dashed red and blue lines represent the 1:1 linear fit and the average size ratio (*i.e.* 1.01), respectively. The blue area represents the standard deviation of the size ratio (*i.e.* 0.04)

Reference Au-NPs of known sizes (*ca.* 10, 15, 20, 40, 60 and 80 nm) were analysed and their size distributions were established using Equations 2 and 4 with $\eta_{Transport}$ fixed at 100% (sensitivity for ^{197}Au that day equal to $993 \pm 16 \text{ cps ng}^{-1} \text{ L}$, $R^2 = 0.9992$). If $\eta_{Transport}$ is indeed 100%, the measured size should be identical to the reference size. The Gaussian-like shape of the measured particle size distributions (PSD) for Au-NPs between 10 and 80 nm (Figure 37 a) shows that neither the μ -*dDIHEN*

system nor the spICP-MS parameters (*i.e.* settling time and dwell-time) alter the size distributions ($p \leq 10^{-15}$ in the Kolmogorov-Smirnov test)²⁹. Moreover, the measured and reference average diameters are in good agreement (Table 5) for Au-NPs of 10, 15, 20 and 40 nm diameters. For larger Au-NPs (60 and 80 nm), the measured average diameters are underestimated by our method (Figure 37 b). The same trend was however observed with a conventional spray chamber (*i.e.* $size_{\mu\text{-dDIHEN}}/size_{\text{spray-chamber}} = 1.01 \pm 0.04$, $n = 6$, for Au-NPs of diameters between 10 and 80 nm). This underestimation arises from the non-linear response of the MS detector above a given number of counts sec^{-1} in counting mode³⁰ when too large a number of ions issued from a relatively large NP reaches the detector. It was clearly observed in this study since the instrument analysis report displayed intensities of 60 and 80 nm Au-NPs with a “S” for “skipped” meaning that the secondary electron multiplier (SEM) jumped from pulse counting to analog mode, due to a saturation in counting mode. As a consequence, the high sensitivity of SF-ICP-MS, compared to quadrupole or time-of-flight ICP-MS³¹, can be a drawback for NP measurements, because the saturation point of the SEM in counting mode can be quickly reached. It is particularly the case with elements that have isotopes with high abundance (*i.e.* Au with $A_{197\text{Au}} = 100\%$) and/or low first ionisation energy.

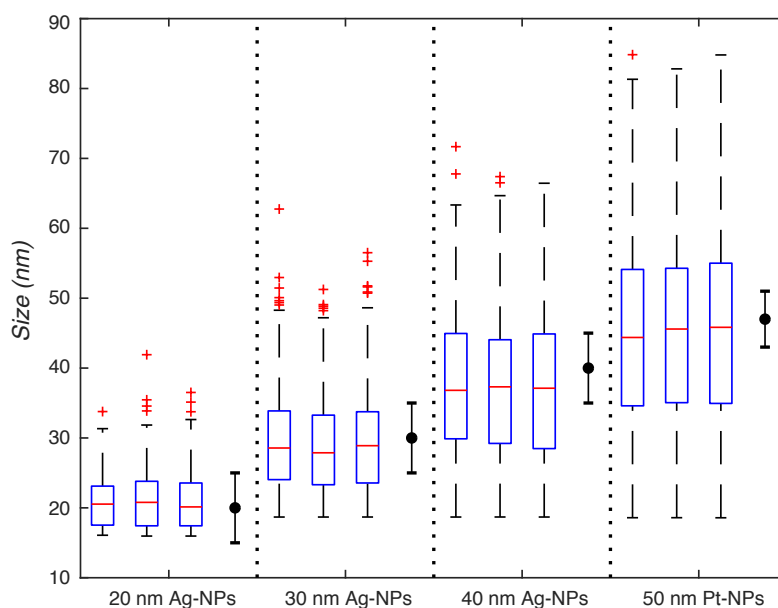


Figure 38: Nanoparticle size distributions independently determined ($n=3$), for 20, 30 and 40 nm Ag-NPs and 50 nm Pt-NPs. All distributions are displayed as boxplots where the red horizontal mark indicates the median, and the bottom and top edges of the blue box indicate the 25th and 75th percentiles, respectively. The black whiskers extend to the most extreme data points not considered outliers. Outliers, plotted individually using the red-cross, are values outside the 99.3% confidence interval ($\pm 2.7SD$). Note that the number of outliers is negligible for each distribution ($< 1\%$). The black dot and the error bar represent the reference material value and its standard deviation, respectively

The applicability of the method to other types of nanoparticles was also tested for Ag-NP and Pt-NP reference materials with the $\mu\text{-dDIHEN}$ at $8 \mu\text{L min}^{-1}$ (Figure 38). Individual particle size distributions are displayed as boxplots and were calculated using dissolved calibrations with Ag and Pt standards between 10 and 10000 ng L^{-1} ($n_{\text{standard}} = 6$) that gave a sensitivity of $596 \pm 2 \text{ cps ng}^{-1} \text{ L}$ ($R^2 = 0.9999$) and $393 \pm 3 \text{ cps ng}^{-1} \text{ L}$ ($R^2 = 0.9998$) for ^{107}Ag and ^{195}Pt , respectively that day. As for Au-NP

measurements, $\eta_{Transport}$ was fixed at 100%. The average sizes that were obtained from these measurements are in close agreement with the reference sizes (Table 5 and black dots in Figure 38). With these measurements of reference material solutions of Au-NPs at different sizes and of Ag-NPs and Pt-NPs, we demonstrate that at $8 \mu\text{L min}^{-1}$ the $\mu\text{-dDIHEN}$ system used does achieve complete transport ($\eta_{Transport} = 100\%$) and provides accurate size measurement for various metallic nanoparticles, using only a sensitivity calibration with dissolved standards of Au, Ag and Pt.

5.6. Long-term stability under $\mu\text{-dDIHEN}$ optimal conditions

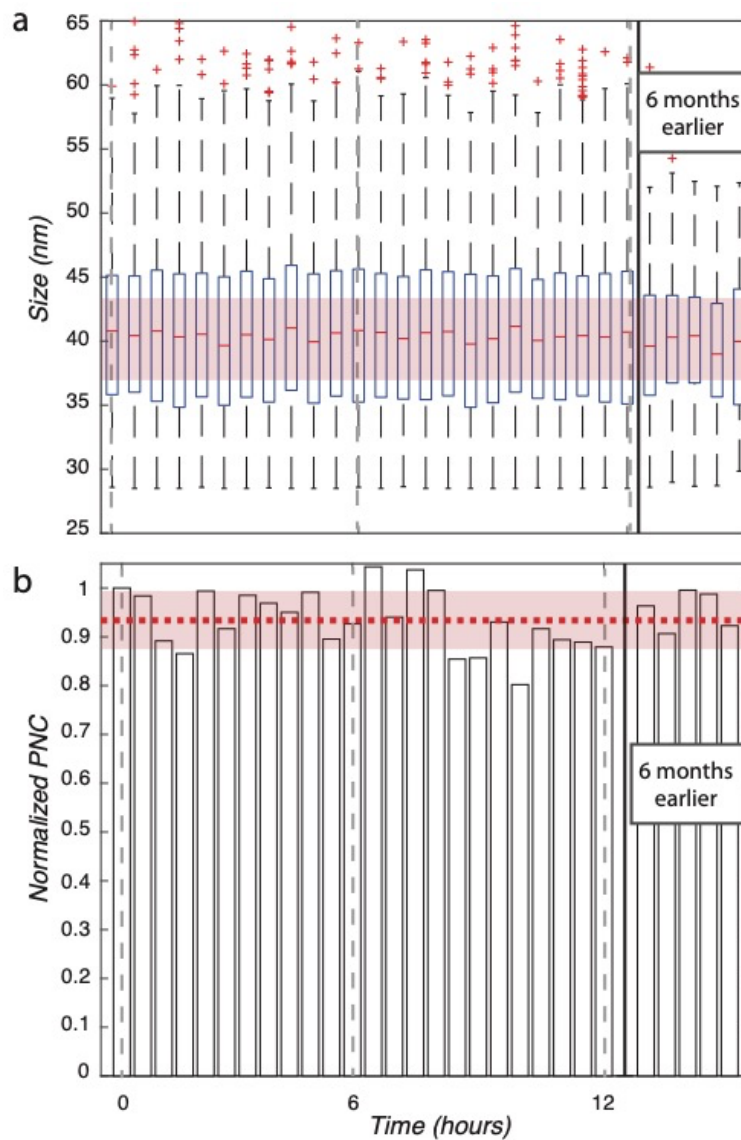


Figure 39: Long-term stability of NPs analysis with the over 12 hours and for measurement sessions 6 months apart. a) Nanoparticle size distributions for 40 nm Au-NPs displayed as boxplots. The red area represents the reference size range. b) Normalized particle number concentration ($\alpha_i = [\text{PNC}]_{\mu\text{dDIHEN-}i} / [\text{PNC}]_{\text{spray-chamber}}$, where $[\text{PNC}]_{\text{spray-chamber}}$ is the particle number concentration determined using a conventional introduction system). The red horizontal mark indicates the median, and the bottom and top edges of the blue box indicate the 25th and 75th percentiles, respectively. The black whiskers extend to the most extreme data points not considered outliers. Outliers, plotted individually using the red-cross, are values outside the 99.3% confidence interval ($\pm 2.7\text{SD}$). Note that the number of outliers is negligible for each distribution ($< 1\%$). The dashed red line and the red area represent the averaged value, $\alpha_{\text{AuNPs-12hours}} = 0.93$ and its associated standard deviation $sd = 0.06$. Other displayed data (i.e. right side of each graphs) are from the same 40 nm Au-NPs solution, analysed 6 months earlier

Besides the accuracy, we verified the repeatability of the μ -dDIHEN spICP-MS measurements by analysing a 40 nm Au-NP solution overnight (*i.e.* ≈ 12 hours, with one measurement every 15 minutes). Boxplots of individual calculated size distributions (Figure 39 a) show that the average diameter over this relatively extended period of time does not vary ($d_{Au-NPs-12hours} = 40.7 \pm 0.3$ nm (n = 48)). Furthermore, the Gaussian-like shape of the distribution remains identical during the analytical sequence (unchanged form of the boxes and whiskers and no increase of the number of outliers (< 1%)). The PNC, using Equation 5 with $\eta_{Nebulization} = 100\%$ (*i.e.* all NPs nebulized are introduced into the plasma), was also determined over this 12-hour measurement of the Au-NP solution, and then compared to the PNC determined using a conventional introduction system (*i.e.* $\alpha_t = [\text{PNC}]_{\mu\text{dDIHEN-t}}/[\text{PNC}]_{\text{spray-chamber}}$). Figure 39 b shows that the overnight reproducibility is excellent ($\alpha_{AuNPs-12hours} = 0.93 \pm 0.06$ (n = 48)). However, after 9 hours, a decrease of the α_{AuNPs} by *ca.* 13% is observed, which is linked to an instrumental drift, also regularly observed when using ICP-MS with conventional introduction system over hours. As with conventional ICP-MS, the periodic measurement of a quality control (*i.e.* certified solution), a repeated dissolved external calibration or the use of an internal standard well suited to spICP-MS³² can rectify this drift. Thereby, we can state that the prolonged use of the μ -dDIHEN does not alter the measurement of the particle number concentration or the average size distribution. We also measured the same Au-NP standards 6 months apart and these data of spICP-MS analysis are also displayed in both Figure 39 a and b. Although the PSDs appear narrower 6 months earlier, due to differences in the performance of the day (*i.e.* decrease of the stability), as there are no changes in the d_{Au-NPs} and the α_{AuNPs} between the two-measurement series, we can claim that the system is robust for spICP-MS measurement even at lower NP concentration.

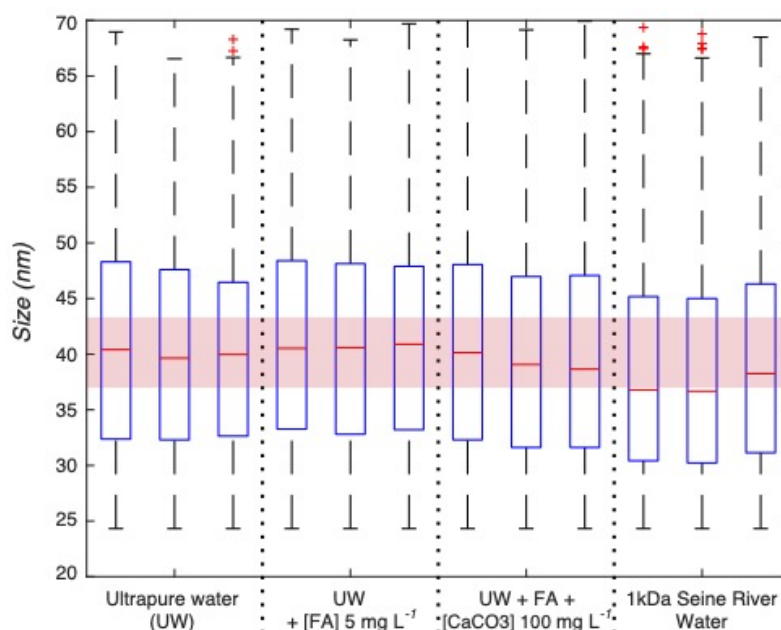
5.7. μ -dDIHEN measurement of Au-NPs in synthetic and natural matrices

Figure 40: Matrix testing for Au-NPs measurement with the μ -dDIHEN. Nanoparticle size distributions for 40 nm Au-NPs displayed as boxplots in i) ultra-pure water, then spiked with ii) 5 mg L⁻¹ fulvic acid (IHSS Pahokee Peat), finally additionally spiked with iii) 100 mg L⁻¹ CaCO₃ and iv) in an ultra-filtered (i.e. 1 kDa membrane pore size) Seine river water (SRW). The red horizontal mark indicates the median, and the bottom and top edges of the blue box indicate the 25th and 75th percentiles, respectively. The black whiskers extend to the most extreme data points not considered outliers. Outliers, plotted individually using the red-cross, are values outside the 99.3% confidence interval ($\pm 2.7SD$). Note that the number of outliers is negligible for each distribution ($< 1\%$). The red area represents the reference size range

Like any ICP-based technique, spICP-MS can be subject to matrix effects³². In a complex matrix (*i.e.* higher level of total dissolved solid, total organic carbon, etc), ionization of the analytes can be increased or decreased as compared to ultrapure water or dilute acid, changing the sensitivity. These potential matrix effects were tested for 40 nm Au-NPs in three different matrices (fulvic acid, fulvic acid + calcium carbonate, and ultra-filtered water from the Seine River in Paris) and compared to analysis in ultra-pure water. Individual calculated size distributions of the triplicate measurements are represented as boxplots (Figure 40). Spiking Au-NP solution with fulvic acid and calcium carbonate has no effect on the average size and distribution spread. For the ultra-filtered Seine River water, the calculated Au-NP average size is smaller by 7.5% but with the same full width at half maximum (FWHM). This underestimation of NP size by matrix effect is not specific to the use of the μ -dDIHEN, as it was reported for other introduction systems (*i.e.* μ DG)¹⁴. Matrix-matching the dissolved sensitivity calibration appears to successfully correct this underestimation^{16,33}, as the change in sensitivity due to the matrix is then taken into account. In our case, based on Equation 3 and the cubic-root relationship between diameter and sensitivity, the sensitivity (from dissolved calibration) should be 4.2% lower (*i.e.* 953 cps ng⁻¹ L) to obtain the reference Au-NP average size. Although matrix-matching calibration should be further studied to increase the accuracy of our μ -dDIHEN method, the average size that was experimentally determined in the ultra-filtered Seine River water is still in reasonable agreement with the reference material value (Table 5).

6. Conclusion

The direct injection sample introduction system μ -*dDIHEN* was used to directly spray solutions containing NPs into the plasma at very low uptake rate ($\leq 10 \mu\text{L min}^{-1}$) and reach complete transport. The analytical performance of our system was evaluated for uptake rates between 8 and 38 $\mu\text{L min}^{-1}$. We first demonstrated that, for 40 nm gold nanoparticles, very high transport efficiencies were always reached, and increased from 85% at 38 $\mu\text{L min}^{-1}$ to 100% at 8 $\mu\text{L min}^{-1}$. At this lowest uptake rate, solutions spiked with NP reference materials of different size (10 to 80 nm) and composition (Au-, Ag- and Pt-NPs) all showed excellent agreement between the calculated and NP average sizes of the reference materials, validating the performances of our μ -*dDIHEN* system for spICP-MS measurements. As complete transport efficiency was reached (100%), these results were obtained without the need of a calibration with Au-NPs reference material of calibrated size; only a calibration of the sensitivity with solutions of the dissolved analyte is necessary. Environmental-like matrices (fulvic acids and calcium carbonate) did not alter these performances. In water from the Seine River, although calculated size distributions were slightly smaller compared to diluted acid, these effects were not specific to the use of the μ -*dDIHEN* and could easily be corrected by matrix-matching the dissolved standards used for the sensitivity calibration. Long-term repeatability over 12 hours and between measurement series 6-months apart was also achieved, showing that long series of automated analyses are possible with the μ -*dDIHEN*. Moreover, a very high analysis throughput (*i.e.* 1 sample every 40 seconds in this study; total amount depending on the autosampler capacity) with very low sample consumption (the sample injection loop volume was 50 μL) is possible since the μ -*dDIHEN* system is fully automated.

Direct nebulization, and the resulting complete transport efficiency, was thus achieved for the first time for continuous nebulization in spICP-MS, using the μ -*dDIHEN* at $\mu\text{L min}^{-1}$ uptake rate. In addition, we have shown that in most cases, the transmission efficiency differs between ions from solute and ions from NPs. Thus, we establish an updated calculation methodology, which distinguishes transport efficiency from nebulization efficiency during the transfer of NPs from the solution to the ICP-MS detection and can be reliably used to calculate sizes and particle number concentrations. Future work will focus on the reliability of the μ -*dDIHEN* for the determination of PNC, as this is a very important parameter. However, few Certified Reference Material with certified PNC and uncertainty are available. A step forward would also be to monitor the uptake rate on-line using a dedicated device, which would allow to more accurately determine size and PNC as well as their uncertainties using uncertainty propagation. Another way to remove the uptake rate measurement would be to use the methodology developed by Lamsal *et al.* (2016 - 2020)^{34, 35} for flow-injection analysis, which is well adapted to the μ -*dDIHEN* system.

Additionally, a cell suspension can be nebulized into the ICP-MS for the measurement of metal content in individual cells by single-cell ICP-MS (scICP-MS). However, these cells are usually dispersed in complex biological media, very fragile and/or contained in small sample volume. Nebulization through a spray chamber can lead to inaccuracy in the results because of matrix effects or

cell degradation. All the benefits of the μ -*dDIHEN* system indicate that it is well adapted to: i) monitor the metal content within individual cells for either dissolved or nanoparticulate form, ii) deal with lower cell concentration compared to conventional introduction system, and iii) minimize sample volume and preparation.

Furthermore, the use of very low μ -uptake rate is also a major asset for the hyphenation of separation techniques such as asymmetrical-flow field-flow-fractionation (AF4), which could directly control the uptake rate of the μ -*dDIHEN* thanks to the pump that delivers the carrier solution, in place of the mass-flow controller used here. Finally, since there can be a significant dilution of the sample during separation, avoiding a spray chamber and the resulting sample loss is very attractive.

7. References

1. M. F. Hochella, D. W. Mogk, J. Ranville, I. C. Allen, G. W. Luther, L. C. Marr, B. P. McGrail, M. Murayama, N. P. Qafoku, K. M. Rosso, N. Sahai, P. A. Schroeder, P. Vikesland, P. Westerhoff and Y. Yang, *Science*, 2019, **363**, eaau8299.
2. A. López-Serrano, R. M. Olivás, J. S. Landaluze and C. Cámara, *Analytical Methods*, 2014, **6**, 38-56.
3. C. Degueldre, P. Y. Favarger and S. Wold, *Analytica Chimica Acta*, 2006, **555**, 263-268.
4. R. Reed, D. Martin, A. Bednar, M. Montaña, P. Westerhoff and J. Ranville, *Environmental Science: Nano*, 2017, **4**, 69-77.
5. A. P. Gondikas, F. v. d. Kammer, R. B. Reed, S. Wagner, J. F. Ranville and T. Hofmann, *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**, 5415-5422.
6. H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, E. P. Gray, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Environmental science & technology*, 2012, **46**, 12272-12280.
7. M. D. Montaña, J. W. Olesik, A. G. Barber, K. Challis and J. F. Ranville, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2016, **408**, 5053-5074.
8. K. Loeschner, M. S. J. Brabrand, J. J. Sloth and E. H. Larsen, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2014, **406**, 3845-3851.
9. L. Fréchette-Viens, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Talanta*, 2017, **163**, 121-126.
10. B. Franze, I. Strengé and C. Engelhard, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2012, **27**, 1074-1083.
11. J.-L. Todolí and J.-M. Mermet, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, **17**, 345-351.
12. S.-i. Miyashita, H. Mitsuhashi, S.-i. Fujii, A. Takatsu, K. Inagaki and T. Fujimoto, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2017, **409**, 1531-1545.
13. F.-h. Lin, S.-i. Miyashita, K. Inagaki, Y.-H. Liu and I.-H. Hsu, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2019, **34**, 401-406.
14. S. Gschwind, H. Hagendorfer, D. A. Frick and D. Günther, *Analytical Chemistry*, 2013, **85**, 5875-5883.
15. K. Shigeta, H. Traub, U. Panne, A. Okino, L. Rottmann and N. Jakubowski, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2013, **28**, 646-656.
16. K. Mehrabi, D. Günther and A. Gundlach-Graham, *Environmental Science: Nano*, 2019, **6**, 3349-3358.
17. D. R. Wiederin, F. G. Smith and R. Houk, *Analytical chemistry*, 1991, **63**, 219-225.
18. J. Szpunar, J. Bettmer, M. Robert, H. Chassaigne, K. Cammann, R. Lobinski and O. F. X. Donard, *Talanta*, 1997, **44**, 1389-1396.
19. K. Kahen, A. Strubinger, J. R. Chirinos and A. Montaser, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2003, **58**, 397-413.

20. C. S. Westphal, K. Kahen, W. F. Rutkowski, B. W. Acon and A. Montaser, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2004, **59**, 353-368.
21. P. Louvat, J. Bouchez and G. Paris, *Geostandards and Geoanalytical Research*, 2011, **35**, 75-88.
22. P. Louvat, J. Moureau, G. Paris, J. Bouchez, J. Noireaux and J. Gaillardet, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, **29**, 1698-1707.
23. J. L. Todoli and F. Vanhaecke, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, 2005, 182-227.
24. P. Louvat, M. Tharaud, M. Buisson, C. Rollion-Bard and M. F. Benedetti, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2019, **34**, 1553-1563.
25. S. Lee, X. Bi, R. B. Reed, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Environmental science & technology*, 2014, **48**, 10291-10300.
26. N. Bings, J. O. Von Niessen and J. Schaper, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2014, **100**, 14-37.
27. J. A. McLean, H. Zhang and A. Montaser, *Analytical chemistry*, 1998, **70**, 1012-1020.
28. J. W. Olesik and P. J. Gray, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2012, **27**, 1143-1155.
29. F. J. Massey Jr, *Journal of the American statistical Association*, 1951, **46**, 68-78.
30. W.-W. Lee and W.-T. Chan, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2015, **30**, 1245-1254.
31. N. Jakubowski, L. Moens and F. Vanhaecke, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 1998, **53**, 1739-1763.
32. H. El Hadri, E. J. Petersen and M. R. Winchester, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**, 5099-5108.
33. J.-L. Wang, E. Alasonati, M. Tharaud, A. Gelabert, P. Fiscaro and M. F. Benedetti, *Water Research*, 2020, **176**, 115722.
34. R. P. Lamsal, G. Jerkiewicz and D. Beauchemin, *Analytical chemistry*, 2016, **88**, 10552-10558.
35. R. P. Lamsal, M. S. E. Houache, A. Williams, E. Baranova, G. Jerkiewicz and D. Beauchemin, *Analytica Chimica Acta*, 2020, **1120**, 67-74.

■ CHAPITRE III

Accurate methodology for the determination of ionic and nanoparticle populations in natural samples.

Mickaël Tharaud[§], Nathan Leguay[&], Zakaria Belfadil[♯], Marc F. Benedetti[§]

[§] Université de Paris, Institut de physique du globe de Paris, CNRS, F-75005 Paris, France

[&] Université de Paris, École d'Ingénieurs Denis Diderot (EIDD)

- nathan.leguay@wanadoo.fr

[♯] Université de Paris, Master 2 Apprentissage Machine pour la Science de la Données (AMSD)

- zakaria.belfadil96@gmail.com

Table des matières

1.	RESUME.....	- 111 -
2.	ABSTRACT.....	- 112 -
3.	INTRODUCTION.....	- 113 -
4.	EXPERIMENTAL SECTION.....	- 116 -
4.1.	<i>Chemicals</i>	- 116 -
4.2.	<i>spICP-MS analysis</i>	- 116 -
5.	ALGORITHMS.....	- 118 -
5.1.	<i>Linear regression coefficient</i>	- 118 -
5.2.	<i>Transport and nebulization efficiencies</i>	- 118 -
5.3.	<i>Particle mass distribution</i>	- 119 -
5.4.	<i>Ionic concentration</i>	- 121 -
6.	PROCESSING STEPS	- 123 -
7.	RESULTS & DISCUSSION	- 125 -
7.1.	<i>External calibration</i>	- 125 -
7.2.	<i>Calculation of transport and nebulization efficiencies</i>	- 126 -
7.3.	<i>GMM clustering on suspensions with synthetic NPs</i>	- 128 -
7.4.	<i>GMM clustering on NP-containing natural samples</i>	- 130 -
8.	CONCLUSION	- 132 -
9.	GLOSSARY	- 133 -
10.	APPENDIX	- 134 -
11.	REFERENCE.....	- 135 -

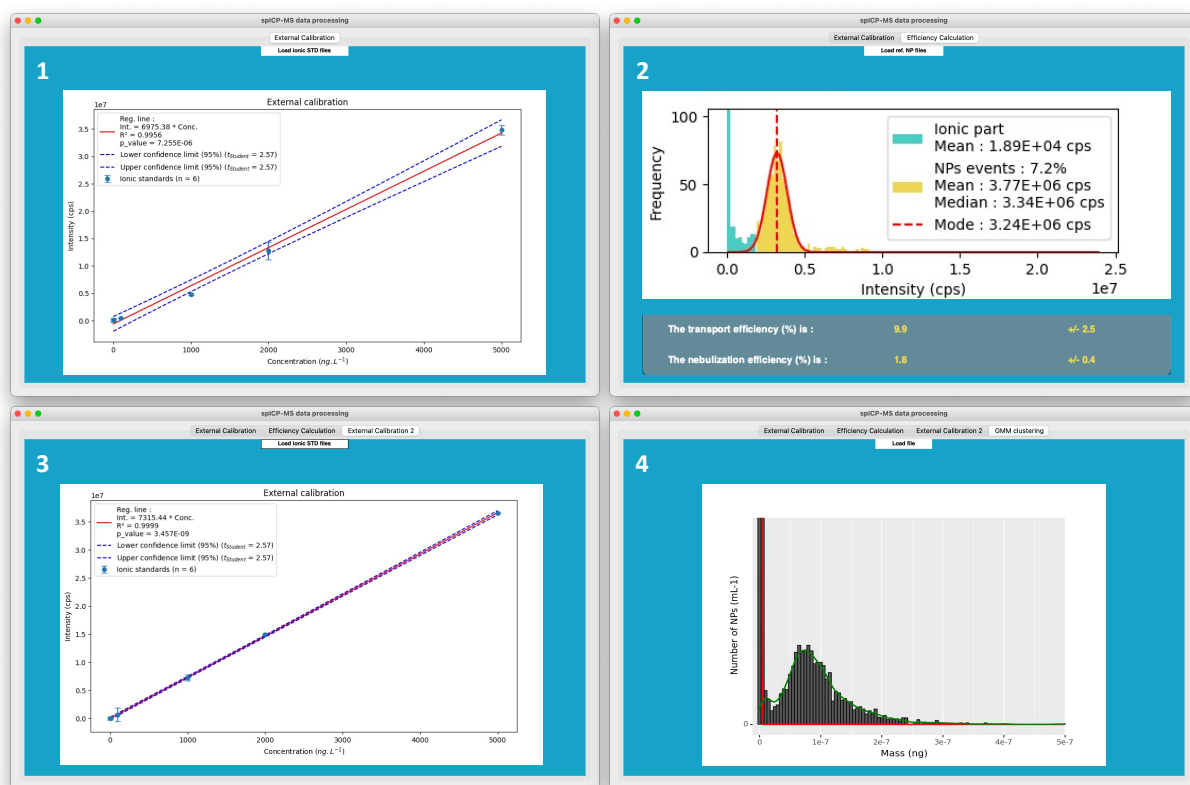
1. Résumé

Au cours de la dernière décennie, l'ICP-MS en mode particule unique (spICP-MS) est devenue une méthode fiable pour la détermination directe de la composition, de la taille et du nombre de nanoparticules (NPs) dans des solutions aqueuses à faibles concentrations. Cependant, aucune méthodologie standardisée n'est encore disponible pour la communauté scientifique pour le traitement des données. La détermination des efficacités de transport et de nébulisation, $\eta_{transport}$ et $\eta_{nebulisation}$, ne sont par exemple généralement pas dissociées et une seule valeur sans incertitude est fournie. Par ailleurs, plusieurs méthodologies sont disponibles pour la détermination des populations « ioniques » et « nanoparticulaires » mais aucune n'offre une entière satisfaction dans la diversité des scénarios rencontrés dans les études biogéochimiques. A titre d'exemple, l'application d'un seuil de coupure basée sur la variation du signal « ionique » n'est pas adaptée dans le cas de populations qui se chevauchent. L'utilisation de l'apprentissage machine et plus particulièrement le clustering par la méthode des k-moyennes montre également des limitations dans le cas où les populations « ioniques et « nanoparticulaires » ne sont pas clairement distinctes. La méthodologie à ce jour la plus avancée permet quant à elle de bien faire la distinction mais s'avère être encore en partie subjective. Du fait de l'utilisation de ces diverses méthodologies soit non-adaptées soit manquant d'objectivité dans les différentes études publiées, une comparaison fiable et robuste entre les études est souvent délicate.

