

TESIS DE LA UNIVERSIDAD
DE ZARAGOZA

2023

75

David Ojeda Asensio

Caracterización de partículas de óxidos mediante técnicas basadas en ICP-MS

Director/es

Bolea Morales, Eduardo
Pérez Arantegui, Josefina

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

ISSN 2254-7606



Premsas de la Universidad
Universidad Zaragoza

Tesis Doctoral

**CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS DE ÓXIDOS
MEDIANTE TÉCNICAS BASADAS EN ICP-MS**

Autor

David Ojeda Asensio

Director/es

Bolea Morales, Eduardo
Pérez Arantegui, Josefina

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AMBIENTALES DE ARAGÓN
GRUPO DE ESPECTROSCOPIA ANALÍTICA Y SENSORES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**CARACTERIZACIÓN DE
PARTÍCULAS DE ÓXIDOS
MEDIANTE TÉCNICAS BASADAS
EN ICP-MS**



**Universidad
Zaragoza**

**DAVID OJEDA ASENSIO
TESIS DOCTORAL 2021**



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza

D. Eduardo Bolea Morales, Profesor Titular de la Universidad de Zaragoza y Dña.
Josefina Pérez Arantegui, Profesora Titular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN

que la presente Memoria:

**“CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS DE ÓXIDOS MEDIANTE
TÉCNICAS BASADAS EN ICP-MS”,**

ha sido realizada bajo su dirección por D. David Ojeda Asensio en el Departamento de
Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, para optar
al título de Doctor en Ciencia Analítica en Química.

Y asimismo,

AUTORIZAN

la presentación de dicha Memoria para que sea defendida ante el Tribunal
correspondiente.

Zaragoza, 1 de octubre de 2021

Firmado: Eduardo Bolea

Firmado: Josefina Pérez

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los proyectos:

- CTQ2015-68094 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) de España: Plataformas nanométricas analíticas para la detección, caracterización y cuantificación de nanomateriales en muestras complejas.

- OUTBIOTICS. Tecnologías innovadoras para el diagnóstico, prevención y eliminación de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio POCTEFA (EFA 183/16). Programa Interreg V A España/Francia/Andorra.

- RTI2018-096111-B-100 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España y el Gobierno de Aragón (E29_17R), cofinanciado con fondos FEDER 2014-2020 “Construyendo Europa desde Aragón”.

Distintas partes de la presente Tesis Doctoral se han realizado en colaboración con las siguientes empresas, grupos de investigación y servicios de apoyo:

Laboratorios ENOSÁN S.L.

Instituto Tecnológico de Embalaje, Transporte y Logística (ITENE).

Grupo de Elementos Traza, Espectroscopía y Especiación (GETEE) de la Universidad de Santiago de Compostela.

Grupo de Agua y Salud Ambiental, del departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

Servicios de Análisis Químico y Microscopía Electrónica de Materiales del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza.

Me he dado cuenta de que, de forma más o menos consciente, he ido posponiendo la escritura de los agradecimientos y se han quedado prácticamente para el final. A las prisas irremediables por terminar la memoria se suman las pocas ganas que uno tiene de escribir después de tantas horas delante del ordenador. Sin embargo, no quería hacer un simple listado con las personas que me han apoyado durante todo este periodo. El que me conozca un poco sabe de mí dos cosas: uno, lo mucho que me gustan los relatos, y dos, que no tengo remedio. Así que me apetecía escribir dejando de lado toda esa prosa más técnica, al menos por un momento. De ahí ha surgido esta idea, no solo para mencionar a las personas que han compartido conmigo su día a día, sino para intentar dejar una imagen de lo que han significado para mí. Una imagen a la que poder recurrir en el futuro y tratar de recordar a sus integrantes con el mayor cariño posible, aunque no necesariamente con la máxima exactitud.

Ahí va.

Es día de medidas. Debería haber ciertos nervios, pero el sueño puede con todo. Subo las escaleras hacia el departamento y lo primero que me encuentro es a Pilar con su carro. «¡Hombre, David! ¡Buenos días! Qué pronto has venido hoy», dice a grito pelado. Casi ni me sale la voz de la garganta, pero consigo farfullar algo. Si quedaba alguien en todo el edificio sin saber que había llegado, ella se encarga de despejar cualquier duda. Trato de huir de más comentarios y me meto corriendo en el laboratorio de espectroscopía atómica. Allí está la poli: Cecilia y Ana Christine. Ambas se giran a la vez y dicen al unísono: «¿Qué horas son estas? ¿No ibas a madrugar para medir?», mientras niegan con la cabeza. Me tienen fichado en sus archivos policiales: conocen mis horarios, mis resultados (tampoco es muy difícil esta parte), mis gustos personales, lo que acabo de desayunar... Todo. En teoría, debería haber una poli buena y otra mala, pero no sé si este es el caso, así que en mi cabeza son Poli I y Poli II. Poli I enseguida se cansa de mí y vuelve a hacer cosas con sus plásticos y a maldecir por lo bajo (supongo que recordando algún regalo del amigo invisible, pobre) en un idioma que parece francés, pero vete a saber. Poli II me sigue mirando con su “cara de reposo”. Mal asunto. Será que no ha almorzado todavía y/o que sus vecinos no la han dejado dormir. Y dice que un año fue Maja en su pueblo... No me gustaría conocer al resto.

Me escabullo al siguiente laboratorio, el de preparación de muestras. Por algún motivo, allí mandan a los casos perdidos, como Laura (que ya nos podría hacer una visita, pues nos cansamos de ir a Girona), Huracán Bianca (con su pelo verde de comer tanta espinaca) o Estéfano. Ahora está desierto, pero siempre que paso por allí me vienen recuerdos del chico italiano diciendo que tiene hambre y que su nombre no es Estéfano, sino Sebastiano. Si lo sabré yo... Todavía puedo oír sus gritos con el AF4: «¡Ayudo!».

Un sonido me saca de mis pensamientos. Parece que alguien está torturando gatos en el laboratorio de electroquímica. Me asomo preocupado; nunca se sabe cuándo un felino puede necesitar ayuda, pero compruebo que solo es mi sosia, Dea, que está cantando no sé qué bolero, aislada con sus auriculares. Le digo en perfecto castellano antiguo: «Qué bolá», pero no me contesta. «¡Qué bolá!», repito. «Ay mijo, no grites que no estoy sorda. A ver cuándo me llevas al cine que han sacado un nuevo ciclo de pelis cubanas contempo...» Apenas termino de oír la frase. Estoy dispuesto a atacar y a analizar muestras durante cuatro meses seguidos sin descanso, pero lo del cine cubano es otra historia. Todo el mundo tiene sus límites.

Me apresuro a salir de nuevo al pasillo. No hay nadie. Suspiro y sigo caminando hasta el final, en dirección al laboratorio de separación: ese al que nadie acude porque no pilla a mano de nada y en el que diez meses al año te hielas de frío y el resto parece que estás en una sauna. Según abro la puerta noto que algo me atenaza. Mis brazos se pegan a la cintura de forma antinatural y no los puedo mover. La circulación deja de fluir por mi cuerpo, la presión se va acumulando en mis sienes y me cuesta respirar. Logro mirar hacia abajo. La versión 2.0 de Khaoula me ha atrapado en uno de sus mortíferos abrazos. Si mi mente aún estaba un poco adormilada, todo es sacudido por una sensación de pánico. Por suerte, hoy no es el día en que abraza tanto a una persona que logra implosionarla. Oigo una risa exaltada, como la de una muchacha de apenas doce años, y veo que Khaoula se aleja dando saltos. Me relajo. Ella se gira, sonrío y me dice: «Hoy estoy triste». Pues menos mal...

Falta la otra chica, la rancia. Aunque me imagino dónde está, o, mejor dicho, en cuántos lugares está, porque anda tan deprisa que es capaz de estar presente de forma simultánea en sus tres sitios favoritos: las balanzas, el ICP y toda la zona del pasillo. Y justo cuando abras una puerta te la encontrarás de frente, se asustará y te echará la culpa. Pero si es cosa suya, que se tropieza con todo. Eso sí, nunca se cae. O, al menos, eso asegura ella.

Me duele reconocerlo, pero me alegro de verlas y comprobar que siguen ahí, en el laboratorio de separación. Por unos meses, fue realmente “de separación” y estaba solo casi todo el día. La vida era más sencilla entonces. Recuerdo que a veces venía gente como Dani, mi primer compañero y dj particular, el doctor Carlos con sus historias... vamos a decir peculiares. También estaba Vanessa, esa chica que invadió mi escritorio sin preguntar e insinuaba, sin ningún tipo de pudor, que mi acento gallego era penoso. Normal que no le contara los secretos de AF4 y le hiciera alargar las sesiones de trabajo de forma innecesaria. Le debió de gustar Zaragoza, porque vino dos veces de estancia, aunque nunca lo admitiré.

Por fin consigo preparar mis muestras y voy con las gradillas llenas de tubos. Conforme salgo y me dirijo al ICP, me voy fijando en los despachos que quedan a mi izquierda. El primero que veo es el de Sierra. Recuerdo que al principio parecía una mujer distante, pero es de las que engaña. Teresa directamente no lleva a engaño. Ese tándem maravilloso que forman y que se descubre con el paso del tiempo y de los congresos es difícil de olvidar. Siempre quedará en mi memoria cuando pidieron una canción de Manolo Escobar en una Plasma Party (y si la fiesta no se llamaba así, debería hacerlo). Después está el despacho de Josefina. Buenas sesiones de microscopía nos hemos pegado en el CPS y en alguna de ellas buscando una aguja en un pajar, literalmente. Pero si en algo he de agradecerle su trabajo (mucho) y esfuerzo (todavía más) ha sido en la parte final de la Tesis. Sin ella todo habría salido bastante peor y le agradezco mucho su paciencia para corregirme todas las comas (sé que cuando esté leyendo estas líneas se horrorizará al ver que sigo poniéndolas mal. Lo siento mucho). Un poco más adelante se sitúa el despacho de Paco, el jefe del grupo. Admiro su capacidad para estar en veinte mil historias a la vez y sacarlas adelante. Una mente a otro nivel. Para entrar en su despacho dicen que hay una lista de espera de cuatro meses y medio, en parte por culpa de Poli I y de Poli II, que lo tienen monopolizado. Más adelante está entreabierta la puerta de Eduardo, pero decido no molestarle. Todavía no.

Entro en el laboratorio del Servicio de Análisis. Allí están Ana, Maite y Teresa, que al verme con las muestras se quedan quietas y me miran fijamente. La atmosfera se ha paralizado en el interior; incluso un tubo que estaban preparando rueda sobre la poyata y cae al suelo, pero nadie reacciona. «No, tranquilas. Hoy vengo a medir. Ya no tengo que hacer más ataques», les digo. Entonces sonrían, me saludan y el aire vuelve a circular por el laboratorio. El trabajo que les he dado a estas tres mujeres no lo sabe

nadie y me siento muy en deuda con ellas. Solo hay una persona que les complique la vida más que yo, y esa es Mariam (anteriormente mencionada como la rancia). Mi compañera de “ataúges”. Ella también está por el ICP, aunque no le toque medir, porque no puede o no sabe estar quieta. La cosa no ha salido tan mal con ella, teniendo en cuenta cómo empezaron las cosas: archivos borrados, pronunciaciones incorrectas de nombres, ciudadelas de las que no se sabe salir, etc. Si alguno tiene interés por estas historias que le pregunte a Mariam, aunque mejor que no sea durante un viaje, que si le hablan puede sufrir mareos terribles.

A lo que consigo encender el plasma y empezar a organizarlo todo, me vibra el móvil. Hora del café. ¿Ya? Increíble, pero no hay nada que pueda hacer, porque si faltas a la cita, aunque sea solo una, te apuntan en la lista negra y, lo peor de todo, te pierdes lo que en un grupo social normal serían ocho semanas de chismorreos. Reunión de mandarinas, chorizas que roban servilletas, Poli I abriendo plátanos del revés y un nuevo episodio de la serie “Titi. Oscuro deseo”. Hay temporadas para aburrir y yo ya me pierdo. Todo eso siempre condensado en unos escrupulosos diez minutos de café, como máximo. Somos gente seria y responsable.

Lo que sucede después es una nebulosa de optimizaciones, calibraciones, réplicas, baños de ultrasonidos, paseos por el pasillo y largas esperas entre medidas. Porque, seamos sinceros, tiempo hay para la reflexión. Y es que, cuando no es debido a los programas en AF4, es por la cámara empleada en Single Particle, que aspira a escasos microlitros por semana. Me gustaría decir que, al menos, todo ha merecido la pena, porque los resultados son magníficos y han salido a la primera: estas nanopartículas qué majas que son y qué bien estas muestras que apenas hay que hacerles un tratamiento. Me gustaría.

Termino de medir. Llego al despacho de Eduardo con cara larga y le llevo el parte de guerra. Es allí donde surge lo inesperado. Tras hablar con él, no solo he aprendido a interpretar los resultados de formar correcta y a considerar diferentes alternativas de cara al futuro, sino que consigo que tenga ganas de volver a intentarlo, de obtener los mejores resultados posibles (siempre que sea posible, claro). Creo que, de entre todas las cosas buenas que podría decir de Eduardo, que son muchas, y de entre todo lo que he aprendido de él, lo que mejor resume estos años y lo que más valoro es precisamente eso: la motivación para seguir aprendiendo y mejorando.

Recojo todo lo que he ido utilizando a lo largo del día y me quito la bata. Apago las luces del laboratorio de separación y cierro con llave. La luz del pasillo es menos intensa que antes y afuera ha anochecido. Deslizo la mirada por dos despachos que no he mencionado antes, pero no porque los haya olvidado. Son dos despachos en los que ya no aparece señalado ningún nombre, aunque siempre serán el de Gemma Cepriá y el de Juan Ramón Castillo. Gemma fue la primera persona en acogirme en el laboratorio. Lo hizo con los brazos abiertos, salvo en un par de ocasiones en las que amenazó con dejarme encerrado en alguna caja de materiales. En su defensa diré que hubiera sido merecido. A Castillo le agradezco el haberme dado la oportunidad de formar parte del GEAS y, a su vez, haber ayudado tanto a todos los doctorandos que han pasado por allí. Siempre recordaré el brillo en sus ojos mientras nos contaba sus aventuras en la Antártida.

Enfrascado en estos pensamientos, dejo atrás el letrero del departamento de Química Analítica y bajo las escaleras para salir de la universidad. No puedo evitar soltar un suspiro. Me encuentro cansado por todo el trabajo realizado, pero estoy contento. Mañana más.

Dedicado a mis padres, que deberían recibir algún título honorífico por haberme aguantado todos estos años. También al rondador nocturno que tantas horas de sueño me ha robado, y al que nosotros insistimos en llamar Dylan, pero él ni caso.

Bien que hace.

RESUMEN

Los nanomateriales basados en partículas de óxidos son uno de los casos más representativos del auge que está experimentando la nanociencia y la nanotecnología. Debido a sus propiedades fisicoquímicas específicas, son incorporados en una gran variedad de productos en diferentes sectores. En este contexto, surge la necesidad del desarrollo de estrategias que permitan obtener información analítica sobre este tipo de nanomateriales. Con el objetivo de la caracterización de partículas de óxidos metálicos, se han desarrollado en la presente Tesis Doctoral metodologías analíticas basadas en el uso de la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), que, debido a su sensibilidad y a su especificidad elemental, la convierten en una de las técnicas más empleadas en el análisis de nanomateriales tanto metálicos como óxidos. Concretamente, se han desarrollado métodos basados en el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) acoplado a ICP-MS e ICP-MS en su modo de detección individual de partículas (SP-ICP-MS).

En el caso de los métodos basados en AF4 se han estudiado, en primer lugar, las variables que determinan la separación desde un punto de vista teórico, con el objetivo de mejorar la eficiencia en la separación de nanomateriales. Se ha demostrado que el uso de un canal corto permite mejorar esta eficiencia sin modificar los caudales internos del canal (flujo cruzado y caudal de salida), manteniendo los tiempos de elución y sin comprometer las recuperaciones respecto a un canal de dimensiones convencionales. Los modelos teóricos desarrollados han sido corroborados de forma experimental aplicándolos a la separación de nanopartículas de poliestireno comprendidas en un amplio rango de tamaños (de 50 a 500 nm de diámetro). La mejora obtenida con el canal corto se ha confirmado en la separación de nanopartículas basadas en óxidos, a través de la separación de mezclas de poblaciones de nanopartículas de TiO_2 de diferentes tamaños.

A partir de estas mejoras, se ha desarrollado un método basado en AF4 para la caracterización y cuantificación de nanopartículas de TiO_2 en diferentes tipos de productos, como materiales para recubrimientos o alimentos (surimi) que incorporan este tipo de nanopartículas como aditivo alimentario E171. En el caso del surimi se ha desarrollado un procedimiento de extracción alcalina con altos rendimientos y compatible con el análisis en AF4, lo cual ha permitido la cuantificación de partículas de TiO_2 en rangos de concentración de $\mu\text{g g}^{-1}$. Para la caracterización de tamaños de partícula de TiO_2

se han desarrollado dos tipos de estrategias, consistentes en la calibración de tamaños, a partir de estándares de partículas de diferentes tamaños y naturaleza, y en el uso de técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS) como sistema acoplado de detección. La caracterización ha resultado satisfactoria en la mayoría de los casos, con limitaciones en la detección de las fracciones de menor tamaño, para las que ha sido necesario el uso complementario de SP-ICP-MS.

La técnica SP-ICP-MS permite además superar algunas de las limitaciones mostradas por AF4 para el análisis de nanomateriales con geometrías no esféricas, como es el caso de los aluminosilicatos que presentan estructuras laminares. En este contexto, se ha desarrollado una metodología analítica basada en SP-ICP-MS para la caracterización de este tipo de micropartículas en ensayos de migración desde envases plásticos, productos en los que los aluminosilicatos son incorporados para mejorar la conservación de alimentos. Para ello, se han estudiado las limitaciones de la técnica respecto al rango de partículas analizable en términos de rendimientos de nebulización y de límites de detección en número y tamaño. La determinación conjunta de silicio y aluminio, o la determinación de aluminio bajo dos condiciones distintas de sensibilidad, son dos alternativas para caracterizar los tamaños de partícula de aluminosilicatos en un amplio rango de tamaños (desde 35 hasta 1200 nm), dada la complementariedad de los rangos analizables.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	25
------------------------	-----------

1. ANÁLISIS DE NANOPARTÍCULAS BASADAS EN ÓXIDOS	27
1.1. NANOMATERIALES Y CIENCIA ANALÍTICA	27
1.2. NANOPARTÍCULAS BASADAS EN ÓXIDOS	28
1.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS EN DIFERENTES ESCENARIOS	29
1.4. ESTRATEGIAS BASADAS EN ICP-MS	33
2. FRACCIONAMIENTO EN FLUJO MEDIANTE CAMPO	35
2.1. FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO EN FLUJO MEDIANTE CAMPO (FFF)	35
2.2. SUBTÉCNICAS FFF	41
2.2.1. FFF de flujo (FIFFF)	42
2.3. ASPECTOS PRÁCTICOS Y LIMITACIONES RELACIONADOS CON LA CARACTERIZACIÓN DE NANOMATERIALES MEDIANTE AF4	44
3. DETECCIÓN INDIVIDUAL DE PARTÍCULAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON FUENTE DE IONIZACIÓN DE PLASMA DE ACOMPLAMIENTO INDUCTIVO (SP-ICP-MS)	47
3.1. FUNDAMENTO TEÓRICO DE SP-ICP-MS	47
3.2. TRATAMIENTO DE SEÑALES EN SP-ICP-MS	48
3.3. DETECCIÓN DE PICOS EN SP-ICP-MS	52

II. OBJETIVOS	55
----------------------	-----------

1. MEJORA DE LA EFICIENCIA EN LA SEPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS EN AF4 MEDIANTE EL USO DE CANALES CORTOS	61
1.1. INTRODUCCIÓN	63
1.2. FUNDAMENTOS DE LA SEPARACIÓN EN AF4	64
1.2.1. Eficiencia de la separación en AF4. Factores que afectan a la dispersión	66
1.3. EXPERIMENTAL	69
1.3.1. Materiales y estándares	69
1.3.2. Instrumentación	70
1.3.3. Cálculos de eficiencia y tratamiento de datos	71
1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
1.4.1. Eficiencias teóricas basadas en fenómenos de dispersión	72
1.4.2. Uso de un canal de dimensiones reducidas: implicaciones experimentales	75
1.4.2.1. Estudio de eficiencias experimentales en función del flujo cruzado	77
1.4.2.2. Estudio de eficiencias experimentales en función del diámetro hidrodinámico	81
1.4.2.3. Aplicación a nanopartículas de dióxido de titanio	85
1.5. CONCLUSIONES	88
2. CARACTERIZACIÓN DE TAMAÑOS Y CUANTIFICACIÓN DE NANO- Y MICROPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO MEDIANTE AF4 ACOPLADO A DLS E ICP-MS	91
2.1. INTRODUCCIÓN	93
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	96
2.2.1. Reactivos	96
2.2.2. Suspensiones de nanopartículas de TiO ₂	97