Une méthodologie automatisée basée sur l'apprentissage machine et en accès libre pour un traitement robuste et précis des données spICP-MS est développée dans cette étude. En plus de l'élaboration d'une procédure fiable pour la détermination des efficacités, une approche innovante et objective permettant une dissociation directe et précise des populations « ioniques » et « nanoparticulaires » est proposée. Grâce à cette procédure automatisée, $\eta_{transport}$ et $\eta_{nebulisation}$ sont calculées avec précision en fonction de la sensibilité de l'élément ciblé pour l'efficacité et de la distribution des intensités d'une suspension de NPs de référence certifiée. Pour la première fois, les deux efficacités sont calculées individuellement et fournies avec leur incertitude associée calculée après propagation des incertitudes. Grâce aux modèles de mélange gaussien (GMM), des résultats justes et précis sont fournis dans de multiples cas. A l'aide de NPs synthétiques, il a été démontré que la forme et le chevauchement des distributions n'influencent pas la distinction des populations à séparer. Ensuite, en utilisant la méthodologie proposée, des données spICP-MS d'une campagne de prélèvement d'eaux de surface réalisée en 2016 sont utilisées. Une nouvelle fois, les populations « ioniques » et « nanoparticulaires » sont dissociées avec précision. De plus, en comparaison avec l'étude menée précédemment, leur concentration respective sont en parfait accord. Cette nouvelle méthodologie offre donc la possibilité de renforcer la robustesse du traitement des données spICP-MS, permettant par conséquent une comparaison inter-études plus fiable.

2. Abstract

The past decade has seen the single-particle (sp)ICP-MS technique becoming a reliable method for the direct determination of the composition, the size and the number of inorganic (*i.e.* metallic) nanoparticles (NPs) in aqueous solutions at low concentrations. However, no “gold-standard” methodology is yet available for the scientific community the processing of the data. The determination of the transport and nebulization efficiencies are for instance usually not dissociated and only a single value with no uncertainty is provided. In addition, several methodologies are available for the determination of ionic and NP populations but none offers entire satisfaction in the diversity of scenario encountered in biogeochemical studies. Therefore, a reliable comparison between studies is often limited. We hereby developed an open-access and machine learning-based methodology for robust, precise and accurate processing of spICP-MS data. In addition to the elaboration of a precise methodology for the determination of the efficiencies, we propose an innovative and objective approach allowing a direct and accurate dissociation of ionic and NP populations even when overlapping. Thanks to the Gaussian Mixture Models (GMM), we first provide accurate results whether or not distributions are gaussian and/or overlapping for synthetic NPs. Then, using the proposed methodology we processed the spICP-MS data of a natural water. We accurately dissociate ionic and NP populations with the GMM are precisely determined their concentration.



3. Introduction

Based on the sensitivity and the robustness of the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), the single-particle (sp)ICP-MS is becoming a reliable technique for the direct determination of the composition, the size and the number of inorganic (*i.e.* metallic) nanoparticles (NPs) in aqueous solutions at low concentrations ($< 10^6$ part mL⁻¹; *i.e.* environmental sample) with a minimum pre-treatment (*i.e.* dilution)^{1, 2}. Basically, the NP containing liquid sample is nebulized into the plasma creating an ion cloud for each individual NP. Once at the detector, this cloud creates a significant spike in the recorded signal. Each individual spike can then be related to a mass using a calibration step (*i.e.* response of the detector for different known masses of a particular element) and an efficiency calculation step (*i.e.* ratio of the number of ions and/or NPs that enter the plasma to the total number aspirated)³. In addition, knowing the morphology of the NPs, the calculated mass can be converted into a size. Then, at millisecond dwell-time, a particle mass (or size) distribution (PMD or PSD) can be deduced from the number of spikes (*i.e.* frequency), assuming constant efficiencies.

Therefore, the first two steps of the spICP-MS data processing are i/ the determination of the response of the ICP-MS for different masses/concentrations of the targeted element, namely the external calibration and ii/ the determination of losses of both ions and NPs during the travel from the solution to the detector, namely the transport and nebulization efficiencies. These $\eta_{transport}$ and $\eta_{nebulization}$ must be both taken into account since, as shown in a previous study, the last one covers only the material losses in the introduction system while the first one encompasses the $\eta_{nebulization}$ as well as the losses in the ICP-MS for NPs relative to ionic sample ($\alpha_{Transmission}$)⁴. Although, ICP-MS companies have made substantial contributions by incorporating an automated computation of the sensitivity and the efficiencies, prior to determine the PMD/PSD, “Results” modules displayed are often considered as “black boxes”. Indeed, users get very few information on the equations applied for the data treatment and consequently, mostly users tend to developed their own spICP-MS data processing with (Nanocountⁿ) or without (RIKILT^o)⁵ automation. Presently, while data treatment theory is available, it appears that there is a lack of harmonization/standardization in the way spICP-MS data is processed among research groups. Additionally, the large amount of data generated can imply a time-consuming treatment difficult to correctly handle in a spreadsheet format. A first major challenge is therefore to propose an automated, easy-to-use and reliable methodology to determine the efficiencies in spICP-MS as well as associated uncertainty always overlooked.

Before determining the PMD/PSD, the distribution of the NP signal needs to be dissociated from the distribution generated by the ionic element signal. Initially, in order to determine the limit between these distributions, Pace *et al.* (2011, 2012)^{3, 6} applied a threshold (or cut-off). This method is adapted mostly when the NP population is distinct of the ionic one. Indeed, in the case of an overlap between

ⁿ <https://blogg.slu.se/nanocount/>

^o <https://www.wur.nl/en/show/Single-Particle-Calculation-tool.htm>

ionic and NP populations, applying a straight cut-off usually leads to an underestimation of small NPs. Few years later, alternative data treatment were proposed. These methods undeniably offer benefits, but still present limitations when applied to natural samples where NP and ionic parts are overlapping. For instance, the “n x sigma” method described by Tuoriniemi *et al.* (2012)⁷ allows a direct definition of the cut-off using the sample itself. NP population is isolated from the ionic one based on the number of time outliers (*i.e.* NPs) appear in the dataset. The standard deviation of the resulting ionic signal (*i.e.* “sigma”) is then applied on the sample histogram. This method presents the advantage of using the ionic signal within the sample. However, the “n” must be defined by the user and the algorithm can randomly consider NP events as false negative (*i.e.* part of the ionic population) or signal instability as false positive (*i.e.* part of the NP population). It can thus lead to misrepresent the smallest NPs. In order to better discriminate smaller NPs, Cornelis and Hasselöv (2014)⁸ developed a signal deconvolution method that consists of different mathematical correction steps. First, Polya-Gaussian probability mass functions (PG-pmf) are fitted to signal distributions of blanks and ionic standards. Then, relationships between ionic concentration and pmf parameters (mean, standard deviation and shape) and amongst pmf parameters are established during a regression analysis. Secondly, a PG-pmf is fitted to the relative frequencies of the lowest-intensities of the signal distribution of NP containing samples. Then, the ionic signal component is subtracted from the total signal and deconvoluted from the resulting signal, effectively obtaining a signal distribution that emerged only from particulate signals and not from background ions. So far, this method is the most advanced as it allows the discrimination of relatively small NPs from the ionic part⁹. Nevertheless, an input from the user is still needed to define the limit between ionic and NP populations making this method still slightly subjective. In 2014, Bi *et al.* (2014)¹⁰ presented a first computer-based method (*i.e.* no human input) applied to spICPMS data, the k-means clustering. This machine learning approach uses an algorithm that allows a partitioning of the data in “k” clusters. The definition of each group is made using a minimized standard deviation into the cluster, and datapoints are then assigned to the closest centroid. As for the “n x sigma” method, it uses only the data of the sample itself to determine the threshold between ionic and NP populations but with the advantage of being unsupervised. This method was however shown limited once an overlapping between ionic and NPs parts occurs. Therefore, no “gold-standard” methodology is yet available for the scientific community dealing with spICP-MS data. Thus, in addition to the elaboration of a precise methodology to determine efficiencies, a major challenge is also to develop an innovative and objective approach allowing a direct and accurate dissociation of ionic and NP populations even when overlapping. Based on machine learning, a more advanced methodology than the k-means clustering, is the Gaussian Mixture Models (GMM)¹¹. These probabilistic models use the soft-clustering approach for distributing the datapoints in different clusters. The main difference between k-means and GMM methodologies is that the k-means clustering only provides strictly-defined clusters while the GMM proposes flexible clusters (*i.e.* overlapping clusters). Moreover, compared to the k-means clustering that assigns a datapoint to one of the clusters (hard-clustering), the GMM gives probabilities to datapoints,

so it expresses how likely a given datapoint belongs to a specific cluster. In analytical chemistry, mixture models are mostly used for peak deconvolution in mass spectrometry. Polanska et al. (2011)¹² and Polanski et al. (2015)¹³ for instance applied the GMM algorithm to protein matrix assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-ToF) spectra analysis. The conclusion of the first study stated that this algorithm was particularly useful when an overlap of peaks occurred. The second paper showed that applying the GMM to the mass spectra lowered the relative error on the estimation of peak positions compared to another algorithm of high efficiency (*i.e.* continuous wavelet transform). Both studies however mentioned few drawbacks linked to the number of components (*i.e.* peaks) and the width of the dataset (*i.e.* number of datapoint). The number of components should be previously set and not too large in order to increase the precision of the estimation. In combination, a dataset too important would increase the time of the computing. Nevertheless, our study focuses on the distinction between ionic and NP population limiting the number of components to two. Moreover, in spICP-MS at millisecond dwell-times, a typical acquisition time is *ca.* 2 minutes leading to a number of datapoints between 12000 and 120000 which is very low compared to MALDI-ToF.

Our aim here is to provide an accurate open-access methodology for the treatment of spICP-MS data and demonstrates the interest of using a machine learning algorithm such as the Gaussian Mixture Models, for the direct and reliable determination of synthetic NP distribution.

i/ This study first focuses on providing a procedure to directly and accurately calculate transport and nebulization efficiencies as followed:

- Calibration of the response of the element used for the efficiency calculation
- Determination of $\eta_{transport}$ and $\eta_{nebulization}$ using a certified reference material

ii/ Two additional steps are then added to determine the NP population as well as the ionic background concentration after spICP-MS acquisition of synthetic and natural samples:

- Calibration of the response of the targeted element
- Determination of the ionic concentration, number concentration and particle mass distribution.

4. Experimental section

4.1. Chemicals

Table 7: Reference diameter (nm) and mass (fg) with the associated relative uncertainty (initially given on the diameter by the manufacturer). The quality control (LGCQC5050) used for efficiency calculation is underlined

	<i>NP diameter (nm)</i>	<i>NP mass (fg)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Manufacturer</i>
<i>Au-NPs</i>	10.0	0.010	10	
	15.0	0.034	10	<i>BBI solutions (UK)</i>
	20.3	0.085	8	
	<u>32.7</u>	<u>0.354</u>	<u>6</u>	<u><i>LGC (UK)</i></u>
<i>Ag-NPs</i>	19.7	0.042	18	
	31.0	0.164	10	<i>NanoComposix (USA)</i>
	41.0	0.379	12	

Ultrapure water (resistivity $\approx 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) from a Millipore Integral 5 (Millipore, USA) was used throughout the work for dilutions. Mono-elemental standards (Au, Ag) at 1 mg mL^{-1} were obtained from SCP Science (Canada). Normapure nitric acid (VWR, USA) was purified into a sub-boiler DST 1000 (Savillex, USA). A quality control LGCQC5050 (underlined in Table 7) with a certified particle number concentration (*i.e.* $1.47 \times 10^{11} \pm 3.8 \times 10^{10} \text{ NP/g}$) was purchased from LGC (UK). All reference diameter as well as the associated uncertainty provided by the manufacturer are displayed in Table 7. To facilitate the reading and understanding of the manuscript, the NP suspensions are hereafter named by their rounded nominal size and type (*i.e.* 33 nm Au-NPs).

4.2. spICP-MS analysis

Table 8: Operating parameters of the HR-ICP-MS

<i>Parameter (unit)</i>	<i>HR-ICP-MS</i>
Spray chamber type	Quartz cyclonic
Nebulizer type	PFA MicroFlow
Plasma power (W)	1285
Cool Gas (L min^{-1})	16
Auxiliary Gas (L min^{-1})	1
Sample Gas (L min^{-1})	0.97 ± 0.01
Sample uptake ($\mu\text{L min}^{-1}$)	160 ± 2
Monitored isotope	^{197}Au and ^{107}Ag
Dwell-time (ms)	3

spICP-MS measurements were performed on a high-resolution (HR)-ICP-MS (Element II, ThermoScientific, Germany). Daily, the HR-ICP-MS was first tuned to ensure maximum sensitivity and stability while also maintaining low uranium oxide formation ($UO/U \leq 5\%$). Table 8 gives representative operating conditions and spICP-MS parameters.

A typical spICP-MS sequence consists in the measurement of i) “efficiency element” (*i.e.* here Au) in: blank, external calibration range and NP suspensions for efficiency calculation and; ii) the targeted element (*i.e.* here Au and Ag) in: blank, calibration range and NP suspensions for PMD determination. Note that a dwell-time equal to 3 ms was used in this study to avoid splitting of NP events (*i.e.* measurement of one NP event in two consecutive dwell-times). The total number of dwell-time was fixed at 20000.

5. Algorithms

In order to provide an easy-to-use/modify and open-access processing, the spICP-MS data treatment was mainly programmed in Python 3.8 using the raw data exported from the HR-ICP-MS sequence. However, the clustering methodology was programmed using R 4.1.0 as the package used to perform this task, *mclust*¹⁴, is more accurate and reliable than those available in Python. Still, as the R script is embedded in the Python one, no particular intervention from the user is needed.

5.1. Linear regression coefficient

Before calculating $\eta_{transport}$ and $\eta_{nebulization}$, a mandatory calibration allows to establish the relationship between intensities and concentrations. Many calibration approaches exist to determine a concentration in ICP-MS¹⁵. Mostly, analytical scientists perform an external calibration. Known concentrations of the element are plotted as a function of corresponding measured intensities. Then, the linear regression coefficient is calculated using the least squares method¹⁶. The sensitivity, expressed as the slope S (in cps ng⁻¹ L) of the calibration line, and its associated uncertainty can be determined using the following equations:

$$S = \frac{\sum \left(([X]_i - \overline{[X]}) * (I_i - \bar{I}) \right)}{\sum ([X]_i - \overline{[X]})^2} \quad (1)$$

$$\delta S = \sqrt{\frac{\sum (I_i - \bar{I})^2 - S^2 \sum ([X]_i - \overline{[X]})^2}{(n - 2) \sum ([X]_i - \overline{[X]})^2}} \quad (2)$$

Then the Y-intercept Y and its associated uncertainty can be determined by mean of:

$$Y = \bar{I} - S \cdot \overline{[X]} \quad (3)$$

$$Y = \sqrt{\left(\frac{\sum (I_i - \bar{I})^2 - S^2 \sum ([X]_i - \overline{[X]})^2}{(n - 2)} \right) \left(\frac{1}{n} + \frac{\overline{[X]}^2}{\sum ([X]_i - \overline{[X]})^2} \right)} \quad (4)$$

5.2. Transport and nebulization efficiencies

Additionally, the analysis of a certified reference material is needed for the determination of the efficiencies. As a recommendation, NPs with a produced signal sufficiently distinct from the background noise/signal should be analysed for an accurate determination of the $\eta_{transport}$. Moreover, this

solution should be perfectly characterized in terms of particle number concentration for an accurate determination of the $\eta_{nebulization}$. Here, the 33 nm AuNP suspension from LGC is selected (Table 7). Thereby as ionic and NP populations are showing no overlapping, at this step the methodology described by Bi et al. (2014)¹⁰ using the k-means clustering can be applied for the automatic partitioning of the events. Briefly, K initial means are randomly set. Note that K represents the number of clusters, here fixed to 2 as events are distributed either in the ionic or in the NP populations. Then, the algorithm iteratively assigns each datapoint to the cluster with the least squared Euclidean distance and recalculates the centroids after the assignment until they no longer vary. After convergence, the lower intensity and the higher intensity centroids correspond to the average ionic and NP signals, respectively. Then, using the relationship between the reference diameter and the mean signal produced by the NPs as well as the reference PNC and the number of NP events detected, the $\eta_{transport}$ and $\eta_{nebulization}$ are calculated as followed:

$$\eta_{Transport} = \frac{d_{NPs}^3 \cdot S \cdot f_a \cdot \pi \cdot \rho}{6 \cdot (I_{NPs} - I_{ionic}) \cdot t_d \cdot q_{liq}} \quad (5)$$

$$\eta_{Nebulization} = \frac{D_{NPs}}{N_{NPs} \cdot q_{liq} \cdot D \cdot t_d} \quad (6)$$

Then, $\eta_{transport}$ and $\eta_{nebulization}$ associated uncertainties are determined applying the same algebraic method as in Tharaud et al. (2015)¹⁷ for uncertainty propagation can be expressed as:

$$\frac{\delta \eta_{Transport}}{\eta_{Transport}} = \sqrt{\left(\frac{\sqrt{(\delta I_{NPs})^2 + (\delta I_{ionic})^2}}{(I_{NPs} - I_{ionic})} \right)^2 + \left(3 \frac{\delta d_{NPs}}{d_{NPs}} \right)^2 + \left(\frac{\delta S}{S} \right)^2 + \left(\frac{\delta t_d}{t_d} \right)^2 + \left(\frac{\delta q_{liq}}{q_{liq}} \right)^2 + \left(\frac{\delta \rho}{\rho} \right)^2 + \left(\frac{\delta f_a}{f_a} \right)^2} \quad (7)$$

$$\frac{\delta \eta_{Nebulization}}{\eta_{Nebulization}} = \sqrt{\left(\frac{\delta D_{NPs}}{D_{NPs}} \right)^2 + \left(\frac{\delta N_{NPs}}{N_{NPs}} \right)^2 + \left(\frac{\delta q_{liq}}{q_{liq}} \right)^2 + \left(\frac{\delta t_d}{t_d} \right)^2 + \left(\frac{\delta D}{D} \right)^2} \quad (8)$$

5.3. Particle mass distribution

The PSD/PMD in a sample is here determined using the histogram of the measured intensities, applying the gaussian mixture models. The GMM is a parametric probability density function $p(x_i)$ represented as a weighted sum of Gaussian component densities such as:

$$p(x_i) = \sum_{k=1}^K \phi_k \cdot \mathcal{N}(x_i | \mu_k, \sigma_k^2) \quad (9)$$

With the Gaussian of the k^{th} component following a normal law \mathcal{N} with μ_k and σ_k^2 respectively its mean and variance, such as:

$$\mathcal{N}(x_i | \mu_k, \sigma_k^2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \cdot \sigma_k^2}} \cdot \exp\left(-\frac{(x_i - \mu_k)^2}{2 \cdot \sigma_k^2}\right) \quad (10)$$

And with the sum of the weight of the components equal to 1 as:

$$\sum_{k=1}^K \phi_k = 1 \quad (11)$$

For a known number of components (*i.e.* K clusters), the parameters of the model are usually estimated from the dataset (*i.e.* D events/datapoints) using the iterative Expectation-Maximization (EM) algorithm. The EM algorithm starts with an initialization of the parameters of the density to be estimated. Then the parameters are iteratively modified until convergence. Each iteration consists of a step E (Expectation) that consists of calculating the expectation of the component assignments for each datapoint, followed by a step M (Maximization) which updates the model parameters after maximizing the expectations calculated in the previous step E. So, in summary, the main objective of the EM algorithm is to find the optimum parameters which maximizes the probability of the observed data given the model parameters. This probability, or the so-called log-likelihood, is calculated thanks to the following equation:

$$\ell(\vartheta|x) = \sum_{i=1}^D \log\left(\sum_{k=1}^K \phi_k \cdot \mathcal{N}(x_i | \mu_k, \sigma_k^2)\right) \quad (12)$$

With the ϑ gathering all the parameters such as:

$$\vartheta = \{\phi_1, \dots, \phi_k; \mu_1, \dots, \mu_k; \sigma_1^2, \dots, \sigma_k^2\} \quad (13)$$

Once the maximum log-likelihood is estimated, the fitted model with the estimated parameters can be used to perform the clustering. As mentioned, the partitioning of the data using a GMM is not like using the k-means methodology. Indeed, while the latter assigns a datapoint to a cluster, the GMM gives its probability to belong to a specific cluster which is more adapted in the case of overlapping clusters. To do so, it uses the Bayes' theorem coupled to the estimated model parameters, to *a posteriori* estimate the component assignment probability such as:

$$p(C_k | x_i) = \frac{p(C_k) \cdot p(x_i | C_k)}{p(x_i)} = \frac{\phi_k \cdot \mathcal{N}(x_i | \mu_k, \sigma_k^2)}{\sum_{l=1}^K \phi_l \cdot \mathcal{N}(x_i | \mu_l, \sigma_l^2)} \quad (14)$$

A key point in GMM is to determine how many components should be included in the mixture. Here, the idea is to separate two populations: the ionic vs the NPs. Therefore, k is set to 2 by default. Another central question is to decide which covariance parameterization to adopt. In one dimension, there are just two models: E for equal variance and V for varying variance. To compare, the k-means methodology is an equal variance methodology (*i.e.* all variables have the same variance) by default, leading to a very

good ability to separate distinct monodispersed populations quite distinct but a poor one for overlapping or polydisperse populations where variances can be different (*i.e.* natural samples). *mclust* presents the advantage of automatically determining which of these two models is the more adapted to the dataset by minimizing the Bayesian Information Criterion (BIC) ¹⁴:

$$BIC = -2 \ln(\ell(\vartheta|x)) + v \ln(D) \quad (15)$$

where v is the number of parameters estimated by the model (here 3 per distribution).

Finally, using the spICP-MS theory, PMD are calculated from the signal extracted thanks to the GMM. It was chosen to display distributions of mass per particle instead of size since the morphology of the NPs is usually unknown, especially in natural samples. Thus, the mass of the i^{th} bin can be calculated as:

$$m_{i-NPs} = \frac{(I_{i-NPs} - I_{ionic}) \cdot t_d \cdot q_{liq} \cdot \eta_{Transport}}{S} \quad (16)$$

Moreover, the following equation allows to calculate the mean mass:

$$\overline{m}_{NPs} = \frac{(\overline{I}_{NPs} - I_{ionic}) \cdot t_d \cdot q_{liq} \cdot \eta_{Transport}}{S} \quad (17)$$

Regarding the number concentration for each i^{th} bin, the calculation is expressed as:

$$N_{i-NPs} = \frac{f(I_{NPs})_i}{\eta_{Nebulization} \cdot q_{liq} \cdot D \cdot t_d} \quad (18)$$

The total particle number concentration can then be determined as:

$$N_{NPs} = \frac{D_{NPs}}{\eta_{Nebulization} \cdot q_{liq} \cdot D \cdot t_d} \quad (19)$$

5.4. Ionic concentration

Another information extracted from the GMM is the signal of the ionic population in the sample. Indeed, as mentioned for the k-means methodology the lower intensity cluster corresponds to events where the targeted element is under its dissolved form (*i.e.* free or complexed ion). Therefore, the average signal as well as its standard deviation can be used to calculate the dissolved concentration and its associated uncertainty using the coefficient of the 2nd external calibration as:

$$[X] = \frac{I_{ionic} - Y}{S} \quad (20)$$

$$\frac{\delta[X]}{[X]} = \sqrt{\left(\frac{(\delta I_{ionic})^2 + (\delta Y)^2}{I_{ionic} - Y}\right)^2 + \left(\frac{\delta S}{S}\right)^2} \quad (21)$$

6. Processing steps

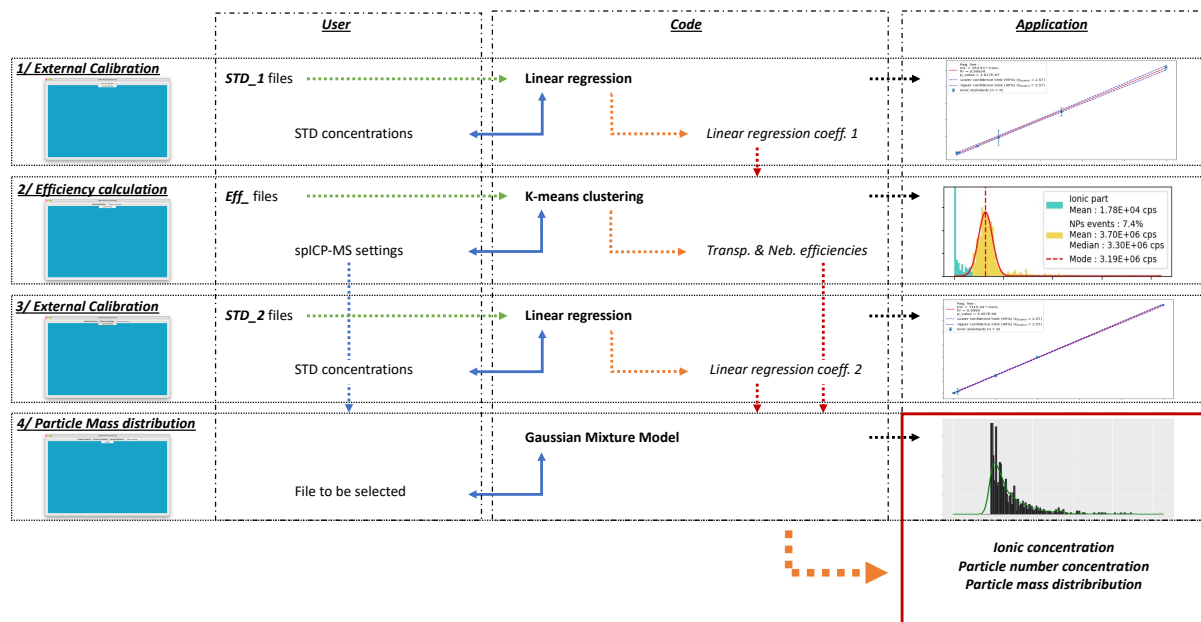


Figure 41: Processing steps for the treatment of spICP-MS data. Horizontal dashed arrows represent automatic processing in green as input (i.e. spICP-MS data), in orange as output (i.e. text files) and in black as displays in the application (i.e. graphs). Vertical dashed arrows represent automatic processing using data from a previous step either from user's input (blue) or directly from created text files (red). Blue double-direction arrows represent necessary input from the user. The red rectangle highlights the final output of the procedure

As mentioned above, the proposed methodology is a 4 steps procedure for the treatment of spICP-MS data (Figure 41). First, the relationship between concentration of the “efficiency element” and the signal produced by the ICP-MS is established thanks to a linear regression. It is then followed by the determination of $\eta_{transport}$ and $\eta_{nebulization}$ using the k-means clustering methodology. Next, linear regression coefficient is determined for the targeted element and finally complete information about the unknown sample such as the ionic concentration, particle number concentration (PNC) as well as particle mass distribution (PMD) are provided. In practice, this is a step-by-step procedure as the next step cannot be executed as long as the previous one is not completed. Each of the processing step is started by clicking on a button on the application window (i.e. *Load ionic STD files* and *Load ref. NP files*). The code automatically deduces the nature of the sample (green dashed arrows in Figure 41) from its name in the spICP-MS batch folder. Therefore, sample name must be specify using a particular set of prefixes referring to its nature. *STD_1* and *STD_2* are respectively employed for ionic standards used for the 1st and 2nd external calibrations (i.e. using above named “efficiency” and targeted element, respectively) while *Eff_* refers to the NP suspensions used for the efficiency calculation. The format required for these files is a text (txt) file format with 2 columns: *Time* and *Intensity*. The number of samples with the same prefix is unlimited but a particular attention must be taken to avoid identical file names. A sample whose file name does not start with one of the above prefixes is considered as an unknown sample and is used only if the user selects it to determine its PMD. Once initiated, the

processing requires some inputs from the user (blue double-direction arrows in Figure 41) such as concentration of the external calibration standards (*i.e. Concentrations entry*) and spICP-MS settings (*i.e. NP reference diameter, concentration, dwell-time, flow-rate...*) for NP suspensions. For these latter, the associated uncertainty is requested but can be set to 0 as for the dwell-time for instance. In this study, the flow-rate is determined by converting the difference of the weight of a solution before and after injection in the ICP-MS for 10 minutes. This is repeated at least 3 times, then the average and standard deviation are used as settings in the pop-up window. Once executed, the code first automatically displays the corresponding graphs as well as important calculated numbers such as linear coefficient and efficiencies on the application (black dashed arrows in Figure 41). These numbers are either displayed directly on the graphs or in a table with their associated uncertainties. It also saves this same information in text files (orange dashed arrows in Figure 41) that are used afterwards (red dashed arrows in Figure 41) for other calculation steps. Finally, as much information as possible are displayed (red rectangle in Figure 41) starting with the dissolved concentration which is the concentration of the element in the dissolved part. This concentration as well as its associated uncertainty are calculated using the average signal and standard deviation of the cluster with the lower mean (Equation 20 and 21). Simultaneously, individual intensities in the cluster with the higher mean are converted into masses. To do so, it uses spICP-MS settings (*i.e. dwell-time and flow-rate*) previously entered by the user (blue dashed arrow in Figure 41). The particle mass distribution and the total particle number concentration are then determined using Equation 17 and 19.