2.2.3. Muestras	97
2.2.4. Determinación de Ti total mediante ICP-OES e ICP-MS	98
2.2.5. Ensayos de lixiviación con producto para recubrimientos NP Fotoactiva 23	99
2.2.6. Extracción de TiO ₂ NPs en muestras de surimi mediante digestión alcalina	100
2.2.7. Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4)	100
2.2.7.1. Caracterización mediante AF4-DLS	102
2.2.7.2. Detección elemental y determinación de TiO ₂ NPs mediante AF4-ICP-MS	102
2.2.8. Determinación de TiO ₂ NPs mediante SP-ICP-MS	102
2.2.9. Estudio mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)	103
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	104
2.3.1. Estudio de las condiciones de separación de TiO ₂ NPs en AF4	104
2.3.2. Estrategias para la calibración de tamaños en AF4	107
2.3.3. Análisis de productos fotocatalíticos	110
2.3.3.1. Ensayos de lixiviación con producto NP Fotoactiva 23	113
2.3.4. Análisis de muestras de surimi	114
2.3.4.1. Extracción alcalina de TiO ₂ NPs en muestras de surimi	114
2.3.4.2. Determinación de tamaños de partícula de TiO ₂ en surimis	115
2.3.5. Validación de la extracción alcalina y de la cuantificación de TiO ₂ NPs mediante AF4-ICP-MS	121
2.3.6. Cuantificación de partículas de TiO ₂ en los productos analizados	122
2.4. CONCLUSIONES	124
3. CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE ALUMINOSILICATOS MIGRADOS DESDE ENVASES PLÁSTICOS MEDIANTE SP-ICP-MS	127
3.1. INTRODUCCIÓN	129

3.2. EXPERIMENTAL	132
3.2.1. Instrumentación	132
3.2.2. Estándares, suspensiones de partículas y disoluciones	134
3.2.3. Muestras	135
3.2.4. Ensayos de migración	136
3.2.5. Determinación de los contenidos totales de Al mediante ICP-MS	136
3.2.6. Tratamiento de datos en SP-ICP-MS	138
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	139
3.3.1. Estudio de las principales variables en el desarrollo de un método basado en SP-ICP-MS para el análisis de partículas de óxido de silicio y óxido de aluminio	139
3.3.1.1. Comparación de las prestaciones de las cámaras de nebulización en el análisis de partículas de óxido de silicio mediante SP-ICP-MS	141
3.3.1.2. Limitaciones en el análisis de partículas de SiO ₂ : límite inferior	148
3.3.1.3. Limitaciones en el análisis de partículas de SiO ₂ : límite superior	151
3.3.1.4. Análisis de aluminosilicatos a través del isótopo ²⁷ Al	156
3.3.2. Aplicación del método a la caracterización de un caolín natural	158
3.3.3. Análisis de partículas de aluminosilicatos migrados desde envases plásticos	165
3.3.3.1. Migración desde botella (material #1)	165
3.3.3.2. Migración desde envases de PET (material #2)	170
3.4. CONCLUSIONES	172
<hr/> IV. CONCLUSIONES	175
<hr/> V. BIBLIOGRAFÍA	181
<hr/> VI. ANEXOS	215

ANEXO 1. ESTUDIO DE LA EFICIENCIA EN LA SEPARACIÓN DE NPs EN AF4 MEDIANTE EL USO DE CANALES CORTOS **217**

A1.1. Estudio del efecto de la focalización en la eficiencia de separación en AF4 217

A1.2. Estudio de las eficiencias de separación a través del número de platos experimentales a diferentes caudales de flujo cruzado y para partículas de estándares de PS de diferentes tamaños nominales 219

A1.3. Comparativa de resultados de separación obtenidos para los canales de dimensiones convencionales (SC) y de longitud reducida (SLC), bajo unas mismas condiciones de velocidad de flujo cruzado 220

ANEXO 2. ANÁLISIS DE PARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO MEDIANTE AF4-DLS-ICP-MS Y SP-ICP-MS **223**

A2.1. Optimización de la extracción alcalina de TiO₂ NPs en muestras de surimi 223

A2.2. Estudio del producto Fotoactiva 23 aplicado sobre una superficie cerámica mediante FESEM 227

ANEXO 3. DESARROLLO DEL MÉTODO BASADO EN SP-ICP-MS PARA EL ANÁLISIS DE PARTÍCULAS DE ALUMINOSILICATOS **229**

A3.1. Estudio del efecto del medio de suspensión en los niveles de línea base 229

A3.2. Estudio de tratamiento de línea base con Origin Data Analysis 230

A3.3. Estudio del límite superior del método por saturación del detector 232

A3.4. Determinaciones de espesores de partículas de caolinita en imágenes TEM 234

A3.5. Determinaciones de diámetros equivalentes para partículas de caolinita en imágenes TEM 236

A3.6. Observación de partículas migradas desde el material #1 mediante TEM 240

ANEXO 4. PUBLICACIONES **243**

I. INTRODUCCIÓN

1. ANÁLISIS DE NANOPARTÍCULAS BASADAS EN ÓXIDOS

1.1. NANOMATERIALES Y CIENCIA ANALÍTICA

Debido a las propiedades intrínsecas que la escala nanométrica confiere a los materiales, la nanociencia y la nanotecnología han experimentado una rápida expansión en las últimas décadas, con el desarrollo y producción de gran variedad de nanomateriales sintéticos. Este tipo de nanomateriales están siendo incorporados en un número creciente de productos industriales, de consumo y alimentación, entre otros sectores [1], lo que conlleva, como consecuencia de su producción, uso y deshecho, un aumento de la exposición de la población humana y del medio ambiente a los mismos [2]. Incluso en la actualidad, la mayoría de sus efectos potenciales y riesgos son desconocidos, a pesar del elevado número de estudios y trabajos sobre el impacto que este tipo de materiales puedan causar.

De acuerdo con la Recomendación de la Comisión Europea, adoptada en 2011, se definió como nanomaterial a todo material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando agregados, en el que el 50% o más de la granulometría numérica presente una o varias dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 y 100 nm [3], aunque este porcentaje de la distribución puede ser reducido a entre el 1 y el 50% en casos específicos, justificados desde una perspectiva relacionada con el medio ambiente, la salud o la seguridad.

Es en este contexto en el que surge la necesidad del desarrollo de estrategias basadas en métodos analíticos que permitan obtener información sobre los nanomateriales, lo que supone uno de los retos más importantes de la Ciencia Analítica [4]. Un tipo de información que resulta esencial a diferentes niveles: en términos de regulaciones, para determinar si un producto contiene o no nanomateriales, atendiendo a recomendaciones o definiciones como la de la Unión Europea [5]; en términos tecnológicos, para conocer los beneficios de su incorporación y utilización en productos finales [1]; y para afrontar con fiabilidad estudios de liberaciones o transformaciones que puedan sufrir estos materiales en sistemas biológicos y medioambientales, así como la evaluación de sus riesgos toxicológicos y ecotoxicológicos [6,7].

1.2. NANOPARTÍCULAS BASADAS EN ÓXIDOS

Uno de los casos más representativos del auge de los nanomateriales son las nanopartículas de óxidos y, más concretamente, las de óxidos metálicos, en las que destacan las de zinc (II) (ZnO), las de titanio (IV) (TiO₂) o las de cerio (IV) (CeO₂), entre otras. Este tipo de nanomateriales poseen unas propiedades únicas que los hacen especialmente atractivos desde la perspectiva de la nanotecnología, con aplicaciones en numerosas áreas como la química, la medicina, la agricultura, la óptica, la electrónica y el medioambiente, y en sectores como el energético o el farmacéutico [8].

Las nanopartículas (NPs) de ZnO presentan una gran versatilidad como material. Debido a sus propiedades antibacterianas y antimicrobianas, son utilizadas en productos farmacéuticos como cremas [9], además de su aplicación como pigmento blanqueante en pinturas [10] y como recubrimiento de superficies [11]. En el sector cosmético son empleados en cremas solares por su capacidad de absorción de radiación UV [12], aplicación que comparten con las NPs de TiO₂ [13]. El dióxido de titanio, como nanomaterial, destaca por su insolubilidad, su estabilidad térmica, su falta de reactividad con otros materiales y su bajo coste de producción [14]. Sus aplicaciones, como se verá en mayor profundidad en el Capítulo 2, están sobre todo relacionadas con la fotocatalisis y con la alimentación, sector en el que se emplea como aditivo bajo la etiqueta E171 [15]. Las nanopartículas de CeO₂ presentan una alta capacidad para el almacenamiento de oxígeno [16] y un bajo potencial redox [17]. Son empleadas fundamentalmente en el sector automovilístico, como aditivo en combustibles y como catalizadores para la mejora de la quema del combustible, disminuyendo la temperatura de ignición del proceso [13,18].

Como nanopartículas de óxidos de metaloides destacan las de silicio (IV) (SiO₂), con aplicaciones en el desarrollo de sensores [19] y en biomedicina [20]. En el sector alimentario, las NPs de SiO₂ son utilizadas como agente antiaglomerante [21], como potenciadores de sabores y fragancias [22] y como aditivo E551 [23,24]. Otro nanomaterial basado en silicio con múltiples aplicaciones en el sector alimentario son los aluminosilicatos. Este tipo de partículas, que se describen con mayor detalle en el Capítulo 3, presentan unas propiedades mecánicas y térmicas específicas que han potenciado su uso en la producción de envases para alimentos [25].

1.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS EN DIFERENTES ESCENARIOS

En vista de la gran variedad de productos que incorporan nanopartículas de óxidos, para obtener información sobre estos nanomateriales son necesarios métodos analíticos que permitan no solo su análisis en su estado original (como pueda ser el caso de estándares o partículas sintetizadas), sino también en matrices complejas. En función de la complejidad de la matriz y los niveles de concentración a los que se encuentren las nanopartículas, se pueden distinguir diferentes escenarios (Figura 1) [26].

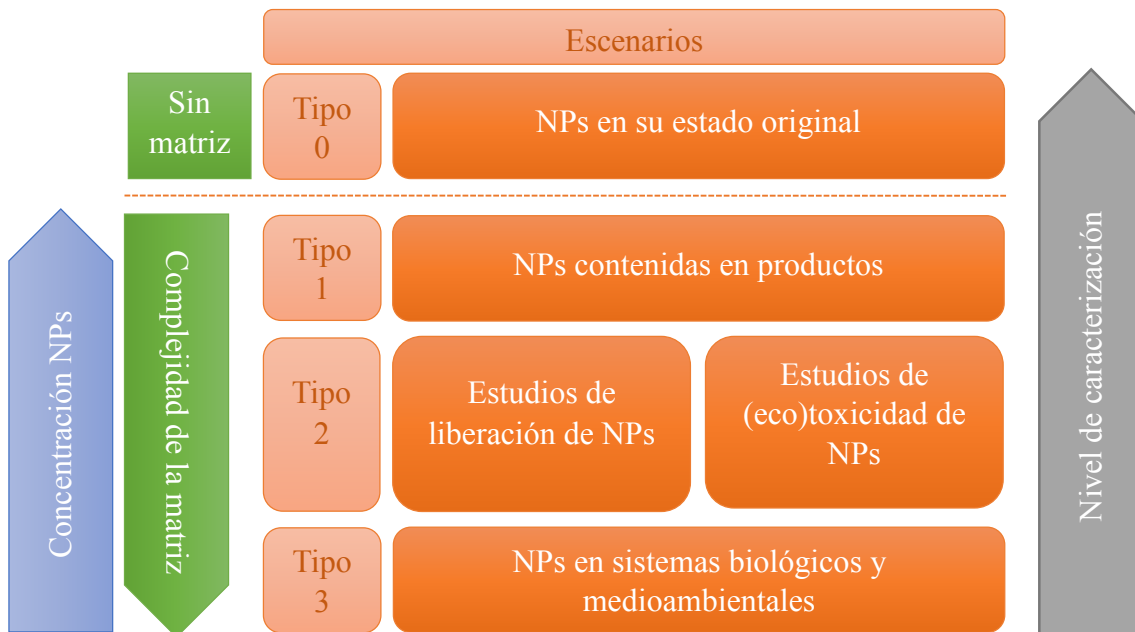


Figura 1. *Diferentes escenarios de análisis de nanopartículas en función de la complejidad de la matriz y sus niveles de concentración* [26].

El escenario 0 representa el de menor complejidad a nivel analítico, en el que es posible el máximo nivel de caracterización de los nanomateriales. Suele estar relacionado con el análisis de NPs sintetizadas en laboratorio o producidas a escala industrial, por lo que se encuentran en un estado puro, sin alteraciones ni matrices que las contengan. El escenario 1 hace referencia a los productos comerciales en los que se incorporan los nanomateriales, como puedan ser productos textiles, cosméticos o alimentarios. En el caso de las nanopartículas de óxidos, los productos que se analizan con mayor frecuencia son las cremas solares [27–31], aunque también hay estudios que analizan pastas de dientes [5,32], dulces [33], sopa de tomate [34], crema de café [35] y tintas comerciales para tatuajes [36].

El escenario 2 incluye los nanomateriales empleados en los dos escenarios anteriores, pero para los que se aplican unas condiciones específicas producidas en laboratorio con el objetivo del análisis de su liberación, su destino, su comportamiento y/o su toxicidad. Este tipo de estudios pueden comprender tanto su exposición en unas condiciones recreadas (por ejemplo, digestiones in vitro o simuladores alimentarios) como medios biológicos o naturales en los que se añaden las NPs de forma artificial. Bajo estas condiciones, la caracterización de los nanomateriales se dificulta, debido a una mayor complejidad de las matrices y una disminución en sus niveles de concentración. En el caso de las nanopartículas de óxidos, los estudios más comunes suelen estar relacionados con exposiciones de las NPs en aguas naturales [37–41], suelos [42], fluidos biológicos [7,43], cultivos celulares [44] y estudios de migración en alimentos [45].

En el escenario de mayor complejidad, de tipo 3, los nanomateriales están sometidos a situaciones reales en organismos (lo que incluye seres humanos) y en sistemas medioambientales. Las nanopartículas pueden sufrir diferentes transformaciones como su disolución, su modificación superficial, su agregación/aglomeración y demás cambios en sus propiedades a lo largo de su ciclo de vida útil. En estas condiciones extremas, los contenidos de nanopartículas pueden ser menores que en los escenarios anteriores. Para las nanopartículas de óxidos, los estudios publicados que comprenden este escenario se han realizado en aguas residuales [46,47], aguas naturales [48,49], suelos [50] y tejidos humanos [24].

El nivel de caracterización de los nanomateriales no solo depende de su concentración, de las transformaciones que puedan sufrir en el entorno o de la complejidad de las matrices en las que estén contenidos, sino que también depende de los propios métodos analíticos aplicados. El tipo de información obtenida varía en función de las técnicas, que en el caso de las nanopartículas de óxidos suelen ser las mismas que las empleadas para las nanopartículas metálicas, y que suelen estar basadas generalmente en microscopía electrónica, técnicas de dispersión de luz, espectrometría atómica y técnicas de separación.

Dentro de las técnicas de microscopía electrónica, destaca el uso de las microscopías electrónicas de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) [7,24,30] y de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) [5,29,38]. A través de ellas, se obtiene información sobre el tamaño, la forma o el estado de agregación de las partículas, con una

capacidad de resolución de 1 nm en el caso de que en SEM se esté usando una fuente de emisión de campo (*Field-Emission Scanning Electron Microscopy*, FESEM) e incluso por debajo del nanómetro para TEM, aplicables para sistemas con unos niveles de concentración de hasta 10^9 - 10^{12} partículas L^{-1} [6]. Su combinación con sistemas de detección de espectrometría de rayos X de dispersión de energía (*Energy Dispersive X-ray Spectrometry*, EDS) permite además la identificación elemental, confirmando la presencia de nanopartículas de un elemento determinado en su composición. Aunque las microscopías electrónicas son consideradas como una de las técnicas más potentes para el análisis de NPs debido a sus prestaciones, suelen servir como técnicas de apoyo para la interpretación de resultados de otras técnicas. Su aplicación para nanopartículas de óxidos es posible en todos los escenarios mostrados en la Figura 1, destacando su uso para la caracterización inicial de nanomateriales sintetizados o comercializados (escenario tipo 0) [7,38,43,47], para la caracterización de NPs en productos de consumo (tipo 1) [5,29], en ensayos de migración (tipo 2) [45] y en muestras medioambientales y biológicas (tipo 3) [24,48,51].

Las técnicas de dispersión de luz permiten la caracterización de tamaños de partículas en suspensión, entre las que destacan la técnica de dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) y la de dispersión de luz multiangular (*Multiangle Light Scattering*, MALS). DLS presenta limitaciones para la detección de las fracciones de partículas de menor tamaño en presencia de otras de diámetros superiores [52] y para la interpretación de resultados en muestras con alta polidispersidad [53]. Pese a que su límite de detección en tamaño es de 1 nm, en términos de concentración presenta una baja sensibilidad (del orden de los $mg L^{-1}$), lo que dificulta su aplicación para escenarios de cierta complejidad, como el 2 y el 3, siendo además dependiente del tamaño, por lo que las partículas más pequeñas requieren de mayores concentraciones para su detección y correcta caracterización. En el análisis de NPs de óxidos, suelen emplearse dentro del escenario 0 para la pre-caracterización de tamaños de materiales originales [45] o para estudios de estabilidad coloidal de las NPs sintetizadas [43]. En el escenario 1 su aplicación se basa en el análisis de NPs en productos de consumo [5,36] y en el 2 para medios que recrean aguas naturales [37,40]. En comparación con DLS, MALS presenta unos límites de detección en concentración similares, aunque en tamaño ascienden a valores de 50 nm de diámetro [6]. Suelen requerir de un conocimiento profundo de las propiedades ópticas del analito, por lo que su utilización en muestras complejas es

limitada, aunque su uso acoplado con la técnica de separación de fraccionamiento en flujo mediante campo (*Field Flow Fractionation*, FFF) es frecuente para el análisis de NPs de óxidos en el escenario 1 [31,36]. Otra posibilidad es la técnica de análisis de rastreo de nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA), en la que se realizan seguimientos individuales de las partículas, por lo que no presenta algunas de las limitaciones mencionadas para DLS. La técnica presenta alta sensibilidad en términos de concentración en número (límite de detección de 10^9 partículas L^{-1}) y resultados fiables de caracterización de tamaños para partículas superiores a 10-20 nm. Sin embargo, su utilización para el análisis de NPs de óxidos es escasa [37,40].

Las técnicas basadas en espectrometría atómica más empleadas para el análisis de nanomateriales son la espectrometría de absorción atómica electrotrémica (*Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*, ET-AAS), la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS) y las de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, ICP-OES). Por sí mismas, estas técnicas no son específicas para el análisis de nanomateriales y sus aplicaciones se basan en la detección y en la cuantificación de contenidos totales de un elemento, con límites de detección en masa del orden de $\mu g L^{-1}$ para ICP-OES, $\mu g-ng L^{-1}$ para ET-AAS y $ng L^{-1}$ para ICP-MS. Debido a su alta sensibilidad, esta última es la más común en el análisis de NPs de óxidos, tal y como refleja la bibliografía, en la que se ha descrito para la determinación de concentraciones elementales en todos los escenarios mostrados en la Figura 1 [5,7,27,28,30,31,33,36,38,43–47,49,51].

Las técnicas de separación permiten el fraccionamiento de las partículas en función de sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño, la densidad, el recubrimiento o la carga superficial. Para la obtención de información de las fracciones separadas, estas técnicas precisan de su acoplamiento a otros sistemas de detección, que determinarán la sensibilidad del método, como la espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible (*Molecular Absorption Ultraviolet-Visible Spectrophotometry*, EAM UV-Vis) (concentraciones del orden de los $mg L^{-1}$), alguna técnica de dispersión de radiación como DLS o MALS ($mg L^{-1}$), o de espectrometría atómica como ICP-OES e ICP-MS (μg y $ng L^{-1}$, respectivamente), así como la información de las especies separadas (tamaño, composición elemental o presencia de determinados grupos funcionales). Dentro de su aplicación para el análisis de nanopartículas de óxidos, destacan el fraccionamiento en

flujo mediante campo de flujo asimétrico (*Asymmetric Flow Field Flow Fractionation*, AF4) [5,30,33,39,41,54] y la cromatografía hidrodinámica (*Hydrodynamic chromatography*, HDC) [27,50,55]. En ambas técnicas la separación viene definida por la difusión (tamaño) de las especies inyectadas y han sido aplicadas en la caracterización de nanomateriales basados en óxidos en los diferentes escenarios descritos.

1.4. ESTRATEGIAS BASADAS EN ICP-MS

A pesar del amplio número de técnicas disponibles para la caracterización de nanomateriales, la aplicación de algunas de ellas en escenarios de mayor complejidad puede resultar inviable [6], como se ha comentado en el apartado anterior. En el caso de las nanopartículas de óxidos, los contenidos de Ti, Zn, Si o Ce suelen ser del orden de los mg kg^{-1} o superiores cuando estas son incorporadas en productos de consumo (escenario 1), unos niveles que no representan demasiada dificultad para su análisis [5,32,33]. Sin embargo, en estudios de liberación de NPs y en análisis de contenidos en medios biológicos o medioambientales (escenarios 2 y 3) las concentraciones pueden reducirse a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$ o incluso ng L^{-1} [46,47,49], lo que reduce las posibilidades de poder aplicar gran parte de las técnicas descritas. Precisamente los bajos límites de detección alcanzados mediante ICP-MS, del orden de ng L^{-1} , hacen que esta sea una de las técnicas más utilizadas para la detección y cuantificación elemental en muestras que contienen nanopartículas metálicas o de óxidos, resultando aplicable para cualquier tipo de escenario de análisis.

En su forma de trabajo convencional, ICP-MS no es capaz de proporcionar información sobre el tamaño, la forma o el estado de agregación, ni permite discriminar la presencia del analito entre formas disueltas y formas particuladas. Por ello, resulta necesario su uso en combinación con otras técnicas analíticas para el análisis de nanomateriales. La aplicación de ICP-MS conjuntamente con un procedimiento de separación previo, como la ultrafiltración, permite diferenciar entre contenidos de especies disueltas respecto a nanopartículas, a partir del aislamiento de las primeras con la utilización de membranas de un tamaño de poro adecuado. Este procedimiento ha sido empleado en gran variedad de estudios de nanomateriales [56], aunque su aplicación es cada vez menos frecuente frente al uso de la técnica de detección individual de partículas mediante ICP-MS (*Single Particle ICP-MS*, SP-ICP-MS). Esta última es una modalidad

de ICP-MS en la que también es posible la detección y cuantificación de las diferentes formas en las que se encuentra una especie en la muestra, además del análisis de partículas de forma individual, por lo que se ha erigido como una técnica de referencia en el análisis de nanomateriales [38], con aplicaciones también para nanopartículas de óxidos [38,46,49,51].