7. Results & discussion

7.1. External calibration

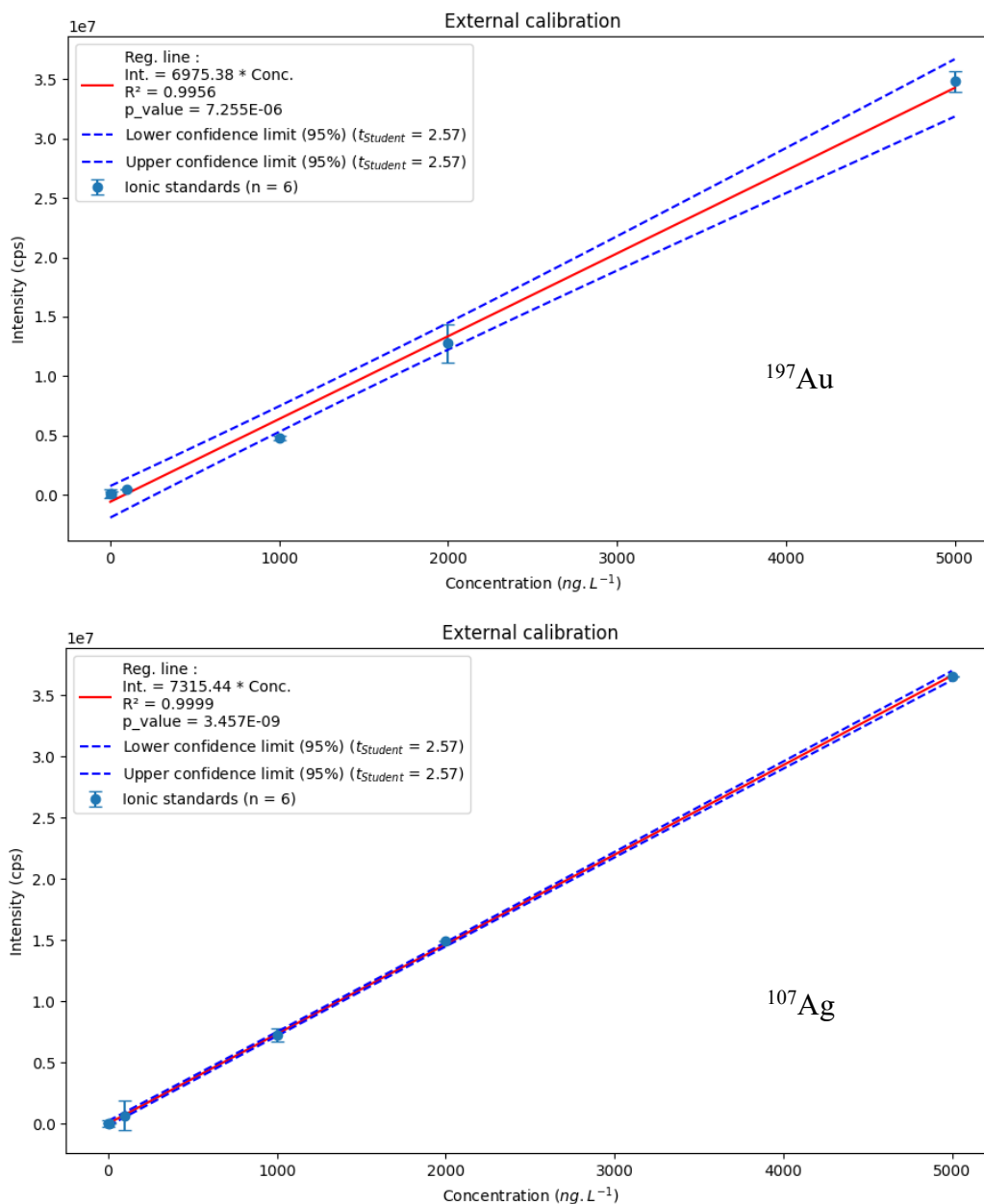


Figure 42: Displays of the external calibration of ^{197}Au , ^{107}Ag saved from the application

The processing of the spICP-MS data starts with the determination of the regression line for the external calibration. Figure 42 displays it as well as the corresponding slope (*i.e.* the sensitivity) which is also stored for following steps. Furthermore, the coefficient of determination, R^2 , as well as the p -value are presented in order to attest the linearity of the external calibration. Typically, it is well established that a $R^2 > 0.99$ and a p -value < 0.05 indicate that the linearity is proven. However, as recommended by Mermet (2010)¹⁶, limits at 95% confidence are also displayed (dashed blue lines).

These limits are calculated using a Student's t -test where $t_{Student}$ is calculated using a pre-set confidence interval (here 95%) with $n-1$ degree of freedom, n corresponding to the number of ionic standards. The external calibrations all show good correlation as R^2 are higher than 0.99 and p -values are lower than 0.05 (Figure 42).

7.2. Calculation of transport and nebulization efficiencies

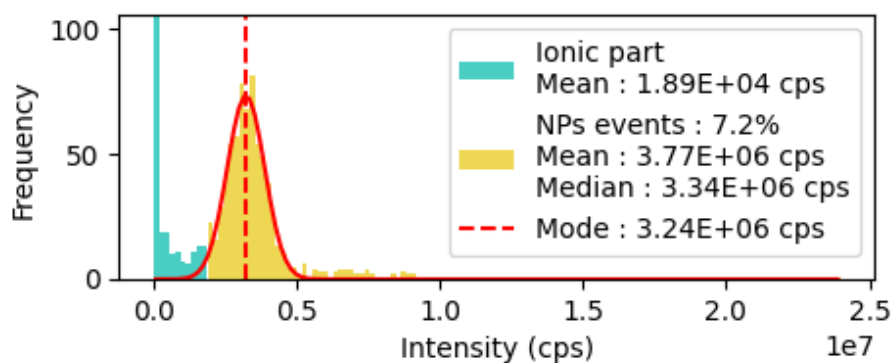


Figure 43: Efficiency calculation, step 1. Display of the histogram of 30 nm Au-NPs after clustering with the k-means algorithm.

Once the sensitivity for gold is determined, the next compulsory step is to determine transport and nebulization efficiencies. To do so, a certified reference Au-NP suspension is usually analysed and here the 33 nm Au-NP suspension from LGC is selected. First, the NP population must be isolated in order to determine I_{NPs} and D_{NPs} , the NP average intensity and event number, needed in Equation 5 and 6. The k-means methodology is the default approach used here to separate ionic and NP population. Figure 43 displays the intensity histograms after the clustering. It clearly appears that this methodology is adapted for distinct population. However, the limit between ionic (in blue) and NP (in yellow) populations is slightly shifted to the right. As previously mentioned, the k-means algorithm is a similar variance approach meaning that the clustering is influenced by the outliers occurring at higher intensities (*i.e.* $> 0.5 \times 10^7$ cps). A gaussian fit (red curve) is added to the NP population known as monodisperse in order to more accurately estimate the centroid. The so-called mode of the distribution is then used in Equation 5 as I_{NPs} . Such a gaussian fit can be useful as the centre of the distribution slightly differ from its mean or median that are also influenced by outliers. The experimental alternative is to analyse a more diluted suspension of the NPs until no outliers are appearing.

Please enter the settings with the associated uncertainty, then hit 'Calculate' to obtain the efficiencies.

Setting name :	Value :	Uncertainty :
Ext. Calib. slope (cps L ng ⁻¹):	6975.38	231.73
Blank average intensity (cps):	1.88E+04	7.63E+02
NPs average intensity (cps):	3.21E+06	2.03E+04
NP reference diameter (nm):	32.7	2.0
NP concentration (part mL ⁻¹):	500000	100000
Mass fraction (%):	100	0
Density (kg m ⁻³):	19300	1930
Dwell-time (ms):	3	0
Flow-rate (mL min ⁻¹):	0.156	0.02

Calculate

The transport efficiency (%) is : **9.9** +/- 2.5

The nebulization efficiency (%) is : **1.8** +/- 0.4

Figure 44: Efficiency calculation, step 2. Screen-shot of the pop-up window to enter spICP-MS settings. The red rectangle highlights $\eta_{transport}$ and $\eta_{nebulization}$ calculated using information above

Next, the intervention from the user is requested to enter information about NPs used and spICP-MS settings (Figure 44). Then, by hitting *Calculate*, it initiates the calculation of $\eta_{transport}$ and $\eta_{nebulization}$ which are displayed in yellow along with their associated uncertainty (highlighted by the red rectangle). For the first time, associated uncertainty after uncertainty propagation is given. It can be noted that these uncertainties are quite high. However, it covers the range of the already published $\eta_{transport}$ using such a HR-ICP-MS^{2, 18}. The $\eta_{nebulization}$ is here also calculated. It is significantly different than the $\eta_{transport}$. This confirms the statement of a previous study mentioning that must be determined independently⁴. This is mainly because the transmissions within the ICP-MS of ions from the ionic and from NP fractions differ.

7.3. GMM clustering on suspensions with synthetic NPs

The aim of spICP-MS analysis is commonly the determination of the mass (or size) distribution of NPs in an aqueous sample. After the determination of the efficiencies, the “unknown” solution is analysed in single-particle mode. It is then necessary to distinguish NP events from ionic events. Figure 45 displays the results of the clustering using our new methodology applied to spICP-MS data of Au- and Ag-NP of different sizes dispersed in ultrapure water. In all cases, the so-called ionic background is coming either from the solution or from the ICP-MS (*i.e.* memory effect or electronic noise) as no ionic Au or Ag has been added. As expected, in relatively simple cases such as for 15 – 20 nm Au-NPs (Figure 45 c and e) and 31 – 41 nm Ag-NPs (Figure 45 d and f) the GMM approach is adapted. Average sizes assuming a spherical shape are recalculated based on the obtained mass distributions ($\rho_{Au} = 19300$ and $\rho_{Ag} = 10490 \text{ kg m}^{-3}$) and the PSDs are displayed in Appendix. Diameters of 17 ± 3 nm, 21 ± 4 nm, 25 ± 6 nm and 37 ± 8 nm are found for NP population in Appendix 1 c, e, d and f, respectively. These results are in good agreement with reference diameters displayed in Table 7. It is still worth to note that the clustering is not influenced by the second Au-NP population at the right of the main one (*i.e.* 15 nm Au-NPs in Figure 45). This population is likely coming from the measurement of two NPs in one dwell-time (*i.e.* NP coincidence) since its average mass is twice the mass of the main population. In practice, the analysis should be repeated with a proper dilution to get rid of the coincidences. However, this can be used as a potential scenario in natural (or synthetic) samples. At last, two cases where an overlap occurs are displayed in Figure 45 a and b. The GMM shows a very good ability to partition the two populations in the case of the 10 nm Au-NPs leading to an average size of 10 ± 2 nm (Appendix 1 a). For the 20 nm Ag-NPs, the average size 14 ± 4 nm (Appendix 1 b) is slightly lower than the reference one, but still within the reference standard deviation (Table 7). Using the k-means methodology (blue line in Figure 45) on these data the resulting NP distribution is influenced either by its shape or by the presence of the second population. In the last scenario (Figure 45 c and e), the ion – NP threshold is indeed slightly shifted towards the higher masses. The right-skewed distribution of the Ag-NPs (Figure 45 d and f) even more negatively influences the k-means clustering even though ionic and NP populations are distinct. In the case of an overlap (Figure 45 a and b), the k-means is clearly limited as an important part of the distribution (*i.e.* the smallest masses) is missed. The GMM more accurately determine the ionic and NP distributions than the k-means. Even though non-gaussian distributions are observed, the differentiation between the two populations is correctly done by the GMM.

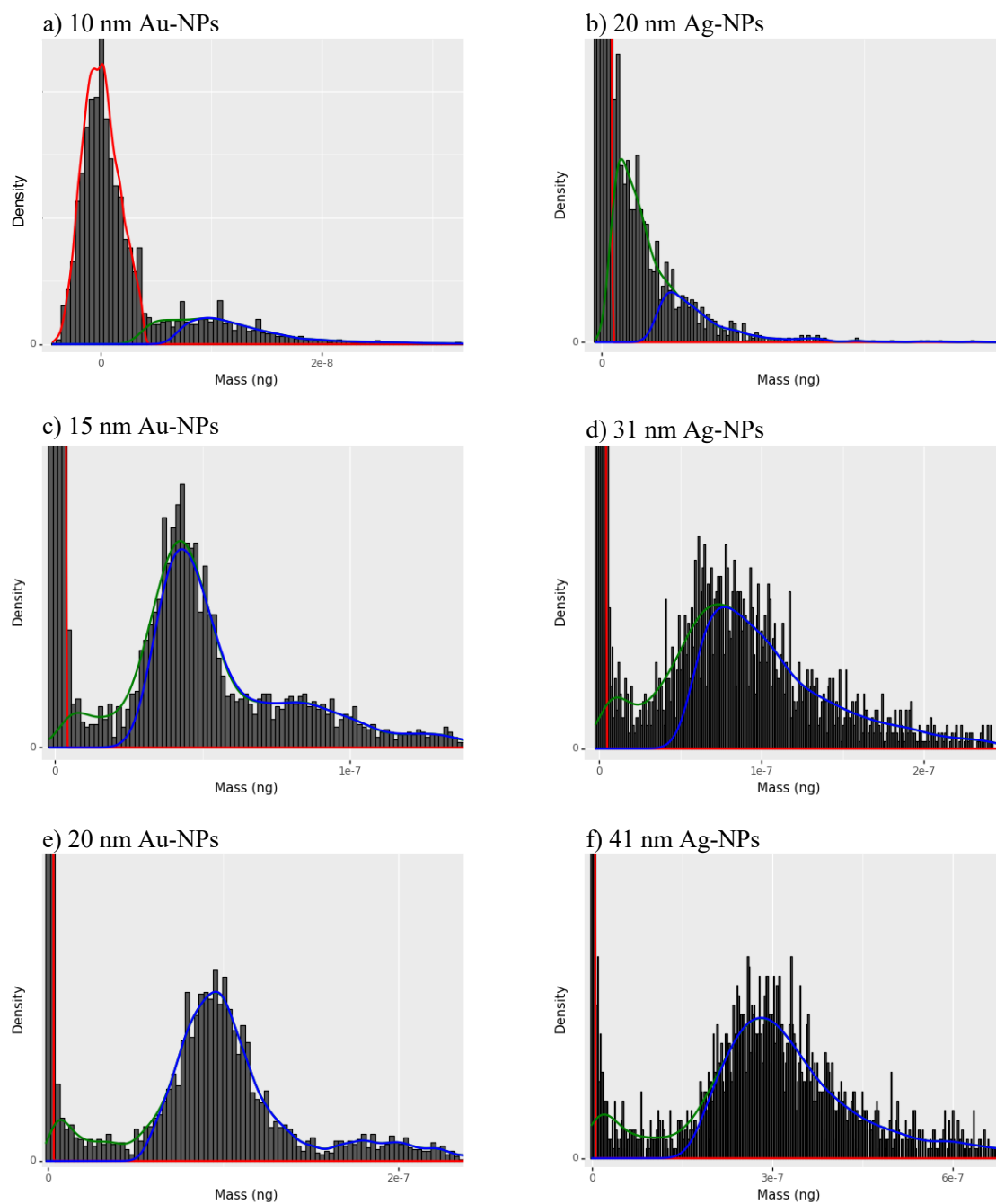


Figure 45: Particle mass distributions of Au- and Ag-NPs. The histogram represents the distribution of masses calculated based on spICP-MS data and equation (16). Red green and blue lines respectively represent the density function of the ionic, the GMM-based NP and k-means-based NP clusters

7.4. GMM clustering on NP-containing natural samples

The application of a model-based clustering thus appears to be efficient in cases where NP distributions are known. In natural samples, its *a priori* knowledge is unlikely. Nevertheless, as demonstrated in lab^{19,20} or field^{1,2,18,21,22} studies, isolating the ionic fraction from the NPs is possible thanks to ultrafiltration. The pore size of such membrane is indeed small enough (*i.e.* ≤ 10 kDa) to prevent the passage of NPs. In the following section, spICP-MS results from a sample of a field work are used. Briefly, Wang *et al.* (2020)¹ collected surface waters from small creeks within the Seine River watershed (Paris, France). These creeks are characterized by different land-uses (*i.e.* forested, agricultural and urban) and the aim was to determine whether the fate and flow of Ag-NPs is linked to these land-uses. From the analytical point of view, once sampled, a fraction of each water was ultrafiltered for the analysis of the so-called “realistic dissolved background of the natural water”. The resulting spICP-MS intensity-based histogram was then subtracted to the raw sample intensity-based histogram to obtain the NP intensity distribution. Although this methodology appeared to be very promising, its application to the analysis of a high number of samples can be time-consuming. We apply here the GMM to the spICP-MS data corresponding to the urban creek sampled on 2016-11-30. The measurements were initially done in triplicates. Figure 46 displays their intensity-based histograms as well as the density function of the sample after ultrafiltration (in yellow). Note that the difference in shape for the yellow track is only due to a difference in binwidth. This has no effect on the clustering since this later is directly applied on the unsorted dataset. The density function determined after the clustering thanks to the GMM is also provided (in red). Although slightly different, it appears that the shapes of all ionic distributions are in good agreement. This is confirmed by the calculation of the total ionic concentration (Figure 46 d) that are slightly higher after GMM but still in the same range as the ultrafiltrate (UF). Along with the ionic concentration, the other important information to be determined by spICP-MS is the total particle number concentration (PNC). For this sample, Wang *et al.* (2020)¹ measured a PNC equal to $1.99 \pm 0.98 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. The average PNC calculated after GMM on the triplicates (Figure 46 a, b and c) is $1.73 \pm 0.10 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. The GMM-based total PNC is slightly lower than the one calculated after subtraction of the histogram. It is however in agreement with the difference observed on the ionic concentrations. Indeed, since the number of events is finite, the more are grouped in the ionic population, the higher is its concentration and the lower is the PNC and contrariwise. The GMM offers thus a faster and as accurate determination of the ionic population/concentration than the subtraction of the histogram.

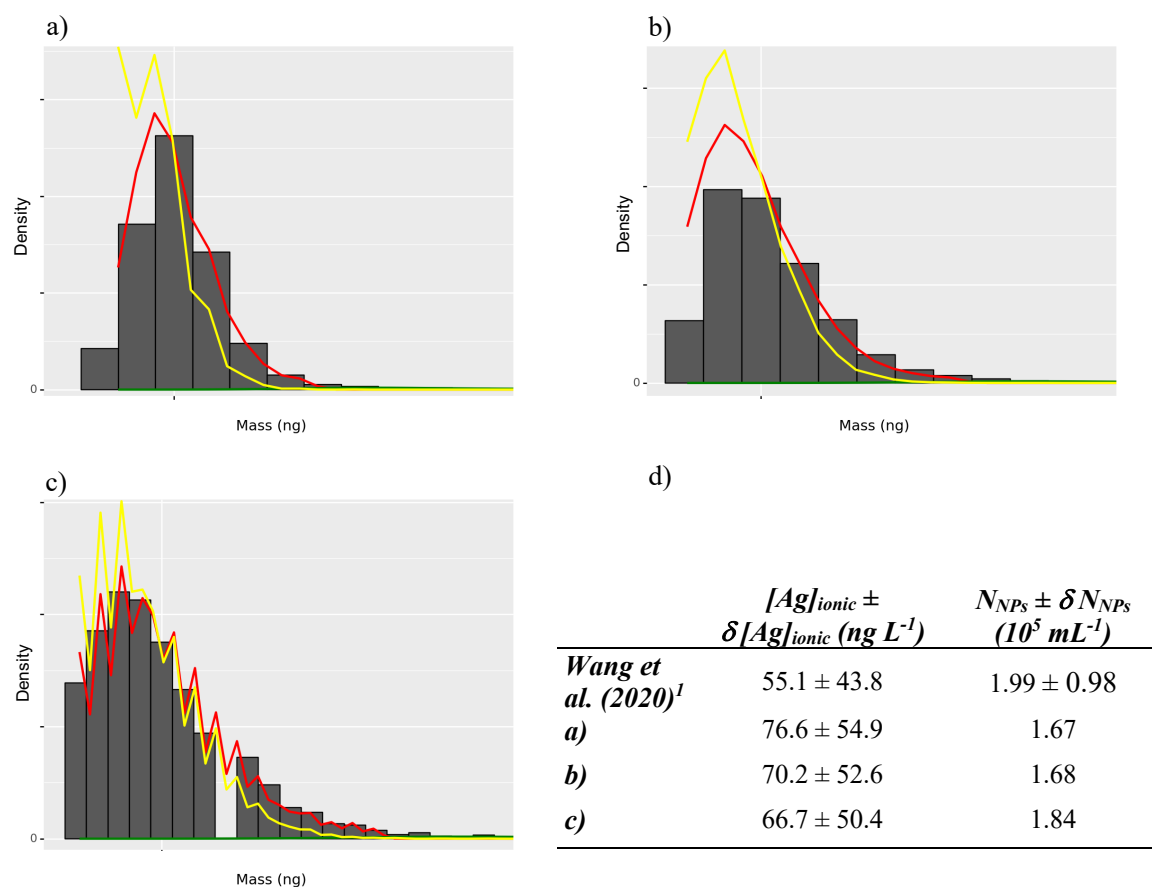


Figure 46: Intensity distributions of the ionic Ag population in the natural water sample. The histogram represents the distribution of spICP-MS data. Yellow and red lines represent the density function of the ultrafiltered surface water and the GMM-determined ionic populations, respectively. The table summarizes the ionic concentration and their associated uncertainty (in ng L^{-1}) calculated thanks to equation (20) and (21). The resulting particle number concentration (in mL^{-1}) is also determined using equation (19). Note that the associated uncertainty provided by Wang et al. (2020)¹ is calculated after three independent measurements

8. Conclusion

To date, several methodologies are available to treat the data after spICP-MS measurements. In order to allow a thorough comparison between studies/results, the development of a “gold-standard” methodology for spICP-MS data processing is essential. We here propose a robust, precise and accurate procedure. Thanks to this automatized procedure, $\eta_{transport}$ and $\eta_{nebulization}$ are accurately calculated based on the “efficiency” element sensitivity and the intensity distribution of a certified reference NP suspension. For the first time, they are also displayed with their associated uncertainties calculated after uncertainty propagation. In addition, the clustering thanks to the GMM appears to be performant in multiple cases. Indeed, coupled to the described procedure for the calculation of the efficiencies, the GMM gives accurate results whether or not distributions are gaussian and/or overlapping for synthetic NPs. Furthermore, when processing spICP-MS data of a natural water sample from one of our previous studies, the concentration of its ionic and NP populations in very good agreement with the previously determined concentrations. Compared to this later, the GMM allows to directly deconvolute the two distributions without any additional laboratory step. Avoiding the ultrafiltration is indeed time- and labour-saving in the case of an important number of samples. In future works, the UF step could still be (at least randomly) included to ensure that the GMM performs the clustering accurately for all possible scenario encountered in biogeochemical studies. It may also turn out that such a UF step could be interesting to strengthen the determination of the ionic distribution. By analogy with the deconvolution methodology mentioned in the introduction, prior to the clustering, some parameters (*i.e.* mean and variance) of the ionic distribution could be first determined using the spICP-MS data of the UF sample. Then, these parameters could be added to the procedure as an input for the clustering at the expectation-maximization step. Here, the edge of the distribution is based on its density function. An improvement is still possible by means of the probability provided by the GMM.

9. Glossary

Variable signification is explained below. Note that δ_j is the associated uncertainty of the j variable, with j one of the following variables.

S , the slope of the external calibration (in cps ng L⁻¹)

$[X_i]$, the concentration of the i^{th} standard (in ng L⁻¹)

$[X]$, the average concentration of the standards (in ng L⁻¹)

I_i , the intensity of the i^{th} standard (in cps)

I , the average concentration of the standards (in cps)

Y , the y-intercept of the external calibration (in cps)

n , the number of standards

$\eta_{\text{Transport}}$, the transport efficiency (in %)

$\eta_{\text{Nebulization}}$, the nebulization efficiency (in %)

d_{NPs} , the reference diameter of the NPs (in nm)

f_a , the mass fraction of the targeted element in the NPs (in %)

ρ , the density of the targeted element in the NPs (in kg m⁻³)

I_{NPs} , the average intensity of the NP population (in cps)

I_{ionic} , the average intensity of the ionic population (in cps)

t_d , the dwell-time (in ms)

q_{liq} , flow-rate (in mL min⁻¹)

N_{NPs} , the NP number concentration (in mL⁻¹)

D_{NPs} , the number of NP events

D , the total number of events/datapoints

$m_{i\text{-NPs}}$, the mass of the i^{th} NP (in fg)

m_{NPs} , the average mass of the NPs (in fg)

$I_{i\text{-NPs}}$, the intensity of the i^{th} NP (in cps)

I_{NPs} , the average intensity of the NPs (in cps)

$p(x_i)$, the probability density function of x (x represents all the intensities x_i of the sample)

K , the number of component (*i.e.* cluster)

ϕ_k , weight of each component

$\mathcal{N}(x_i | \mu_k, \sigma_k^2)$, the normal law with μ_k and σ_k^2 , the average (in cps) and the variance of the k^{th} distribution (in cps²), respectively

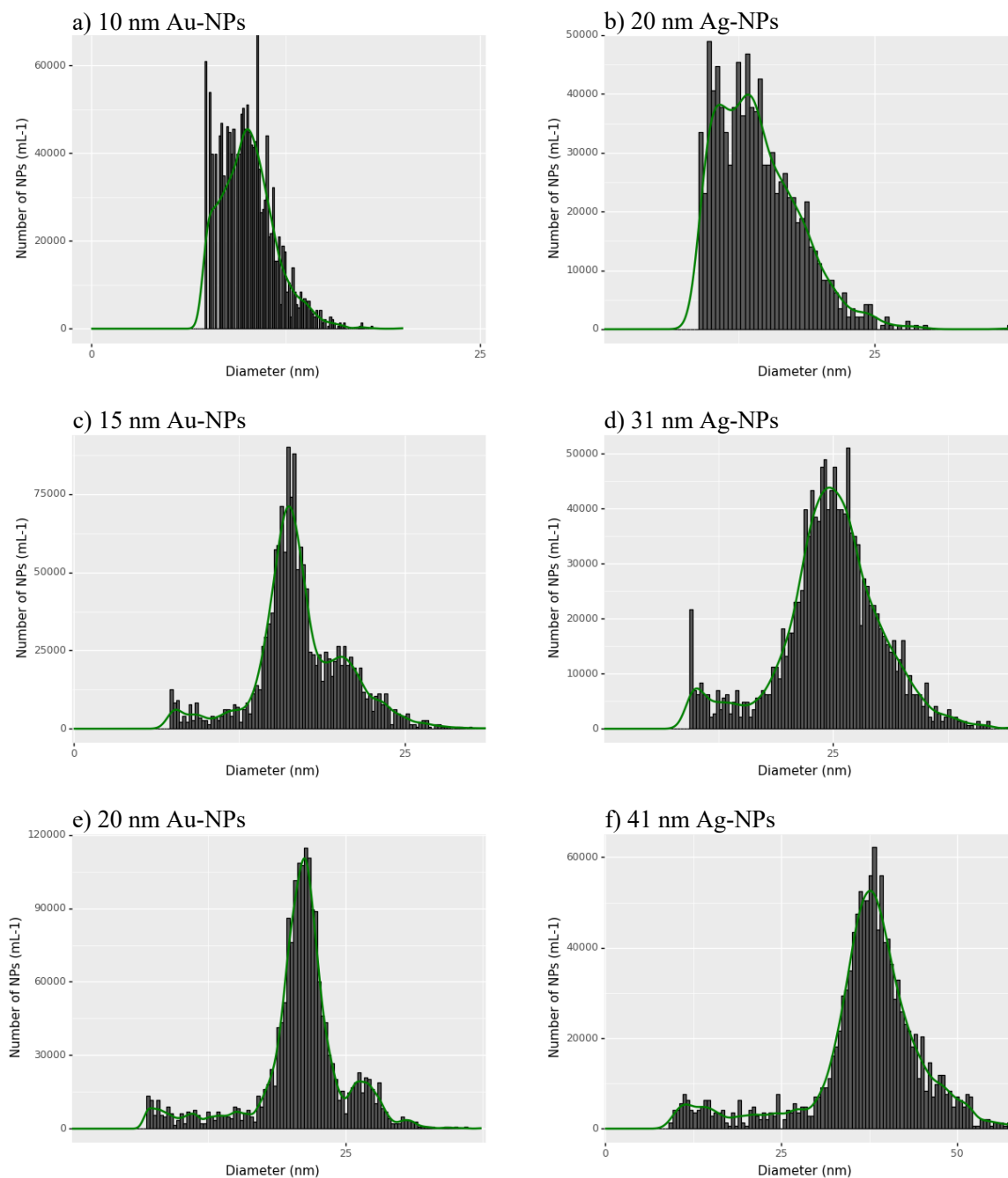
$\ell(\vartheta|x)$, the log-likelihood

C_k , the component assignment

BIC , the Bayesian Information Criterion

v , the number of parameters estimated by the model

10. Appendix



Appendix 1: Particle size distributions of Au- and Ag-NPs. The histogram represents the distribution of sizes calculated based on spICP-MS data assuming a spherical shape of the NPs. The green line represents the density function of the GMM-based NP clusters

11. Reference

1. J.-L. Wang, E. Alasonati, M. Tharaud, A. Gelabert, P. Fiscaro and M. F. Benedetti, *Water Research*, 2020, **176**, 115722.
2. K. Phalyvong, Y. Sivry, H. Pauwels, A. Gélabert, M. Tharaud, G. Wille, X. Bourrat and M. F. Benedetti, *Frontiers in Environmental Science*, 2020, **8**.
3. H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Analytical chemistry*, 2011, **83**, 9361-9369.
4. M. Tharaud, P. Louvat and M. F. Benedetti, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, **413**, 923-933.
5. R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. van der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester and S. Weigel, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2015, **30**, 1274-1285.
6. H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, E. P. Gray, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Environmental science & technology*, 2012, **46**, 12272-12280.
7. J. Tuoriniemi, G. Cornelis and M. Hassellöv, *Analytical chemistry*, 2012, **84**, 3965-3972.
8. G. Cornelis and M. Hassellöv, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, **29**, 134-144.
9. M. Tharaud, A. P. Gondikas, M. F. Benedetti, F. von der Kammer, T. Hofmann and G. Cornelis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2017, **32**, 1400-1411.
10. X. Bi, S. Lee, J. F. Ranville, P. Sattigeri, A. Spanias, P. Herckes and P. Westerhoff, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, **29**, 1630-1639.
11. J.-P. Baudry, A. E. Raftery, G. Celeux, K. Lo and R. Gottardo, *Journal of computational and graphical statistics*, 2010, **19**, 332-353.
12. J. Polanska, M. Plechawska, M. Pietrowska and L. Marczak, *Expert Systems*, 2012, **29**, 216-231.
13. A. Polanski, M. Marczyk, M. Pietrowska, P. Widlak and J. Polanska, *PloS one*, 2015, **10**, e0134256.
14. L. Scrucca, M. Fop, T. B. Murphy and A. E. Raftery, *The R journal*, 2016, **8**, 289.
15. H. E. Taylor and H. M. TAYLOR, *Inductively coupled plasma-mass spectrometry: practices and techniques*, Academic press, 2001.
16. J.-M. Mermet, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2010, **65**, 509-523.
17. M. Tharaud, S. Gardoll, O. Khelifi, M. Benedetti and Y. Sivry, *Microchemical Journal*, 2015, **121**, 32-40.
18. J.-L. Wang, E. Alasonati, P. Fiscaro and M. F. Benedetti, *Journal of Hazardous Materials*, 2022, **422**, 126695.
19. I. Abad-Alvaro, E. Bolea, F. Laborda and J. R. Castillo, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2017, **32**, 1101-1108.

20. V. Merdzan, R. F. Domingos, C. E. Monteiro, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Science of The Total Environment*, 2014, **488-489**, 316-324.
21. K. Phalyvong, Y. Sivry, H. Pauwels, A. Gélabert, M. Tharaud, G. Wille, X. Bourrat, J. F. Ranville and M. F. Benedetti, *Frontiers in Environmental Science*, 2021.
22. A. A. Markus, P. Krystek, P. C. Tromp, J. R. Parsons, E. W. M. Roex, P. d. Voogt and R. W. P. M. Laane, *Science of The Total Environment*, 2018, **631-632**, 485-495.

■ CHAPITRE IV

Nanoparticle identification using single particle ICP-ToF-MS acquisition coupled to cluster analysis. From model to natural NPs

Mickaël Tharaud[§], Lukas Schlatt[‡], Phil Shaw[‡], Marc F. Benedetti[§]

[§]Université de Paris, Institut de physique du globe de Paris, CNRS, F-75005 Paris, France

[‡]Nu Instruments, 74 Clywedog Road South, Wrexham, UK

Table des matières

1.	RESUME.....	- 139 -
2.	ABSTRACT.....	- 140 -
3.	INTRODUCTION.....	- 141 -
4.	MATERIAL & METHODS.....	- 144 -
4.1.	<i>Chemicals</i>	- 144 -
4.2.	<i>Sample preparation</i>	- 145 -
4.3.	<i>Scanning transmission electron microscopy</i>	- 145 -
4.4.	<i>Single particle ICP-ToF-MS</i>	- 145 -
4.5.	<i>Processing and post-processing procedures</i>	- 146 -
4.5.1.	<i>spICP-MS raw data processing</i>	- 146 -
4.5.2.	<i>Hierarchical agglomerative clustering</i>	- 147 -
5.	RESULTS & DISCUSSION.....	- 149 -
5.1.	<i>External calibration and size detection limits of the spICP-ToF-MS</i>	- 149 -
5.2.	<i>Gold and/or silver NPs</i>	- 151 -
5.3.	<i>Nickel/Zinc Cobalt Iron oxide NPs</i>	- 154 -
5.4.	<i>Mixture of model NPs</i>	- 157 -
5.5.	<i>Analogue of natural NPs</i>	- 160 -
6.	CONCLUSION.....	- 167 -
7.	APPENDIX.....	- 168 -
8.	REFERENCES.....	- 170 -

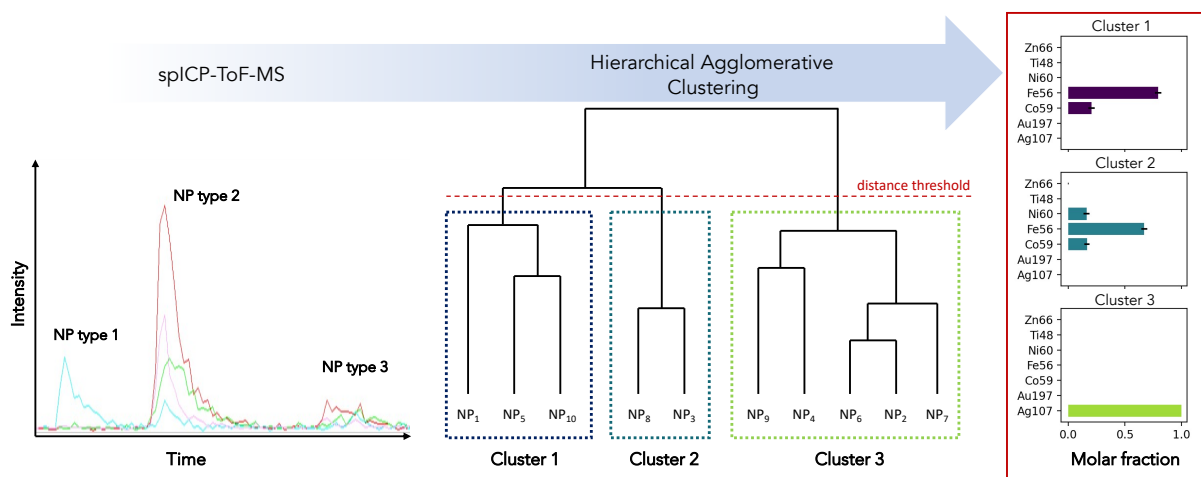
1. Résumé

Une meilleure compréhension de l'impact anthropique provenant du rejet de nanoparticules (NPs) dans l'environnement est liée à une meilleure identification de l'origine des NPs. Cette dernière peut notamment être identifiée à l'aide de la composition (multi-)élémentaire de ces NPs. Néanmoins, cette tâche peut s'avérer ardue du fait des compositions potentiellement proches entre les NPs anthropiques et naturelles. Habituellement, le signal ICP-MS en mode particule unique (spICP-MS) est utilisée pour la détermination de la distribution granulométrique des NPs ainsi que de leur composition. Sur la plupart des ICP-MS, uniquement le signal d'un isotope peut être enregistré. Ce signal mono-isotopique est acquis en continu à des temps d'intégration compris entre 10 μ s et 10 ms. Cette technique s'est notamment révélée utile pour étudier le devenir et le comportement de NPs en milieu naturel. Cependant le manque d'information limite l'interprétation des données signifiant que la technique se doit d'être être améliorée. En utilisant un ICP-MS à temps de vol (ICP-ToF-MS) l'enregistrement en simultanée de multiples isotopes/éléments est possible. En mode particule unique (spICP-ToF-MS), il offre la possibilité de déterminer les compositions (multi-)élémentaires des NPs individuellement. Ainsi, par rapport aux méthodes spICP-MS mono-élémentaires conventionnelles, la spICP-ToF-MS donne des informations plus complètes et détaillées sur la population de NPs dans l'échantillon. Son potentiel d'identification des NPs naturelles vs anthropiques est donc à exploiter pour mieux comprendre l'origine et/ou les transformations de celles-ci dans les systèmes naturels.

Dans cette étude, l'acquisition spICP-ToF-MS est couplé à une méthodologie d'apprentissage permettant de regrouper automatiquement les NPs en fonction de leur composition (multi-)élémentaires. Afin de valider cette approche, le signal de nanoparticules synthétiques de compositions connues est dans un 1^{er} temps enregistré à l'aide d'un ICP-ToF-MS. Les compositions (multi-)élémentaire ainsi que les tailles obtenues s'avèrent être en parfait accord avec les valeurs théoriques. Par la suite, un mélange de ces NPs synthétiques est caractérisé et une approche de post-traitement automatisé basée sur l'utilisation de clustering agglomératif hiérarchique (HAC) est appliquée. Cette méthodologie innovante permet de faire ressortir chacune des populations introduites dans le mélange avec des compositions et des tailles en accord avec l'analyse précédente. Des analogues de NPs naturelles (un oxyde d'aluminium, une kaolinite et une montmorillonite) sont ensuite individuellement analysés. Cela permet notamment de mettre en évidence une hétérogénéité dans les compositions (multi-)élémentaires au sein même de ces NPs naturelles. L'utilisation du HAC en complément de la spICP-ToF-MS a finalement permis une identification robuste et précise des différents types de NPs présentes dans un mélange de ces analogues. L'utilisation de la méthode spICP-ToF-MS développée ici suivie d'une analyse HAC pourrait être un point de départ pour faciliter l'interprétation et la compréhension de l'origine, du devenir et du comportement des populations de NPs dans les écosystèmes aquatiques.

2. Abstract

Single-particle ICP-MS (spICP-MS), where a single isotope signal is acquired continuously at dwell times between 10-10000 μs is a particularly helpful technique when investigating the number and size of individual elemental nanoparticles (NPs). The technique can be further improved by using an ICP-Time of Flight (ToF)-MS allowing the determination of multi-element compositions of each particle. The spICP-ToF-MS allows for more thorough and detailed information on the NP population in the sample compared to conventional mono-elemental ICP-MS methods. Part of the interest of using a multi-elemental spICP-MS analysis is its potential for identifying engineered from natural NPs to better understand the origin and/or the transformations of NPs in natural systems. In this study, the signal of mono-, bi-, and tri-metallic synthetic nanoparticles, either alone or mixed, are first analysed using an ICP-ToF-MS. Then, an automated post-processing approach based on hierarchical agglomerative clustering (HAC) is applied for NP population identification in the mixture. Finally, the method is used to characterize natural oxide and clay minerals. For the first time, this methodology is used to determine elemental fingerprints of engineered and natural NPs. Using the herein developed spICP-ToF-MS method followed by HAC analysis could be a starting point to facilitate the analysis and make reliable interpretations of unknown NP populations and thereby more accurately understand NP populations in natural systems.



3. Introduction

A better qualification and quantification of the anthropogenic impact coming from nanoparticles (NPs) release in the environment is linked to a better identification of the NP's origin. Several studies have shown that it can be revealed using its elemental composition (*i.e.* fingerprint)¹⁻³. However, the composition of engineered nanoparticles (ENPs) (*i.e.* purposely manufactured by human beings) can be quite similar to incidental (INPs) (*i.e.* by-product of human activities) and natural nanoparticles (NNPs) (*i.e.* produced by natural phenomenon). Indeed, the production of ENPs requires elements present in soils and/or sediments from where some INPs and most NNPs come. Nevertheless, ENPs are produced for a specific purpose, for which they must have special properties, and therefore their elemental composition could differ from that of NNPs. Nevertheless, an identification of individual or group of NPs can be particularly challenging.

Single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (*i.e.* spICP-MS) is a technique which is able to not only investigate the particle number concentration and size (or mass), but also the elemental composition of individual nanoparticles⁴⁻⁸. Briefly, NPs introduced into the plasma are ionized and generated ions are successively extracted through the interface, separated according to their m/z , collected at the detector and the signal is recorded by a computer at high frequency. The resulting signal of individual NP is then converted to a mass using an external calibration and the transport efficiency⁹. Typically, the signal of a single NP event usually lasts between 200 and 1200 μs . Thus, a critical point for nanoparticle analysis/identification is the ability to monitor several elements/isotopes in an individual particle during in this timeframe. Using a sector field (SF)-MS in single particle mode would allow very low detection limits (*i.e.* $D_{min} \leq 10 \text{ nm}$)¹⁰. However, the single detector with milliseconds dwell-times (*i.e.* $t_d \geq 1 \text{ ms}$) combined with the relatively slow rate of change of the magnetic field (few tens of milliseconds) to switch from one mass to charge ratio, m/z , to another prevents the possibility of monitoring multiple elements in an individual NP. Hirata *et al.* (2020)¹¹, proposed spICP-MS analysis on a multi-collector (MC)-ICP-MS for Re/Os ($^{185}\text{Re}/^{188}\text{Os}$ and $^{187}\text{Os}/^{188}\text{Os}$) ratios on NPs produced through a laser-ablation system. Such a mass spectrometer is equipped with several detectors that allow the measurement of multiple isotopes simultaneously. In the cited study, thanks to four high-time resolution ion counters, isotope signals were recorded at very high acquisition rates (*i.e.* $t_d = 10 \mu\text{s}$), However, a MC-ICP-MS is not adapted for multiple element analysis as it can only target one isotopic system (*i.e.* Re/Os in the cited study). Recently, although quadrupole (Q)-MS have only one detector, manufacturers increased the peak-jumping and acquisition rates (*i.e.* $t_d \leq 50 \mu\text{s}$)¹². These improvements allowed better spICP-Q-MS time resolution for NP events and monitoring multiple elements in each particle became possible. While very promising and although settling-times (*i.e.* time separating the measurement of two consecutive masses) are relatively short (*i.e.* $\geq 50 \mu\text{s}$), the monitoring is limited to a couple of targeted elements so that each NP event is still well resolved¹³.

Compared to the above, a time of flight (ToF)-MS does not depend on a magnetic, electrostatic, or RF field to disperse or filter ions for individual m/z ion detection¹⁴. The polyatomic ion beam generated in the ICP is accelerated thanks to an orthogonal repeller plate pulsed for 1-2 μs giving each particle a constant potential energy of a charged particle in an electric field: $E_{el}=z\cdot V$, where z is the charge of the ion and V is the applied potential voltage. The packet of ions then passes into a drift tube where the previous electric energy is converted into a characteristic kinetic energy: $E_k = \frac{1}{2}\cdot m\cdot v^2$, where m is the ion mass and v its velocity. Since $E_{el} = E_k$, ions of different mass travel down the drift tube at different velocities with $v = (2\cdot z\cdot V/m)^{1/2}$. Since the distance between the repeller plate and the detector is fixed (*i.e.* designed by the manufacturer), light ions traveling faster, reach the detector in a shorter time than the heavier ions such as $t = \frac{d}{\sqrt{2\cdot V}} \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$. This time discrimination process can be used to resolve ions of different mass. An ion reflector, also called a reflectron, is often used to reverse the direction and double the ions' travel distance thus increasing the mass-resolution. The reflectron also compensates for the kinetic energy distribution of the ions resulting in a narrower arrival time distribution for each mass and thus an improved mass-resolution. The time required for the heaviest ion to travel the distance between the reflectron and the detection system is typically around 25-30 μs ¹⁴. This short spectral-acquisition time presents one of the major advantages of the time-of-flight mass analyzer as it enables the monitoring of all m/z ions in the mass spectrum (nearly-)simultaneously (packets of ions sampled every 25-30 μs)¹⁴. Undeniably, an ICP-ToF-MS continuously collecting the multi-ion beam at around 25-30 μs per spectra with no interruption allows i/ the deconvolution the NP signals ii/ collection of all NPs without loss, iii/ reduction in the incidence of multiple NP being measured in the same acquisition period and iv/ determination of the (multi)-elemental composition of individual NPs. Thus, the identification of nanoparticles (NPs) in natural complex matrices (*i.e.* environmental, geological, biological...) should be facilitated as the information on the NPs is much more thorough.

Nevertheless, at least one issue still needs to be addressed since the large amount of data/information makes its interpretation very challenging. Human beings are able to compute and categorize with creativity when computers show better precision and processing speed with less bias. Thereby, Lai *et al.* (2019)¹⁵ have demonstrated that although with some explanations/observations human beings are able to interpret complex systems, the effectiveness/trueness of these interpretations is greatly improved when providing assistance from machine learning. This latter, considered as an advancing branch of computational algorithms (*i.e.* how numbers are represented and manipulated on a computer) is designed to mimic human intelligence by learning from its surrounding environment. Methodologies based on machine learning have been applied successfully in diverse fields confronted with the so-called big data (*i.e.* finance, biomedical and medical applications)^{16, 17}. In the analytical chemistry domain, machine learning was used for different applications such as prediction of breast cancer after Paper Spray Ion Mobility Spectrometry Mass Spectrometry¹⁸ or image interpretation after Time Of Flight - Secondary Ion Mass Spectrometry¹⁹. It is also often used after inductively coupled

plasma optical emission spectroscopy, for the hierarchical classification of sparkling wine samples according to the country of origin based on chemical elements²⁰. Here, the term *classification* indicates that wines were gathered based on predefined classes (*i.e.* countries) while the term *hierarchical* refers to the construction of a data structure in the form of a tree containing similar objects in different branches. This approach to data analysis is called *supervised* machine learning²¹. However, in analytical chemistry, the classes are usually unknown. Thus, the term/approach named *clustering*, which is a type of *unsupervised* machine learning, seems more appropriate for analytical data as it identifies similarities/dissimilarities between data using the dataset only²². It actually groups them according to these characteristics and differentiates them from others²³. Such hierarchical clustering algorithm can be broadly separated into two categories. The first one, so-called *agglomerative*, is a bottom-up approach that treats individual datapoints as an individual cluster, then pairs clusters until all clusters are merged into one big cluster that contains all the data. The second one, so-called *divisive*, is a top-down approach (initially, all the data belong to one big cluster) that splits the data recursively into smaller clusters.

Several studies have used spICP-ToF-MS for the characterization of NPs in complex/environmental matrices²⁴⁻²⁸. Praetorius *et al.* (2017)²⁴ were the first to use machine learning by means of a supervised gradient decision tree boosting classification after spICP-ToF-MS. Then, Mehrabi *et al.* (2021)²⁹ and Baalousha *et al.* (2021)³⁰ combined time-of-flight measurement with another type of unsupervised machine learning algorithm: the hierarchical agglomerative clustering (HAC). Thanks to the ToF-MS, they were able to analyze metal and metalloid-containing NPs in wastewater samples and soil extractions and determine their (multi-)elemental composition. The use of the HAC helped them to preliminarily classify the NPs and hypothesize their natural or anthropogenic origin. However, due to the lack of information (*i.e.* composition, transformation) about the NPs potentially present in these artificial and geological reservoirs, the interpretation of the provided data was limited. To go further and more surely determine their origin, both studies mentioned the need to have more knowledge (*i.e.* data) about original NPs (*i.e.* engineered and natural).

Thus, to undertake the challenge of the identification of NP origin, this study first focuses on developing a robust and reliable methodology based on:

- i/ the measurement of multi-metallic model (*i.e.* engineered) NPs using spICP-ToF-MS at high acquisition rate
- ii/ the use of an automated post-processing approach based on hierarchical agglomerative clustering for NP population identification.

After testing and approving this methodology on NPs of known composition, analogues of natural NPs (*i.e.* alumina and clay minerals) are analyzed and characterized. The results displayed herein provide information for future studies about the origin and the transformation of NPs in the environment.

4. Material & Methods

4.1. Chemicals

Ultrapure water (UPW; resistivity $\approx 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) from a Millipore Integral 5 (Millipore, USA) was used throughout the work for dilutions. Mono-elemental standards (Au, Ag, Al, Si, Ti, Fe, Zn, Co, Mg, Ca, La, Ce, Zr) at 1000 mg L^{-1} were obtained from SCP Science (Canada). Normapure nitric acid (VWR, USA) was purified in a sub-boiler DST 1000 (Savillex, USA).

Spherical and citrate capped Au-NPs from British Biocell International (UK) with a certified nominal diameter of 40, 60 and 80 nm were used for the determination of the sample transport rate.

For the proof-of-concept experiments, different types of NPs were used:

- Mono-metallic spherical and citrate capped Au- and Ag-NPs from BBI Solutions (UK) with a certified nominal diameter of $79 \pm 6 \text{ nm}$ and $80 \pm 7 \text{ nm}$, respectively.
- Bi-metallic spherical and citrate capped core-shell NPs from Nanocomposix (USA) with a certified nominal diameter of $59 \pm 6 \text{ nm}$ and $79 \pm 9 \text{ nm}$ with Au core diameter of $30 \pm 3 \text{ nm}$ and $51 \pm 6 \text{ nm}$, respectively. For both NPs, based on certificates the respective calculated thickness of the Ag shell is 15 nm and 17 nm. To facilitate the reading, they are referred to as 60 and 80 nm Ag@Au-NPs.
- Tri-metallic Nickel Cobalt Iron and Zinc Cobalt Iron oxide nanopowders, respectively named FeCoNi and FeCoZn, from US Research Nanomaterials (USA) both with a nominal diameter of 40 nm.

The theoretical molar fraction of all particles is displayed in Table 9.

As analogue of NNPs, two clay minerals, a kaolinite – *KGa-2* – and a Texas montmorillonite – *STx-1b* –, each in powder form, were purchased from the Clay Mineral Society (CMS). Their composition and molar fraction derived from the structure given on the CMS website (http://www.clays.org/sourceclays_data.html) are displayed in the Table 9. An aluminium oxide ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) was obtained from Interchim (pure 99.99%, theoretical size fraction 200 – 500 nm). It was purified as described in Janot et al. (2012)³¹.

Table 9: Theoretical molar fraction of the different NPs used in this study.

	<i>Au</i>	<i>Ag</i>	<i>Al</i>	<i>Co</i>	<i>Zn</i>	<i>Ni</i>	<i>Si</i>	<i>Ti</i>	<i>Fe</i>	<i>Mg</i>	<i>Ca</i>
80 nm Au-NPs	1.00	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
80 nm Ag-NPs	/	1.00	/	/	/	/	/	/	/	/	/
60 nm Ag@Au-NPs	0.13	0.87	/	/	/	/	/	/	/	/	/
80 nm Ag@Au-NPs	0.25	0.75	/	/	/	/	/	/	/	/	/
FeCoNi	/	/	/	0.17	/	0.17	/	/	0.67	/	/
FeCoZn	/	/	/	0.17	0.17	/	/	/	0.67	/	/
Alum. ox. – Al₂O₃	/	/	1.00	/	/	/	/	/	/	/	/
Kaolinite – KGa-2	/	/	0.46	/	/	/	0.51	0.02	0.01	/	/
Montm. – STx-1b	/	/	0.21	/	/	/	0.70	0.002	0.008	0.06	0.02

4.2. Sample preparation

The clay mineral samples and the aluminium oxide were each dispersed in 50 ml of ultrapure water at 100 mg L⁻¹ and vigorously shaken for 15 minutes. In order to remove bigger particles (*i.e.* > 1 µm), solutions were left to settle overnight, *ca.* 15 hours, and then the top 10 mL from each supernatant were sampled. All the different solutions were sonicated for 60 seconds and freshly diluted prior to spICP-ToF-MS analysis. Solutions were further diluted to avoid NP coincidences as necessary after reviewing initial measurements.

4.3. Scanning transmission electron microscopy

In order to verify their composition and their structure, transmission electron microscopy (TEM) analyses were performed on the model NPs. Few µL of the stock suspensions were deposited onto carbon-coated copper TEM grids 24h prior the analysis and let dry in a clean atmosphere. The analyses were done at IMPMC (Paris, France) using a JEOL-2100F microscope operating at 200 kV. It is equipped with a Schottky emission gun, a JEOL X-ray detector with an ultra-thin window allowing the detection of light elements and a scanning TEM (STEM) device. Thanks to the Z-contrast imaging, high angle annular dark field (STEM-HAADF) imaging mode was initially used to highlight the structure of the NPs. Then, the chemical mapping of the NPs was done using X-ray energy dispersive spectroscopy (XEDS)^{32, 33}. The aggregation state of the NPs cannot be assumed based on this method as this is a known artefact of this technique

4.4. Single particle ICP-ToF-MS

The simultaneous multi-elemental spICP-MS analysis was performed on an ICP-ToF-MS (Vitesse, Nu Instruments). This instrument is able to record mass spectra from ²³Na to ²³⁸U in a 27.5 µs timeframe. By reducing the data during collection, uninterrupted acquisitions are possible for multiple

minutes at fast dwell-times. Therefore, 3 raw spectra were accumulated for each fully processed spectrum stored to the solid-state hard drive resulting in a total dwell-time of 83 μ s, still allowing the deconvolution of all NP peaks. Spectra processing included the subtraction of electronic noise and spectral baseline followed by an integration of specific mass regions for each isotope with the mass range measured.

The instrument was tuned daily to ensure maximum sensitivity and stability, as well as low barium oxide formation. Table 10 gives representative spICP-ToF-MS operating conditions and parameters.

Table 10: Instrument operating conditions and spICP-ToF-MS parameters

<i>spICP-ToF-MS parameters</i>	
Cones	standard Ni cones
Uptake rate	0.4 L min ⁻¹
RF power	1100 W
Ar Cool gas	13.0 L min ⁻¹
Ar auxiliary gas	2.0 L min ⁻¹
Ar nebulization gas	1.0 L min ⁻¹
Collision cell gas	He at 0.016 L min ⁻¹ and H ₂ at 0.002 L min ⁻¹
Acquired mass range	23 amu – 245 amu
Examined isotopes	²⁴ Mg, ²⁷ Al, ²⁸ Si, ⁴⁴ Ca, ⁴⁸ Ti, ⁵⁶ Fe, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶⁶ Zn, ⁹⁰ Zr, ¹⁰⁷ Ag ¹³⁹ La, ¹⁴⁰ Ce and ¹⁹⁷ Au [#]
Dwell-time	83 μ s *
Oxides	0.2% for BaO/Ba

* in this case, the dwell-time represents the spectral-acquisition time.

[#] Full spectra from ²³Na to ²³⁸U were acquired by the ICP-ToF-MS. However, to reduce the data processing time post-acquisition, the isotope set was reduced to key elements. This made processing possible in seconds rather than minutes when calculating the permutations of element coincidence in each particle.

4.5. Processing and post-processing procedures

4.5.1. spICP-MS raw data processing

ICP-ToF-MS data were processed using the integrated software – *NuQuant* using the methodology described by Shaw & Donard (2016)³⁴. Briefly, the integrated isotopes from the analog to digital converter will be converted to ion count data. The individual spectra are then combined according to the previously described method and typically displayed as counts for accumulated spectra in specified dwell time (in this case 83 μ s) per spectra. The chromatographic data is then displayed in *NuQuant* as counts for each isotope vs. time. To reduce the processing workload of finding particles for every isotope measured, a reduced set of “target isotopes” can be defined. Here, exclusively data

containing the elements cited above (Table 10) were extracted, treated and finally exported in a csv file for further calculations. Each particle peak is then smoothed and integrated based on the parameters defined by the user in *NuQuant* (smoothing points, smooth iterations, peak threshold...) using a rolling search window. A maximum is looked for in the search window and the corresponding raw data points between the pre-maximum and post-maximum inflection points are then defined as a peak. The remaining smoothed data points in the search window are then used to determine the background average. Note that if the maximum found in the smoothed data is less than a specific parameter called – trigger (smoothed background average + peak threshold) – then the peak is not reported and the search window continues to look for the next peak maximum. Also, for all of the found particles for each target isotope, if the time for the peak maximum is within one peak width for two different target isotopes, these peaks are treated as a single particle peak and the lowest start point and highest end points are used to integrate the data. Then, for each peak reported, the background is subtracted as the difference between the integrated peak count and the number of points in the peak multiplied by the average background. All data obtained that is not part of a peak is then used to calculate the ionic background signal for each isotope (*i.e.* element signal that is not due to a nanoparticle). Finally, peak counts are converted in number of moles and/or masses using the individual isotope sensitivity (*i.e.* slope of the external calibration) and the transport rate.

4.5.2. Hierarchical agglomerative clustering

The post-processing strategy for graphical representation, advanced calculations and cluster analysis was programmed in Python 3.8 using calculated moles and masses exported from *NuQuant*. The machine learning library – *Scikit-learn* (<https://scikit-learn.org/stable/>) – and specifically its object – *AgglomerativeClustering* – was used to perform the hierarchical agglomerative clustering (HAC).