Por otro lado, ICP-MS también puede ser considerado como un sistema de detección elemental específico que, acoplado a una técnica de separación como AF4, permite obtener información sobre el tamaño de las partículas, así como la cuantificación de las fracciones separadas. De este modo, se mejoran los límites de detección de AF4 en comparación con otros detectores como UV-Vis o los basados en técnicas de dispersión de luz. Además de las mejoras en la selectividad y la sensibilidad propias de ICP-MS, AF4 ofrece la mejor resolución frente a otras técnicas de separación y una alta capacidad de fraccionamiento en matrices complejas [31,57].

Debido al potencial de AF4-ICP-MS y SP-ICP-MS para el análisis de nanomateriales, la Tesis Doctoral se ha centrado en la caracterización de nanopartículas de óxidos mediante estas dos técnicas, cuyos fundamentos se estudian en las siguientes secciones.

2. FRACCIONAMIENTO EN FLUJO MEDIANTE CAMPO

AF4 pertenece al conjunto de técnicas de fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF), que son una de las familias más versátiles dentro de las técnicas de separación. Debido a la diversidad de campos que se pueden aplicar como principio de separación, la configuración instrumental, la propia estructura del canal o el modo de operación, este conjunto de técnicas puede ser empleado para la separación y caracterización de especies muy diversas en un amplio rango de tamaño: desde macromoléculas con masas moleculares del orden de unos pocos kDa a partículas de hasta 100 micras [58].

Es precisamente esta versatilidad la que justifica la aplicación de AF4 al análisis de nanopartículas de óxidos. Un tipo de nanomaterial que, como se ha comentado anteriormente, es incorporado a gran variedad de productos en los que las partículas, incluso para un mismo tipo de producto específico, pueden presentar una elevada polidispersidad, con poblaciones que comprenden desde unos pocos nanómetros hasta tamaños de varias micras [12,36].

2.1. FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO EN FLUJO MEDIANTE CAMPO (FFF)

Los sistemas FFF funcionan a través de la inyección de un volumen discreto de muestra que es conducido por un flujo portador a través de un canal. En su interior se produce la separación de los componentes de la muestra en ausencia de fase estacionaria, a diferencia de la cromatografía, hasta ser eluidos de forma secuencial al final del canal, donde se sitúan los sistemas de detección. La retención y separación del analito se produce por la acción conjunta de un campo externo y el flujo con el que circula el portador en el interior del canal.

El flujo en el canal sigue un perfil parabólico, similar al mostrado en la Figura 2. En las zonas más próximas a las paredes la velocidad de desplazamiento del portador se va reduciendo, debido a la fricción del fluido, hasta ser nula ($v = 0$). Conforme se aleja de las paredes, la velocidad de flujo aumenta de forma gradual, hasta alcanzar su máximo valor en el centro ($v_{\text{máx}}$).

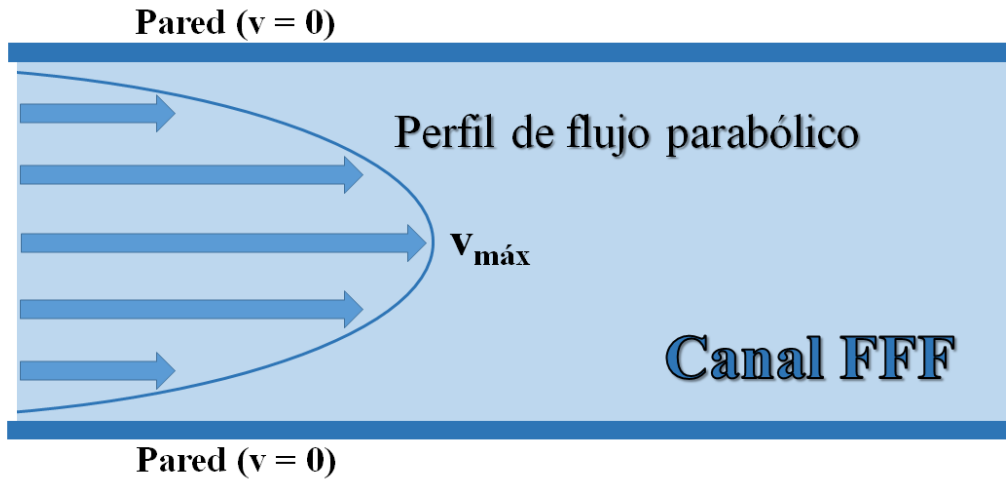


Figura 2. Perfil de flujo parabólico en el interior de un canal FFF.

Si una partícula fuera liberada en el canal sin ningún tipo de campo externo, esta sería conducida por el flujo del portador y se movería de forma errática a distintas alturas entre las paredes, de acuerdo con el movimiento browniano. Estas variaciones en la altura supondrían diferencias en su velocidad de desplazamiento a lo largo del eje longitudinal, dado que la velocidad está determinada por la posición en el perfil parabólico. La velocidad promedio de la partícula sería la del portador, denominada $\langle v \rangle$. El tiempo que tardaría en atravesar el canal sería el tiempo de retención de volumen muerto, o *void peak* (t_0). Este tiempo sería igual a la longitud del canal (L), dividido por la velocidad promedio:

$$t_0 = \frac{L}{\langle v \rangle} \quad (1)$$

En FFF, el campo externo es aplicado de forma perpendicular al flujo interior del canal. El objetivo es que el campo sitúe las diferentes especies que forman parte de la muestra en posiciones específicas entre las paredes del canal. Al ser un flujo laminar, a cada posición o altura le corresponde una velocidad promedio específica, representada con las flechas en la Figura 2. La retención de las especies a diferentes alturas conlleva que la velocidad con la que atraviesen el sistema también será diferente, produciéndose la separación y alcanzando la salida a tiempos distintos.

El tiempo de retención específico para una especie (t_r) siempre será igual o mayor a t_0 . De la relación entre estos tiempos se puede determinar el parámetro de retención R , que se define de acuerdo con la siguiente expresión:

$$R = \frac{t_0}{t_r} \quad (2)$$

R, por tanto, es un parámetro experimental que sirve para describir la retención que sufre un analito por la acción del campo aplicado. La retención es el resultado de dos fuerzas contrapuestas: la del campo y la de la difusión de las propias especies, cuya interacción determinará la altura o posición del analito en el canal respecto al fondo del mismo, que se denomina l (Figura 3).

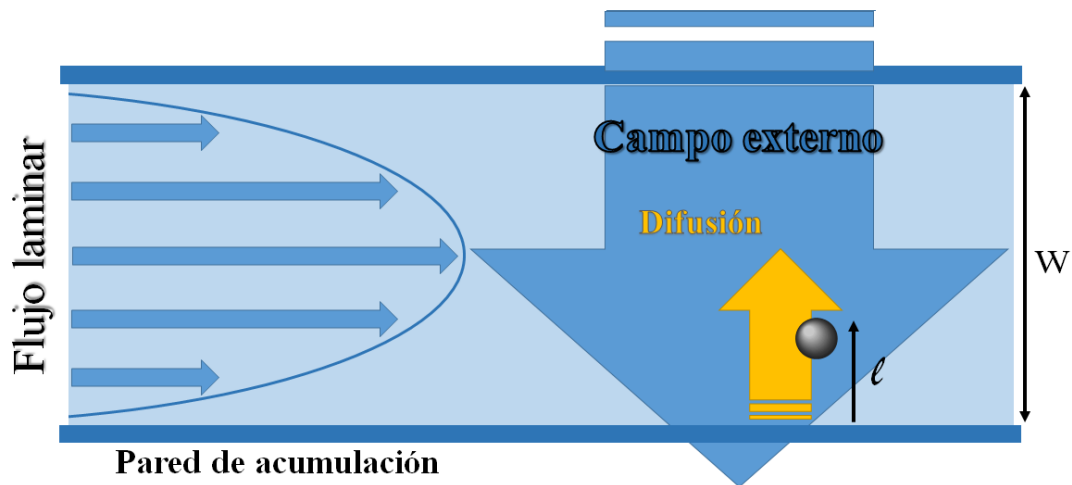


Figura 3. Retención de una partícula en un canal FFF como resultado de dos fuerzas opuestas: un campo externo y la difusión de la partícula, donde w es el espesor del canal y l es la altura o posición del analito.

La altura l puede ser expresada en relación con el espesor del canal (w) a través del parámetro de retención λ :

$$\lambda = \frac{l}{w} \quad (3)$$

El parámetro λ es adimensional e indica el grado de compresión que sufre el analito en una determinada zona a través de la expresión:

$$\lambda = \frac{kT}{Fw} \quad (4)$$

donde T es la temperatura absoluta, k es la constante de Boltzmann y F la fuerza realizada por el campo externo sobre el analito. Por lo tanto, conforme mayor es la fuerza del campo, mayor será la compresión de las especies en la pared de acumulación (menor λ).

Una de las características más importantes de λ es que puede relacionarse con el parámetro de retención experimental R , según la expresión:

$$R = 6\lambda \coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 12\lambda^2 \quad (5)$$

lo que permite a λ ejercer de puente entre los fundamentos teóricos y los parámetros experimentales de la técnica. De este modo, a partir de datos experimentales obtenidos para una especie, como el tiempo de retención, se pueden determinar algunas de sus propiedades fisicoquímicas, como el diámetro hidrodinámico o el peso molecular. El tipo de información que se pueda obtener, no obstante, dependerá del tipo de campo empleado, característico para cada una de las subtécnicas que constituyen la familia FFF.

La elución de las especies puede tener lugar en dos modos: normal y estérico, en función de su rango de tamaño. En el modo normal (o Browniano), la separación está controlada por la difusión del analito (Figura 4). El tamaño de las especies es lo suficientemente pequeño para que su movimiento sea browniano y su tamaño, respecto a la nube que forman en el canal, es casi despreciable. De esta forma, en función de su coeficiente de difusión, el analito se situará a una determinada altura dentro de la nube. Si el analito es de menor tamaño, su difusión será mayor y quedará en una posición superior, lo que supondrá una elución más rápida que la de especies de mayor tamaño, de acuerdo con el perfil de flujo parabólico.

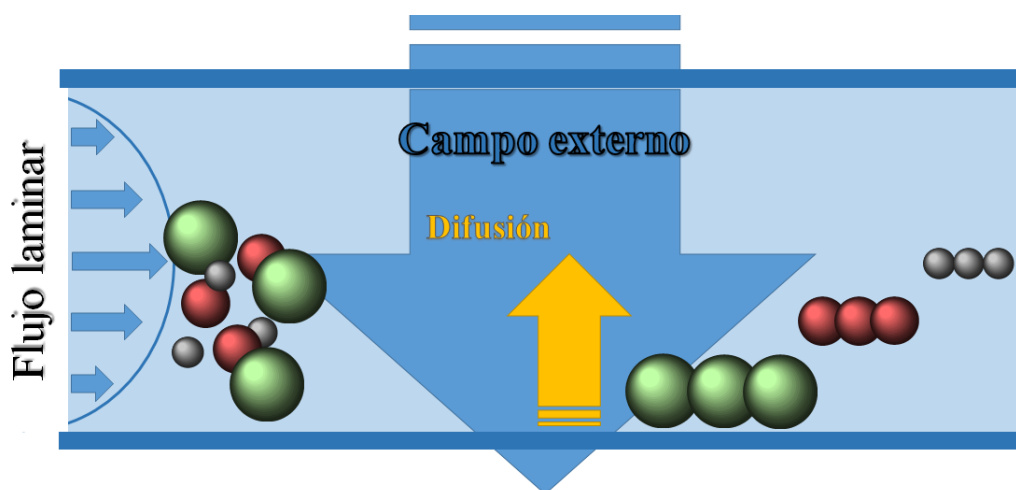


Figura 4. Separación en modo normal en FFF.

Sin embargo, si las partículas sobrepasan cierto tamaño, la separación puede producirse en el modo de elución estérico (Figura 5). Para estas especies de gran tamaño, su difusión queda ralentizada, de modo que el campo externo las conduce hacia la parte inferior del canal sin oposición, donde se sitúa la pared de acumulación. Al no poder aproximarse de forma ilimitada a la parte inferior del canal, y debido a su tamaño, quedan en posiciones centrales que no responden a fenómenos de difusión y las partículas más grandes se eluyen antes que las pequeñas [58]. La elución en modo estérico corresponde a partículas que tienen, en general, un tamaño superior a una micra de diámetro, mientras que las partículas se separan en modo normal para tamaños entre 1 y 1000 nm.

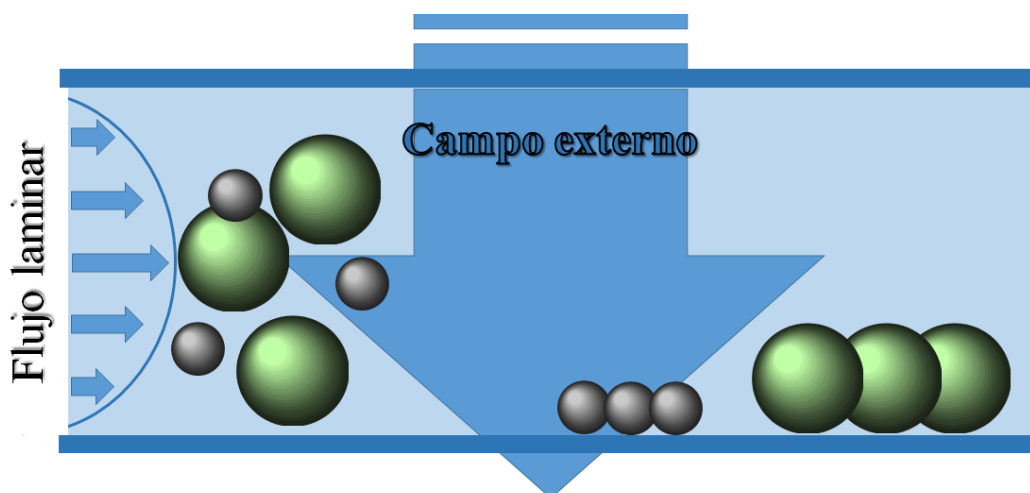


Figura 5. *Modo de elución estérico en FFF.*

El proceso de separación consta de dos etapas principales: la etapa de inyección/focalización, donde se forma la nube de partículas ordenada en función de sus coeficientes de difusión, y la de elución, en la que las partículas son conducidas a lo largo del canal. Durante la etapa de inyección, un volumen discreto de muestra es introducido en el sistema a través del flujo de entrada (Figura 6a). Después hay un proceso de relajación/focalización, en el que durante unos minutos se establece un equilibrio en el interior del canal para las distintas especies inyectadas (Figura 6b). Este equilibrio se consigue enfrentando el caudal de entrada con un caudal de focalización, por lo que las especies quedan retenidas en una zona concreta del canal, formando la nube. Por último, tiene lugar la etapa de elución, en la que el caudal de focalización ha desaparecido y, bajo la acción del campo externo todavía presente, el flujo de entrada conduce las especies a lo largo del canal, siguiendo el flujo laminar (Figura 6c). A la salida del canal, el efluente

con las especies separadas es conducido a los diferentes sistemas de detección acoplados, o recogido en fracciones para una detección posterior.

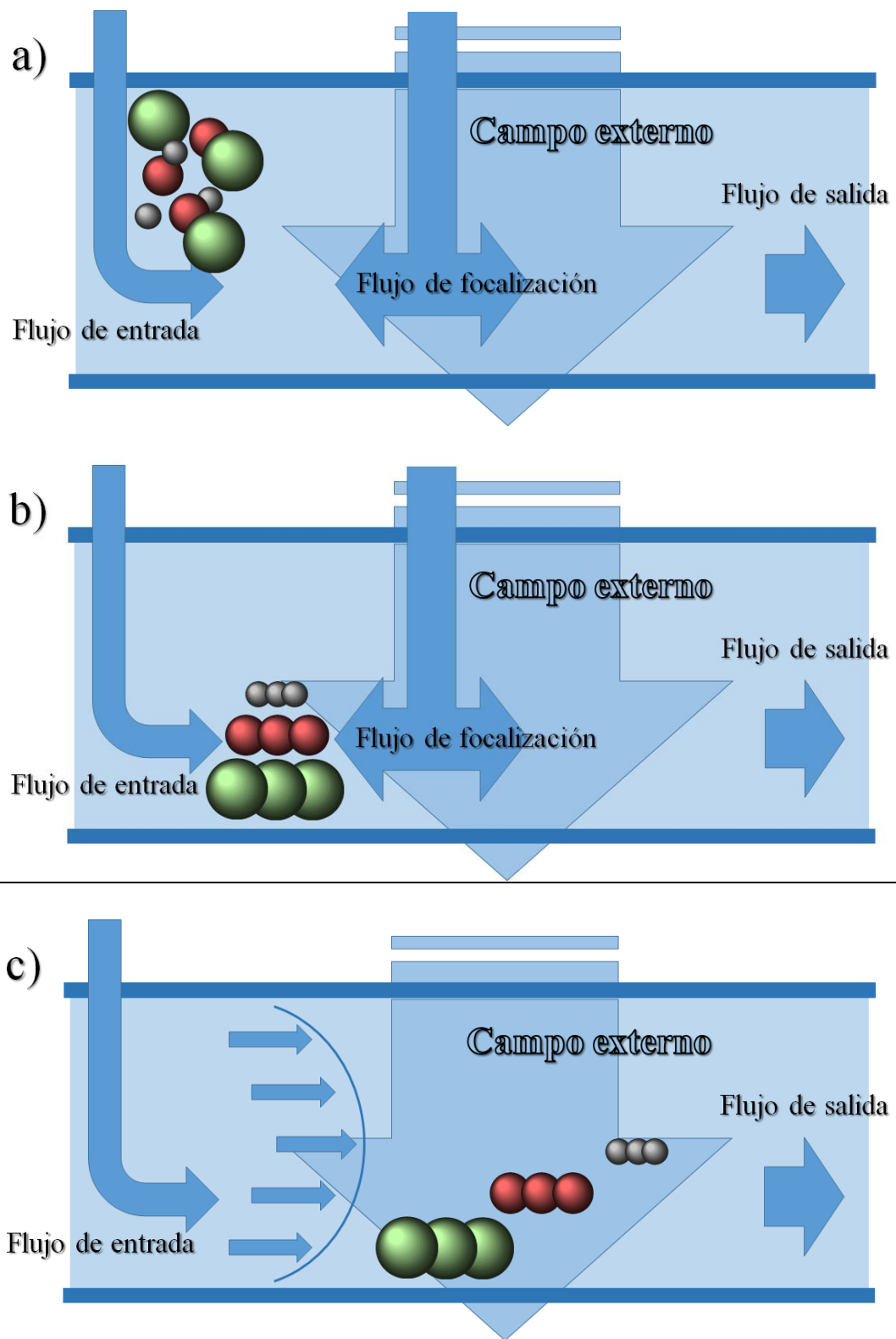


Figura 6. Etapas de separación en FFF: a) inyección, b) focalización, y c) elución.

2.2. SUBTÉCNICAS FFF

En función del tipo de campo, los fundamentos de separación en FFF varían, así como los rangos y las áreas de aplicación. Dentro de FFF destacan las siguientes subtécnicas: FFF térmico (ThFFF), de sedimentación (SdFFF) y de flujo (FlFFF), siendo esta última la más utilizada. Existen otras subtécnicas, aunque empleadas de forma minoritaria, como FFF eléctrico (ElFFF) y magnético (MgFFF) [58]. En los últimos años, además, se han desarrollado híbridos entre algunas de las subtécnicas, como es el caso de la combinación de eléctrico y de flujo (EAF4).

En ThFFF el campo se basa en un gradiente de temperatura aplicado a lo largo del canal y la separación se da en función de los coeficientes de difusión térmica de las especies [58]. Su aplicación se centra sobre todo en el análisis de polímeros [59], especializándose en los últimos años en la caracterización de estructuras de cada vez mayor complejidad [60–62].

En FFF de sedimentación la separación está basada en la fuerza centrífuga. El campo se crea a través de un rotor, que con unas velocidades de giro produce que las especies se separen en función de su tamaño y su densidad en el interior del canal. Su rango de aplicación es muy amplio, siendo un método común de separación de partículas y coloides entre 10 nm y 100 μm [58]. Otra ventaja es que, en comparación con otras técnicas de la misma familia, tiene un poder de separación muy alto y la elección del portador no resulta tan crítica como pueda ser en FFF de flujo. Sin embargo, la instrumentación es cara y resulta muy compleja, debido a la necesidad de un rotor para generar el campo [63].

En sus inicios, la técnica SdFFF se utilizó fundamentalmente para la separación de coloides y partículas de gran tamaño [64,65], aunque en la última década se ha centrado en el análisis de nanopartículas de distinta naturaleza, como las de plata [66,67], dióxido de titanio [68–70] u óxido de silicio [71]. SdFFF puede ser también una opción en el futuro para la separación de microplásticos [72].