The hierarchical clustering consists of grouping clusters recursively either in an agglomerative or divisive way. The hierarchical agglomerative clustering (HAC) is here preferred. Each datapoint is considered as an individual cluster and is afterward successively merged in clusters based on similarities. Govender and Sivakumar (2019)³⁵ described its execution as follows:

- i/ individual observation (here NP) is considered to be an initial cluster
- ii/ distances between clusters are computed
- iii/ two clusters with minimum distance are merged in a new single cluster. Then, the distance matrix is recomputed so as to reflect this clustering process
- iv/ repeat ii/ and iii/ until there is a unique cluster containing all observations (NPs)

The usual output of the HAC is a 2-D tree-like structure. The so-called dendrogram illustrates the arrangement of the grouped clusters^{29, 35}. The number of clusters is determined by cutting this dendrogram at a desired level (*i.e.* distance threshold discussed below). Ward minimum variance method is used here as the recursive merging strategy. It is defined as the smallest increase in the within-cluster

sum of squares due to the merging of two clusters. The Ward's distance, also called the merging cost, between two clusters A and B with n datapoint each and $d(a, b)$ their Euclidean distance is given by:

$$\Delta(A, B) = \frac{n_a \cdot n_b}{n_a + n_b} \cdot d(a, b)^2$$

5. Results & Discussion

5.1. External calibration and size detection limits of the spICP-ToF-MS

Table 11: Representative results of the spICP-ToF-MS external calibrations as well as M_{min} and D_{min} in ultrapure water.

Isotope	sensitivity (cts sec ⁻¹ L μg ⁻¹)	R ²	σ _{UPW} (cts sec ⁻¹)	M _{min} (fg)	ρ (g cm ⁻³)	D _{min} (nm)
²⁴ Mg	4069.5	0.999	2637.4	0.605	1.74	87.2
²⁷ Al	11293.6	0.999	7904.1	0.643	2.70	76.9
²⁸ Si	3448.7	0.886	10805.4	2.924	2.33	133.8
⁴⁰ Ca	38786.2	0.900	21823.7	0.525	1.55	86.7
⁴⁸ Ti	20330.7	1.000	3079.1	0.148	4.54	39.7
⁵⁶ Fe	35492.9	0.994	7086.6	0.238	7.87	38.7
⁵⁹ Co	48377.6	1.000	1322.5	0.033	8.82	19.2
⁶⁰ Ni	10444.3	0.999	2000.1	0.179	8.90	33.7
⁶⁶ Zn	5465.4	0.999	1442.7	0.246	7.13	40.4
⁹⁰ Zr	17506.4	0.999	609.6	0.032	6.52	21.2
¹⁰⁷ Ag	14388.6	1.000	1171.6	0.076	10.49	24.0
¹³⁹ La	13518.0	0.999	527.3	0.036	5.97	22.4
¹⁴⁰ Ce	13454.2	0.999	577.1	0.040	6.77	22.4
¹⁹⁷ Au	16436.0	0.994	2123.7	0.121	19.32	22.8

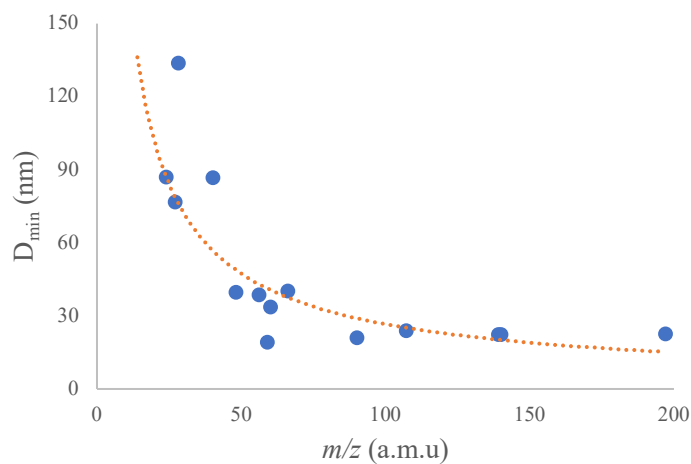


Figure 47: Minimum size detectable (D_{min}) vs mass on charge ratio (m/z) using data in Table 3

Table 11 displays the results of each individual isotopes external calibration using mono-elemental standards mixed together in 1% HNO₃. The coefficient of determination (R^2) of their individual linear regression fits, calculated using the least square method, show a linear response in the range of 100 – 20000 ng L⁻¹. The minimum detectable mass (M_{min}) and minimum detectable diameter

(D_{min}) are listed in Table 11 and D_{min} is also displayed in Figure 47 as a function of mass on charge (m/z) ratio. Following previous studies³⁶ the sensitivity in $\text{cts sec}^{-1} \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ is first converted in $\text{cts } \mu\text{g}^{-1}$ using the transport rate (here $0.16 \mu\text{L sec}^{-1}$). Then, the standard deviation of the background in cts sec^{-1} as determined by all datapoints in which no particle events were detected is used along with the average particle duration to determine the M_{min} . Finally, assuming a spherical shape of pure metal, the D_{min} is calculated. D_{min} reported in this study for Au and Ag as well as for La, Ce and Zr, are in the range of those presented in the literature for quadrupole^{37,38} or time-of-flight^{39,40} based instruments. Much lower D_{min} are usually reported for sector-field based instruments as the sensitivity is much higher^{28,34,41}. For Fe, the resolution of the $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ interference is a key factor ($R \geq 2500$). Although ICP-SF-MS has higher sensitivity, ^{56}Fe is usually measured in medium-resolution mode to fully resolve the interference, which gives a 10-fold lower response and thus slightly higher D_{min} . Rua-Ibarz et al. (2020)⁴² have shown that the use of high sensitivity instruments such as an ICP-SF-MS in pseudo-medium-resolution mode or an ICP-MS/MS in H_2 mode decreases the D_{min} for Fe_3O_4 ($D_{min} = 19 \text{ nm}$; *ca.* 13.7 nm for pure FeNPs). The resolution power of this ICP-ToF-MS (*ca.* 3500 FWHM) combined to a collision cell with H_2 and He (always on) allows the full removal of the $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ interference. The lower sensitivity compared to those reported in the study mentioned above however leads to a higher D_{min} . Polyatomic interferences also need to be resolved for Zn, Ni and Co and the resolution power of the time-of-flight coupled to the collision cell looks efficient as D_{min} are very low compare to the D_{min} reported by Lee et al. (2014)³⁶ for ICP-Q-MS. Zn, Ni and Co natural abundances are respectively 27.97, 26.22 and 100% and the first ionization energies of Zn (*i.e.* 9.39 eV) is much higher than the others (7.64 and 7.88 eV, respectively), leading to the reported sensitivities with $S_{\text{Zn}} < S_{\text{Ni}} < S_{\text{Co}}$. Additionally, as their $3\sigma_{\text{UPW}}$ and their densities (used for the calculation of the D_{min}) are quite close, this leads to D_{min} decreasing as followed: $\text{Zn} > \text{Ni} > \text{Co}$. The case of ^{48}Ti is much complex as there is an isobaric interference (*i.e.* ^{48}Ca) more difficult to resolve. In a previous study¹⁰, we demonstrated that the use of the high-resolution mode (*i.e.* $R \approx 10000$) on an ICP-SF-MS is necessary to reach $D_{min} \approx 10 \text{ nm}$ in presence of high ionic Ca. The absence of ionic Ca here allows to reach low D_{min} , nevertheless this is in the range of those reported for ICP-Q-MS for instance^{37,43}. While D_{min} at $m/z > 40$ are quite low (*i.e.* $\leq 40 \text{ nm}$), an increase is observed at $m/z \leq 40$ (*i.e.* $> 70 \text{ nm}$) (Figure 47). The D_{min} of ^{24}Mg and ^{27}Al calculated here are however in the range of the one reported in the synthesis of Lee et al. (2014)³⁶. The high background of Si and Al is probably influenced by the composition of the introduction system entirely made of borosilicate glass that can lead to high D_{min} . Additionally, the highest of all D_{min} displayed for ^{28}Si is also due to its low sensitivity. This D_{min} is however lower than the one reported in other studies^{36,44}. For ^{40}Ca , it is probable that the removal of ^{40}Ar is not 100% efficient. However, the collision cell still looks very powerful as at least 99.5% of ions that are extracted from the plasma are $^{40}\text{Ar}^+$ and only few counts are detected at $m/z = 40$.

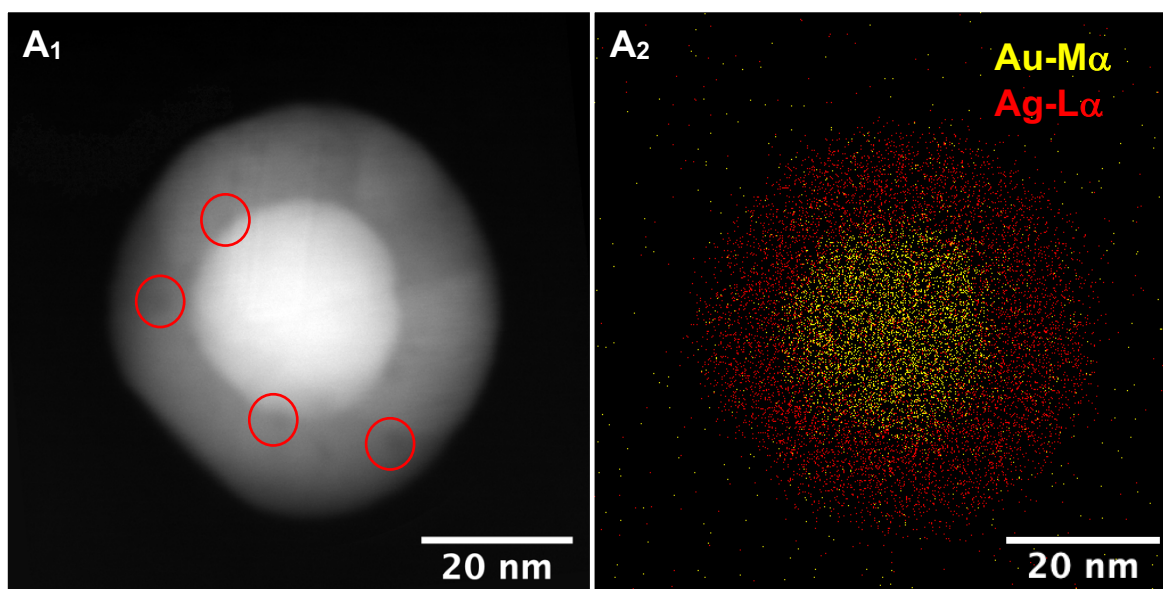
5.2. Gold and/or silver NPs


Figure 48: STEM analysis of 60 nm bi-metallic Ag shelled AuNPs (A). Indices 1 and 2 are for STEM-HAADF imaging and STEM-XEDS chemical mapping, respectively. Red arrows point the imperfections (lack of Ag) in the Ag-shell

Scanning transmission electron microscopy (STEM) images of the Ag shelled Au-NPs in Figure 48 confirm the spherical morphology of the NPs. Moreover, the core-shell structure is verified using HAADF imaging where the contrast allows to distinguish the heaviest element (gold) in the center and the lightest (silver) at the edge of the NP. This is confirmed by the XEDS mapping displaying the bi-metallic “Au-core – Ag-shell” composition. Nevertheless, NPs observed ($n = 10$) seem to be in the low range of the theoretical size displayed in the certificate (59 ± 6 nm). Additionally, imperfections (*i.e.* lack of Ag) are observed in the Ag-shell as highlighted by the red circles.

Table 12: Experimental diameter and molar fractions of the different NPs for pure Au-, pure Ag- and bi-metallic Ag shelled Au-NPs

	<i>Molar fraction</i>		<i>Nanoparticle diameter (nm)</i>
	<i>Au</i>	<i>Ag</i>	
80 nm Au-NPs	1.00	/	76.6 ± 6.5
80 nm Ag-NPs	/	1.00	76.8 ± 13.0
60 Ag@Au-NPs	0.10 ± 0.06	0.90 ± 0.06	63.2 ± 10.5
80 Ag@Au-NPs	0.17 ± 0.08	0.83 ± 0.08	93.7 ± 15.0

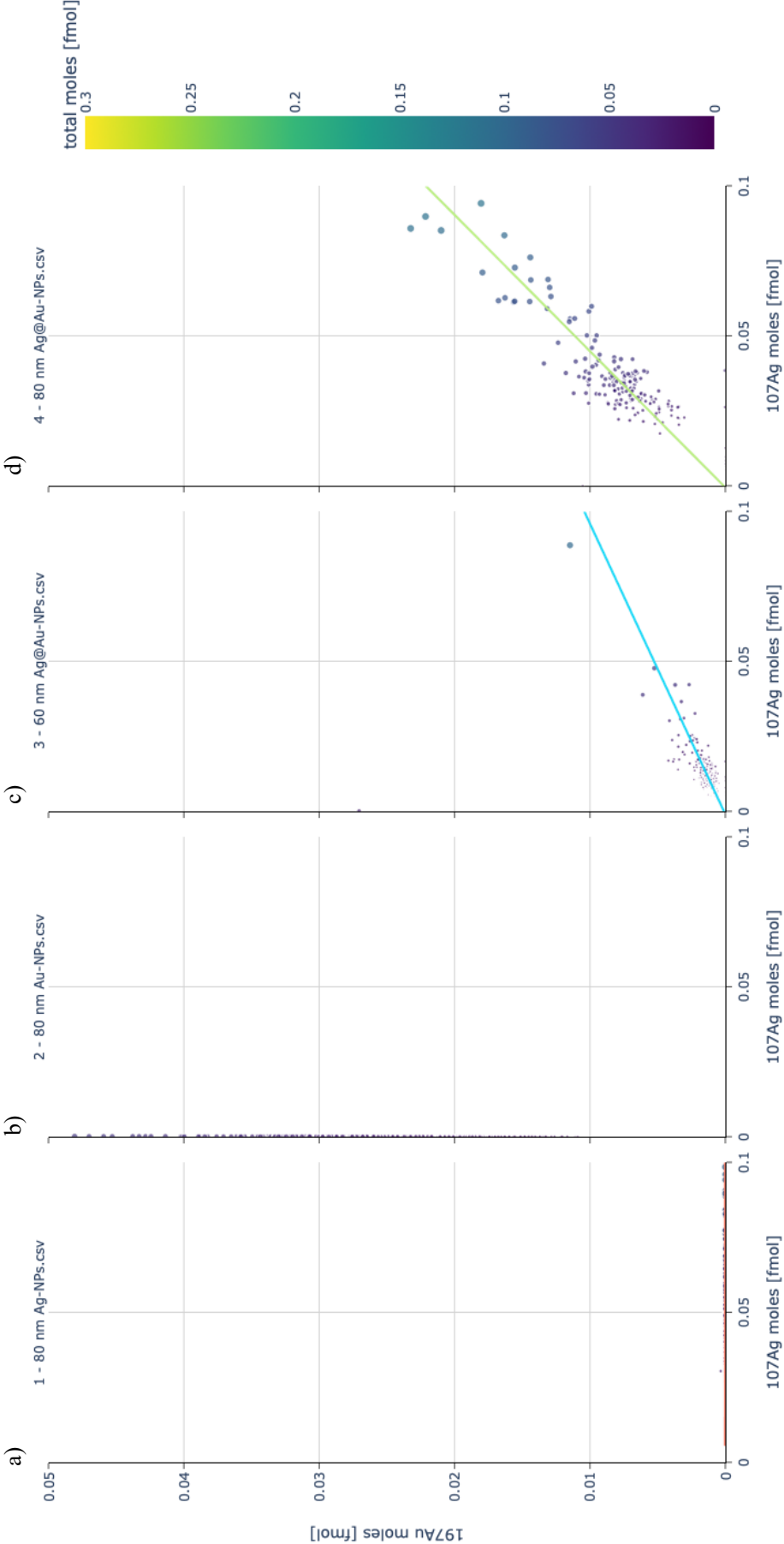


Figure 49: number of moles of Au vs the number of moles of Ag (all in femtomoles). Blue and green lines represent the best fit lines, for c) 60 nm and d) 80 nm Ag@Au-NPs respectively. The colorbar gives the total amount of moles (in femtomoles) in individual datapoints while the size of each point is related to the calculated mass of the NPs. Note that the number of moles and the mass are calculated using all the monitored elements cited above

In this section, 80 nm pure Au- and Ag-NPs as well as 60 nm and 80 nm bi-metallic Ag shelled Au-NPs were analyzed using the ICP-ToF-MS in single particle mode. Figure 49 displays the number of moles of Au vs the number of moles of Ag (all in femtomoles) for individual solutions.

Pure Au- and Ag-NPs (Figure 49 a and b) respectively give an average size of 76.6 ± 6.5 nm and 76.8 ± 13.0 nm (Figure 49 c and d) with a pure metallic fingerprint (molar ratio = 1). For 60 and 80 nm bi-metallic Ag shelled Au-NPs, the average size per particle is – 63.2 ± 10.5 nm with a molar fraction of Ag = 0.90 ± 0.06 and Au = 0.10 ± 0.06 – and – 93.7 ± 15.0 nm with a molar fraction of Ag = 0.83 ± 0.08 and Au = 0.17 ± 0.08 –, respectively. Additionally, the calculated size of the Au-core is 29 ± 7 nm and 54 ± 10 nm for 60 and 80 nm for Ag@Au-NPs, respectively. Based on the average diameter of 60 and 80 nm Ag@Au-NPs, the recalculated thickness of the Ag shell is respectively *ca.* 17 nm and *ca.* 19 nm. These results show that calculated sizes as well as mole fraction of pure and bi-metallic NPs are in good agreement with the certified ones.

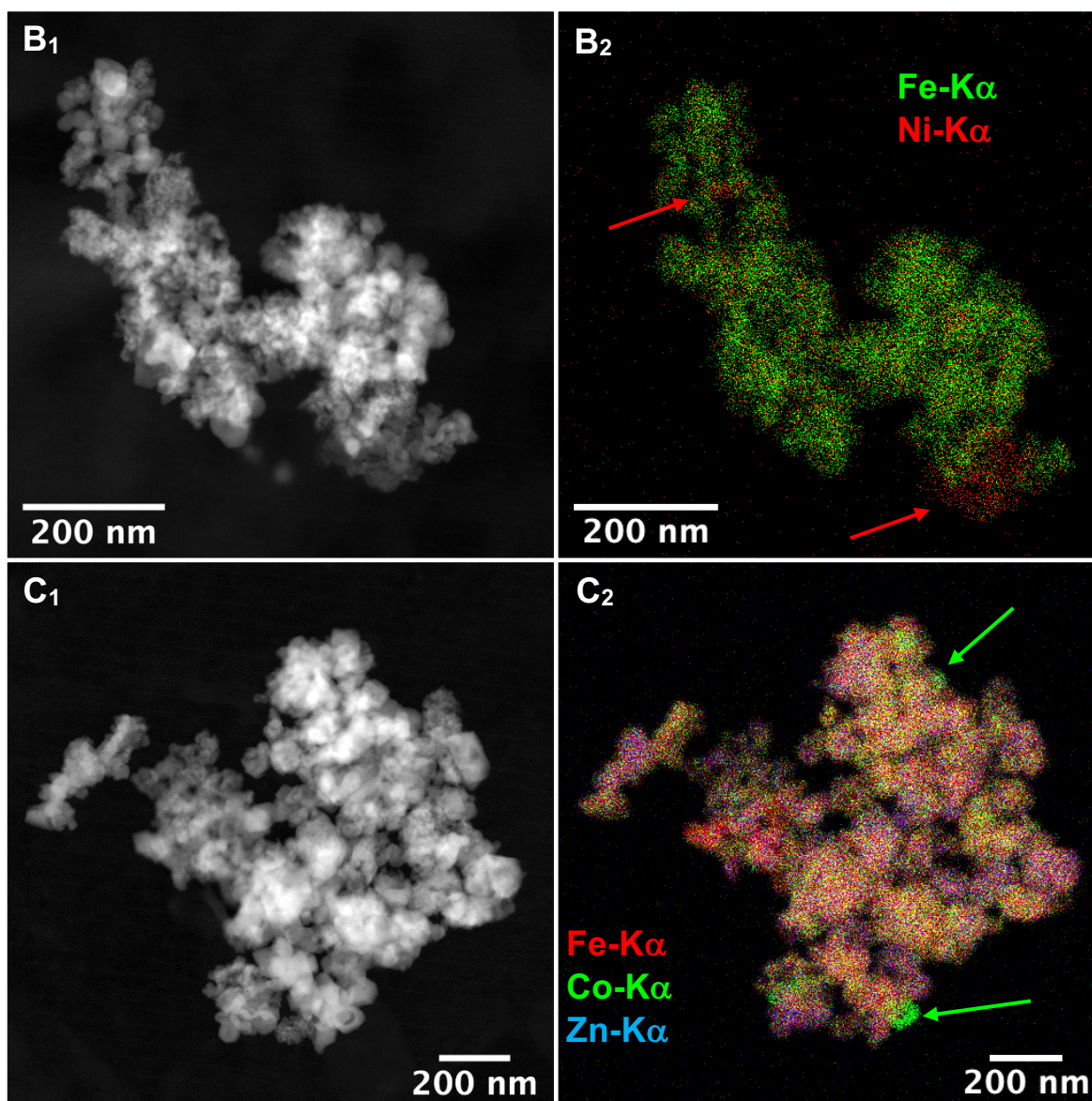
5.3. Nickel/Zinc Cobalt Iron oxide NPs

Figure 50: STEM analysis of Nickel Cobalt Iron oxide (B) and Zinc Cobalt Iron oxide (C). Indices 1 and 2 are for STEM-HAADF imaging and STEM-XEDS chemical mapping, respectively. Red and green arrows point hot-spots of Ni and Co, respectively

Figure 50 displays the images of scanning transmission electron microscopy (STEM) for Nickel/Zinc Cobalt Iron oxides. The images show no evidence of a core-shell structure and/or of a homogeneous size distribution (40 nm, given in the certificate). Indeed, most of the particles observed are above 350 - 400 nm with a heterogeneous size distribution. However, no information about the size of the NPs and/or aggregation state can be extracted from these images as STEM preparation influences the formation of such amasses. Still, the XEDS mapping demonstrates that elements are heterogeneously distributed in the agglomerate with hot-spots of some elements (*i.e.* Ni and Co in Figure 50 B₂ and C₂, respectively).

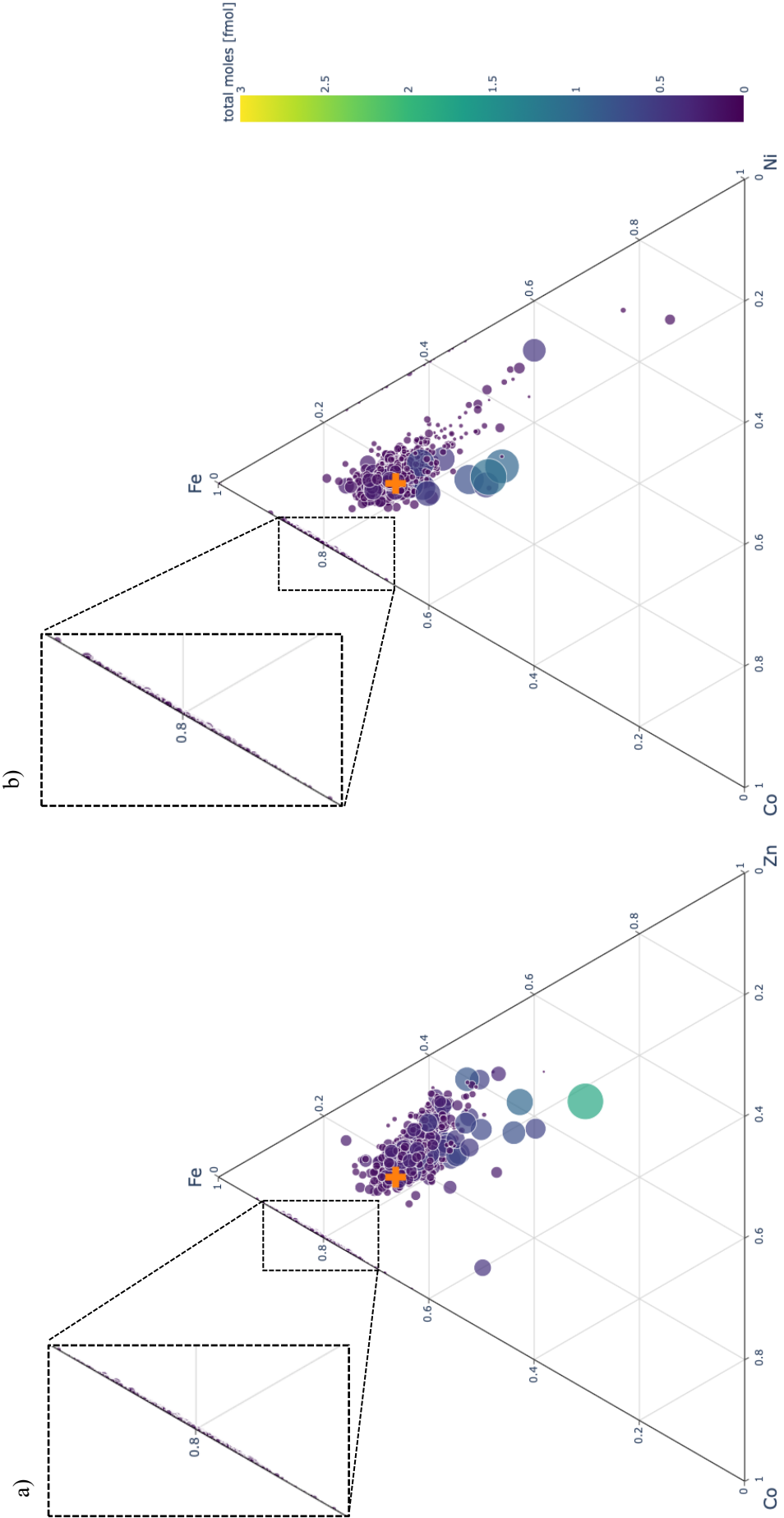


Figure 51: Ternary diagrams of molar fractions of a) Fe-Co-Ni and b) Fe-Co-Zn. Orange cross represents the theoretical molar fraction (i.e. 0.67/0.17/0.17). The color bar gives the total amount of moles (in femtomoles) in individual datapoints while the size of each point is related to the calculated mass of the NPs. Note that the molar fraction and the mass are calculated using all the monitored elements cited above. Rectangles provide a zoom on the datapoints (i.e. NPs) with a bi-metallic signature (i.e. Fe-Co)

Table 13: Experimental mass and molar fractions of the different types of NPs coming from Fe-Co-Ni/Zn oxides

		Molar fraction			Total particle
		Fe	Co	Ni/Zn	mass(fg)
Fe-Co-Ni	Fe	1.00	/	/	0.5 ± 0.2
	Fe-Co	0.80 ± 0.03	0.20 ± 0.03	/	1.1 ± 0.6
	Fe-Co-Ni	0.66 ± 0.05	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.05	5.0 ± 5.2
Fe-Co-Zn	Fe	1.00	/	/	0.4 ± 0.2
	Fe-Co	0.82 ± 0.05	0.18 ± 0.05	/	1.4 ± 1.3
	Fe-Co-Zn	0.63 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.23 ± 0.05	9.5 ± 8.3

Tri-metallic Nickel Cobalt Iron and Zinc Cobalt Iron oxide NPs dispersed in ultrapure water were analyzed by spICP-ToF-MS. Figure 51 displays the calculated molar fraction of the three metals. In both tri-metallic NP solutions, 3 types of NPs are found with the following composition: 1/ pure Fe NPs, 2/ bi-metallic Fe-Co NPs and 3/ tri-metallic Fe-Co-Ni/Zn NPs. The total particle mass displayed in Table 13 shows that the one of bi-metallic NPs is lower than the one of tri-metallic NPs. This is in agreement with the M_{min} (Table 11). Indeed, although Co, Ni and Zn are all minor constituents of both tri-metallic NPs, Ni and Zn have higher M_{min} compare to Co. Thus, the ability to detect them is reduced as the NP mass decreases. On the contrary, Table 13 indicates $m_{Fe} < m_{Fe-Co}$ while Table 11 shows that $M_{min-Fe} > M_{min-Co}$. This can be explained by the fact that, omitting oxygen, Fe is the major constituent of the NP which favors its detection. Considering only tri-metallic NPs, calculated sizes (assuming a spherical shape) are much larger compare to the theoretical one (*ca.* 98 ± 25 and 124 ± 30 nm, for Fe-Co-Ni and Fe-Co-Zn respectively, instead of 40 nm). The calculated molar fractions (Table 13) are however in good agreement with theoretical ones displayed in Table 9. The dispersity of the datapoints displayed around the theoretical molar fraction (orange cross) in Figure 51 is also in good agreement with the heterogeneity observed in Figure 50. These results suggest that aggregates are detected instead of the individual tri-metallic NPs.

5.4. Mixture of model NPs

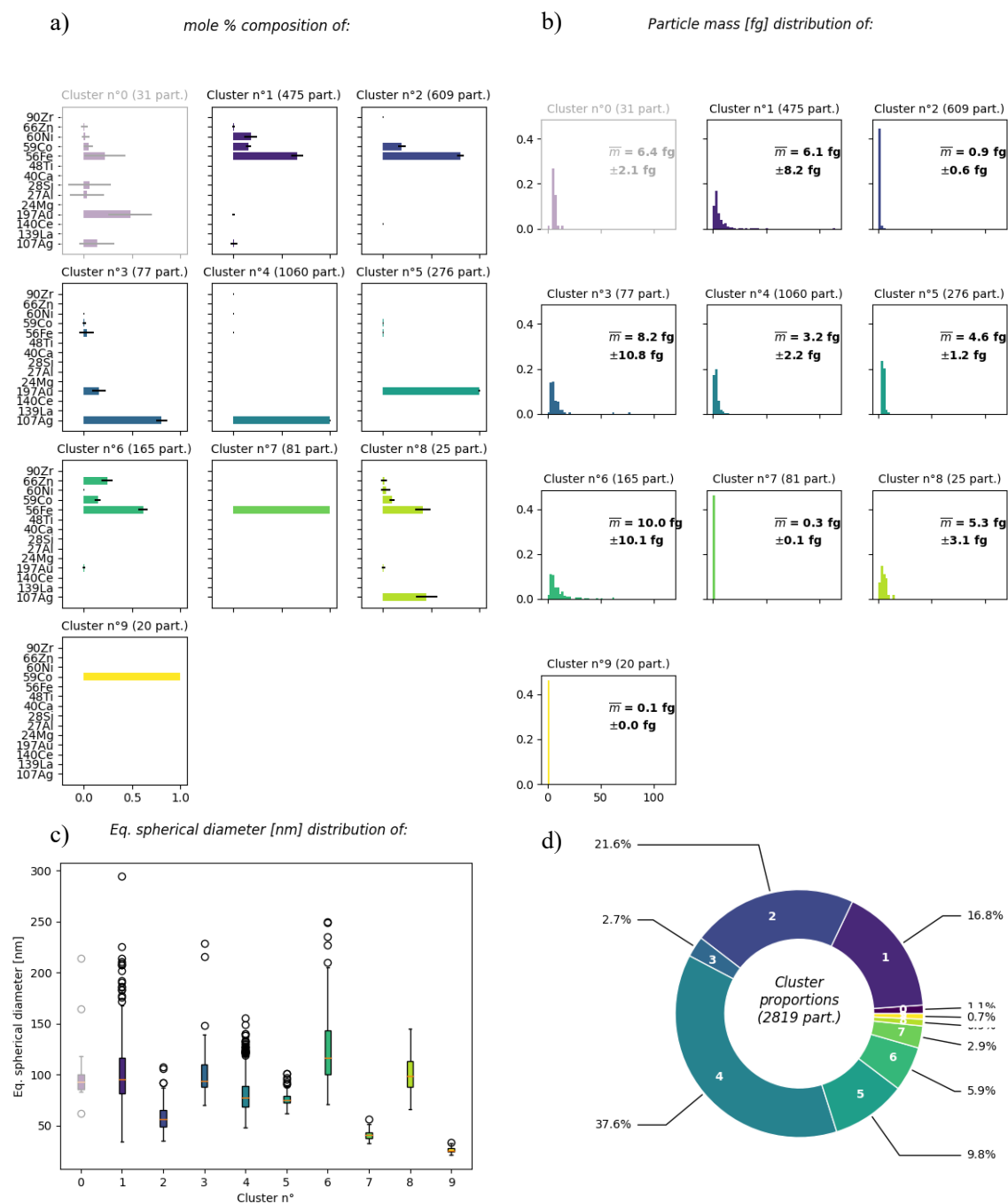


Figure 52: Summary of the hierarchical agglomerative clustering on spICP-ToF-MS data of the NP mixture analysis. a) mole fractions, b) particle mass distributions, c) equivalent spherical diameters and d) proportions of individual clusters are displayed. The cluster with an unexpected composition is purposely dimed to facilitate the understanding of the manuscript

The results displayed in the previous sections show that the analysis of multi-metallic NPs is possible using an ICP-ToF-MS in single particle mode. Although sizes provided for the tri-metallic NPs are much larger than expected, sizes of other NPs as well as all molar fractions are individually precisely determined. To go further, it is important to demonstrate that this kind of analysis is precise and reliable for the characterization of NP mixture with a number of monitored elements > 3 as in

environmental samples. In order to mimic these kinds of samples, a mixture of the model NPs characterized above is analyzed by spICP-ToF-MS. Then, the hierarchical agglomerative clustering (HAC) approach described above is used to recursively group similar events (*i.e.* NP) with similar fingerprints (*i.e.* elemental molar fraction). The HAC, being an unsupervised methodology, performs the clustering “blindly” (*i.e.* without influence of a human being). Based on the summary displayed in Figure 52: Summary of the hierarchical agglomerative clustering on spICP-ToF-MS data of the NP mixture analysis. a) mole fractions, b) particle mass distributions, c) equivalent spherical diameters and c) proportions of individual clusters are displayed. The cluster with an unexpected composition is purposely dimed to facilitate the understanding of the manuscript , the methodology looks very precise and accurate. Indeed, cluster characteristics are in agreement with the model NPs described above. For instance, considering gold and silver, the pure (cluster 4 and 5) and bi-metallic (cluster 3) populations are displayed with the correct molar fractions although impurities (*i.e.* Fe-Co-Ni < 2%) are observed for Ag@Au-NPs. Equivalent spherical diameters also correspond to the ones calculated when analyzed separately. For the tri-metallic NPs, pure Fe (cluster 7), bi-metallic Fe-Co (cluster 2) as well as tri-metallic Fe-Co-Ni/Zn (cluster 1 and 6) NPs are still displayed with molar fractions and equivalent spherical diameters in agreement with information provided in the previous section. Three other clusters (cluster 0, 8 and 9) are also displayed in Figure 52: Summary of the hierarchical agglomerative clustering on spICP-ToF-MS data of the NP mixture analysis. a) mole fractions, b) particle mass distributions, c) equivalent spherical diameters and c) proportions of individual clusters are displayed. The cluster with an unexpected composition is purposely dimed to facilitate the understanding of the manuscript . NPs included in cluster 0 contain Al and Si which was not dispersed in the solution. These NPs can be considered as carry-over from previous analysis or an artifact from the data processing in *NuQuant*. Moreover, the proportion of this cluster is negligible compared to most of the others (*i.e.* 1.1%) and can be arbitrarily omitted within the discussion. The mono-metallic composition (*i.e.* only Co is detected) as well as the very low mass of cluster 9 show that these NPs are probably pristine Co-NPs dispersed during the sonication and initially categorized as hot-spots in STEM-XEDS mapping (Figure 50). The cluster 8 shows an unexpected multi-metallic composition with molar fraction of *ca.* Ag = 0.50, Fe = 0.45, Co = 0.04 and traces of Ni and Zn. The sample was initially diluted to reduce the probability of coincidences. However, such NP coincidences as well as (hetero-)aggregation within the sample are probable. Chromatograms displayed in the Appendix section demonstrate that these are easily identified through the continuous acquisition at tens of micro-second dwell-times. In the first scenario (Appendix 1), the starting time of the peaks of Fe, Co, Zn and Ag is exactly the same. Based on the NPs initially dispersed in the sample, this indicates a hetero-aggregation between a tri-metallic NP and a pure Ag-NP. The Appendix 2 shows a different scenario. Indeed, the starting point of the peak of Ag is different than the one of Fe, Co and Ni. An overlap is however observed. Thus, the way data are processed in

NuQuant lead to estimate that these pure Ag and tri-metallic peaks are actually a single quadri-metallic peak. Here again, the proportion of this cluster is insignificant compared to most of the others (*i.e.* 0.9 %).

This nevertheless shows that spICP-ToF-MS analysis coupled to HAC is very efficient in differentiating populations of NPs even in low proportions (*i.e.* impurities). As described above, an arbitrary threshold distance of $d_{\text{threshold}} = 3$ is used to gather the data into clusters. The more complex the dataset is, the more complicated the definition of the threshold distance becomes for clustering. For instance, by increasing the distance threshold for this dataset, the total number of clusters decreases as some clusters are merged together. The first populations to be merged are tri-metallic NPs both with Ni and Zn giving one cluster with a quadri-metallic signature. Then by increasing the $d_{\text{threshold}}$ further, all cluster containing either Fe, Co, Ni or Zn are merged together while pure Ag and Ag@Au-NPs are also combined, leaving a third cluster with only Au-NPs. To find the appropriate/optimal distance threshold in HAC (as for environmental samples), Krishnamoorthy *et al.* (2012)⁴⁵ propose an Optimized Agglomerative Clustering (OAC) that reduces computational complexity and misclassification errors with good accuracy using multilevel threshold for finding optimum number of clusters. However, this optimized methodology is not yet implemented in Python but is a promising line of development for future studies. In the next section, the distance threshold is thus fixed at the suitable value used for the clustering of the model NPs mixture *i.e.* $d_{\text{threshold}} = 3$.

5.5. Analogue of natural NPs

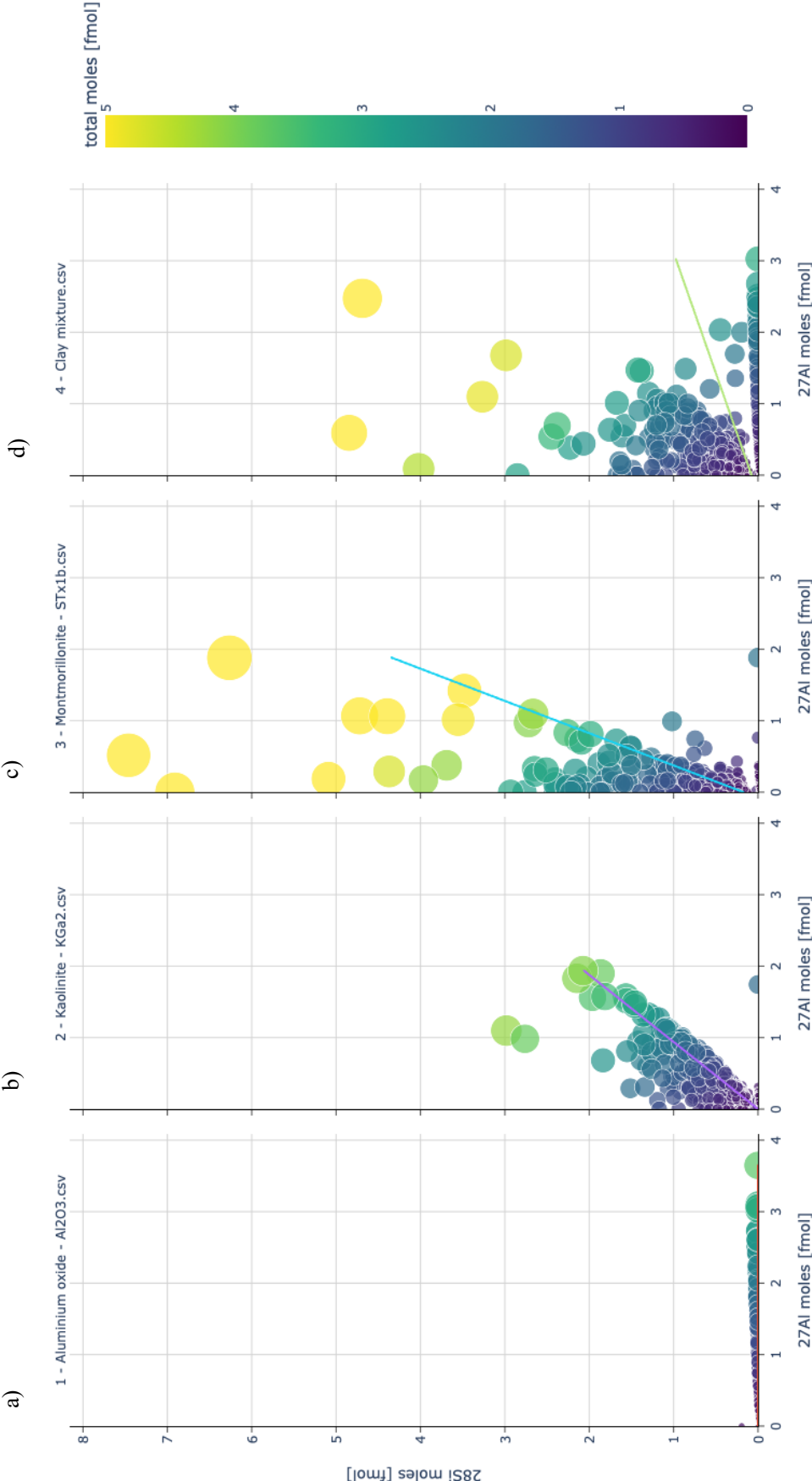


Figure 53: Number of moles of Si vs the number of moles of Al (all in femtomoles). Purple, blue and green lines represent the best fit lines, for KGa-2, STx-1b and the mixture, respectively. The color bar gives the total amount of moles (in femtomoles) in individual datapoints while the size of each point is related to the calculated mass of the NPs. Note that the number of moles and the mass are calculated using all the monitored elements cited above

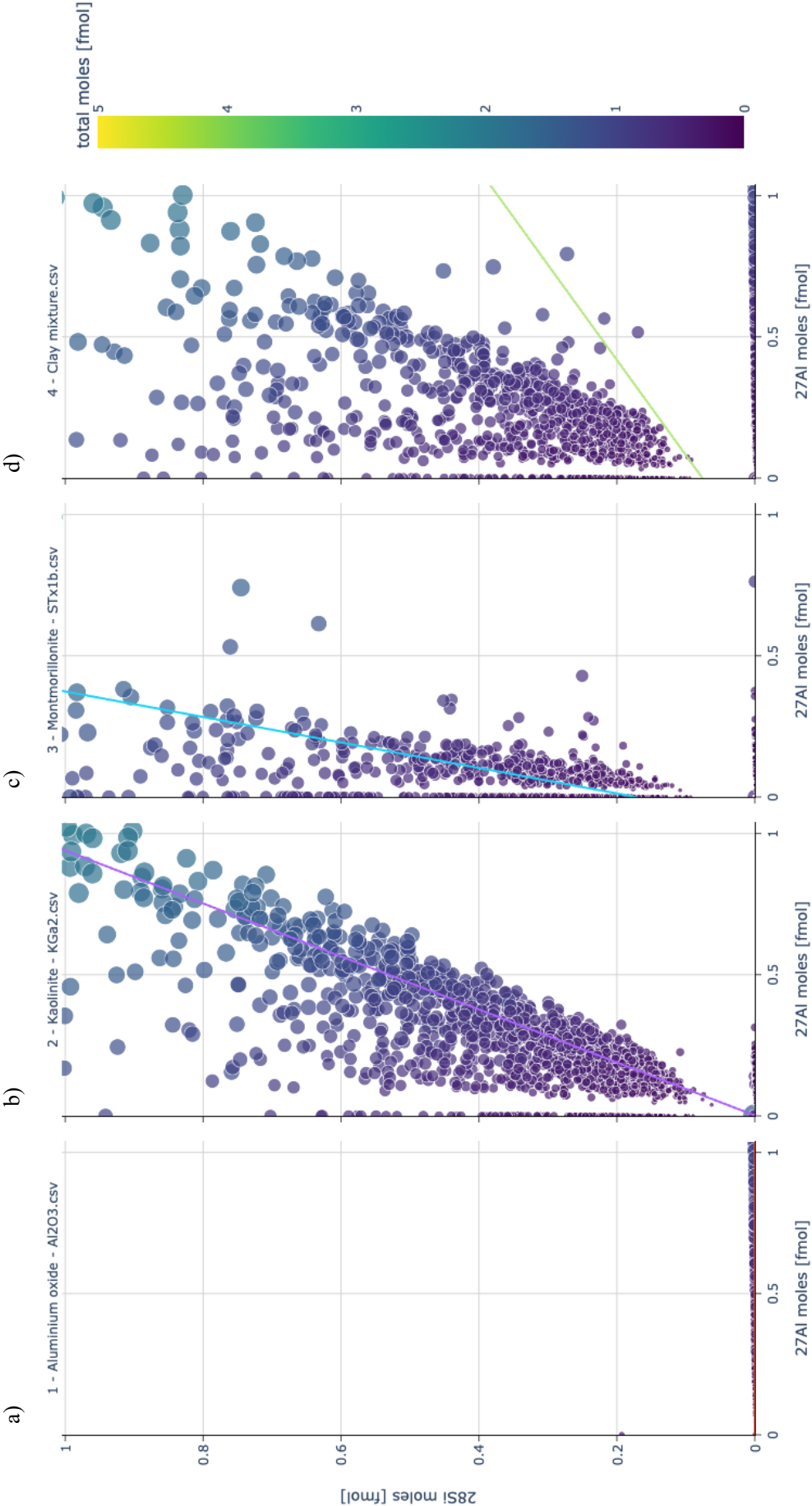


Figure 54: (Zoom of Figure 7). Number of moles of Si vs the number of moles of Al (all in femtomoles). Purple, blue and green lines represent the best fit lines, for KGa-2, STx-1b and the mixture, respectively. The color bar gives the total amount of moles (in femtomoles) in individual datapoints while the size of each point is related to the calculated mass of the NPs. Note that the number of moles and the mass are calculated using all the monitored elements cited above

In this section, for the first time, two clay mineral samples (*i.e.* a kaolinite and a montmorillonite) as well as an aluminium oxide are characterized using single-particle ICP-ToF-MS. Figure 53 displays the number of moles of Si vs the number of moles of Al (*i.e.* the two major elements) for all samples individually and also mixed together. The four graphs in Figure 54 are zoomed representations of the 4 graphs in Figure 53. Clearly, fitted lines appears to be different for all samples. For Al_2O_3 , a zero-correlation is observed between Si and Al while for KGa-2 and STx1-b, correlation coefficients are 1.06 and 2.21, respectively. These coefficients represent the experimental Si-Al molar ratio. Theoretical ones, calculated from the data in Table 9, are 1.11 and 3.33 for KGa-2 and STx1-b, respectively. For the kaolinite, the experimental and theoretical molar ratio are in perfect agreement. For the montmorillonite the experimental ratio slightly diverges from the theoretical one but is still different from kaolinite. For the mixture, the correlation coefficient is not very representative but, on the graph, more datapoints than for the kaolinite and montmorillonite are displayed on the pure-Al axis (*i.e.* x-axis) while bi-elemental datapoints look slightly more dispersed.

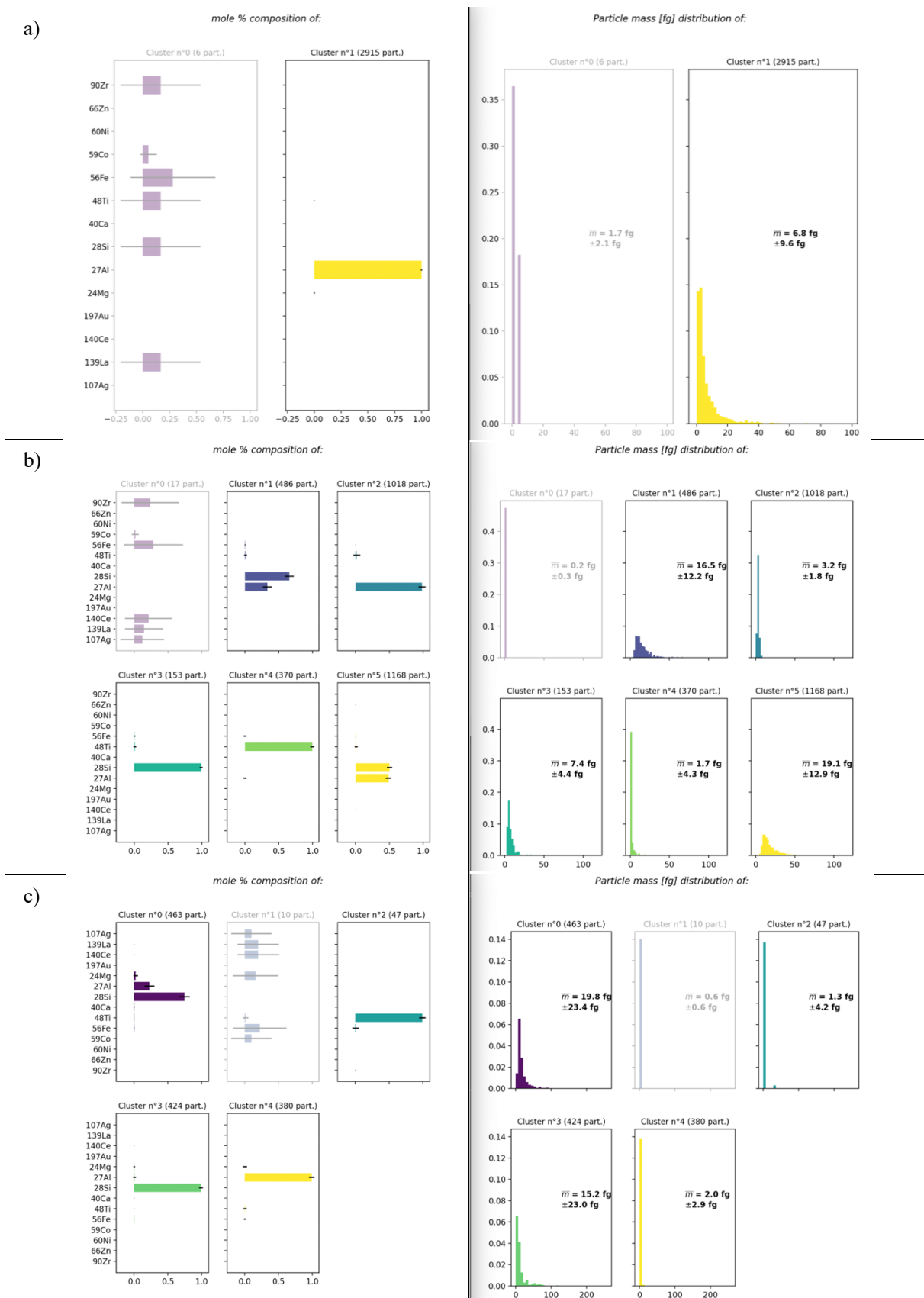


Figure 55: Summary of the hierarchical agglomerative clustering on spICP-ToF-MS data of the a) aluminium oxide, b) the kaolinite and c) the montmorillonite. Molar fractions and particle mass distributions of individual clusters are displayed. The cluster with an unexpected composition is purposely dimed to facilitate the understanding of the manuscript

To better interpret this data, the hierarchical agglomerative clustering methodology used above is required. First, data of individual samples and then of the mixture are processed using the HAC with the distance threshold set to 3. All results displayed in Figure 55 show a cluster with an unexpected elemental composition. However, as for the mixture of model NPs, these NPs can be considered as carry-over from previous analysis or an artifact from the data processing in *NuQuant*. Thus, this “false” cluster is purposely omitted in the following discussion and dimed in Figure 55. Consequently, as expected, aluminium oxide presents a cluster with pure-Al (*i.e.* Al molar fraction = 1) while the major cluster for kaolinite (1168 NPs – *ca.* 36% of the total number) and montmorillonite (463 NPs – *ca.* 35% of the total number) is composed of Si – Al – Fe – Ti and Si – Al – Mg – Fe – Ca – Ti, respectively. Looking at their molar fractions, results are all in agreement with the molar fraction listed in Table 9. Indeed, it appears that for KGa-2, silicon and aluminium respectively represent 0.50 ± 0.04 and 0.49 ± 0.03 , followed by Ti and Fe with 0.007 ± 0.025 and 0.003 ± 0.005 . For STx1-b, the principal cluster has silicon, aluminium and magnesium molar fraction of 0.74 ± 0.07 , 0.23 ± 0.07 and 0.02 ± 0.03 , respectively. Fe, Ca and Ti are less present with molar fractions of 0.003 ± 0.004 , 0.002 ± 0.006 and 0.001 ± 0.003 , respectively. Both kaolinite and montmorillonite also show two additional clusters with a molar fraction *ca.* 0.99 ± 0.02 of either Si, Al or Ti along with traces (*i.e.* molar fraction < 0.01) of Mg – Fe and/or Ca. The Si-containing clusters/NPs are (nearly-)pure quartz NPs (SiO_2) as mentioned on the CMS website. Indeed, using infrared spectroscopy, quartz was detected at $\lambda = 697 \text{ cm}^{-1}$ in STx-1b for instance. The very low mass of Al-containing NPs can be considered as individual Al_2O_3 sheets while Ti-containing clusters/NPs are actually TiO_2 NPs. These TiO_2 NPs were for instance observed by micro-Raman spectroscopy within clay mineral samples and particularly in kaolinite where Ti is as free-oxide at *ca.* 86%⁴⁶. This high amount of TiO_2 NPs in kaolinite is also verified here as *ca.* 3 times more TiO_2 NPs are detected in KGa-2 compared to STx-1b. Surprisingly, a last cluster is displayed in KGa-2, still with Si – Al – Ti – Fe signature but with unexpected molar fractions (0.66 ± 0.06 – 0.33 ± 0.07 – 0.009 ± 0.021 – 0.004 ± 0.005 , respectively). These NPs can be considered as “real” NPs and the existence of this unexpected population is principally due to the clustering methodology. Indeed, as previously mentioned, using HAC, data are merged based on their similarities until a certain distance threshold. One limitation of this methodology is the fact that this threshold is arbitrarily set by the user. In our case, d_t was fixed at 3 as determined using model NPs. However, by increasing the threshold, both clusters having Si – Al – Ti – Fe signature are gathered and the theoretical molar fraction of the kaolinite is preserved (*i.e.* Si = 0.55 ± 0.10 and Al = 0.44 ± 0.09 followed by molar fraction < 0.01 for Ti and Fe). Consequently, this demonstrates for the first time that natural NPs can be individually fully characterized using spICP-ToF-MS coupled to hierarchical agglomerative clustering.

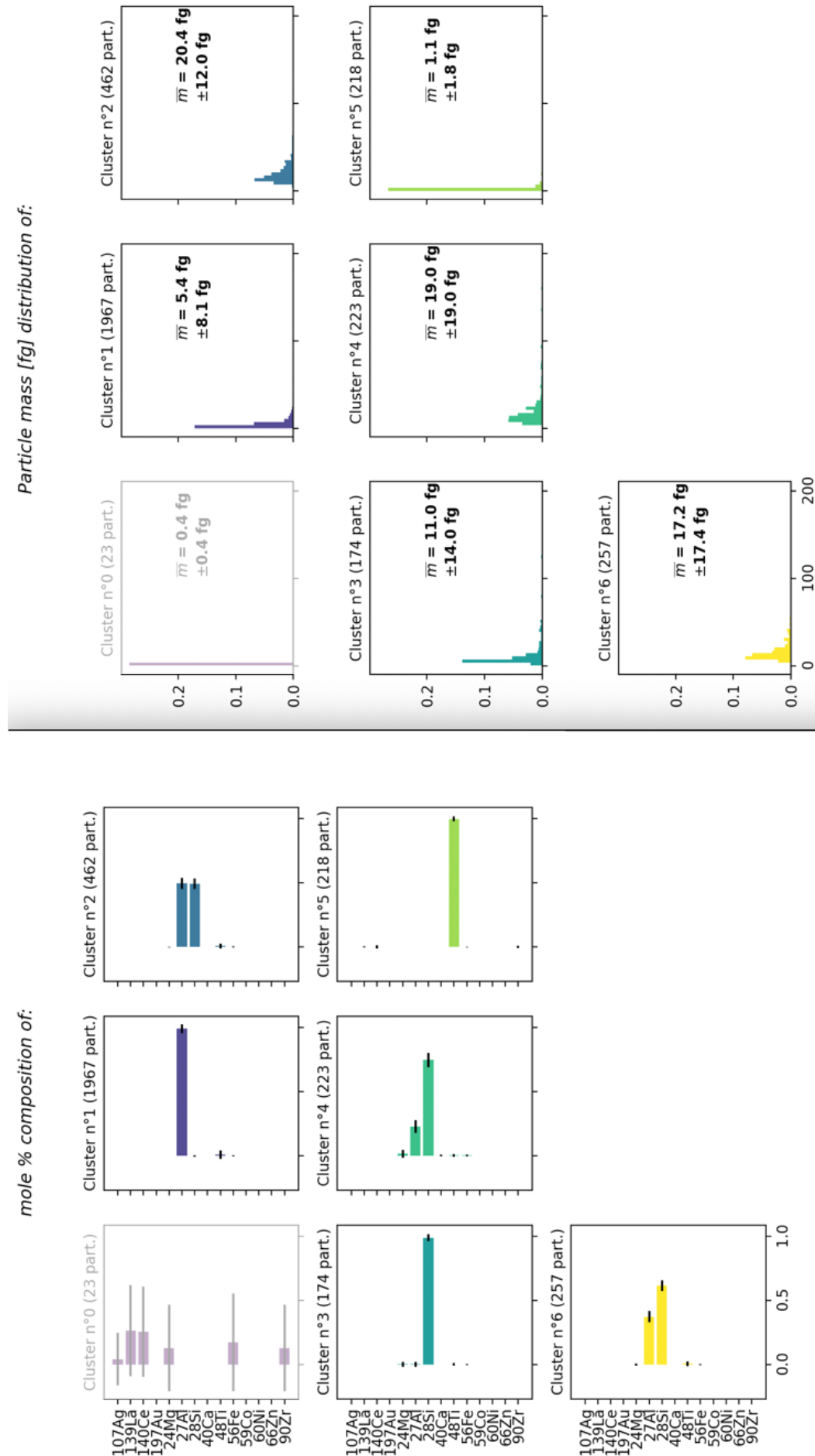


Figure 56: Summary of the hierarchical agglomerative clustering on spICP-ToF-MS data of the mixture of natural NPs. Molar fractions and particle mass distributions of individual clusters are displayed. The cluster with an unexpected composition is purposely dimed to facilitate the understanding of the manuscript

Previous results for model NPs have shown that the here described methodology coupling spICP-ToF-MS analysis with hierarchical agglomerative clustering is reliable for determining the NPs fingerprint individually as well as distinguishing them when mixed together. Furthermore, this methodology has also been proved to be effective for the characterization of individual natural NPs. Thus, in the following section, NNPs mixed together are analyzed using spICP-ToF-MS. Results are then processed using the HAC approach with d_i still set to 3. As displayed in Figure 56, an unexpected cluster is still identified and is thus still purposely omitted in the following discussion. As for the mixture of model NPs, our methodology perfectly preserves the molar fractions of each individual cluster/NP population. Indeed, the three (nearly-)pure NPs (*i.e.* Al_2O_3 , SiO_2 and TiO_2 with the major element molar fraction *ca.* 0.99 ± 0.02) are still identified. Additionally, major clusters of KGa-2 and STx-1b composed of Si – Al – Fe – Ti and Si – Al – Mg – Fe – Ca – Ti respectively, likewise the previously named “unexpected cluster” in KGa-2 with Si – Al – Fe – Ti signature in wrong proportions are displayed with well-maintained molar fractions. Thus, even for mixture of NNPs, our methodology is able to distinguish NPs population, accurately establish their elemental fingerprint as well as correctly determine their mass distribution (Figure 56).