Otras subtécnicas se basan en el uso de campos eléctricos (ElFFF) o magnéticos (MgFFF), aunque su uso, tal y como se ha comentado, es minoritario. En el primero, las especies son separadas de acuerdo a su movilidad electroforética y tamaño, a partir de un campo eléctrico. El campo es generado por la diferencia de potencial entre dos electrodos, situados como paredes en la parte superior e inferior del canal, siendo ElFFF sensible a las cargas superficiales y recubrimientos, y su aplicación se ha ido enfocando a la

caracterización de sistemas coloidales y partículas en el rango de los micrómetros y los nanómetros. Sin embargo, debido a ciertas limitaciones, su uso ha quedado relegado a sistemas experimentales [73,74]. En el caso de FFF de campo magnético, las partículas magnéticas se separan en función de sus contenidos en materiales magnéticos. La aplicación de MgFFF se ha centrado en la separación de partículas tanto en la escala micrométrica [75] como nanométrica [76–78]. Sin embargo, es una técnica compleja, en la que limitaciones como la pérdida de analito por retención en el canal y su baja eficiencia de separación han impedido su aplicación práctica [75], sin existir tampoco un sistema comercial.

2.2.1. FFF de flujo (FIFFF)

La técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo (*Flow Field Flow Fractionation*, FIFFF) se caracteriza por emplear un flujo secundario denominado flujo cruzado o *cross flow*, de la misma naturaleza que el portador que recorre el canal. La separación se origina por un equilibrio entre la fuerza del campo y la fuerza opuesta generada por las especies a separar. Esta fuerza opuesta corresponde a la difusión del propio analito y depende de su tamaño.

Los primeros canales en FIFFF tenían diseños rectangulares simétricos, en los que tanto la parte superior como la inferior estaban formadas por paredes permeables. En ellos, el flujo cruzado atravesaba el sistema de modo uniforme, con su entrada por la pared superior y su salida por la inferior. Posteriormente, comenzaron los diseños asimétricos del canal, lo que se conocería como sistema FIFFF asimétrico o AF4, en los cuales la pared superior fue reemplazada por una pieza impermeable para reducir efectos de permeabilidad no deseada [79]. El diseño rectangular, sin embargo, presentaba limitaciones en cuanto a la velocidad de flujo, en la que se observaba un descenso gradual conforme se aproximaba a la salida del canal. Para remediarlo, se propuso una geometría trapezoidal, modelo que se emplea hoy en día, cuya parte final se va estrechando para que la velocidad de la fase móvil permanezca constante a lo largo de todo el sistema [80].

Actualmente también existe otra configuración: FFF de fibra hueca o *Hollow Fiber* (HF5). Lo que varía en este caso es la forma geométrica del canal y la manera en la que se aplica el flujo cruzado, con un campo radial. En HF5, el canal ha sido sustituido por un tubo hueco de dimensiones reducidas (0,4 mm de radio) por donde circula el portador

en régimen laminar. Aunque de uso más sencillo que AF4, sus prestaciones analíticas son inferiores en comparación [81].

Dentro de la familia de técnicas de FFF, a pesar de que SdFFF ofrece un mayor poder de fraccionamiento en la separación, el amplio rango de tamaños en el que es aplicable (desde unos pocos nanómetros hasta 100 micras), así como que la separación de las especies esté basada únicamente en su tamaño hidrodinámico, han hecho que AF4 sea la subtécnica más universal de la familia. Se ha aplicado a especies muy diversas, que comprenden tanto polímeros y macromoléculas como (nano)partículas [58]. Su uso más extendido es la separación y caracterización de nanopartículas en muestras complejas [39,82–84].

La gran versatilidad que ofrece AF4 en el tipo de especies a separar se debe en parte a la posibilidad de ajuste de muchas condiciones operativas, como sus flujos internos, tipos de portadores o membranas [85]. Sin embargo, debido a todas estas variables, su operatividad puede resultar compleja y, en cada caso específico, se necesitará de un proceso de optimización para afrontar una correcta separación [86]. Otro inconveniente son las interacciones analito-membrana [87], que requieren especial atención porque pueden conllevar problemas en términos de recuperación. Además, la duración de una separación puede ser prolongada, especialmente en el análisis de macromoléculas, en el que suelen ser necesarios flujos cruzados muy elevados.

Los últimos avances en FFF han derivado en el uso de canales de AF4 con un componente eléctrico, lo que se ha denominado como FFF eléctrico de flujo asimétrico (*Electric Asymmetric Flow Field Flow Fractionation*, EAF4). De su combinación se espera mejorar algunas de las limitaciones mostradas en ambas técnicas por separado. En EAF4 la retención de las especies se produce principalmente por la fuerza del campo de flujo, separándolas en función del tamaño, mientras que el campo eléctrico produce variaciones en los tiempos de retención, suficientes para calcular la movilidad electroforética específica de las fracciones separadas [81].

2.3. ASPECTOS PRÁCTICOS Y LIMITACIONES RELACIONADOS CON LA CARACTERIZACIÓN DE NANOMATERIALES MEDIANTE AF4

Como se ha comentado anteriormente, la separación en AF4 depende de muchos factores que han de ser optimizados para poder obtener una correcta separación [88]. El flujo cruzado es una de las variables más importantes, pero no la única. Además de los caudales internos, parámetros instrumentales como las dimensiones del canal también tienen influencia en la separación, como se discutirá a lo largo del Capítulo 1. Otras variables son de tipo experimental y van a estar relacionadas con las interacciones membrana-analito. Entre ellas se encuentran el tipo de membrana empleada, sus propiedades superficiales y las características del portador, es decir, su pH, su fuerza iónica y su composición química, factores todos ellos que van a determinar las propiedades electrostáticas tanto de la membrana como de las partículas, que resultan cruciales para evitar la pérdida de analito durante la separación [89]. Estas variables de tipo experimental serán estudiadas en el Capítulo 2, a través de la aplicación de AF4 para la separación y posterior cuantificación de nanopartículas de TiO₂.

Los sistemas de detección a los que se acople AF4 también definen algunas de las limitaciones de la técnica para el análisis de nanomateriales. Para AF4 con detección en UV-Vis o acoplado a técnicas de dispersión de radiación, su aplicación puede verse afectada por los problemas ya mencionados de baja sensibilidad [90], a lo que se suma la ausencia de especificidad para la detección para un analito concreto en el caso de UV-Vis [91]. El acoplamiento AF4-ICP-MS se basa en la detección de partículas en términos de masa, lo que puede suponer cierta limitación para la detección de las fracciones de menor tamaño. Puesto que la relación entre el tamaño de una partícula y su masa es a través del diámetro al cubo, un sistema de partículas de tamaño reducido puede no tener apenas relevancia en términos de masa, pero suponer una concentración en número elevada. En este tipo de sistemas, las técnicas basadas en la detección en masa pueden no resultar adecuadas para el análisis de partículas.

Existen alternativas para superar esta limitación, como es el uso de microscopías electrónicas para confirmar la presencia de fracciones de menor tamaño o el uso de técnicas de análisis individual de partículas, como NTA o SP-ICP-MS. En el primer caso, pese ser una técnica de dispersión de radiación, no presenta las limitaciones propias de estas técnicas y únicamente se ve afectada por parámetros instrumentales como la potencia del láser o la cámara que emplea para la detección, dificultando su aplicación

para partículas de tamaños inferiores a 20 nm [6]. SP-ICP-MS, al ser una técnica basada en la detección individual de partículas, no presenta los problemas de las técnicas basadas en detección en masa, alcanzando unos límites de detección de 10^6 partículas L^{-1} . Su uso complementario con la técnica AF4-ICP-MS puede resultar de interés para el análisis de muestras complejas, en las que se obtenga información en conjunto de todas las fracciones de NPs que pueda contener, como se muestra en el Capítulo 2.

Otro tipo de limitación en la separación de nanomateriales en AF4 está relacionado con la geometría del analito. Las nanopartículas pueden tener formas muy diversas, como en el caso de los nanotubos de carbono o, más concretamente en las partículas basadas en óxidos, los silicatos y aluminosilicatos, que presentan estructuras laminares con espesores en el rango de los nanómetros y longitudes variables que puede llegar a ser del orden de las micras. En estos casos, el comportamiento de la partícula en un fluido puede alejarse del ideal representado por una forma esférica y el fraccionamiento de las especies en función del tamaño, principio en el que se basa AF4, puede quedar invalidado. Esto puede traducirse en varios problemas, como la elución simultánea en modo estérico y en modo normal de diferentes fracciones del analito (ver Sección 2.1 de este capítulo sobre los modos de elución), lo que conlleva que partículas de tamaños muy diferentes se separen en tiempos de retención similares [92]. Además, pueden producirse aglomeraciones de los tamaños primarios de partícula en el interior del canal, provocando un aumento de la polidispersidad de la muestra y dificultando la caracterización de tamaños [93]. Por último, y no menos importante, existe el riesgo de tener valores de recuperación bajos al dificultar su separación [94], una limitación ya de por sí recurrente en AF4 en su aplicación a muestras complejas [88].

De nuevo, SP-ICP-MS representa una alternativa ante algunas de estas limitaciones de AF4 en función de la geometría del nanomaterial. La técnica de detección individual de partículas mediante ICP-MS no precisa de separación y la información obtenida es de masa por partícula, por lo que si se conoce su forma mediante otras técnicas, como las microscopías electrónicas, puede establecerse un diámetro equivalente (entendido como el diámetro de una esfera que equivale a la masa de la partícula analizada). La determinación de los diámetros equivalentes permitirá la obtención de distribuciones de tamaños, que puede relacionarse con cualquier tipo de geometría.

Si a las ventajas en cuanto a la geometría y a la detección de fracciones de menor tamaño de las nanopartículas frente a AF4, se suman los niveles de sensibilidad

alcanzados por SP-ICP-MS, esta técnica presenta unas capacidades únicas para el análisis de nanomateriales en situaciones en las que AF4-ICP-MS no resulta una opción viable. Con este motivo, se ha desarrollado y evaluado un método basado en el análisis individual de partículas mediante ICP-MS en un escenario de gran complejidad (tipo 2), que contempla la caracterización de partículas de aluminosilicatos migrados desde envases plásticos y que se mostrará en el Capítulo 3. Los fundamentos en los que se basa la técnica se profundizan en la siguiente sección.

3. DETECCIÓN INDIVIDUAL DE PARTÍCULAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON FUENTE DE IONIZACIÓN DE PLASMA DE ACOMPLAMIENTO INDUCTIVO (SP-ICP-MS)

3.1. FUNDAMENTO TEÓRICO DE SP-ICP-MS

La detección individual de partículas en SP-ICP-MS está basada en las diferencias en el comportamiento del analito entre sus formas disueltas y las partículas en el plasma, una diferencia relacionada con su distribución dentro de las gotas de aerosol generadas en el sistema. En las formas solubles, el analito está distribuido de forma homogénea en la disolución, por lo que la masa del elemento que entra en el plasma y que llega al detector puede considerarse constante, con una señal estable durante todo el tiempo de análisis. En las partículas, en cambio, el analito no está distribuido homogéneamente, sino que su presencia consiste en un grupo discreto de átomos. Si la suspensión de partículas es introducida con una dilución suficiente, cada una de ellas será vaporizada, atomizada e ionizada de forma individual, generando un paquete de iones que será detectado como un evento.

En estas condiciones y con una frecuencia de adquisición de datos lo suficientemente elevada, en SP-ICP-MS es posible la detección individual de partículas, que serán registradas como eventos discretos sobre una línea base continua, como se muestra en la Figura 7. La línea base es debida a la señal de fondo, constituida a su vez por las especies poliatómicas procedentes del plasma y/o matriz, y a la presencia de especies disueltas del analito. De esta forma, la intensidad del evento es proporcional a la masa de elemento en la partícula (y al tamaño si se tiene información adicional de la misma), mientras que el número de eventos será proporcional a la concentración en número de las mismas.

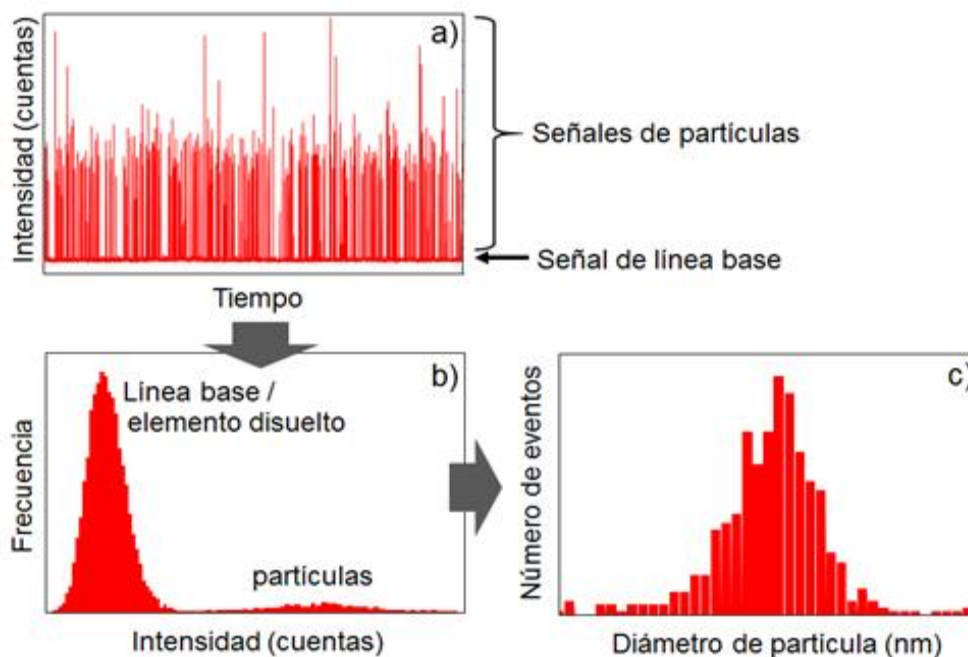


Figura 7. Resumen esquemático de la técnica SP-ICP-MS. a) Barrido de señales brutas registradas obtenidas durante un tiempo de medida. b) Histograma de intensidades procedente de los datos brutos. c) Distribuciones de tamaños de partícula (también posibilidad de distribuciones en masa) a través de transformaciones de las distribuciones de intensidades debidas a partículas en el histograma.

3.2. TRATAMIENTO DE SEÑALES EN SP-ICP-MS

La base teórica en la que se fundamenta la detección individual de partículas introducidas en sistemas ICP-MS de forma continua y a través de sistemas de nebulización convencionales fue descrita por Degueldre y Favarger [95]. Para establecer la relación entre la intensidad de una partícula y su información en masa o tamaño existen dos estrategias fundamentales. La primera corresponde al uso de calibraciones con estándares de nanopartículas de diferentes tamaños de la misma composición elemental, la misma geometría y la misma densidad que el analito. En este caso, a través de las sensibilidades obtenidas en las calibraciones se pueden establecer correlaciones directas entre la respuesta instrumental y parámetros como la masa o el diámetro de una partícula, la concentración en número de partículas y la concentración del elemento en formas disueltas. Sin embargo, la existencia de estándares bien caracterizados de la misma naturaleza que el analito es escasa, por lo que es necesario otro tipo de estrategias.

Como alternativa, se emplean estándares disueltos del mismo elemento, aunque en esta segunda estrategia es necesario conocer las contribuciones de ciertos factores que van a tener un efecto en el análisis de partículas de un determinado analito. Estos factores están relacionados con la introducción de la muestra (K_{intro}), la eficiencia de detección del sistema (K_{ICP-MS}) y el isótopo de análisis (K_M), que son descritos a lo largo de las expresiones que se muestran en esta sección. Dentro del factor de introducción de la muestra se considera el parámetro de la eficiencia de transporte. Para su determinación existen diferentes métodos, como el cálculo del volumen que entra en el plasma a partir del caudal de introducción de muestra y la cantidad de efluente desechado, o los más habituales basados en el uso de suspensiones de estándares o patrones de partículas, que bien a partir de su concentración en número (método de la frecuencia) o a partir de su diámetro y densidad (método del tamaño) es posible el cálculo de la eficiencia de transporte [96].

La relación entre una señal bruta (Y_R) y la masa correspondiente a un elemento nebulizado (X^M) puede establecerse a través de la siguiente expresión [97,98]:

$$Y_R = K_R X^M = K_{intro} K_{ICP-MS} K_M X^M \quad (6)$$

en la que K_R hace referencia a la sensibilidad obtenida con la calibración de una serie de estándares a través de la relación de señales de intensidad y concentración en masa del elemento M. Por otro lado, la señal también puede relacionarse con la masa de un elemento a través del factor de introducción de muestra K_{intro} , que depende de la mencionada eficiencia de transporte del analito (η) y del caudal de introducción de muestra ($Q_{muestra}$) ($K_{intro} = \eta Q_{muestra}$); del factor de eficiencia de detección K_{ICP-MS} , que es el ratio de iones detectados frente al número de átomos introducidos en el sistema, y del factor del isótopo K_M ($K_M = A_A N_{Av} / M_M$), para el que A_A es la abundancia atómica del elemento analizado, N_{Av} es el número de Avogadro y M_M es la masa atómica del elemento.

La asunción principal en la que se basa SP-ICP-MS es que cada evento registrado representa una partícula individual. Trabajando bajo esta premisa, el número de partículas detectadas (Y_N) durante un determinado tiempo de adquisición (t_i) está directamente relacionado con la concentración en número de partículas (X^N):

$$Y_N = K_N X^N = K_{intro} t_i X^N \quad (7)$$

donde K_N es la sensibilidad obtenida para la calibración en concentración en número realizada.

Además de la concentración en número de partículas a partir del número de eventos detectados, SP-ICP-MS permite obtener información sobre la masa de analito por partícula. Así, la intensidad neta para cada partícula detectada (S_P), entendida como la intensidad bruta correspondientes a un pico (Y) menos la intensidad promedio de la línea base (Y_B), $S_P = Y - Y_B$, es proporcional al número de átomos del analito y, por tanto, a la masa del elemento por partícula (m_P):

$$S_P = K_m m_P = K_{ICP-MS} K_M m_P \quad (8)$$

expresión en la que K_m es la pendiente de la calibración en masa por partícula (intensidad neta de pico por masa por partícula del elemento). Si se conoce la composición, la densidad de la partícula y se asume una forma esférica, la Ec. 8 puede expresarse como:

$$S_P = \frac{1}{6} \pi \rho F_P K_{ICP-MS} K_M d^3 \quad (9)$$

donde d hace referencia al diámetro (equivalente), ρ a la densidad y F_P a la fracción en masa del elemento en la partícula.

En función del tiempo de lectura (o *dwell time*) empleado en las condiciones de medida, los iones procedentes de las partículas serán registrados como pulsos o como señales transitorias [99]. Cuando se utilizan tiempos de lectura del orden de los milisegundos, estos tiempos son mayores que la duración del evento de la propia partícula individual, que suele variar entre 300 y 1000 μs [99,100], por lo que es registrado como un único pulso (una única medida). Mientras que para tiempos de lectura de microsegundos, los tiempos son menores que el evento de una partícula, por lo que el registro se efectúa como un conjunto de señales transitorias, que involucran varias medidas (Figura 8).

En el caso de tiempos de lectura del orden de microsegundos, la intensidad neta para una partícula detectada (S_P) corresponderá a la suma de las intensidades netas registradas a lo largo de la señal transitoria ($S_P = \sum S_{Pi}$). Esta intensidad neta total para una partícula no depende del tiempo de lectura, aunque, en el análisis con microsegundos, la altura del perfil del pico sí que será proporcional [101].

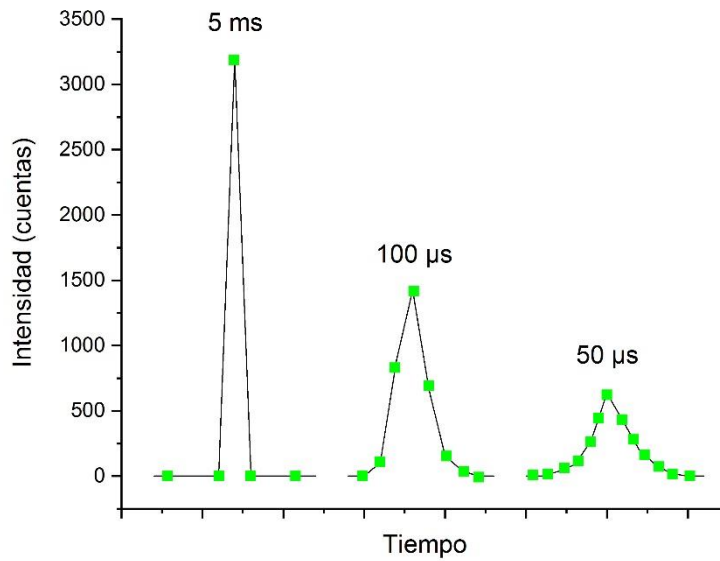


Figura 8. Representación esquemática de perfiles de pico en función del tiempo de lectura empleado en SP-ICP-MS. Los cuadrados verdes hacen referencia al pulso (en el caso de tiempo de lectura de milisegundos; S_P) o a las señales transitorias (microsegundos; S_{Pi}) registradas que corresponden a un pico.

Por último, a partir de la señal correspondiente a la línea base se puede obtener información sobre la concentración en masa del elemento en formas disueltas (X^D). Esta concentración puede ser calculada a partir de la señal neta promedio de la línea base, $S_{\bar{D}} = Y_{\bar{D}} - Y_B$, en la que $Y_{\bar{D}}$ es la señal promedio de la línea base e Y_B la intensidad promedio de la línea base para un blanco. Si se considera un tiempo de lectura (t_{dwell}) específico, la concentración en masa debida al elemento disuelto se calculará a través de la siguiente expresión:

$$S_{\bar{D}} = K_R t_{dwell} X^D = K_{intro} K_{ICP-MS} K_M t_{dwell} X^D \quad (10)$$

Las ecuaciones mostradas resumen los fundamentos de SP-ICP-MS, en las que se establecen las relaciones de las intensidades registradas respecto a la masa de un elemento (Ec. 6), ya sea para partículas (Ec. 8) o para la determinación de concentraciones del elemento en forma disuelta (Ec. 10), y la relación entre el número de eventos detectados y la concentración en número de partículas (Ec 7). La intensidad de los eventos de partícula puede relacionarse no solo con su masa, sino también con su diámetro (Ec. 9), lo que permite la determinación de las distribuciones en masa y en tamaño de las partículas analizadas.