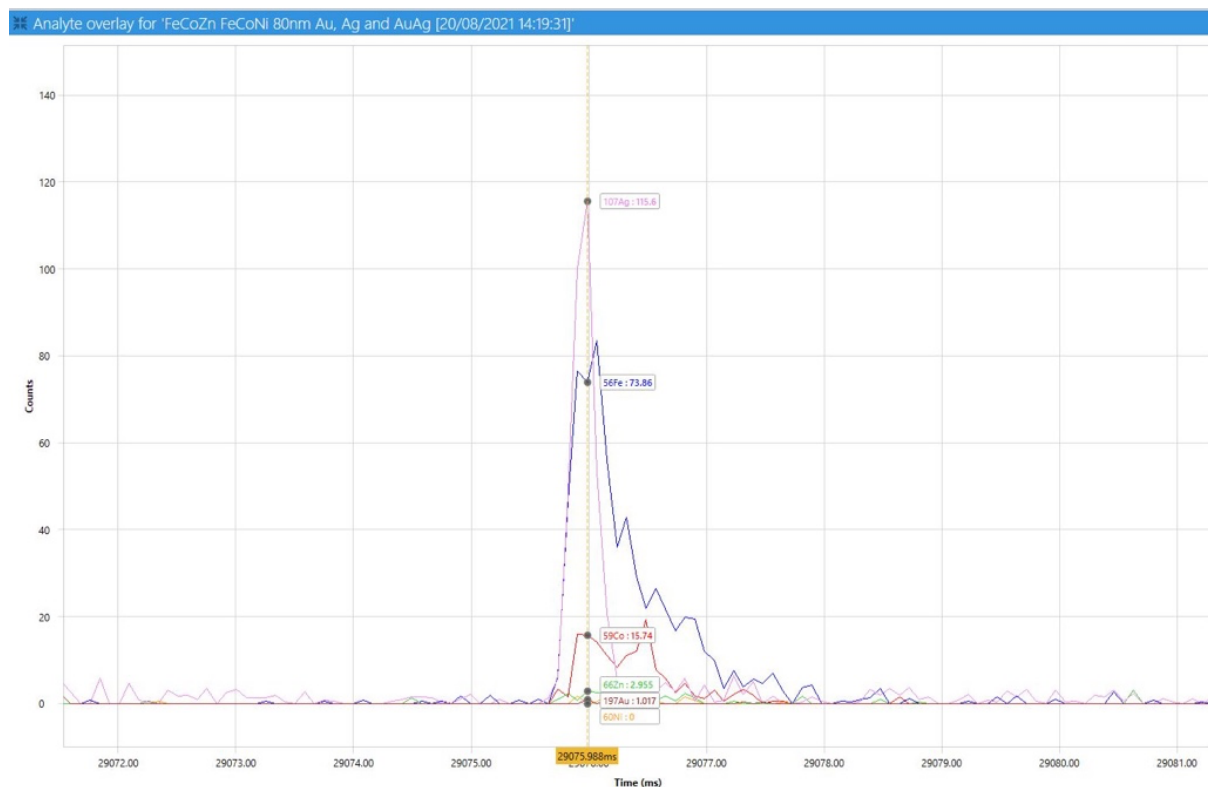
6. Conclusion.

We hereby successfully analyzed model as well as natural NPs using an ICP-ToF-MS in single particle mode and processed the data using an HAC approach. Thanks to this methodology, we fully determined the elemental fingerprint of these NPs alone and mixed together with very good precision and accuracy. STEM analysis realized in this study as well as μ -Raman spectroscopy from another one⁴⁶ were used to confirm the results. However, results were mainly confirmed on the qualitative side (*i.e.* bi- or tri-metallic composition of the model NPs and presence of TiO₂ in the kaolinite). These techniques do not offer the possibility to combine the NP mass distribution with the elemental signature on thousands of NPs in a reasonable amount of time. Although, mineralogical characterization such as with X-ray diffraction could have been useful to identify the different populations, the NP mass distribution would still be missing.

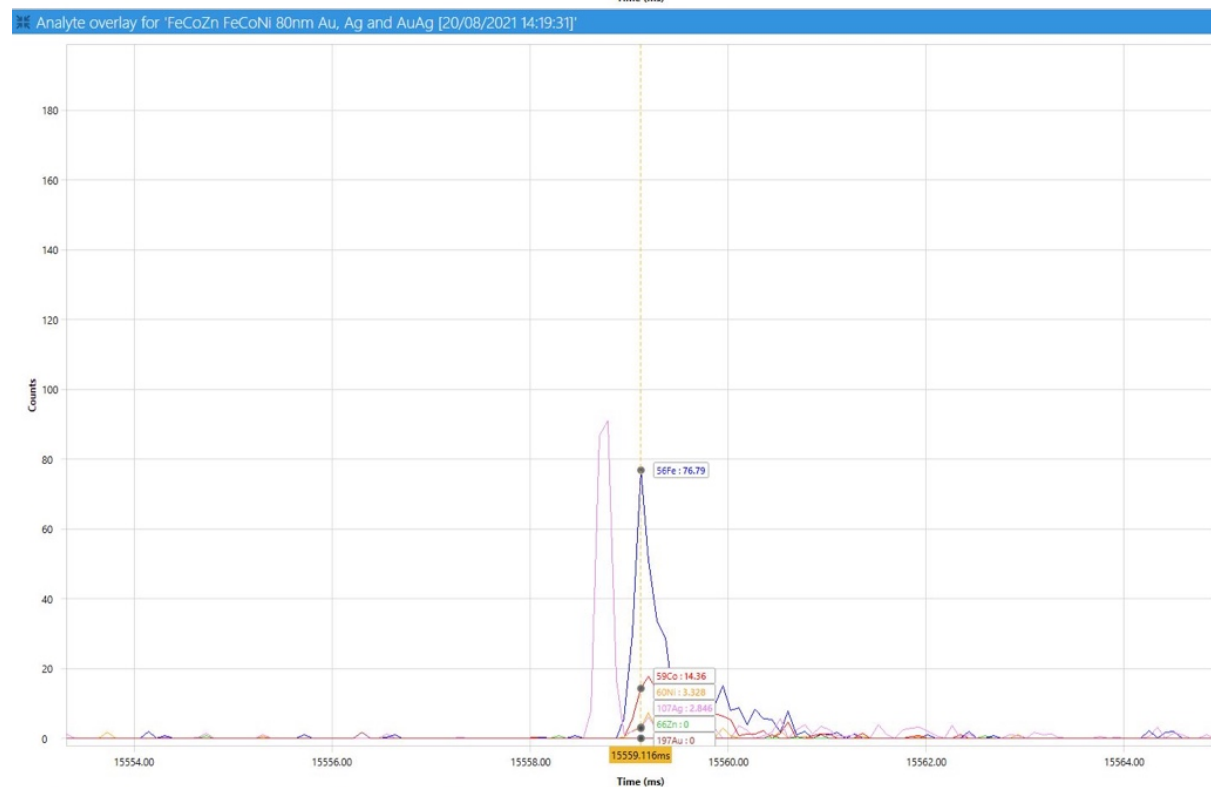
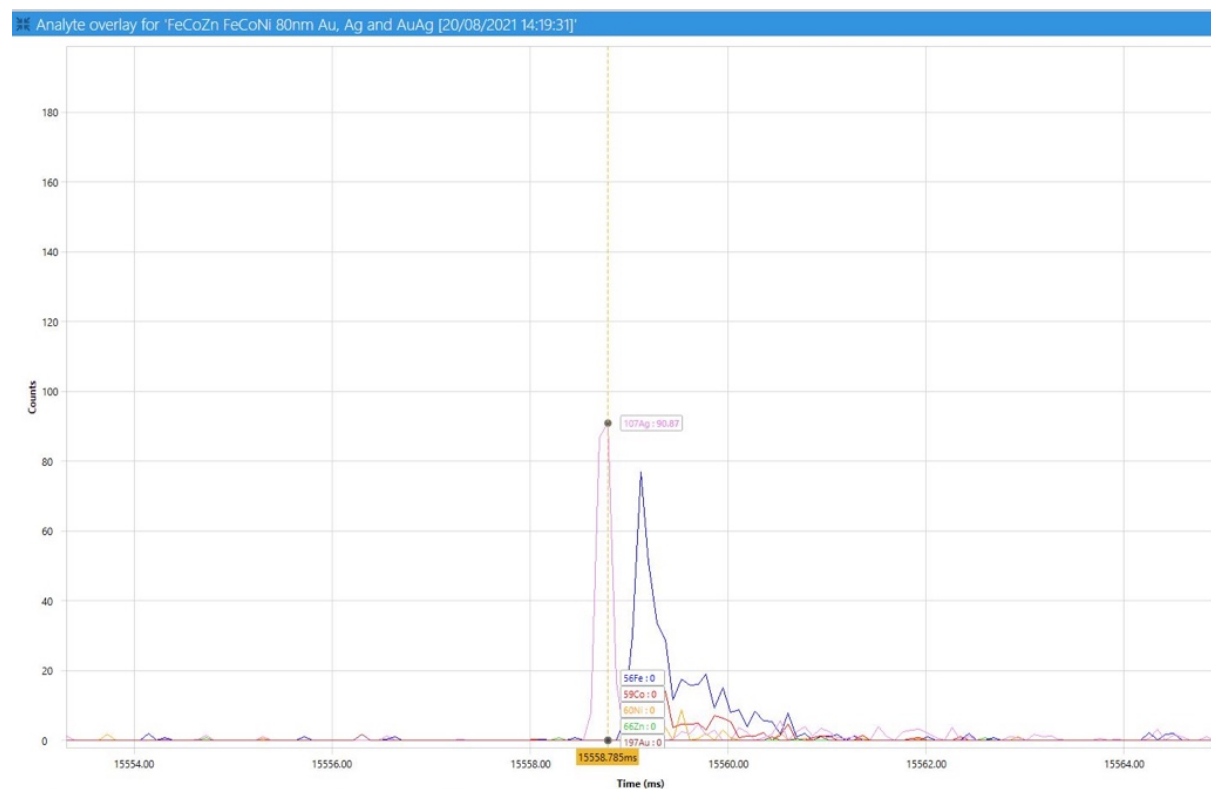
We provide here information about well-known engineered and natural NPs. This work is a starting point to better identify/classify NP populations in the future. Experiments on a variety of NP populations, must be performed before assuming the origin of NPs. Therefore, along with needed studies of natural environments, future studies must also focus on supplying more information about model (*i.e.* engineered) as well as natural NPs either alone or mixed together. By then comparing such studies with unknown samples, the identification, origin and potential transformations of NPs can more easily be identified.

From the analytical point of view, in order to increase reliability of the hierarchical clustering, the automatic determination of the distance threshold should be improved as this is the starting point of the grouping of NPs based on their similarities. Indeed, HAC miscomputation can obviously lead to misinterpretation of spICP-ToF-MS data. Additionally, as demonstrated here while very powerful for relatively large particles (*i.e.* > 40 nm) for which the mass of each element is above the M_{\min} , traces can be more difficult to detect, limiting the understanding of the environment studied. Moreover, differentiating natural from engineered particles goes through the detection of elemental impurities within the NPs. Hence, manufacturers should continue to work on the development of more efficient ion extraction and/or detection systems.

7. Appendix



Appendix 1: Screenshot of a spICP-ToF-MS chromatogram of the multi-NP mixture. Example of a multi-metallic event demonstrating hetero-aggregation within the mixture



Appendix 2: Screenshots of spICP-ToF-MS chromatograms of the multi-NP mixture. Examples of a multi-metallic event demonstrating an overlap between pure Ag and Fe-Co-Ni peaks (i.e. coincidence). This leads to consider these two not well separated peaks as a single peak during the data treatment in NuQuant

8. References

1. A. Gondikas, F. von der Kammer, R. Kaegi, O. Borovinskaya, E. Neubauer, J. Navratilova, A. Praetorius, G. Cornelis and T. Hofmann, *Environmental Science: Nano*, 2018, **5**, 313-326.
2. K. Phalyvong, Y. Sivry, H. Pauwels, A. Gélabert, M. Tharaud, G. Wille, X. Bourrat and M. F. Benedetti, *Frontiers in Environmental Science*, 2020, **8**.
3. D. L. Slomberg, M. Auffan, N. Guéniche, B. Angeletti, A. Campos, D. Borschneck, O. Aguerre-Chariol and J. Rose, *Frontiers in Environmental Science*, 2020, **8**, 76.
4. C. Degueldre and P. Y. Favarger, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003, **217**, 137-142.
5. C. Degueldre and P. Y. Favarger, *Talanta*, 2004, **62**, 1051-1054.
6. C. Degueldre, P. Y. Favarger and C. Bitea, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **518**, 137-142.
7. C. Degueldre, P. Y. Favarger and S. Wold, *Analytica Chimica Acta*, 2006, **555**, 263-268.
8. C. Degueldre, P. Y. Favarger, R. Rossé and S. Wold, *Talanta*, 2006, **68**, 623-628.
9. H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Analytical chemistry*, 2011, **83**, 9361-9369.
10. M. Tharaud, A. P. Gondikas, M. F. Benedetti, F. von der Kammer, T. Hofmann and G. Cornelis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2017, **32**, 1400-1411.
11. T. Hirata, S. Yamashita, M. Ishida and T. Suzuki, *Mass Spectrometry*, 2020, **9**, A0085-A0085.
12. M. Montano, H. Badiei, S. Bazargan and J. Ranville, *Environmental Science: Nano*, 2014, **1**, 338-346.
13. M. D. Montaña, J. W. Olesik, A. G. Barber, K. Challis and J. F. Ranville, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2016, **408**, 5053-5074.
14. M. Guilhaus, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2000, **55**, 1511-1525.
15. V. Lai and C. Tan, 2019.
16. F. Rundo, F. Trenta, A. L. di Stallo and S. Battiato, *Applied Sciences*, 2019, **9**, 5574.
17. D. E. Jones, H. Ghandehari and J. C. Facelli, *Computer methods and programs in biomedicine*, 2016, **132**, 93-103.
18. Y.-C. Huang, H.-H. Chung, E. P. Dutkiewicz, C.-L. Chen, H.-Y. Hsieh, B.-R. Chen, M.-Y. Wang and C.-C. Hsu, *Analytical Chemistry*, 2020, **92**, 1653-1657.
19. W. Gardner, A. L. Hook, M. R. Alexander, D. Ballabio, S. M. Cutts, B. W. Muir and P. J. Pigram, *Analytical Chemistry*, 2020, **92**, 6587-6597.
20. G. H. Yamashita, M. J. Anzanello, F. Soares, M. K. Rocha, F. S. Fogliatto, N. P. Rodrigues, E. Rodrigues, P. G. Celso, V. Manfroi and P. F. Hertz, *Food Control*, 2019, **106**, 106737.
21. C. N. Silla and A. A. Freitas, *Data Mining and Knowledge Discovery*, 2011, **22**, 31-72.
22. K. Drab and M. Daszykowski, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2014, **97**, 29-38.
23. V. Cohen-addad, V. Kanade, F. Mallmann-trenn and C. Mathieu, *J. ACM*, 2019, **66**, Article 26.

24. A. Praetorius, A. Gundlach-Graham, E. Goldberg, W. Fabienke, J. Navratilova, A. Gondikas, R. Kaegi, D. Günther, T. Hofmann and F. von der Kammer, *Environmental Science: Nano*, 2017, **4**, 307-314.
25. K. Mehrabi, D. Günther and A. Gundlach-Graham, *Environmental Science: Nano*, 2019, **6**, 3349-3358.
26. A. Azimzada, J. M. Farner, I. Jreije, M. Hadioui, C. Liu-Kang, N. Tufenkji, P. Shaw and K. J. Wilkinson, *Frontiers in Environmental Science*, 2020, **8**.
27. F. Loosli, J. Wang, S. Rothenberg, M. Bizimis, C. Winkler, O. Borovinskaya, L. Flamigni and M. Baalousha, *Environmental Science: Nano*, 2019, **6**, 763-777.
28. A. Azimzada, I. Jreije, M. Hadioui, P. Shaw, J. M. Farner and K. J. Wilkinson, *Environmental Science & Technology*, 2021.
29. K. Mehrabi, R. Kaegi, D. Günther and A. Gundlach-Graham, *Environmental Science: Nano*, 2021, **8**, 1211-1225.
30. M. Baalousha, J. Wang, M. Erfani and E. Goharian, *Science of The Total Environment*, 2021, **792**, 148426.
31. N. Janot, P. E. Reiller, X. Zheng, J.-P. Croué and M. F. Benedetti, *Water Research*, 2012, **46**, 731-740.
32. J. Li, N. Menguy, C. Gatel, V. Boureau, E. Snoeck, G. Patriarche, E. Leroy and Y. Pan, *Journal of The Royal Society Interface*, 2015, **12**, 20141288.
33. J. Li, N. Menguy, M.-A. Arrio, P. Sainctavit, A. Juhin, Y. Wang, H. Chen, O. Bunau, E. Otero, P. Ohresser and Y. Pan, *Journal of The Royal Society Interface*, 2016, **13**, 20160355.
34. P. Shaw and A. Donard, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2016, **31**, 1234-1242.
35. P. Govender and V. Sivakumar, *Atmospheric Pollution Research*, 2020, **11**, 40-56.
36. S. Lee, X. Bi, R. B. Reed, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Environmental science & technology*, 2014, **48**, 10291-10300.
37. A. R. Donovan, C. D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz and H. Shi, *Chemosphere*, 2016, **144**, 148-153.
38. L. Fréchette-Viens, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Talanta*, 2017, **163**, 121-126.
39. O. Borovinskaya, B. Hattendorf, M. Tanner, S. Gschwind and D. Günther, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2013, **28**, 226-233.
40. O. Borovinskaya, S. Gschwind, B. Hattendorf, M. Tanner and D. Günther, *Analytical chemistry*, 2014, **86**, 8142-8148.
41. M. Tharaud, P. Louvat and M. F. Benedetti, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, **413**, 923-933.
42. A. Rua-Ibarz, E. Bolea-Fernandez, G. Pozo, X. Dominguez-Benetton, F. Vanhaecke and K. Tirez, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2020, **35**, 2023-2032.
43. Y. Dan, H. Shi, C. Stephan and X. Liang, *Microchemical Journal*, 2015, **122**, 119-126.

44. M. D. Montaña, B. J. Majestic, Å. K. Jämting, P. Westerhoff and J. F. Ranville, *Analytical chemistry*, 2016, **88**, 4733-4741.
45. R. Krishnamoorthy and S. SreedharKumar, 2012.
46. S. Shoval, G. Panczer and M. Boudeulle, *Optical Materials*, 2008, **30**, 1699-1705.

- **CONCLUSION & PERSPECTIVES**

Table des matières

1.	CONCLUSION	- 175 -
1.1.	<i>Objectifs</i>	- 175 -
1.2.	<i>Synthèse</i>	- 175 -
2.	PERSPECTIVES	- 179 -
2.1.	<i>Analytiques et méthodologiques</i>	- 179 -
2.2.	<i>Biogéochimiques</i>	- 182 -
3.	BIBLIOGRAPHIE	- 185 -

1. Conclusion

1.1. Objectifs

Les objectifs de cette thèse étaient donc de lever les verrous analytiques faisant obstacles à une interprétation biogéochimique robuste des résultats spICP-MS. De nouvelles alternatives pour une version 2.0 de la spICP-MS sont proposées. La démarche adoptée consiste en la mise en œuvre séquentielle d'outils et de méthodes :

- i/ le comptage de NPs par spectrométrie de masse en mode particule unique (spICP-MS) à l'aide d'un spectromètre de masse à haute-résolution (HR-ICP-MS) permettant la résolution d'interférence et améliorant les limites de détection
- ii/ l'utilisation d'une technique originale d'injection directe des NPs dans le plasma permettant de s'abstenir de quantifier les pertes liées au système d'introduction
- iii/ le développement d'une nouvelle approche pour le traitement des signaux facilitant la distinction entre le signal de l'élément sous forme « ionique » de celui sous forme « nanoparticulaire »
- iv/ l'acquisition du signal à l'aide d'un spectromètre de masse à temps de vol (ICP-ToF-MS) couplé à du clustering hiérarchique (HAC), permettant une analyse multi-élémentaire à haute fréquence et favorisant l'identification des NPs dans des échantillons naturels.

1.2. Synthèse

Le Chapitre I est axé sur la mesure des TiO₂-NPs dans des matrices riches en calcium. La particularité de cette étude est que l'isotope majoritaire du Ti, le ⁴⁸Ti, qui produit un signal plus important que les autres isotopes minoritaires, le ⁴⁷Ti ou le ⁴⁹Ti, est interféré par un isotope minoritaire du Ca, le ⁴⁸Ca. Dans des échantillons naturels provenant d'eaux de surface par exemple, la concentration en Ca est généralement supérieure à 10 mg L⁻¹ noyant ainsi le signal du Ti au $m/z = 48$. Les études précédentes se basaient donc sur la mesure d'un isotope minoritaire du Ti ayant pour conséquence d'augmenter le diamètre minimum détectable ou limite de détection en taille (D_{min}). Pour diminuer le signal « ionique » provenant du ⁴⁸Ca, plusieurs approches expérimentales ont été testées *via* l'utilisation d'un HR-ICP-MS ou d'un ICP-MS/MS combiné à une cellule de réaction. Ces deux instruments ont permis une diminution du D_{min} dans des échantillons fortement concentrés en Ca.

L'HR-ICP-MS en mode particule unique (spHR-ICP-MS) a notamment permis de réaliser des mesures en deçà de 10 nm en combinant :

- la mesure de l'isotope ⁴⁸Ti au lieu de ⁴⁷Ti ou ⁴⁹Ti
- l'utilisation de la haute-résolution pour séparer le ⁴⁸Ti du ⁴⁸Ca

- l'application d'une méthode de déconvolution développée par Cornelis et Hasselöv (2014) ⁶ pour séparer le signal véritablement « nanoparticulaire » du fond résiduel du ⁴⁸Ca lorsque les concentrations en Ca sont au-delà de 50 mg L⁻¹.

Alternativement, pour les Ti-NPs supérieures à 64 nm, l'ICP-MS/MS en mode particule unique (spICP-MS/MS) peut être utilisé avec de l'ammoniac comme gaz de réaction. Cette approche résout la majorité de l'interférence ⁴⁸Ca sur le ⁴⁸Ti. Cependant la sensibilité de l'instrument est réduite par la nécessité d'introduire de l'hélium avec l'ammoniac, pour protéger l'équipement contre la corrosion. Dans un second temps, la même méthode de déconvolution est appliquée pour retirer le signal résiduel.

La méthodologie développée et validée dans cette étude permet donc de diminuer les limites de détection instrumentales. Cela offre ainsi la possibilité de détecter et caractériser les plus petites TiO₂-NPs qui sont notamment décrites comme étant les plus réactives/toxiques ⁷.

Le Chapitre II propose l'utilisation d'un système d'injection directe des NPs *via* le μ -*ddIHEN* initialement présenté par Louvat *et al.* (2019) ⁸. La mesure de la concentration et de la taille des nanoparticules (NP) par ICP-MS à particule unique (spICP-MS) nécessite généralement l'utilisation d'un matériau de référence NP pour déterminer la perte de NP et/ou d'ions pendant leur transport de la solution d'échantillon au système de détection. La détermination de cette perte est généralement englobée dans l'efficacité de transport, $\eta_{transport}$. Les pertes au sein du système d'introduction pouvant être variables en fonction notamment de la matrice étudiée, la nébulisation des NPs directement dans le plasma (sans chambre de nébulisation) est une alternative intéressante. Un système permettant la nébulisation des NPs directement dans le plasma, le μ -*ddIHEN*, a donc été utilisé dans cette étude. Les performances analytiques de notre système ont été évaluées à des débits compris entre 8 et 38 μ L min⁻¹. Il a tout d'abord été démontré que, pour des Au-NPs de 40 nm, des $\eta_{transport}$ très élevées étaient toujours atteintes, et passaient de 85 % à 38 μ L min⁻¹ à 100 % à 8 μ L min⁻¹. À ce bas débit d'introduction, des suspensions de NPs de référence de différentes tailles (10 à 80 nm) et compositions (Au-, Ag- et Pt-NPs) ont été analysées. Les tailles obtenues sont en parfait accord avec les tailles théoriques validant ainsi les performances de notre système μ -*ddIHEN* pour les mesures spICP-MS. Ces dernières mesures ont été réalisées sans avoir recours à un matériau de référence comme initialement présenté par Pace *et al.* (2011) ⁹. Seul un étalonnage externe à l'aide de solutions étalons de l'élément ciblé a été nécessaire. L'introduction de matrices de type environnemental (acides fulviques, carbonate de calcium et eau de Seine) n'ont pas altéré les performances du μ -*ddIHEN*. La répétabilité à long terme sur 12 heures et entre des séries de mesures espacées de 6 mois a également été étudiée. Les résultats montrent que de longues séries d'analyses sont possibles avec le μ -*ddIHEN*. De plus, ce système étant entièrement automatisé, la cadence de mesure n'est limitée que par la durée de la mesure spICP-MS.

Grâce à une efficacité de nébulisation, $\eta_{Nébulisation}$ égale à 100% due à l'injection directe des NPs dans le plasma, il a été démontré que dans la plupart des cas, le rapport de transmission, $\alpha_{Transmission}$, diffère entre les ions provenant de l'élément sous forme « ionique » et ceux provenant des NPs. Ainsi, une nouvelle méthodologie de calcul est proposée. Pour la 1^{ère} fois, elle distingue $\eta_{Transport}$ de $\eta_{Nébulisation}$ et permet de calculer de manière plus précise les tailles et les concentrations en nombre de NPs.

L'objectif du Chapitre III est de fournir une méthodologie robuste pour le traitement des données spICP-MS. A ce jour, plusieurs méthodologies sont disponibles pour traiter les données après les mesures spICP-MS. La déconvolution des signaux proposée par Cornelis et Hasselöv (2014)⁶ et utilisée dans le Chapitre I est l'une des plus abouties mais présente toujours le désavantage d'être en partie subjective. Afin de rendre plus objective la différenciation « ionique » – « nanoparticulaire », Bi et *al.* (2014)¹⁰ ont proposé l'utilisation de l'apprentissage machine et plus précisément le clustering par la méthode des k-moyennes ou k-means. Cette méthode s'est avérée intéressante mais n'offre pas la possibilité de séparer des populations qui se chevauchent. Or, dans le cadre d'étude sur les milieux naturels, la majorité des données spICP-MS montrent que le signal des NPs est confondu dans le signal ionique. La quasi-totalité des études utilisent également un système d'introduction conventionnel pour nébuliser les échantillons dans l'ICP-MS. En se basant sur les conclusions obtenues dans le précédent chapitre, cette étude se concentre tout d'abord sur le développement d'une procédure pour calculer directement et avec précision $\eta_{Transport}$ et $\eta_{Nébulisation}$ à l'aide d'une méthodologie robuste. Pour la première fois, ces efficacités sont également présentées avec leur incertitude respective calculée après propagation des incertitudes liées à chacune des étapes du calcul. En complément, une méthode de déconvolution des signaux basée sur un algorithme d'apprentissage machine est proposée pour la séparation des populations « ioniques » et « nanoparticulaires ». Le clustering grâce aux modèles de mélange gaussien (GMM) s'avère être très performant dans les cas étudiés. Couplé à la procédure décrite pour le calcul des efficacités, le GMM donne des résultats précis que les distributions soient ou non gaussiennes et/ou chevauchantes pour les NPs synthétiques. De plus, en traitant les données spICP-MS d'un échantillon d'eau naturelle d'une étude précédente portant sur l'argent, la concentration de ses populations « ioniques » et « nanoparticulaires » est déterminée avec précision. Tous les résultats après le regroupement sont en effet en bon accord avec les résultats de l'étude mentionnée.

La méthodologie proposée pour le traitement des données spICP-MS apparaît comme étant robuste et précise. Ceci devrait ainsi permettre une comparaison approfondie entre les études/résultats publiés.

Pour relever le défi de l'identification de l'origine des NPs, le Chapitre IV se concentre d'abord sur le développement d'une méthodologie robuste basée sur la mesure de NPs multi-métalliques modèles en utilisant un ICP-MS en temps de vol, ICP-ToF-MS. En mode particule unique (spICP-MS) un quadripole ou un secteur magnétique permet l'acquisition du signal d'un seul isotope en continu à des temps d'intégration (dwell-time) compris entre 10 μ s et 10 ms. Comme démontré dans les précédents chapitres, ces instruments se sont avérés particulièrement utiles pour étudier le nombre et la taille des NPs. La technique peut cependant encore être améliorée en utilisant un ICP-ToF-MS. Ce type d'instrument permet notamment d'enregistrer le signal de plusieurs éléments simultanément. En mode particule unique (spICP-ToF-MS), cela favorise ainsi la détermination des compositions multi-élémentaires de chaque NPs. Le spICP-ToF-MS permet donc d'obtenir des informations plus complètes et détaillées sur la population de NP dans l'échantillon par rapport aux méthodes ICP-MS mono-élémentaires conventionnelles. Un intérêt de l'utilisation d'une analyse spICP-MS multi-élémentaire réside dans son potentiel d'identification des NPs synthétiques ou naturelles. Une meilleure compréhension de l'origine et/ou de la transformation de celles-ci dans les systèmes naturels est ainsi envisageable. Dans cette étude, le signal de nanoparticules synthétiques de compositions élémentaires connues est dans un 1^{er} temps enregistré à l'aide d'un ICP-ToF-MS. A l'aide d'un étalonnage externe, cette analyse donne accès à la composition (multi-)élémentaire NP par NP. En complément de la distribution en taille, la dispersion des éléments au sein d'une même population de NPs est ainsi accessible. Une approche de post-traitement automatisé basée sur le clustering agglomératif hiérarchique (HAC) ¹¹ est ensuite appliquée lorsque celles-ci sont mélangées. Cette méthodologie innovante permet une identification robuste et précise des différents types de NPs présentes dans le mélange. Il est également possible d'observer une éventuelle agrégation entre celles-ci. Dans un 2nd temps, la méthode décrite est utilisée pour caractériser des analogues de NPs naturelles, à savoir un oxyde d'aluminium et deux minéraux argileux. L'analyse de ces analogues individuellement donne accès à leurs distributions en taille tout en mettant en évidence une hétérogénéité dans les compositions (multi-)élémentaires dans le cas des argiles. L'utilisation du HAC permet ensuite le regroupement des NPs par famille. Dans le cas où ces analogues sont mélangés, la méthodologie décrite permet de faire ressortir l'ensemble des populations observées précédemment tout déterminant précisément leur composition.

L'utilisation de la méthode spICP-ToF-MS développée ici suivie d'une analyse HAC pourrait être un point de départ pour faciliter l'interprétation et la compréhension de l'origine, du devenir et du comportement des populations de NPs dans les écosystèmes aquatiques.

2. Perspectives

2.1. Analytiques et méthodologiques

Les quatre études rassemblées dans cette thèse présentent individuellement des développements analytiques et méthodologiques en lien avec la détection et la caractérisation des NPs en milieu naturel. La 1^{ère} de ces études montre que la détection des TiO₂-NPs est maintenant possible à des tailles de l'ordre de la dizaine de nanomètres tandis que la 2^{ème} fiabilise la mesure spICP-MS à l'aide d'un système d'injection directe. Les deux études suivantes démontrent notamment que l'utilisation de l'apprentissage machine est le présent et l'avenir du traitement des données spICP-MS que ce soit pour de la caractérisation mono- ou multi-élémentaire.

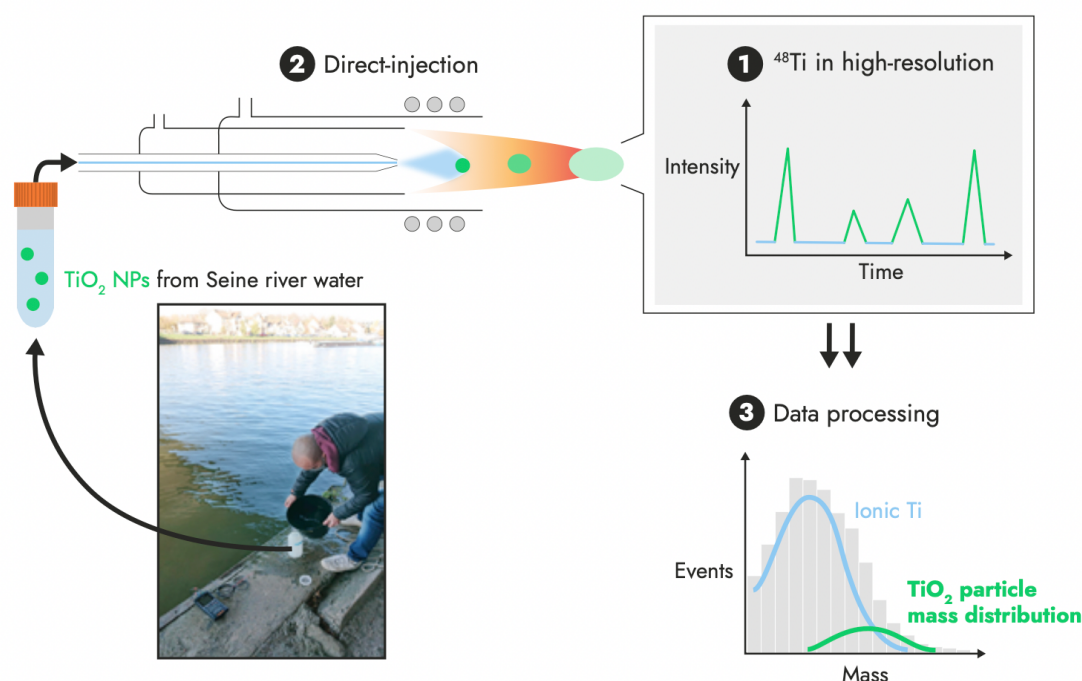


Figure 57: Schéma de synthèse des trois premiers chapitres pour une étude focalisée sur les TiO₂-NPs dans l'eau de Seine (crédit service communication IPGP, 2021)

Plusieurs études ont précédemment démontré que le suivi spatio-temporelle des concentrations en Ti-NPs était nécessaire pour comprendre l'impact de l'être humain sur la zone critique. Phalyvong et *al.* (2021)⁵ ont notamment mis en évidence un apport de ces NPs dans un bassin récréatif au bord de la Loire tandis que Reed et *al.* (2017)¹² ont montré une évolution temporelle de cette concentration dans un ruisseau du Colorado. L'étude de Wang et *al.* (2022)³ a quant à elle mis en lumière une évolution spatio-temporelle des flux en fonction de l'utilisation des sols et des périodes de l'année. Cependant, dans les trois cas, l'observation a été menée en enregistrant le signal du ⁴⁷Ti. Comme démontré cela a pour conséquence une augmentation du D_{min} et donc une limitation dans l'interprétation des résultats.

La 1^{ère} des perspectives proposées est synthétisée dans la Figure 57 avec pour exemple l'étude des TiO₂-NPs dans l'eau de Seine. Celle-ci présente notamment le couplage de la mesure du ⁴⁸Ti en haute-résolution à l'aide d'un HR-ICP-MS suite à l'introduction des échantillons directement dans le plasma grâce au μ -ddIHEN. Cette combinaison aura un double effet sur le D_{min} :

i/ en comparaison des études citées ci-dessus, la mesure du ⁴⁸Ti en haute-résolution permettra une 1^{ère} diminution du D_{min} du TiO₂ en présence de fortes concentrations de calcium, comme dans le cas de l'eau de Seine

ii/ la mesure à très bas débit permettra également de réduire le signal « ionique » (Ca + Ti) tout en maintenant le signal « nanoparticulaire » à son niveau initial, diminuant de nouveau le D_{min} et facilitant la distinction « ionique » vs NPs.

Dans le cas où un signal ionique résiduel subsisterait, les modèles de mélange gaussien (GMM) permettront d'isoler les populations l'une de l'autre et d'obtenir de manière robuste la concentration en nombre totale ainsi que la distribution granulométrique des TiO₂-NPs. En complément d'une meilleure discrimination « ionique » – NPs, la procédure automatisée développée pour le traitement des données spICP-MS sera bénéfique à l'inter-comparabilité des résultats. Lors d'une étude spatio-temporelle le signal ionique est susceptible d'évoluer. Il est donc nécessaire de déterminer expérimentalement ou d'évaluer approximativement celui-ci pour chaque échantillon de manière à l'appliquer à la méthode de traitement choisi. Alors que les méthodes s'appuyant sur la « n x sigma » ont montré leurs limites ^{1, 12}, Phalyvong et al. (2021) ⁵ ont par exemple proposé d'ultrafiltrer un échantillon témoin pour la détermination du signal ionique. Ils ont ensuite utilisé celui-ci pour la détermination de la concentration totale en nombre et de la distribution granulométrique des TiO₂-NPs dans tous les échantillons d'eau de Loire. Wang et al. (2022) ³ ont quant à eux ultrafiltré chacun des échantillons des trois ruisseaux observés au cours de l'année afin de soustraire le signal ionique au signal total. Alors que l'approche de ces derniers apparaît comme étant plus robuste et précise, l'impact sur le temps passé pour réaliser l'acquisition mais aussi le traitement des données apparaît comme considérable. Le GMM s'adaptant automatiquement au jeu de données, cette étape d'ultrafiltration ne sera plus obligatoire.

La 2^{nde} perspective proposée s'appuie sur l'analyse spICP-ToF-MS en injection directe conjuguée à l'application du clustering hiérarchique agglomératif (HAC) sur les résultats obtenus. Alors que l'utilisation combinée de la spICP-ToF-MS et du HAC permet l'identification des différentes populations de NPs, la sensibilité relativement faible de l'ICP-ToF-MS ne permet pas d'avoir accès à la composition des NPs les plus petites. La dynamique des détecteurs est cependant équivalente. Ainsi, à l'inverse d'un ICP-MS à secteur magnétique celui à temps de vol offre la possibilité de mesurer des tailles de NPs plus élevées. Il a été démontré dans le Chapitre II qu'au-delà un certain nombre d'ions et donc d'une certaine taille/masse le détecteur du HR-ICP-MS pouvait saturer. Cela empêche donc la détermination correcte des tailles/masses des NPs les plus grosses. De plus, au cours de la nébulisation, une ségrégation en taille des NPs est faite au sein du système d'introduction. En comparant les

concentrations obtenues par spICP-MS et par digestion totale, Wang et *al.* (2022)³ ont notamment rapporté que les bilans en masse de la phase (nano-)particulaire n'atteignaient pas les 100%. Ils ont attribué cette différence à la perte liée à la ségrégation des grosses particules dans le système d'introduction. La partie *Contexte scientifique* de cette thèse fait état de phénomènes d'agrégation dans les écosystèmes aquatiques. Il va donc de soi qu'au sein d'un échantillon prélevé en milieu naturel, en plus des NPs initialement volumineuses, une NP peut être agrégée à une ou plusieurs autre(s) ou bien adsorbée sur une phase minérale plus large. Ainsi, dans le cas d'une homo-agrégation, le signal produit sera plus intense et celui-ci sera relativement facile à détecter par ICP-ToF-MS. En revanche, comme dans le cas d'une hétéro-agrégation la masse de l'agrégat peut être suffisamment élevée pour que celui-ci ne puisse pas être transporté jusqu'au plasma. Cela représente donc une perte d'information. En couplant le μ -dDIHEN à l'ICP-ToF-MS cette perte sera évitée et la mesure de masses plus élevées qu'avec un HR-ICP-MS sera permise. Ce couplage favorisera notamment la compréhension du comportement des NPs en milieu naturel en obtenant la composition élémentaire des agrégats sur une large gamme de masse.

Ces deux perspectives sont évidemment complémentaires. La spHR-ICP-MS, du fait de l'utilisation d'un ICP-MS à secteur magnétique, présente la meilleure sensibilité mais ne permet qu'un suivi mono-élémentaire. La spICP-ToF-MS offre quant à elle une information plus complète sur la composition des NPs mais ses D_{min} sont relativement élevés. L'analyse en mode particule unique d'échantillons naturels à l'aide de ses deux instruments couplés à l'injection directe de l'échantillon et à l'apprentissage machine offrira une information encore plus complète dans une gamme de masse plus étendue.

2.2. Biogéochimiques

D'après Wang et al. (2022)³, au-delà des verrous liés aux instruments de mesure, un des obstacles à une meilleure compréhension de la biogéochimie des NPs est l'estimation des flux nanoparticulaire à grande échelle. Bien que cette étude ait en effet permis d'estimer les flux de NPs dans des petits bassins versants, celui de la Seine par exemple présente des contraintes plus importantes. Du point de vue de la surface, il est beaucoup plus vaste et la Seine possède de nombreux affluents. Du point de vue temporel et logistique, étudier l'origine, le devenir et le comportement des NPs dans un bassin versant comme celui-ci représenterait un travail considérable si l'étude était réalisée comme celle de Wang et al. (2022)³. Une alternative au prélèvement périodique est l'utilisation de dispositifs intégrant les masses de NPs transportées sur une certaine période de temps. Cela présente l'avantage d'intégrer des événements rares et intenses telles que les crues qu'une étude comme celle de Wang et al. (2022)³ n'a pas pu prendre en compte. Comme démontré par Galgani et al. (2014)¹³ les mollusques tels que les moules sont parmi les bio-indicateurs les plus appropriés pour les études de bio-surveillance. Ces organismes filtreurs sédentaires sont naturellement largement répartis géographiquement. Ils sont en particulier capables d'accumuler des niveaux élevés de contaminants tels que des métaux en proportion des concentrations ambiantes dans l'eau dans laquelle ils se trouvent. Par conséquent, les moules sont utilisées pour étudier les cycles des métaux traces dans les milieux aquatiques. Auclair et al. (2020)¹⁴ ont également montré que les moules d'eau douce sont capables d'accumuler des nanoparticules inorganiques lorsqu'elles y sont exposées. Elles pourraient ainsi être utilisées pour surveiller les flux de NPs grâce à la spICP-MS.

Le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) a été mis en place en 1974 par le Ministère chargé de l'Environnement (devenu Réseau d'Observation de la Contamination Chimique (ROCCh) en 2008). Son objectif est d'évaluer la contamination chimique du milieu marin littoral en portant sa priorité sur les organismes marins. Pour les mêmes raisons que précédemment expliqué, les mollusques bivalves telles que les moules et les huîtres sont utilisés comme bio-indicateurs quantitatifs de contamination. En France, environ 90 points de prélèvements (dont 9 dans les DOM) sont échantillonnés par les agents des laboratoires côtiers de l'IFREMER deux fois par an. La détermination des concentrations en éléments traces métalliques et d'autres contaminants organiques est effectuée au département Biogéochimie et Écotoxicologie du centre IFREMER de Nantes. En complément, un aliquote des échantillons est systématiquement conservée à l'abri de toute contamination pour d'éventuels contrôles *a posteriori* ou pour la recherche ultérieure d'autres contaminants.

En reprenant l'exemple des TiO₂-NPs, du fait de leurs propriétés intrinsèques, leur utilisation (39 000 tonnes produites en 2014) est grandissante, dans des domaines comme l'alimentation, les cosmétiques, etc... Ainsi, elles risquent très probablement d'être rejetées dans les écosystèmes aquatiques au cours de leurs cycle de vie. De ce fait, mesurer leurs concentrations en masse et en nombre dans des

échantillons à différentes périodes ainsi qu'à des endroits différents permettrait d'évaluer l'influence de l'augmentation de la production/utilisation au cours des précédentes années. Également, suite à leur rejet, les TiO₂-NPs vont *in fine* se retrouver mélangées aux NPs naturelles (NNPs) composées de Ti. En effet, celui-ci est naturellement présent dans les minéraux comme le rutile (TiO₂) et l'ilménite (FeTiO₃) dans les sols et les matières en suspension des rivières. Une différence notable entre les NNPs et les TiO₂-NPs manufacturées réside dans leur composition élémentaire. Au cours du procédé de fabrication, le titane utilisé est purifié et celui-ci est généralement enrobé d'une couche d'oxyde aluminium afin de le rendre plus stable¹⁵. *A contrario*, les NNPs devraient présenter une composition élémentaire en relation avec leur lieu de provenance. Ainsi, mesurer les différences de composition élémentaire dans les NPs individuellement permettrait de connaître de manière plus précise et fiable l'origine de celles-ci, de déterminer également leur proportion et ainsi d'asseoir les conclusions sur l'influence de l'augmentation de la production/utilisation sur le flux global aux estuaires. Pour ce faire, les méthodologies développées au cours de cette thèse ainsi que les perspectives analytiques présentées ci-dessus apparaissent comme des atouts majeurs.

Il reste cependant une contrainte qui est l'extraction des NPs incorporées dans les mollusques bivalves. Pour ce faire, des digestions alcalines^{16, 17} et enzymatiques^{18, 19} ont déjà été utilisées sur ces organismes aquatiques. Cependant, de tels protocoles incluent une étape de centrifugation/filtration, ce qui signifie que certaines NPs peuvent être perdues si elles sont volumineuses et/ou agrégées. De plus, les digestions enzymatiques impliquent généralement l'utilisation d'une sonde à ultrasons qui peut contaminer la solution en TiO₂-NPs. Wojcieszek et al. (2020)²⁰ ont notamment montré qu'entre 3 et 15 % de TiO₂-NPs sont perdus lors de l'étape de filtration quelle que soit la taille des pores de la membrane (entre 0,22 et 1,00 µm). Ils ont également mentionné que l'utilisation d'une sonde de sonication a été évitée dans leur étude puisqu'elle est faite de titane et qu'une quantité importante de TiO₂-NPs a été détectée dans les blancs. Une détermination plus robuste du nombre et de la taille des NPs repose donc sur un protocole sans sonication ni filtration. Une étude préliminaire sur des moules (Figure 58 a, b et c) non développée dans cette thèse montre que la dégradation des parties organiques de la moule par photolyse UV est possible à l'aide d'ajout d'H₂O₂ (Figure 58 d et e). Les solutions résultantes qui montrent des concentrations en carbone organique dissous inférieures à la limite de quantification ont ensuite été analysées par spHR-ICP-MS. Les résultats sont très encourageants après traitement des données à l'aide de la méthodologie développée dans le Chapitre III (Figure 58 f). Ce protocole nécessite désormais d'être validé à l'aide de matériaux de référence afin de mener à bien l'étude biogéochimique mentionnée dans ce paragraphe.

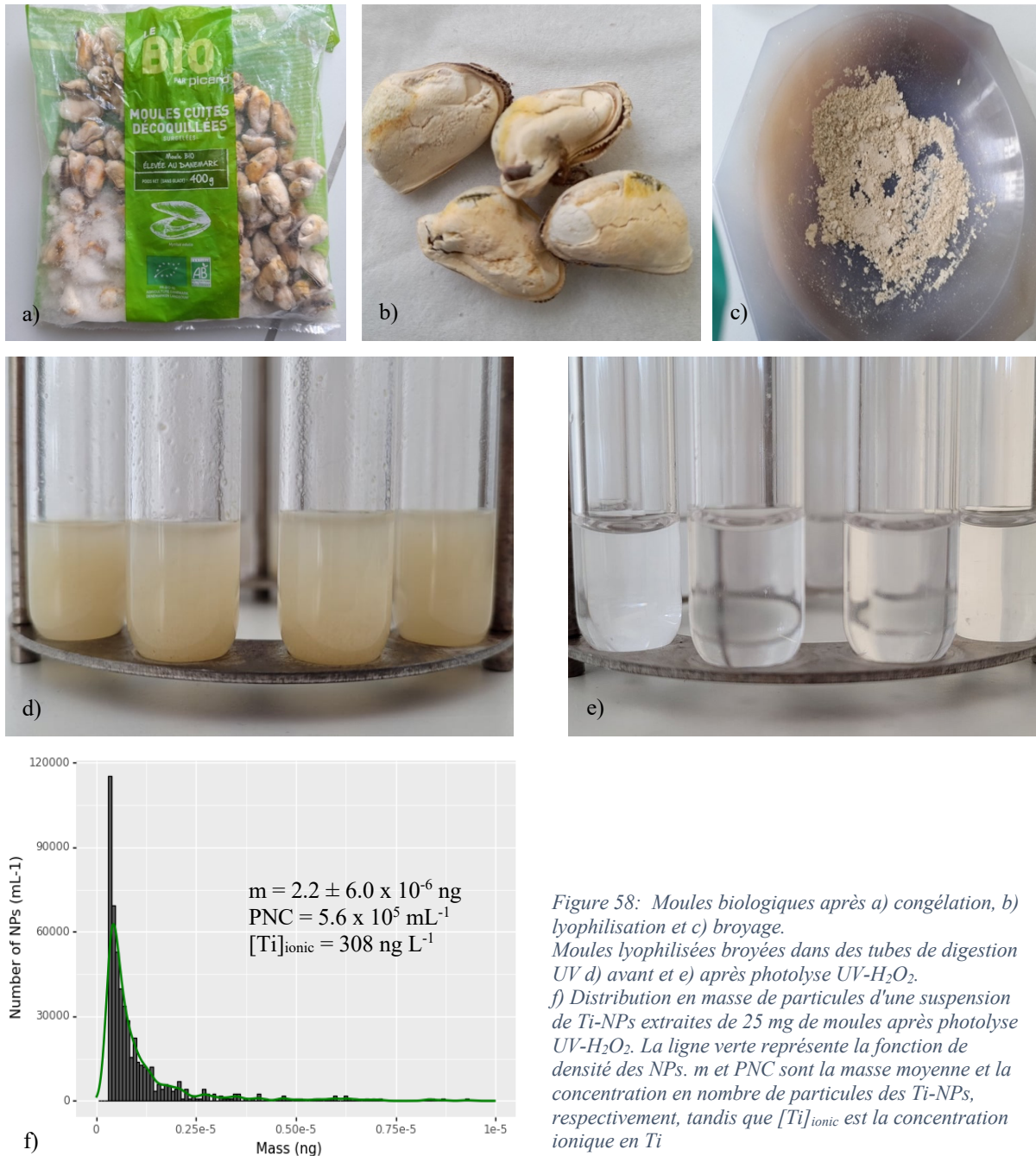


Figure 58: Moules biologiques après a) congélation, b) lyophilisation et c) broyage. Moules lyophilisées broyées dans des tubes de digestion UV d) avant et e) après photolyse UV-H₂O₂. f) Distribution en masse de particules d'une suspension de Ti-NPs extraites de 25 mg de moules après photolyse UV-H₂O₂. La ligne verte représente la fonction de densité des NPs. m et PNC sont la masse moyenne et la concentration en nombre de particules des Ti-NPs, respectivement, tandis que [Ti]_{ionic} est la concentration ionique en Ti

3. Bibliographie

1. A. P. Gondikas, F. v. d. Kammer, R. B. Reed, S. Wagner, J. F. Ranville and T. Hofmann, *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**, 5415-5422.
2. J.-L. Wang, E. Alasonati, M. Tharaud, A. Gelabert, P. Fiscaro and M. F. Benedetti, *Water Research*, 2020, **176**, 115722.
3. J.-L. Wang, E. Alasonati, P. Fiscaro and M. F. Benedetti, *Journal of Hazardous Materials*, 2022, **422**, 126695.
4. K. Phalyvong, Y. Sivry, H. Pauwels, A. Gélabert, M. Tharaud, G. Wille, X. Bourrat and M. F. Benedetti, *Frontiers in Environmental Science*, 2020, **8**.
5. K. Phalyvong, Y. Sivry, H. Pauwels, A. Gélabert, M. Tharaud, G. Wille, X. Bourrat, J. F. Ranville and M. F. Benedetti, *Frontiers in Environmental Science*, 2021.
6. G. Cornelis and M. Hassellöv, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, **29**, 134-144.
7. X. Lin, J. Li, S. Ma, G. Liu, K. Yang, M. Tong and D. Lin, *PloS one*, 2014, **9**, e110247.
8. P. Louvat, M. Tharaud, M. Buisson, C. Rollion-Bard and M. F. Benedetti, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2019, **34**, 1553-1563.
9. H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Analytical chemistry*, 2011, **83**, 9361-9369.
10. X. Bi, S. Lee, J. F. Ranville, P. Sattigeri, A. Spanias, P. Herckes and P. Westerhoff, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, **29**, 1630-1639.
11. K. Mehrabi, R. Kaegi, D. Günther and A. Gundlach-Graham, *Environmental Science: Nano*, 2021, **8**, 1211-1225.
12. R. Reed, D. Martin, A. Bednar, M. Montañó, P. Westerhoff and J. Ranville, *Environmental Science: Nano*, 2017, **4**, 69-77.
13. F. Galgani, J. F. Chiffolleau, M. Barraha, U. Drebiga, C. Tomasino and B. Andral, *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, **21**, 11331-11339.
14. J. Auclair, P. Turcotte, C. Gagnon, C. Peyrot, K. J. Wilkinson and F. Gagné, *Environments*, 2020, **7**, 109.
15. N. Serpone, D. Dondi and A. Albin, *Inorganica Chimica Acta*, 2007, **360**, 794-802.
16. A. Grasso, M. Ferrante, G. Arena, R. Salemi, P. Zuccarello, M. Fiore and C. Copat, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, **18**, 4076.
17. F. Gallochio, G. Biancotto, A. Moressa, F. Pascoli, T. Pretto, A. Toffan, G. Arcangeli, F. Montesi, R. Peters and A. Ricci, *Food Chemistry*, 2020, **323**, 126841.
18. M. V. Taboada-López, S. Iglesias-López, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Analytica chimica acta*, 2018, **1018**, 16-25.
19. M. V. Taboada-López, N. Alonso-Seijo, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Microchemical Journal*, 2019, **148**, 652-660.

20. J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, L. Ruzik, M. Asztemborska, M. Jarosz and J. Szpunar, *Frontiers in Environmental Science*, 2020.
21. D. Fattorini, A. Notti, R. Di Mento, A. M. Cicero, M. Gabellini, A. Russo and F. Regoli, *Chemosphere*, 2008, **72**, 1524-1533.
22. S. R. Sarathy and M. Mohseni, *Environmental Science & Technology*, 2007, **41**, 8315-8320.



Vers une version 2.0 de la spICP-MS pour mieux comprendre la biogéochimie des nanophasés dans l'environnement.

par Mickaël Tharaud

Résumé

De manière directe ou indirecte, l'être humain contribue à l'émission de contaminants naturels ou synthétiques dans l'environnement. Parmi ces contaminants, une famille émergente particulièrement réactive attire l'attention des scientifiques : les nanoparticules (NPs). Leur détection et leur caractérisation apparaissent donc essentielles pour une meilleure compréhension de leur impact biogéochimique au sein de la zone critique. Ces objectifs se heurtent cependant à des limitations technologiques. Cette thèse vise à lever les verrous analytiques et, de fait, biogéochimiques posés par la détection et la caractérisation de ces NPs dans les écosystèmes aquatiques. Les développements analytiques et méthodologiques présentés se sont appuyés sur la spectrométrie de masse à source plasma en mode particule unique (spICP-MS). Une version 2.0 reposant sur la mise en œuvre séquentielle d'outils et de méthodes est ainsi proposée.

L'utilisation d'un ICP-MS à haute-résolution permet la diminution significative des limites de détection pour les TiO₂-NPs et conduit à une détermination plus précise de leurs distributions granulométriques dans les écosystèmes aquatiques riches en calcium. La mise en place ultérieure d'un dispositif originale d'injection directe des NPs dans le plasma, le μ -dDIHEN, fiabilise la détermination de la taille et de la concentration en nombre des NPs à l'aide d'une méthodologie de calcul simplifiée. Le traitement des données spICP-MS au moyen de modèles de mélange gaussien (GMM) facilite ensuite la distinction entre le signal de l'élément sous forme dissoute et celui de l'élément sous forme nanoparticulaire. Enfin, l'acquisition du signal à l'aide d'un ICP-MS à temps de vol (ICP-ToF-MS) permet une analyse multi-élémentaire à haute fréquence qui, renforcée par du clustering hiérarchique (HAC), favorise la caractérisation et l'identification des NPs dans des échantillons naturels.

Mots-clés : zone critique, biogéochimie, nanoparticules, spICP-(ToF)-MS, μ -dDIHEN, apprentissage machine

Abstract

Human activities directly or indirectly contribute to the release of natural or synthetic contaminants into the environment. Among these contaminants, a particularly reactive and emerging family draws the attention of scientists: the nanoparticles (NPs). Their detection and characterization therefore appear to be essential for a better understanding of their biogeochemical impact within the critical zone. However, these objectives encounter technological limitations. This thesis addresses the analytical and, in fact, biogeochemical obstacles posed by the detection and characterization of these NPs in aquatic ecosystems. The analytical and methodological developments presented are based on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (spICP-MS). A version 2.0 based on the sequential implementation of tools and methods is thus proposed.

The use of a high-resolution ICP-MS allows the significant reduction of the detection limits for TiO₂-NPs and leads to a more precise determination of their particle size distributions in calcium-rich aquatic ecosystems. The subsequent implementation of an original device for direct injection of NPs into the plasma, the μ -dDIHEN, makes the determination of the size and number concentration of NPs more reliable thanks to a simplified calculation methodology. Processing of the spICP-MS data using Gaussian Mixture Models (GMM) then facilitates the distinction between the signal of the element in dissolved form and that of the element in nanoparticulate form. Finally, the acquisition of the signal using a time-of-flight ICP-MS (ICP-ToF-MS) enables high-frequency multi-element analysis which, reinforced by hierarchical clustering (HAC), promotes characterization and identification of NPs in natural samples.

Keywords : critical zone, biogeochemistry, nanoparticles, spICP-(ToF)-MS, μ -dDIHEN, machine learning