3.3. DETECCIÓN DE PICOS EN SP-ICP-MS

Una cuestión fundamental que afecta tanto a la caracterización como a la cuantificación en número de partículas es el criterio utilizado para la detección de picos, lo que es especialmente relevante cuando se tienen altos niveles de intensidad de la línea base, ya sea por altas concentraciones de formas disueltas del analito o por las interferencias poliatómicas presentes para algunos isótopos. El criterio para la discriminación de picos se basa en un concepto denominado valor crítico (Y_C), que es definido como la respuesta de un instrumento por encima de la cual una señal observada es atribuida a la presencia de una partícula [102], representado de forma gráfica en la Figura 9.

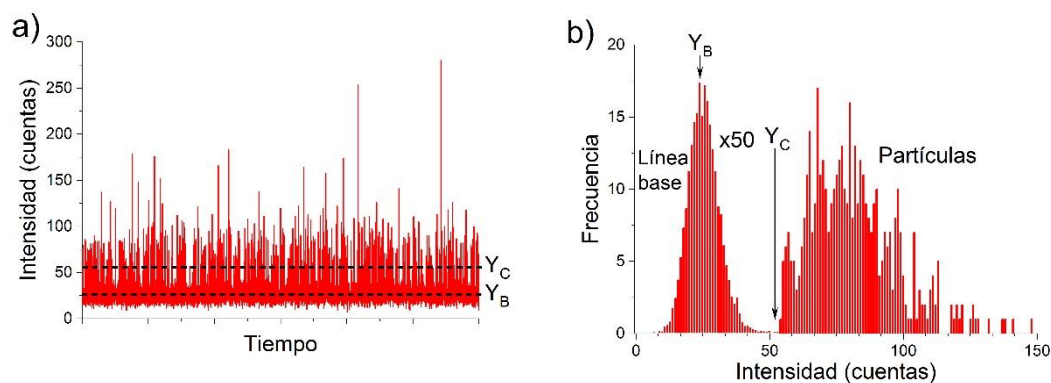


Figura 9. Valor crítico (Y_C) determinado para la discriminación de señales de partículas respecto al promedio de la señal de la línea base (Y_B), representado en: a) un barrido de intensidades para señales brutas y b) el histograma de intensidades correspondiente al barrido.

Para el establecimiento del valor crítico existen diferentes estrategias. Aunque algunos autores [103] han desarrollado algoritmos de deconvolución algo más complejos que la utilización únicamente de un valor crítico para detectar estas señales respecto a la línea base, la mayoría de los autores han propuesto la determinación del valor crítico en base a un criterio n sigma, en el que Y_C es calculado a partir de la intensidad promedio de la línea base (Y_B) y un múltiplo de su desviación estándar (σ_B), a través de la siguiente expresión:

$$Y_C = Y_B + n\sigma_B \quad (11)$$

La mayoría de los procedimientos considerados se basan en el uso de coeficientes que comprenden valores desde 3 hasta 8 para el parámetro n [104,105], aunque los más

utilizados pertenecen a criterios 3σ [28,106,107] y 5σ [101,108,109]. El número de falsos positivos, entendidos como eventos de la línea base considerados de forma errónea como partículas, será más o menos significativo en función del criterio adoptado. Para distribuciones normales de línea base, la aplicación de un criterio 3σ conlleva que un 0,135% de los eventos detectados sean falsos positivos, mientras que con un criterio más estricto como 5σ , su ocurrencia está muy por debajo del 0,1% [102]. En cualquier caso, el objetivo para obtener la mejor capacidad de detección posible en SP-ICP-MS es la reducción del número de falsos positivos al máximo sin por ello comprometer las señales debidas a las partículas, con la consecuente pérdida de información en masa o en tamaño. Además, hay que tener en cuenta que en el caso de tiempos de lectura en el rango de los microsegundos, lo que implica trabajar con eventos de señales transitorias, la detección de estos picos puede ser algo más complicada y es el propio software del instrumento el que realiza la detección de estos picos, aunque la mayoría permite la modificación del valor crítico que se aplica.

En el Capítulo 3 de la Tesis Doctoral se abordarán los efectos de las condiciones experimentales sobre el valor crítico en la detección de eventos de partícula con unos niveles de línea base elevados debidos a interferencias poliatómicas, como sucede en el análisis de silicio con sus isótopos ^{28}Si y, en menor medida, ^{29}Si .

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El desarrollo de la nanotecnología y la incorporación de nanopartículas en un número significativo de productos industriales y de consumo suponen la necesidad de obtener información sobre este tipo de materiales para su evaluación. Proporcionar esa información es uno de los retos más importantes de la Ciencia Analítica en la actualidad, para lo que es necesario el desarrollo de metodologías aplicables en escenarios de cada vez mayor complejidad, en los que en muchos casos se esperan bajos niveles de concentración de nanopartículas.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la caracterización de nanopartículas basadas en óxidos, uno de los tipos de nanomateriales más representativos, en escenarios complejos mediante técnicas basadas en espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), que destaca por su alta sensibilidad y su especificidad elemental. Para ello, se desarrollan metodologías analíticas basadas en dos de las técnicas con mayor potencial para el análisis de nanomateriales, como son la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4), acoplada a ICP-MS y a otros sistemas de detección, como UV-Vis y DLS, y la técnica de detección de partículas individuales mediante ICP-MS (SP-ICP-MS).

Este objetivo principal conlleva una serie de objetivos específicos, que se enumeran a continuación:

- El estudio de la eficiencia de separación en AF4 y las variables que la determinan para partículas en el rango de los nanómetros. Este estudio se ha centrado en el efecto de la longitud del canal a través de la comparación de dos canales: uno de dimensiones convencionales y un canal corto.
- El desarrollo de métodos para la detección, caracterización y cuantificación de partículas de TiO_2 en muestras con diferentes rangos de tamaños y niveles de concentración (desde mg g^{-1} a $\mu\text{g g}^{-1}$). Este desarrollo implica el estudio de las principales variables experimentales que afectan a la separación en AF4, así como la evaluación de distintas estrategias para la determinación de tamaños a partir de la calibración del canal con estándares de tamaño o del uso de detectores basados en dispersión de radiación, como DLS. La cuantificación requiere a su vez de estrategias válidas para la puesta en disolución de las partículas de TiO_2 , la

minimización de las pérdidas por interacciones con los elementos del canal (para obtener elevadas recuperaciones) y establecer procedimientos de calibración en ICP-MS.

- La comparación de los resultados obtenidos mediante AF4-ICP-MS en un escenario complejo (muestras de surimi) con los obtenidos a través de SP-ICP-MS para evaluar sus prestaciones y sus limitaciones analíticas.
- El desarrollo de una metodología basada en SP-ICP-MS que permita la detección y la caracterización de partículas de aluminosilicatos migrados desde envases plásticos. Este desarrollo requiere de la evaluación del método en función del isótopo de análisis (^{27}Al , ^{28}Si o ^{29}Si) y del sistema de introducción de muestra empleado (cámara y nebulizador) para estudiar el rango de tamaños en el que es aplicable la detección individual de partículas.
- La aplicación del método desarrollado en la caracterización de partículas de aluminosilicatos en una arcilla natural y en distintos medios donde han podido liberarse por migración. Esta aplicación conlleva la evaluación de los resultados a través de la comparación con TEM para establecer las distribuciones de tamaños y con ICP-MS para evaluar los contenidos de aluminio determinados en las diferentes muestras.

III. EXPERIMENTAL

***1. MEJORA DE LA EFICIENCIA EN LA
SEPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
EN AF4 MEDIANTE EL USO DE
CANALES CORTOS***

1.1. INTRODUCCIÓN

El uso de canales de diferentes tamaños y geometrías en las técnicas de FFF ha sido descrito en la bibliografía durante las dos últimas décadas [110–113]. En concreto, los sistemas de AF4 miniaturizados y de FFF de fibra hueca (HF5) comercialmente disponibles, son los que han despertado mayor interés para la separación y análisis de un amplio rango de partículas [114–116]. Las principales ventajas de estos dos sistemas de dimensiones reducidas frente a los sistemas convencionales de AF4 incluyen: menores cantidades de inyección de muestra, reducción en el consumo de portador, tiempos de retención más cortos y facilidad de acoplamiento con otras técnicas analíticas. Por ejemplo, el uso de canales miniaturizados se ha descrito en el análisis de diferentes macromoléculas, como lipoproteínas de alta y baja densidad [114,117], nanopartículas de poliestireno [115], oro [115,116] y dióxido de titanio [84,116], así como *quantum dots* [118]. En general, estos estudios corresponden a canales de dimensiones reducidas, tanto en longitud (L), normalmente alrededor de 7 cm (frente a los 23 cm de los canales convencionales), como en amplitud. Esta reducción conlleva menores tiempos de análisis, con la consecuente reducción en costes, y mayor relación señal-ruido. Estas ventajas también están asociadas a la necesidad de inyección de menores cantidades de muestra para evitar efectos de sobrecarga en el canal, aunque generalmente en detrimento de la resolución. El uso de un canal corto (12 cm de longitud) también se ha aplicado en la separación de lipoproteínas para la determinación de colesterol y triglicéridos por reacción enzimática con detección en UV-Vis [119]. La utilización de este tipo de canal permitió la reducción del caudal de salida, minimizando el consumo de reactivos enzimáticos de alto coste y disminuyendo la dilución de muestra necesaria, lo que supuso obtener mayores alturas de pico respecto a los canales de dimensiones convencionales. Sin embargo, en ninguno de los trabajos mencionados se ha realizado un estudio teórico sobre la influencia de las dimensiones del canal en la separación en AF4 y todas las mejoras apreciadas se basan únicamente en observaciones empíricas.

Algunos trabajos sí han estudiado los efectos de la geometría del canal en la separación en FIFFF desde una perspectiva teórica [80,120–124], aunque solo un número reducido ha incluido el efecto de la longitud del canal [123,124]. En general, este tipo de estudios se apoyan en diseños experimentales que emplean moléculas bien definidas en términos de coeficientes de difusión, principalmente proteínas [120,121] o nanopartículas de poliestireno [80,122]. Aunque suelen estar centrados en variables instrumentales como

el flujo cruzado o *cross flow*, algunos parámetros como la recuperación, que permite tener un control de interacciones con la membrana, no fueron considerados.

El interés extraordinario que las nanopartículas artificiales han ido ganando durante la última década ha promovido el uso de AF4 para su detección y caracterización en multitud de campos [6,125]. Las ventajas que ofrece esta técnica (por ejemplo, ausencia de fase estacionaria, alto poder de separación, capacidades multielementales a través de su acoplamiento a diferentes detectores) justifican su popularidad, especialmente en combinación con otras técnicas o como herramienta complementaria, para el análisis en escenarios complejos [34,126–128]. Por otro lado, resulta necesaria la optimización de sus condiciones operativas (como la composición del portador, el tipo de membrana o el programa de flujo cruzado) para cada tipo de muestra, con el objetivo de conseguir una correcta separación con la menor perturbación posible y elevados ratios de recuperación para todas las especies involucradas [129–132]. La optimización tiende a minimizar las interacciones que puedan conllevar la pérdida de analito, aunque a menudo sin prestar especial atención en la eficiencia de separación alcanzada.

Este capítulo se centra en aquellas variables que pueden afectar a la eficiencia de separación de este tipo de analito (partículas por debajo de 500 nm de tamaño), a través de la comparación de dos canales: un canal corto (SLC: *Short Length Channel*) y un canal convencional (SC: *Standard Channel*), en los que se emplean las mismas condiciones de separación. Con el objetivo de respaldar los resultados experimentales, se ha incluido una sección que aborda los fundamentos teóricos de las variables que afectan el ensanchamiento de banda en AF4 y su efecto en la resolución, la retención y la eficiencia de separación.

1.2. FUNDAMENTOS DE LA SEPARACIÓN EN AF4

En los sistemas de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo, la separación se produce por la fuerza originada por un flujo secundario, denominado flujo cruzado (\dot{V}_c). En AF4, el flujo cruzado es generado por una parte del caudal a la entrada del canal, que empuja a las partículas hacia la base del mismo, donde se sitúa la membrana semipermeable. La membrana permite la salida de este flujo, pero evita que las partículas se filtren a través de ella.

Tal y como se ha discutido en el Apartado I de la Tesis (Sección 2.1), la retención de las especies en FFF se expresa a través del parámetro de retención λ (Ec. 4), donde la fuerza F es específica para el tipo de campo aplicado. En el caso de AF4, las partículas se encuentran en una situación de equilibrio entre dos fuerzas opuestas: el flujo cruzado y la difusión del analito (D), de modo que F se expresa como:

$$F = k T \frac{|u_c|}{D} \quad (1.1)$$

donde $|u_c|$ hace referencia a la velocidad lineal de flujo cruzado, que es el resultado del flujo cruzado (\dot{V}_c) aplicado por unidad de área del canal (A):

$$|u_c| = \frac{\dot{V}_c}{A} \quad (1.2)$$

Si en la Ec. 4 se sustituye la expresión específica de F en AF4 de la Ec. 1.1, y el flujo cruzado de la Ec. 1.2, se obtiene que el parámetro λ puede ser reformulado como:

$$\lambda = \frac{DA}{\dot{V}_c w} \quad (1.3)$$

Esta expresión refleja que, conforme aumenta el flujo cruzado, la fuerza de campo aplicada es mayor y, por tanto, las especies quedan retenidas en una zona más próxima a la pared de acumulación, tal y como se mostró en la Ec. 3. Por el contrario, cuanto mayor es la difusión de un analito, mayor será la oposición al campo generado y su posición en el canal estará más alejada de la membrana semipermeable. Puesto que la difusión de las especies puede relacionarse con su diámetro hidrodinámico (d_h), de acuerdo a la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h} \quad (1.4)$$

La Ec. 1.3 puede ser reformulada, resultando en:

$$\lambda = \frac{kTA}{3\pi\eta_m d_h \dot{V}_c w} \quad (1.5)$$

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y η_m es la viscosidad del medio. Por lo tanto, bajo el campo generado por el flujo cruzado, AF4 separa las especies en función de sus coeficientes de difusión, a su vez determinados por el diámetro hidrodinámico. A través de los parámetros de retención teóricos (λ) y experimentales (R) en unas determinadas condiciones de separación, se pueden relacionar los tiempos de retención obtenidos (t_r) con el diámetro hidrodinámico de las especies.

1.2.1. Eficiencia de la separación en AF4. Factores que afectan a la dispersión

La eficiencia de la separación en AF4 está determinada por diferentes fuentes de dispersión. La magnitud de cada componente puede ser cuantificada a través de la altura de plato teórico (H), un parámetro que relaciona la varianza (σ^2) del perfil de concentración dividido por su desplazamiento promedio (L). La altura de plato es el medio más común para describir los fenómenos de dispersión y expresar sus ecuaciones, y que servirá a lo largo del capítulo como guía para comprender mejor las diferentes variables que son relevantes en la separación. En el modo de elución normal, o Browniano (ver fundamentos de FFF en la Sección 2.1, en el Apartado I de la Tesis), los orígenes de estas fuentes de dispersión son: no-equilibrio (H_n), difusión axial (H_d), relajación (H_r), polidispersidad (H_p) y efectos instrumentales (H_e) [58]. Todas estas contribuciones son aditivas, de modo que la dispersión se puede expresar como:

$$H = H_n + H_d + H_r + H_p + H_e \quad (1.6)$$

En la mayoría de las ocasiones, la principal fuente de dispersión en FFF es la de no-equilibrio (H_n). El fenómeno de no-equilibrio tiene lugar cuando los componentes del analito, a pesar de tener tamaños similares, son conducidos a través del canal a diferentes velocidades en el eje axial (ver Figura 1.1). Estas velocidades son originadas por el régimen laminar del flujo del portador, en el que el máximo es alcanzado en el centro del espesor del canal, y el mínimo en las paredes, siguiendo un perfil parabólico.

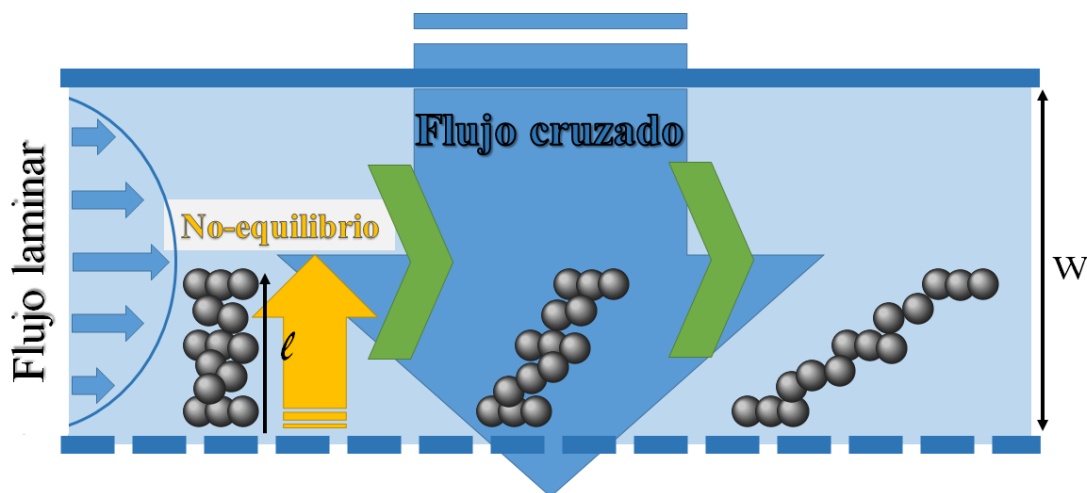


Figura 1.1. Situación de dispersión de no-equilibrio durante la separación en AF4, donde w hace referencia al espesor del canal y l al de la nube formada por el analito.

La dispersión de no-equilibrio es expresada con la siguiente ecuación:

$$H_n = \frac{\chi w^2}{D} \langle v \rangle \quad (1.7)$$

donde w es el espesor del canal, D es el coeficiente de difusión del analito y $\langle v \rangle$ la velocidad promedio del portador, que a su vez es definida por el flujo axial (\dot{V}) dividido entre la anchura del canal (b) y su espesor:

$$\langle v \rangle = \frac{\dot{V}}{bw} \quad (1.8)$$

Por otro lado, la función χ está relacionada con la tercera potencia del parámetro de retención λ . Esta relación normalmente se expresa en su forma simplificada como:

$$\chi = 24\lambda^3(1 - 8\lambda + 12\lambda^2) \quad (1.9)$$

De acuerdo con los fundamentos teóricos de FFF, descritos en la Sección 2.1 del Apartado I de la Tesis Doctoral, λ es definido como el cociente entre el espesor promedio de capa del analito (l) y el espesor del canal (w) (Ec. 3). Este parámetro, por tanto, hace referencia a la posición de la nube formada por el analito en el interior del canal; posición que, en el caso de AF4, dependerá del equilibrio entre el coeficiente de difusión de las especies (D) y la velocidad de flujo cruzado aplicado $|u_c|$ (Ecs. 1.2 y 1.3).

Aunque la relación entre H_n y la longitud del canal (L) no es directa, puede deducirse a partir del parámetro λ y la función χ . Bajo las mismas condiciones de separación (mismo caudal de flujo cruzado (\dot{V}_c) y misma velocidad promedio del portador ($\langle v \rangle$) y dimensiones del canal (w y b), una disminución en el área (A) conllevará una mayor velocidad de flujo cruzado (Ec. 1.2). Este aumento significa una reducción del parámetro λ (Ec. 1.3) y la función χ (Ec. 1.9), y, por lo tanto, la dispersión de no-equilibrio se reduce con la disminución de la longitud L .

El comportamiento de la difusión axial (H_d) respecto a la longitud del canal es precisamente el contrario al de H_n . Esta fuente de dispersión es una respuesta a los gradientes de concentración axial del analito (ver Figura 1.2), los cuales, en mayor o menor medida, siempre van a estar presentes en FFF [58].

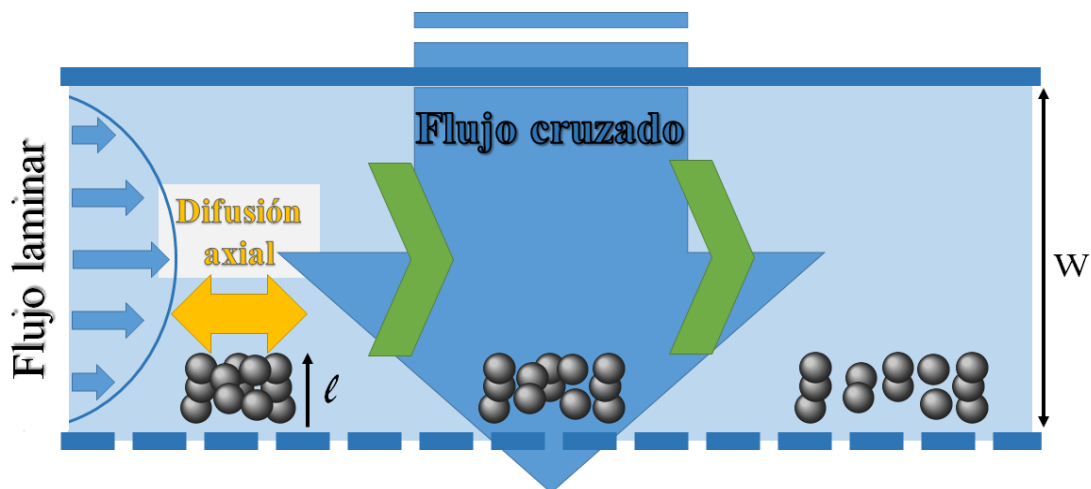


Figura 1.2. Situación de dispersión por difusión axial durante la separación en AF4.

La difusión axial es definida como:

$$H_d = \frac{2D}{R \langle v \rangle} \quad (1.10)$$

donde R es un parámetro de retención experimental referido al cociente entre el tiempo de retención específico para una especie (t_r) y el tiempo de retención de volumen muerto (t_0), de acuerdo con la Ec. 2, descrita en la Sección 2.1 del Apartado I. Esto supone que cuanto mayor es el tiempo de retención (t_r) de una especie en el canal, mayores son los fenómenos de difusión en su interior. El parámetro experimental R también puede relacionarse con λ , a través de la Ec. 5.

Por lo tanto, la difusión axial dependerá del coeficiente de difusión de las especies (tamaño de partícula) y del parámetro de retención R. Para un analito específico con un coeficiente de difusión D, la reducción de la longitud L conlleva una disminución del parámetro de retención λ (Ec. 1.3) y, por consiguiente, de R (Ec. 5); lo que resulta en un aumento de la difusión axial. Aunque esto puede resultar contrario a lo que sucede en cromatografía, se ha de tener en cuenta que una disminución en la longitud del canal implica un aumento de la fuerza aplicada para un mismo flujo cruzado; y, por consiguiente, una posición más próxima al fondo del canal, lo que conlleva una menor velocidad del analito y, por tanto, una mayor difusión. Estas cuestiones se abordan con mayor profundidad en la Sección 1.4.1.

La contribución del resto de fuentes de dispersión suele considerarse despreciable respecto a las vistas anteriormente [58,123], por lo que se ha omitido su desarrollo teórico en este capítulo. Dentro de un diseño experimental, la componente de relajación (H_r)

puede ser minimizada optimizando la etapa de inyección/focalización de la muestra en el canal. En este trabajo, se ha estudiado su influencia modificando diferentes variables que afectan al proceso de relajación, como es el caso del tiempo o los caudales aplicados durante la etapa de inyección/focalización. Respecto a la polidispersidad, esta es una propiedad intrínseca de la muestra de estudio. En este caso, se emplearon estándares monodispersos de poliestireno (PS), con el objetivo de minimizar la contribución de este tipo de dispersión (H_p). Finalmente, los efectos instrumentales (H_e) son definidos como situaciones de no idealidad dentro del diseño experimental. A lo largo de este capítulo, se han estudiado y modificado diferentes variables instrumentales, considerando su contribución en los resultados experimentales.

1.3. EXPERIMENTAL

1.3.1. Materiales y estándares

Para el estudio de la eficiencia de separación en AF4 se emplearon una serie de estándares de tamaño de nanopartículas de poliestireno (PS NPs). Todos estos estándares monodispersos de PS (50, 100, 200 y 500 nm) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza). Se han utilizado dos productos que contienen nanopartículas de TiO_2 a lo largo del estudio, con el objetivo de comprobar la mejora de la eficiencia con el uso del canal corto (SLC) en términos de tiempos de retención, anchuras de pico, resolución y recuperación. Las suspensiones de nanopartículas de dióxido de titanio fueron preparadas a partir de rutilo en polvo (99,9%) con tamaños de partícula primarios de 30 nm (US Research Nanomaterials, Houston, EE. UU.), y mezclados con una suspensión del producto fotocatalítico NP Fotoactiva 23, con partículas de TiO_2 alrededor de 8 nm de tamaño, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Ekoeaso S.L., Gipuzkoa, España).

Todas las suspensiones fueron preparadas a una concentración de 30 mg L^{-1} , diluidas en el portador empleado en AF4 y sonicadas en baño de ultrasonidos (P Selecta, Ultrasons, Barcelona, España) durante 5 minutos antes de su análisis.

1.3.2. Instrumentación

Se ha empleado un sistema AF4 AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg, Alemania). La composición escogida para el portador en la separación fue un surfactante mixto (Novachem, Postnova Analytics), diluido en agua ultrapura al 0,05% (v/v). El agua ultrapura (18 MΩ cm de resistividad) fue obtenida de un dispositivo de purificación Milli-Q (Bedford, EE. UU.). La filtración del portador se llevó a cabo con filtros de nylon de 0,2 μm (Merck Milipore, Irlanda). Para la inyección de muestra se empleó un *loop* de 100 μL a lo largo de todo el estudio experimental.

Se estudió la separación en dos canales comerciales diferentes (Postnova Analytics, Landsberg, Alemania): un canal corto (SLC) (registrado como “Mini Channel”) y un canal convencional (SC) (registrado como “Analytical Channel”). El diseño en ambos casos canales es similar, que consta de dos partes triangulares al comienzo (b_0 : 2,0 cm de anchura) y al final del canal (b_L : 0,5 cm de anchura) y una parte trapezoidal, que es la única sección que realmente varía en longitud para cada canal. La longitud para el SC es de 27 cm, mientras que para el SLC es de 14 cm. El *spacer* empleado fue en ambos casos de 350 μm de espesor, con una membrana de ultrafiltración de celulosa regenerada de 10 kDa (Postnova Analytics). Con cada cambio de membrana para los análisis, primero era necesario un proceso de acondicionamiento, durante el cual se inyectaba en repetidas ocasiones una suspensión de nanopartículas de PS de 100 nm sin aplicar ningún programa de flujo cruzado. Posteriormente, la misma suspensión era inyectada utilizando el programa que se muestra en la Tabla 1.1, hasta que los valores de los tiempos de retención y las recuperaciones eran estables. Por último, se inyectaba el portador varias veces, hasta que no se obtenía señal alguna respecto a la línea base.

Tabla 1.1. Programa de separación aplicado en AF4, con sus diferentes etapas. Caudal de salida: 1 mL min⁻¹.

Etapa	Tiempo (min)	Flujo cruzado (mL min ⁻¹)
Inyección/focalización	4 + 1	Caudal de inyección: 0,2 mL min ⁻¹
	10-30	Constante
Elución	3	Decrecimiento lineal
	2	Constante

A la salida del canal, el portador era conducido a un detector UV-Vis de matriz de diodos (Shimadzu, Duisburgo, Alemania), con registro de señales de absorción en el rango de longitudes de onda comprendido entre 200 y 650 nm. En este caso concreto, se utilizó fundamentalmente la longitud de onda de 254 nm para la detección de PS y de 350 nm para el TiO₂, aunque el espectro completo era registrado cada 0,6 s.

1.3.3. Cálculos de eficiencia y tratamiento de datos

Las eficiencias de separación se estimaron utilizando diferentes procedimientos. Primero se estudiaron las implicaciones de las fuentes de dispersión explicadas a lo largo de la Sección 1.2.1 del capítulo, para lo que se modelizó una eficiencia teórica (H_{teo}), siguiendo la Ec. 1.6. En este caso, tan solo se consideraron las componentes de mayor relevancia, es decir, la de no-equilibrio (H_n) y la difusión axial (H_d), calculadas a través de las Ecs. 1.7 y 1.10, respectivamente. Las eficiencias fueron representadas en el modelo en función del parámetro de retención λ , estimado con la Ec. 1.3. De acuerdo con las bases teóricas, la mayoría de los parámetros que definen λ están referidos a constantes o valores fijos (Ec. 1.5), a excepción de dos factores experimentales: el diámetro hidrodinámico del analito y el flujo cruzado. Dado que el propósito de este capítulo está centrado en la separación de partículas en la escala nanométrica, para el modelo se han considerado tamaños en un rango que comprende desde 50 hasta 500 nm. En cuanto al flujo cruzado, se han estudiado caudales de 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 mL min⁻¹, en un enfoque cercano a las condiciones reales empleadas en AF4, con los valores que más se suelen emplear en la bibliografía [34,126,127,133,134]. Se consideró que durante la separación se empleaba un caudal de salida constante de 1 mL min⁻¹. El parámetro R, necesario para los cálculos de H_d , fue estimado a partir de λ con la Ec. 5 del Apartado I.

Las eficiencias experimentales (H_{exp}) se calcularon para los mismos caudales de flujo cruzado que en H_{teo} , y en términos de diámetro de partícula, se emplearon estándares de tamaño de PS de 50, 100, 200 y 500 nm. Para ello, se utilizó la siguiente expresión:

$$H_{exp} = \frac{L \sigma^2}{5,54 t_r^2} \quad (1.11)$$

donde σ es la anchura de pico a media altura, y el valor de 5,54 hace referencia a la relación entre la anchura de pico en la línea base y a media altura. Tanto los tiempos de

retención como las anchuras fueron obtenidos de los fractogramas resultantes en los análisis correspondientes, en los que las señales de intensidad se representan en función del tiempo. Las resoluciones entre picos se calcularon a través de la relación entre la diferencia de los tiempos de retención y la anchura promedio, como describe Mitrano *et al.* [135]. Para las recuperaciones se siguió el procedimiento especificado en el trabajo de Bolea *et al.* [136], para una longitud de onda específica de 254 nm. El procesamiento de datos fue realizado con el software OriginPro Data Analysis, en su versión 2019b (OriginLab Corporation, Northampton, EE. UU.).

Con el propósito de comparar los resultados de eficiencias teóricas y experimentales en unas condiciones más próximas a las realmente aplicadas en los ensayos, se definieron unas eficiencias previstas (H_{pre}). Este enfoque consiste en una corrección en el parámetro de retención λ a partir de las desviaciones experimentales, respecto a los valores que la teoría predice en los cálculos con la Ec. 1.3. Para ello, en lugar de aplicar dicha ecuación con sus valores teóricos, se utilizaron los tiempos de retención t_r y t_0 obtenidos experimentalmente. El parámetro R fue estimado con la Ec. 2, mientras que la Ec. 5 se empleó para la determinación de λ . Además de las fuentes de no-equilibrio y difusión, se ha considerado una fuente adicional, denominada H_{inst} , relacionada con la propia dispersión que sufre el volumen de muestra inyectado al circular por el canal y el resto de conducciones. Esta contribución puede ser calculada a partir de la anchura de pico, como sucedía en la Ec. 1.11 para H_{exp} . Sin embargo, en este caso la anchura se obtiene a través de la elución de los estándares de tamaño de PS al ser inyectados sin aplicar ningún flujo cruzado (y con caudal de salida 1 mL min^{-1}). H_{pre} , por lo tanto, fue calculada como la suma de H_n , H_d y H_{inst} , y modelizada en función de λ .

1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1. Eficiencias teóricas basadas en fenómenos de dispersión

Se modelizaron las eficiencias teóricas (H_{teo}) de acuerdo con lo descrito en la Sección 1.3.3 y se representaron en función de λ para diferentes tamaños de partícula y flujos cruzados (Figura 1.3). Las eficiencias siguen una tendencia exponencial, en la que conforme el parámetro de retención λ decrece, la altura de plato es menor. Esto significa que las eficiencias de separación mejoran cuando la nube que forman los analitos se estrecha. Para valores de λ por debajo de 0,01, una disminución en el parámetro de

retención, por pequeña que sea, conlleva una reducción significativa de los fenómenos de dispersión; mientras que para valores superiores esta mejora es menos pronunciada. Valores bajos de λ suponen condiciones de alta retención dentro del canal, que solo se consiguen o bien en el caso de partículas de gran tamaño (los mejores resultados se muestran para 500 nm) o bien aplicando altos caudales de flujo cruzado, de acuerdo al principio en el que se basa la técnica. Cuando el flujo cruzado se aumenta hasta 0,8 mL min⁻¹ (representado por las estrellas en la Figura 1.3), se alcanzan los valores mínimos de dispersión para todos los tamaños estudiados. Sin embargo, esta tendencia puede verse limitada por la difusión axial, la cual comenzaría a ser significativa en estas condiciones de alta retención.

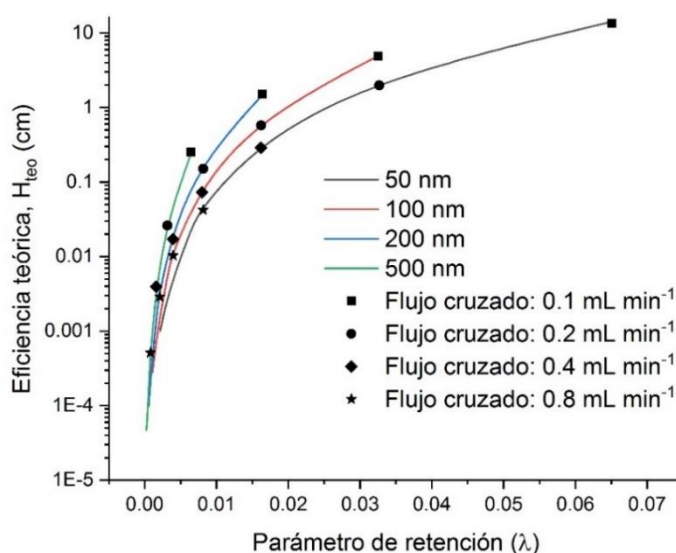


Figura 1.3. Modelo para eficiencias teóricas, referidas como la suma de dos fuentes de dispersión: no-equilibrio (H_n) y difusión axial (H_d), en función del parámetro λ . Eficiencias representadas para diferentes flujos cruzados y diámetros hidrodinámicos del analito.

La contribución de cada fuente de dispersión se muestra en la Figura 1.4, donde, de acuerdo con los fundamentos teóricos, la dispersión de no-equilibrio y la difusión axial siguen tendencias opuestas. La razón es que el ratio de retención R (y por tanto λ) es directamente proporcional en el caso de H_n , mientras que para H_d es inversamente proporcional (Ec. 1.10). Al contrario que lo visto en la Figura 1.3, la difusión axial aumenta cuando λ decrece. Esto se explica a partir de los tiempos de retención de las especies, porque la difusión gana relevancia conforme las partículas permanecen más tiempo en el canal, y los flujos difusivos tienen entonces lugar. Para partículas de mayor

tamaño, los coeficientes de difusión (D) son más bajos y, en consecuencia, H_d decrece, aunque de forma poco significativa. En términos de flujo cruzado, cuando el caudal aumenta las partículas quedan focalizadas en una zona más próxima a la membrana; una zona en la que, siguiendo el perfil parabólico de flujo, la velocidad es más baja y los tiempos requeridos para la elución son mayores. Por lo tanto, al aumentar el flujo cruzado hay más probabilidades de que los flujos difusivos tengan lugar. En el rango de caudales de flujo cruzado considerado para la separación de nanopartículas, la altura de plato para la dispersión de no-equilibrio comprende valores teóricos desde 10 cm hasta 1×10^{-4} cm, mientras que se estiman resultados entre 1×10^{-5} y 1×10^{-6} cm para la difusión axial, lo que puede considerarse casi despreciable en comparación. Esto cumple con lo esperado dado que, a pesar de ser especies con altos coeficientes de difusión, la separación en el análisis de nanopartículas suele llevarse a cabo en condiciones de flujos cruzados bajos y caudales de salida elevados [124]. El modelo para H_{teo} sigue, por lo tanto, la tendencia de no-equilibrio, siendo esta la fuente de mayor contribución dentro de los fenómenos de dispersión. En consecuencia, los esfuerzos para mejorar la eficiencia de separación en AF4 en su conjunto deberían centrarse en disminuir H_n .

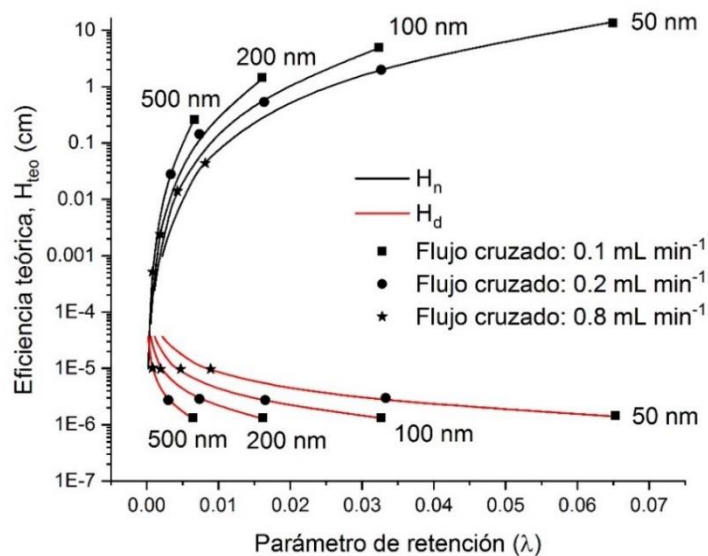


Figura 1.4. Contribución gráfica de la dispersión de no-equilibrio (H_n) y la difusión axial (H_d), ambas representadas para diferentes flujos cruzados y diámetros hidrodinámicos de partícula.

Teóricamente, el interés reside en la reducción del parámetro λ lo máximo posible, hasta alcanzar la región en la que un ligero cambio en su valor conlleve una mejora

significativa en la eficiencia, como se refleja en la Figura 1.3. Dado que el diámetro hidrodinámico es una propiedad que dependerá en exclusiva de la naturaleza de la partícula, la forma principal de producir esta mejora será a través del flujo cruzado. No obstante, hay limitaciones prácticas en lo que a esta variable se refiere, de modo que no es posible reducir λ de manera ilimitada. El incremento del caudal de flujo cruzado supone a su vez un aumento de los efectos estéricos [129], las interacciones analito-membrana [89,133] y las interacciones partícula-partícula [88,137] en el canal. Estas interacciones conllevan en general problemas en términos de recuperación, los cuales son recurrentes cuando la separación es aplicada a nanopartículas, como en el caso de NPs de plata [135,138,139], oro [140,141], dióxido de titanio [89,126,142] o poliestireno [115]. Además de estas interacciones, el aumento del flujo cruzado también implica tiempos de elución más prolongados.

1.4.2. Uso de un canal de dimensiones reducidas: implicaciones experimentales

Como ya se ha mencionado en la introducción de este capítulo, el cambio en las dimensiones del canal ya había sido considerado previamente por diferentes autores. Durante la etapa de desarrollo de las bases teóricas de la técnica, en la década de los 90, Giddings investigó la miniaturización teórica de los canales en FFF [123]. Bajo el concepto de número de platos (N) para el estudio de eficiencias de separación, demostró que este parámetro N tiene una dependencia lineal con el tiempo de retención y con el espesor de capa de la nube que forma el analito en interior del canal (l). Si el tiempo de retención y el espesor de capa se mantienen constantes, gracias al ajuste apropiado de los ratios de flujo, el número de platos también debería ser constante, con independencia de la longitud del canal [123]. En tal caso, si la longitud del canal (L) aumentara, esto supondría un incremento proporcional de la altura de plato teórico (H). El autor concluyó que la separación está determinada principalmente por l , parámetro que a su vez está influenciado por el flujo cruzado, de acuerdo con las Ecs. 3 y 1.3. Litzen corroboró esta observación en un estudio en profundidad de los efectos de las dimensiones del canal en la eficiencia de separación en un sistema de AF4 [124]. Esta autora resolvió que, si los tiempos de retención permanecían constantes, un canal de longitud superior a 15 cm no mejoraría la eficiencia de separación en términos de altura de plato. Además, determinó que las mejoras de la eficiencia con la longitud solo podrían ser conseguidas a través de

un aumento proporcional de los tiempos de retención (alcanzando un máximo a 60 cm), a través de la modificación de los caudales internos. De forma similar a Giddings, concluyó que es más eficiente ejercer una influencia en el ensanchamiento de banda y, por consiguiente, en la eficiencia a través del flujo cruzado.

Como se puede observar, en estos estudios teóricos la eficiencia de separación siempre se ha contemplado desde un punto de vista centrado en la variable del flujo cruzado, pues es el parámetro experimental que puede ser controlado en relación a la fuerza de campo aplicada. Este enfoque se basa en que el poder de fraccionamiento del sistema puede ser aumentado a través de un caudal del flujo cruzado más alto y, por consiguiente, los fenómenos de dispersión serán reducidos. Sin embargo, en el análisis de nanopartículas, debido a sus coeficientes de difusión y sus problemas de recuperación, no se requieren flujos cruzados elevados. Por lo tanto, la variación de la longitud del canal necesita ser considerada desde una nueva perspectiva.

De acuerdo con los fundamentos teóricos de AF4 (discutidos en la Sección 2.3 del Apartado I de la Tesis), la fuerza de campo está determinada por la velocidad de flujo cruzado ($|u_c|$), un parámetro definido como el flujo cruzado aplicado por unidad de área del canal (Ec. 1.2). Esta velocidad está afectada por las dimensiones del canal: bajo unas mismas condiciones de caudales, una reducción del área resulta en un incremento de $|u_c|$. Como consecuencia, la fuerza de campo también aumenta, lo que conlleva una disminución del parámetro de retención λ (Ec. 1.3), y la contribución de no-equilibrio, la fuente predominante de dispersión, será reducida. La teoría predice que, con el mismo ratio de caudales de flujo cruzado y de salida empleado, una reducción de la longitud del canal supondrá una mejora de la eficiencia de separación.

Para estudiar las implicaciones experimentales de la reducción del área de separación, se analizaron estándares de tamaño de PS en dos canales diferentes, SC y SLC, cuyas dimensiones están especificadas en la Sección 1.3.2. La diferencia de longitud supone una reducción de aproximadamente la mitad del área: 32,5 cm² frente a 15,5 cm². Las condiciones de separación empleadas fueron las mostradas en la Tabla 1.1. La eficiencia fue estudiada modificando tanto el caudal de flujo cruzado como el tamaño de partícula, de una forma similar a la realizada en el modelo de la Sección 1.4.1 para la eficiencia teórica (H_{teo}). A partir de los tiempos de retención experimentales se calcularon los parámetros específicos R (Ec. 2) y λ (Ec. 5). Estos parámetros fueron empleados no solo

para la determinación de H_{exp} (Ec. 1.11), sino también para calcular las eficiencias previstas por la teoría (H_{pre}), tal y como se ha detallado en la Sección 1.3.3.

1.4.2.1. Estudio de eficiencias experimentales en función del caudal de flujo cruzado

Los resultados de las eficiencias en función del flujo cruzado se muestran para ambos canales en la Figura 1.5. Como predijeron Giddings [123] y Litzen [124], las eficiencias experimentales mejoran cuando se incrementa el flujo cruzado, sin importar el tipo de canal empleado. Este comportamiento sigue la tendencia del modelo, aunque se observan algunas diferencias para los niveles de baja retención (altos valores de λ), especialmente significativos en el caso del SLC, con resultados mucho más bajos de lo esperado.

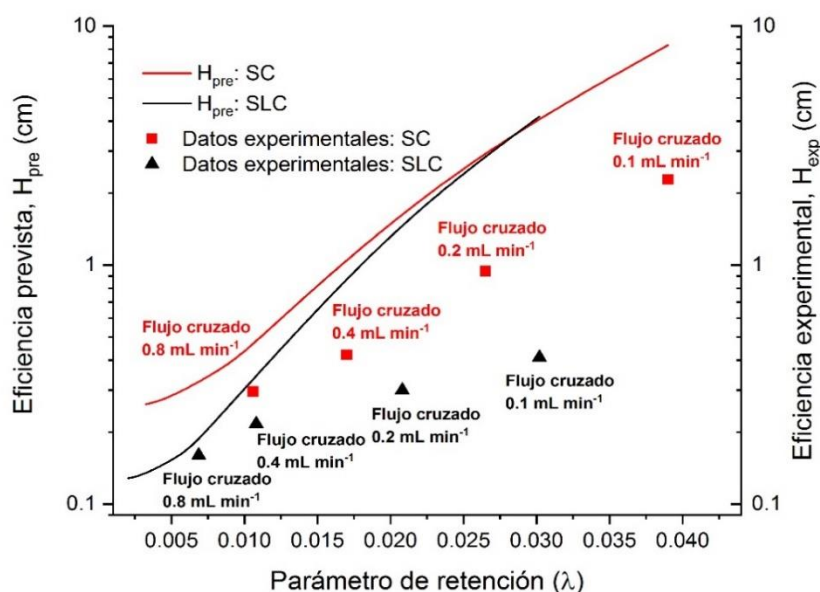


Figura 1.5. Eficiencias previstas y experimentales en ambos canales: canal convencional (SC) y canal corto (SLC), en función del parámetro de retención λ para una suspensión de 30 mg L⁻¹ de PS NPs (estándar de 100 nm). Resultados mostrados para diferentes caudales de flujo cruzado: 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 mL min⁻¹.

Estas discrepancias pueden explicarse por las estimaciones que se han realizado para la eficiencia prevista en parámetros como la temperatura (T) o la anchura del canal (w). En el caso de T, cualquier variación afecta al cálculo de los coeficientes de difusión D a partir del diámetro hidrodinámico de partícula (Ec. 1.4) y finalmente a H_n . Para el valor de la anchura del canal, pese a haberse calculado de forma experimental, puede haber diferencias respecto al valor real, por lo que también afecta al cálculo de la dispersión de

no-equilibrio y, por tanto, a H_{pre} , tal y como se muestra en la Ec. 1.7. Las diferencias tienen mayor relevancia cuando los valores de λ son más elevados, lo cual explicaría las diferencias de los valores experimentales respecto al modelo.

Para todos los caudales de flujo cruzado estudiados, SLC mejora la eficiencia de separación con respecto a SC. En los datos experimentales (Tabla 1.2) puede observarse que esta mejora no proviene de los tiempos de retención, pues en ambos casos son similares. Esto corrobora lo que la teoría predice: bajo las mismas condiciones de caudales los tiempos de retención no deberían verse alterados [143]. De acuerdo con la Ec. 1.11, la mejora de la eficiencia está basada en la anchura de pico en función del flujo cruzado.

Tabla 1.2. Resultados experimentales de separación para el estándar de 100 nm de PS (suspensión de 30 mg L⁻¹) en términos de tiempos de retención (t_r), anchuras de pico y recuperaciones a diferentes flujos cruzados. Las separaciones son llevadas a cabo a un caudal de salida constante de 1 mL min⁻¹. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$). La disminución de la recuperación está referida al valor de cada caudal respecto al de las condiciones más suaves de flujo cruzado (0,1 mL min⁻¹) en el canal correspondiente.

Canal convencional (SC)				
Flujo cruzado	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Recuperación (%)	Disminución de recuperación (%)
0,1 mL min ⁻¹	4,24 \pm 0,03	3,12 \pm 0,03	75,9 \pm 1,9	—
0,2 mL min ⁻¹	6,12 \pm 0,01	2,90 \pm 0,05	71,9 \pm 1,9	-5,2 \pm 2,7
0,4 mL min ⁻¹	9,36 \pm 0,03	2,96 \pm 0,01	72,0 \pm 1,2	-5,1 \pm 2,2
0,8 mL min ⁻¹	14,61 \pm 0,14	3,87 \pm 0,08	53,1 \pm 9,6	-30,1 \pm 9,8
Canal corto (SLC)				
Flujo cruzado	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Recuperación (%)	Disminución de recuperación (%)
0,1 mL min ⁻¹	3,69 \pm 0,04	1,79 \pm 0,04	88,6 \pm 2,1	—
0,2 mL min ⁻¹	5,35 \pm 0,10	2,20 \pm 0,05	82,8 \pm 0,8	-6,5 \pm 2,3
0,4 mL min ⁻¹	10,05 \pm 0,02	3,49 \pm 0,15	78,1 \pm 0,5	-11,8 \pm 2,2
0,8 mL min ⁻¹	15,4 \pm 0,38	4,65 \pm 0,29	61,8 \pm 1,9	-30,3 \pm 2,9

Con el SLC los picos son más estrechos en las condiciones más suaves (flujos cruzados de 0,1 y 0,2 mL min⁻¹), por lo que se obtienen las mayores diferencias entre canales. El factor de mejora más alto se alcanza con 0,1 mL min⁻¹ de flujo cruzado, condición en la que H_{exp} es reducido 5,5 veces respecto al valor obtenido con el SC (ver Tabla 1.3). Para caudales de flujo cruzado mayores, la anchura de pico aumenta en ambos canales, hasta que finalmente se obtienen valores similares. La mejora de la eficiencia a través de la longitud confirma que, incluso en la práctica, el fenómeno de no-equilibrio es la principal fuente de dispersión y que la separación puede mejorarse si es disminuido. En todo el rango de flujos cruzados estudiados se determinaron valores de λ más bajos con el SLC, debido al aumento de la velocidad de flujo cruzado, lo que supuso la mejora en términos de eficiencia.

Tabla 1.3. Resultados de eficiencias experimentales (H_{exp}) y parámetros de retención λ en función del flujo cruzado aplicado, para el estándar de 100 nm de PS (suspensión de 30 mg L⁻¹) a un caudal de salida de 1 mL min⁻¹. El factor de mejora se obtuvo de la división entre la eficiencia para el canal SC y la correspondiente al SLC a un mismo caudal de flujo cruzado.

Flujo cruzado	Canal convencional (SC)		Canal corto (SLC)		Factor de mejora de H _{exp}
	Parámetro λ	H _{exp} (cm)	Parámetro λ	H _{exp} (cm)	
0,1 mL min ⁻¹	3,90×10 ⁻²	2,28	3,20×10 ⁻²	0,42	5,43
0,2 mL min ⁻¹	2,65×10 ⁻²	0,94	2,08×10 ⁻²	0,30	3,15
0,4 mL min ⁻¹	1,70×10 ⁻²	0,42	1,08×10 ⁻²	0,21	2,01
0,8 mL min ⁻¹	1,06×10 ⁻²	0,30	6,87×10 ⁻³	0,16	1,85

Sin embargo, este factor de mejora no es constante y la disminución de H_{exp} con el SLC parece alcanzar un límite en torno a 0,15 cm, que no puede ser reducido ni tan siquiera en las condiciones de caudales de flujo cruzado más altos (0,4 y 0,8 mL min⁻¹). Este comportamiento no se reflejaba en el modelo desarrollado para la eficiencia teórica en la Figura 1.3, en la que H_{teo} decrecía hasta valores por debajo de 0,001 para estos niveles de flujo cruzado. En tales condiciones, la contribución de no-equilibrio es minimizada, y son otras las fuentes de dispersión que pueden cobrar mayor relevancia. Como se discutió anteriormente, los valores de difusión axial continuarían siendo muy bajos en comparación con H_n (Figura 1.4), y lo mismo sucedería con la dispersión asociada a la polidispersidad para los estándares de tamaño de PS. No obstante, son las

contribuciones debidas a otros efectos, como el de focalización/relajación o los instrumentales, las que podrían volverse significativas.

Los efectos de focalización/relajación fueron estudiados experimentalmente a través de la modificación de los parámetros instrumentales que pueden ser ajustados en esta etapa: el caudal de flujo cruzado y el tiempo de focalización. El flujo cruzado fue estudiado a tres caudales diferentes: 0,5, 1 y 1,5 mL min⁻¹; mientras que los tiempos de focalización considerados fueron 5, 7 y 9 min. Los resultados se muestran en el Anexo 1.1, aunque no se observó ninguna variación significativa en la eficiencia con estas modificaciones. El límite experimental, por tanto, no se justificaba con ninguna de estas fuentes de dispersión y los resultados experimentales no cumplían con el modelo teórico para valores bajos de λ ; algo que ya fue observado por Wahlund [137].

Como ya se señaló en la Sección 1.2 de este capítulo, el propio sistema de separación puede contribuir a la dispersión del analito durante su paso a través del canal, las conexiones y el detector. Para estimar experimentalmente esta contribución, referida como H_{inst} , se siguió el procedimiento descrito en la Sección 1.3.3. De este modo, se determinaron unos valores constantes de 0,12 y 0,22 cm de H_{inst} para el SLC y el SC, respectivamente, que fueron sumados a las eficiencias previstas (H_{pre}). Las eficiencias corregidas con esta nueva contribución se muestran en la Figura 1.5. Para altos valores de dispersión, esta contribución es despreciable; sin embargo, cuando la componente de no-equilibrio es minimizada para bajos valores de λ , H_{inst} prevalece. Como resultado, la tendencia es suavizada en esta región y el comportamiento de las eficiencias previstas se ajusta a lo obtenido en los resultados para H_{exp} , explicando así el límite observado de forma experimental.

Aunque el factor de mejora de la eficiencia entre los dos canales se va reduciendo conforme el parámetro de retención disminuye, el SLC sigue mostrando mejores resultados en la separación. Se puede argumentar que se alcanzarían valores de eficiencia similares con el SC si se incrementara el caudal de flujo cruzado, como de hecho sucede en términos de número de platos ($N = L/H$) obtenidos en condiciones de alta retención (bajos λ), mostrados en el Anexo 1.2. Estos datos muestran cómo el número de platos aumenta conforme aumenta el flujo cruzado aplicado, y que para caudales por encima de 0,4 mL min⁻¹, este parámetro se iguala para ambos canales, siendo ligeramente superior en el caso del SC. Sin embargo, tal y como se ha discutido anteriormente, caudales elevados de flujo cruzado conllevan problemas de pérdidas de recuperación, como puede

observarse en los valores de recuperación experimentales de la Tabla 1.2. Así, las recuperaciones sufren un descenso significativo cuando se aplican caudales de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, con una reducción del 30% en ambos canales respecto a las condiciones más suaves ($0,1 \text{ mL min}^{-1}$).

Cabe destacar que el uso de SLC permite disminuir H_{exp} en comparación con el SC para cualquiera de los caudales de flujo cruzado estudiados. El factor de mejora de la eficiencia entre canales alcanza su valor máximo en las condiciones de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$, en las cuales las recuperaciones son del 88%. Esto significa que el canal corto maximiza la mejora de la eficiencia sin modificar por ello los tiempos de retención, porque la separación se realiza bajo las mismas condiciones de caudales, y sin afectar a las recuperaciones, dado que se lleva a cabo con una fuerza de campo suave, lo cual resulta esencial en la separación de nanopartículas en AF4.

1.4.2.2. Estudio de eficiencias experimentales en función del diámetro hidrodinámico

Para el estudio de la eficiencia experimental en función del tamaño de analito se utilizó el caudal de flujo cruzado en el valor óptimo de separación: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$. Las mejores eficiencias fueron obtenidas para las partículas de mayor tamaño en ambos canales (ver Figura 1.6), como ya predijo el modelo teórico (H_{teo}) mostrado en la Figura 1.3. De acuerdo con la teoría, la dispersión de no-equilibrio se reduce porque el parámetro de retención λ disminuye conforme el tamaño de las partículas aumenta (Ec. 1.5). Experimentalmente, los coeficientes de difusión disminuyen para diámetros hidrodinámicos mayores (Ec. 1.4) y el analito es focalizado en una zona más próxima a la membrana. A bajos λ , las partículas son eluidas a tiempos de retención mayores, siguiendo el perfil parabólico de flujo, lo cual explica el descenso observado en los valores de H_{exp} (Tabla 1.4). Si se comparan los valores estimados de H_{pre} con los resultados experimentales (H_{exp}), se comprueba que siguen las mismas tendencias, pero con discrepancias para valores altos de λ (por encima de 0,02), siendo incluso más significativas en el caso del SLC. Esto ya se observó en el estudio en función del flujo cruzado (Figura 1.5), puesto que el mismo procedimiento se llevó a cabo para los cálculos de H_{pre} .

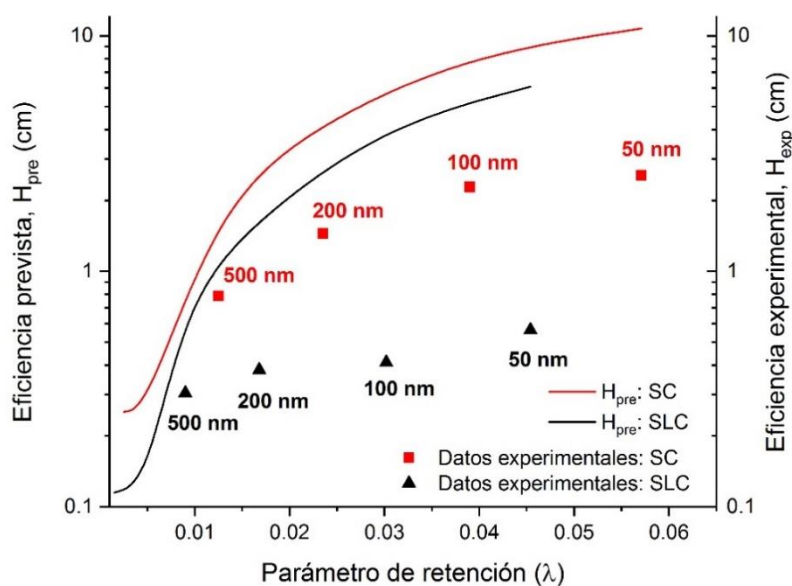


Figura 1.6. Eficiencias previstas y experimentales en ambos canales: canal convencional (SC) y canal corto (SLC), en función del parámetro de retención λ . Resultados mostrados para diferentes estándares de tamaño de PS: 50, 100, 200 y 500 nm de diámetro nominal (suspensiones de 30 mg L^{-1}) a un caudal de flujo cruzado de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$.

En la comparación entre los dos canales, se observa que con el SLC se mejoran las eficiencias en todos los casos de tamaño de partícula estudiados, tanto en términos de altura de plato (H) como de número de platos (N) (ver Anexo 1.2). Dado que los tiempos de retención permanecen constantes para los canales, puesto que los caudales internos no cambian, la mejora de la eficiencia experimental se basa en las anchuras de pico, de acuerdo con la Ec. 1.11. El estrechamiento de los picos en el SLC se explica a partir del aumento de la velocidad de flujo cruzado ($|u_c|$), que permite disminuir la difusión de las especies en el interior del canal, incluso para los tamaños de partícula más pequeños, y a su vez estrecha la nube que forman las partículas. Esta mejora, sin embargo, no es constante para todos los tamaños (Tabla 1.4): H_{exp} es tres veces menor para partículas de 500 nm, y cuatro veces para 200 nm; mientras que para tamaños más pequeños (50 y 100 nm) este factor es maximizado, alcanzando valores en torno a cinco veces inferior respecto al SC. Los fenómenos de difusión en el eje axial son menos probables cuando las partículas tienen un tamaño mayor, por lo que la mejora de la eficiencia causada por la reducción del área en el SLC es menos pronunciada. Sin embargo, cuando las partículas son más pequeñas su difusión es mayor. En estas condiciones el estrechamiento de la

nube formada por el analito a través de la velocidad de flujo cruzado cobra mayor relevancia, y es cuando las diferencias entre el uso de un canal convencional o uno corto son más significativas. Con el SLC, por lo tanto, se consigue mejorar la eficiencia de separación, en especial en el rango por debajo de los 100 nm, rango que establece la Recomendación de la Unión Europea para la definición de nanomaterial [3], y en el cual la mejora de la eficiencia se maximiza respecto a la ofrecida por los canales convencionales.

Tabla 1.4. *Resultados de eficiencias experimentales (H_{exp}) y parámetros de retención λ en función del tamaño de partícula para unas condiciones de caudales constantes: flujo cruzado de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ y caudal de salida de 1 mL min^{-1} . Se analizaron suspensiones de estándares de PS de diferentes tamaños nominales (30 mg L^{-1}): 50, 100, 200 y 500 nm. El factor de mejora se obtuvo de la división entre la eficiencia para el canal SC y la correspondiente al SLC para un mismo tamaño nominal de partícula.*

Tamaño de partícula	Canal convencional (SC)		Canal corto (SLC)		Factor de mejora de H_{exp}
	Parámetro λ	H_{exp} (cm)	Parámetro λ	H_{exp} (cm)	
50 nm	$5,71 \times 10^{-2}$	2,55	$4,54 \times 10^{-2}$	0,56	4,55
100 nm	$3,90 \times 10^{-2}$	2,28	$3,20 \times 10^{-2}$	0,42	5,43
200 nm	$2,35 \times 10^{-2}$	1,45	$1,68 \times 10^{-2}$	0,38	3,82
500 nm	$1,25 \times 10^{-2}$	0,79	$9,00 \times 10^{-3}$	0,30	2,63

Los resultados de las recuperaciones para cada estándar de tamaño de PS se muestran en la Tabla 1.5, obteniéndose valores similares en todo el rango de estudio para el SLC, cercanos al 90%. En el caso del SC, las recuperaciones resultaron en torno al 75% para partículas de 100, 200 y 500 nm, mientras que para las de 50 nm fueron ligeramente superiores, con unos valores más próximos a los obtenidos con el canal corto. Esta diferencia puede deberse a que las partículas de mayor tamaño son focalizadas más cerca de la membrana, por lo que las probabilidades de que haya interacciones aumentan. En cualquier caso, las diferencias entre los dos canales en términos de recuperación son poco significativas, al haber utilizado un caudal bajo de flujo cruzado, con el objetivo de minimizar este tipo de interacciones.

Tabla 1.5. Resultados experimentales de separación para estándares de PS de 50, 100, 200 y 500 nm (suspensiones de 30 mg L⁻¹) en términos de tiempos de retención (t_r), anchura de pico, recuperaciones y resoluciones. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$) para ambos canales. Condiciones fijadas a 0,1 mL min⁻¹ de flujo cruzado y a 1 mL min⁻¹ de caudal de salida. La resolución está referida a los picos del estándar de PS correspondiente y al de tamaño inmediatamente inferior.

Canal convencional (SC)				
Tamaño de partícula	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Recuperación (%)	Resolución
50 nm	3,03 \pm 0,04	2,36 \pm 0,01	85,6 \pm 1,0	—
100 nm	4,24 \pm 0,03	3,12 \pm 0,03	75,9 \pm 1,9	0,44
200 nm	6,53 \pm 0,02	3,83 \pm 0,05	73,8 \pm 6,8	0,66
500 nm	11,63 \pm 0,11	5,04 \pm 0,02	73,5 \pm 4,0	1,15
Canal corto (SLC)				
Tamaño de partícula	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Recuperación (%)	Resolución
50 nm	2,66 \pm 0,04	1,50 \pm 0,01	87,6 \pm 2,5	—
100 nm	3,69 \pm 0,04	1,79 \pm 0,04	88,6 \pm 2,1	0,63
200 nm	6,59 \pm 0,07	3,06 \pm 0,03	88,2 \pm 0,4	1,20
500 nm	11,94 \pm 0,19	4,95 \pm 0,07	85,8 \pm 7,5	1,34

Los fractogramas de los diferentes estándares de PS en ambos canales se muestran en la Figura 1.7. Para todos ellos la resolución mejora con el uso del SLC (Tabla 1.5). En el caso específico de los estándares de tamaño de 100 y 200 nm, se obtuvo una resolución de 0,66 con el SC, lo que significaría casi una coelución, mientras que, con el SLC bajo las mismas condiciones de separación, este valor se incrementa hasta 1,20 gracias al estrechamiento de los picos.

Los resultados de las separaciones entre canales también han sido comparados bajo las mismas condiciones de fuerza de campo, es decir, misma velocidad de flujo cruzado ($|u_c|$) (Anexo 1.3). Esto implica que el caudal de flujo cruzado aplicado en el SC sea dos veces superior al aplicado en el SLC, dado que el área es aproximadamente la mitad para el canal corto. Si se estudia la resolución entre los estándares de 100 y 200 nm en tal caso,

se obtienen las mismas resoluciones para ambos canales. En el caso del SLC, se obtuvo una resolución de 1,20 con un caudal de flujo cruzado de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$, que puede ser mejorado hasta un valor de 1,81 si se aumenta a $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Los resultados son similares si se usa el SC a caudales de $0,2$ y $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. Sin embargo, a pesar de haber igualado las resoluciones entre canales, los resultados globales de separación con el SLC siguen siendo mejores, ya que los tiempos de retención son menores, las anchuras de pico más estrechas y las recuperaciones mayores. Esto es debido a que, pese a que las nanopartículas sean retenidas en la misma posición en el interior del canal (mismo λ), estas son conducidas a través de una distancia menor en el SLC. Como consecuencia, la reducción del tiempo de retención conlleva una disminución de los posibles efectos de dispersión e interacciones con la membrana (recuperaciones más altas). En resumen, para obtener unas resoluciones similares a las del SLC es necesario aplicar caudales de flujo cruzado más elevados en los canales convencionales, lo que resulta en tiempos de retención más prolongados y menores recuperaciones. Bajo las condiciones estudiadas, esta diferencia conlleva una pérdida del 16% de analito en el caso de los estándares de PS de 100 nm, y un 25% para el de 200 nm cuando se emplea el SC en lugar del canal corto.

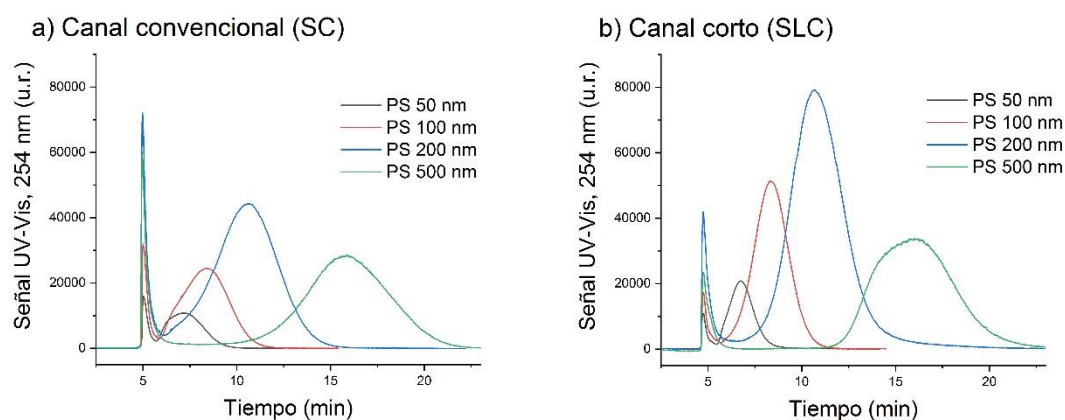


Figura 1.7. Fractogramas para estándares de tamaño de PS de 50, 100, 200 y 500 nm de tamaño nominal (30 mg mL^{-1}), obtenidos para un caudal de flujo cruzado de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ en: a) un canal de dimensiones convencionales (SC) y b) un canal corto (SLC).

1.4.2.3. Aplicación a nanopartículas de dióxido de titanio

La comparación entre los dos canales se amplió al estudio de la separación de nanopartículas de dióxido de titanio, que suelen presentar problemas recurrentes en su análisis en AF4, principalmente relacionados con bajas recuperaciones y falta de resolución [89,137]. De este modo, se pretende evaluar el uso del SLC en un escenario

más complejo. Para ello, dos productos que contienen nanopartículas de dióxido de titanio de diferente tamaño nominal (ver Sección 1.3.1) fueron mezclados en una misma suspensión y analizados en AF4, bajo las condiciones de separación especificadas en la Tabla 1.1.

Tabla 1.6. *Resultados experimentales de separación para la mezcla de dos productos que contienen TiO₂ NPs: producto fotocatalítico y nanopolvo de rutilo. La suspensión con la mezcla fue preparada a una concentración de 15 mg L⁻¹ para cada producto. Resultados en términos de tiempos de retención (t_r), anchuras de pico, recuperaciones y resoluciones expresados como la media ± desviación estándar (n=3) para ambos canales. Para todas las separaciones se empleó un caudal de salida de 1 mL min⁻¹. Las recuperaciones están referidas a ambos productos en la misma suspensión.*

Canal convencional, SC (Caudal de flujo cruzado: 0,1 mL min⁻¹)				
Producto con TiO₂ NPs	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Recuperación (%)	Resolución
Producto fotocatalítico (8 nm)	2,81 ± 0,18	2,50*	69,8 ± 4,9	0,73
Nanopolvo de rutilo (30 nm)	6,47 ± 0,09	7,47 ± 0,55		
Canal corto, SLC (Caudal de flujo cruzado: 0,1 mL min⁻¹)				
Producto con TiO₂ NPs	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Recuperación (%)	Resolución
Producto fotocatalítico (8 nm)	2,31 ± 0,11	2,03 ± 0,13	75,2 ± 4,2	1,07
Nanopolvo de rutilo (30 nm)	6,15 ± 0,29	5,12 ± 0,10		
Canal corto, SLC (Caudal de flujo cruzado: 0,2 mL min⁻¹)				
Producto con TiO₂ NPs	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Recuperación (%)	Resolución
Producto fotocatalítico (8 nm)	2,66 ± 0,23	2,24 ± 0,04	60,1 ± 0,8	1,15
Nanopolvo de rutilo (30 nm)	10,47 ± 0,31	11,38 ± 0,14		

* Valor estimado en base al fractograma obtenido (Figura 1.8)

Como puede observarse en la Tabla 1.6, los tiempos de retención en la mezcla de productos no mostraron ninguna variación significativa al emplear los dos canales, dado que se emplearon las mismas condiciones de caudales ($0,1 \text{ mL min}^{-1}$ de flujo cruzado y 1 mL min^{-1} de caudal de salida). El primer pico de los fractogramas (Figura 1.8) corresponde al producto fotocatalítico, el cual contiene TiO_2 NPs de alrededor de 8 nm de diámetro; mientras que el segundo corresponde a las nanopartículas procedentes del polvo de rutilo, con un tamaño nominal de 30 nm . Tal y como se esperaba, las recuperaciones no se vieron afectadas, con valores en torno al 70-75%. En términos de resolución, se confirma la mejora de la eficiencia con el uso del SLC a través del estrechamiento de los picos al reducir el área del canal. Esta mejora permite una mejor separación de las dos poblaciones en la suspensión, con una resolución superior a 1. La resolución también puede ser mejorada con el aumento del caudal de flujo cruzado aplicado (Tabla 1.6). Sin embargo, esta mejora se produce a expensas de tiempos de retención más largos y una reducción significativa de la recuperación, disminuyendo desde el 75% hasta un 60% para el SLC.

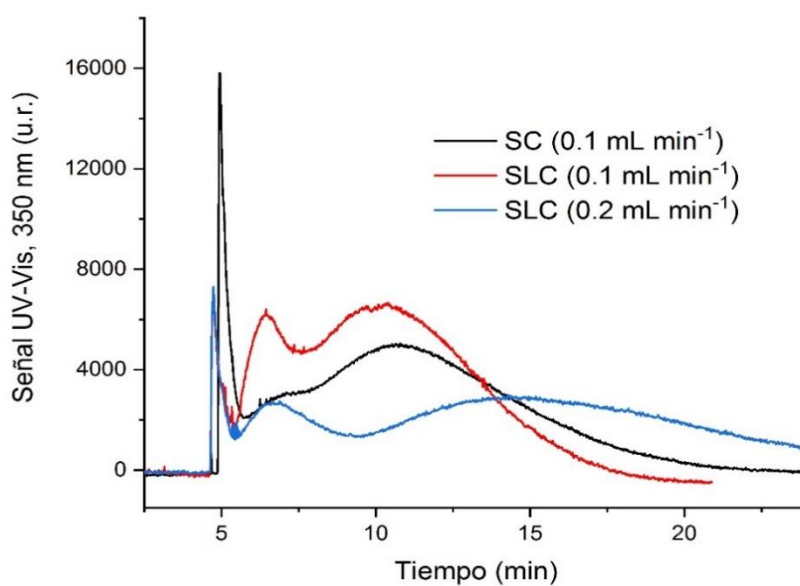


Figura 1.8. Fractogramas de la mezcla de dos productos que contienen TiO_2 NPs: un producto fotocatalítico (8 nm de tamaño nominal, primer pico eluido) y el nanopolvo de rutilo (30 nm , segundo pico). Comparación entre la separación llevada a cabo por el SC y el SLC. Suspensión de análisis de 15 mg L^{-1} para cada producto. Para el SC, el caudal de flujo cruzado fue fijado a $0,1 \text{ mL min}^{-1}$. En el caso del SLC, se muestran dos caudales: $0,1$ y $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Caudal de salida de 1 mL min^{-1} en todas las separaciones.

1.5. CONCLUSIONES

El estudio del efecto de la longitud del canal en la separación se ha llevado a cabo en términos de eficiencia, resolución y recuperación para el caso concreto de partículas en el rango de los nanómetros. Los resultados obtenidos han sido justificados desde una perspectiva teórica. La reducción de la componente de dispersión de no-equilibrio en AF4, que es la de mayor relevancia en las condiciones experimentales empleadas, explica la mejora de los resultados obtenidos en la separación con el canal corto. Bajo las mismas condiciones de caudales (flujo cruzado y caudal de salida), es posible mejorar la separación mediante una reducción de la longitud del canal, sin alterar por ello los tiempos de retención y con unas recuperaciones iguales o incluso superiores a las de un canal convencional. Esto es debido al aumento de la velocidad de flujo cruzado ($|u_c|$), originado a partir de la reducción del área de separación (A), que conlleva un estrechamiento de la nube que forma el analito en el interior del canal, reduciendo así su dispersión. El aumento de la retención de las especies producido por el aumento de $|u_c|$ es compensado por una menor distancia de elución (L).

Todas estas predicciones teóricas han sido corroboradas de forma experimental a través de la separación de nanopartículas comprendidas dentro de un amplio rango de tamaños y de diferente naturaleza, como el poliestireno y el dióxido de titanio. Aunque se pueden alcanzar condiciones de retención similares con un canal convencional respecto al SLC, esto implica un aumento del caudal de flujo cruzado, lo que conlleva tiempos de elución más largos y la disminución de la recuperación. Por otro lado, el uso de canales incluso de menor longitud que el SCL, como es el caso de canales de 7 cm comercialmente disponibles o sistemas de fibra hueca (HF5), suponen la reducción de caudales tanto en el flujo cruzado como en el caudal de salida para evitar situaciones de sobrepresión, lo que reduce la capacidad de separación, además de limitar la cantidad de muestra que puede ser introducida. El uso del canal corto estudiado a lo largo de este capítulo permite trabajar, en cambio, bajo las mismas condiciones de caudales que los de dimensiones convencionales. Esto es especialmente relevante en el caso de las nanopartículas, escenario en el que las interacciones con la membrana son muy frecuentes y se requieren condiciones de separación más suaves. La mejora de la separación obtenida incrementa las posibilidades del análisis de nanopartículas en AF4, como es el caso del TiO_2 , en el que se puede emplear el SLC para su separación y cuantificación en muestras complejas, tal y como se discute en el siguiente capítulo.

***2. CARACTERIZACIÓN DE TAMAÑOS
Y CUANTIFICACIÓN DE NANO- Y
MICROPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE
TITANIO MEDIANTE AF4 ACOPLADO
A DLS E ICP-MS***

2.1. INTRODUCCIÓN

Los materiales basados en dióxido de titanio tienen gran variedad de aplicaciones, siendo fundamentalmente utilizados para el tratamiento de aguas o incorporados en productos como pinturas, cremas solares y materiales de construcción. En estos casos, se suele emplear la anatasa como forma cristalina del dióxido de titanio, o una mezcla de anatasa/rutilo, con tamaños de partícula primarios de 10-50 nm, en los que su capacidad refractiva y sus propiedades fotocatalíticas se ven potenciadas. Su producción masiva, cada vez más extensa, y la generación de residuos a partir de los productos que lo contienen suponen la liberación potencial de nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂ NPs) en el medio ambiente. Se han demostrado sus efectos tóxicos en bacterias, algas [144], plantas [145,146] y células animales [147,148], con evidencias de la acumulación de TiO₂ en diferentes tejidos de peces en forma de nanopartículas [149].

Debido a sus propiedades blanqueadoras, el dióxido de titanio también es utilizado en cosmética y en alimentación. En Europa y Estados Unidos, su uso como aditivo alimentario está autorizado bajo la etiqueta E171 [150]. La dispersión de luz con el TiO₂ es maximizada para partículas comprendidas en un rango entre 200 y 300 nm [15], por lo que la mayoría de los productos comerciales empleados como pigmentos contienen partículas de estos tamaños. Desde los fabricantes, se han especificado distribuciones de tamaños de partícula muy variados para productos con E171 [151,152], que comprenden tanto la escala nanométrica como la micrométrica, con tamaños desde 30 hasta 500 nm [153,154]. En estos aditivos, una pequeña fracción (del 10 al 36%) ha sido identificada como óxido de titanio en forma de nanopartículas con tamaños inferiores a 100 nm [150,151,153,155].

A pesar del pequeño porcentaje de TiO₂ NPs en el E171, el aditivo puede ser considerado como un nanomaterial, de acuerdo con lo establecido en la Recomendación de la Unión Europea [3]. En esta recomendación se sugiere cambiar el criterio actual para la definición de nanomaterial, que establece que para ser considerado como tal su distribución de tamaño en número debe ser del 50%, para reducirlo a entre un 1 y el 50% en casos específicos. De forma adicional, la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), en la reevaluación sobre la seguridad del uso de TiO₂ como aditivo alimentario, publicó una recomendación sobre la necesidad de obtener información en la caracterización de distribuciones de tamaños de partícula, como un primer paso para el análisis de los riesgos del aditivo, en referencia al porcentaje de partículas de E171 que

se situarían en la escala nanométrica [155]. En cuanto a su toxicidad, se han publicado varios estudios en los que, a pesar de ser considerado como posible carcinogénico para el ser humano [156], no se han encontrado evidencias concluyentes, principalmente debido a la baja biodisponibilidad de las nanopartículas de TiO₂ [157]. En marzo de 2021, debido a las incertidumbres en los ensayos sobre su toxicidad, ha sido finalmente catalogado por la EFSA como un producto no seguro para la salud de los consumidores cuando es empleado como aditivo alimentario [158].

Como analito, las nanopartículas representan un desafío analítico por la necesidad de desarrollar nuevas metodologías analíticas, no solo para su cuantificación, sino también para obtener información sobre su distribución de tamaños, entre otros parámetros [159]. En relación con la instrumentación empleada, la identificación y la determinación de TiO₂ NPs se ha llevado a cabo a través de diferentes enfoques, como la cuantificación basada en microscopía electrónica de transmisión (TEM) [150,160], espectroscopía Raman para la detección de nanopartículas [161–163] o dispersión dinámica de luz (DLS) para la caracterización de tamaños [43,152,164]. A estas técnicas se suma la espectrometría de masas con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) en su modo de detección individual de partículas (SP-ICP-MS), una técnica que ha ido ganando popularidad para la caracterización y cuantificación de nanopartículas [31,165,166] y que encuentra sus principales ventajas en su alta sensibilidad y en el análisis simultáneo de distribuciones de tamaños y concentraciones en número [96,167].

La técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) es otra alternativa para la separación y caracterización de TiO₂ NPs, gracias a su acoplamiento a diferentes sistemas de detección [14,15,33,142,151,154,164]. Esta técnica tiene la ventaja de proporcionar información relativa a tamaños, en combinación con composiciones elementales para cada fracción separada cuando es acoplada a ICP-MS. AF4 ha sido empleado para la determinación de TiO₂ NPs en matrices complejas: fundamentalmente, cremas solares [14,31,33,68,142], productos alimentarios [15,154,164], pigmentos [151] o diferentes productos de cuidado personal [15,126]. Sin importar el tipo de muestra, su análisis suele estar basado en la detección de TiO₂ [151] y su caracterización en tamaño, junto con la determinación de contenidos totales de titanio [14,15,33,126,142,164]. En otros estudios se obtuvo información tanto de tamaños como de concentraciones elementales en la fracción de interés separada por AF4 en alimentos y productos cosméticos [15,154]. Sin embargo, debido a problemas de adsorción en AF4,

los resultados obtenidos para muestras con concentraciones por debajo de $0,5 \text{ mg g}^{-1}$ no fueron satisfactorios [15].

Además de nuevos desarrollos instrumentales, los métodos para la caracterización de nanopartículas requieren habitualmente de etapas previas que permitan eliminar o minimizar los efectos de matriz con éxito, garantizando su integridad y su estabilidad. Para conseguirlo, se han realizado diluciones de cremas solares en Tritón X-100 [31], con la determinación posterior de TiO_2 NPs mediante AF4 y SP-ICP-MS. Otros procedimientos han consistido en la suspensión en agua/metanol, seguido de sonicación con sonda y disolución con hexano [14] o empleando hexano antes de una extracción de las nanopartículas con agua [142]. En relación con la extracción de partículas de TiO_2 desde matrices alimentarias o biológicas, el agua ha sido utilizada como extractante en el pre-tratamiento de chicles, dulces y productos de repostería con recubrimientos de azúcar, con agitación tanto mecánica como basada en ultrasonidos [33,150,168]. También se han desarrollado métodos basados en digestiones enzimáticas, basados fundamentalmente en el uso de proteasas, aplicados a surimi y marisco con tratamientos convencionales de ultrasonidos [165,169]. Otras estrategias para el aislamiento de TiO_2 NPs han empleado disolventes orgánicos en muestras con azúcar glas o crema de café [154], o peróxido de hidrógeno concentrado, seguido de una etapa de evaporación y formación de complejos con albúmina de suero bovino (BSA) para el pre-tratamiento de pasteles, dulces y chicles [15].

A pesar de la bibliografía disponible en el análisis de NPs, todavía se requiere del desarrollo de nuevas metodologías, debido a sus bajos niveles de concentración en alimentos y matrices medioambientales y a la complejidad que supone este tipo de muestras. El potencial de ciertas técnicas analíticas, como las basadas en AF4, pueden verse limitado cuando los extractos contienen un alto número de componentes procedentes de la matriz, como es el caso de las extracciones enzimáticas, y más aún en el caso de nanopartículas de dióxido de titanio, para las que su caracterización basada en fraccionamiento mediante campo de flujo suele conllevar problemas recurrentes en términos de baja resolución y bajas recuperaciones [137].

El hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) ha resultado ser una buena alternativa para la extracción y aislamiento de nanopartículas de plata (Ag NPs), oro (Au NPs) y óxido de silicio (SiO_2 NPs) en matrices complejas [170]. Además, los extractos de TMAH se han encontrado adecuados para su uso con TiO_2 NPs en lodos activos [171], en los que el

proceso no supone una modificación de las distribuciones de tamaños de partícula originales en las muestras.

El objetivo de este capítulo es el estudio de las posibilidades que ofrece AF4, acoplado a diferentes sistemas de detección, para la caracterización y cuantificación de partículas de TiO₂ en diferentes rangos de tamaños y de niveles de concentración (desde mg g⁻¹ a µg g⁻¹) en varios tipos de muestras. A lo largo del capítulo se evalúan estrategias para la determinación de tamaños, como la utilización de calibraciones de tamaño a través del uso de estándares de diferente naturaleza o el análisis de la información obtenida por DLS. Además, se describe la aplicación de un procedimiento de extracción alcalina para aislar la fracción de partículas de TiO₂ en muestras de surimi, en las que el aditivo E171 ha sido empleado como pigmento blanqueador. En este último estudio se comparan, además, los resultados obtenidos mediante AF4-ICP-MS con los obtenidos mediante SP-ICP-MS.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Reactivos

Para la calibración de tamaños en AF4 se han empleado una serie de estándares de tamaño monodispersos de poliestireno (100, 200 y 500 nm) y de óxido de silicio (10, 20, 150 y 500 nm). Todos ellos se obtuvieron de Sigma Aldrich (Bucs, Suiza), a excepción de los de 10 y 20 nm de SiO₂, procedentes de PlasmaChem (Berlín, Alemania). Se prepararon suspensiones de partículas de 30 mg L⁻¹ a partir de los estándares, a través de su dilución en el portador empleado en AF4.

El agua ultrapura (18 MΩ cm de resistividad) se obtuvo a través de un dispositivo de purificación Milli-Q (Bedford, EE. UU.). Los estándares de titanio iónico (1000 mg L⁻¹) y germanio (1005 mg L⁻¹) (como estándar interno) para los análisis en ICP-MS y SP-ICP-MS y sus calibraciones se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). La dilución de estos estándares se realizó en ácido nítrico (HNO₃, 69%, J.T. Baker, Países Bajos). El material certificado RM8013, correspondiente a una suspensión de nanopartículas de oro (Au NPs) procedente del NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, EE. UU.), se utilizó para el cálculo de eficiencias de transporte en SP-ICP-MS. Para la optimización del método basado en AF4 se emplearon diferentes tipos de

portadores: el surfactante mixto Novachem (Postnova Analytics), el pirofosfato de sodio (NaPP, Merck) y el dodecilsulfato de sodio (SDS, Merck). La digestión alcalina de las muestras de surimi se realizó con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH, 25% v/v, Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, Alemania) y la dilución de las muestras previa a los análisis en SP-ICP-MS fue llevada a cabo en Tritón X-100 (Sigma, Steinheim, Alemania).

2.2.2. Suspensiones de nanopartículas de TiO₂

Se utilizaron suspensiones de diferentes tamaños de dióxido de titanio para la optimización del método basado en AF4. Las nanopartículas de TiO₂ procedían de materiales de rutilo en polvo (99,9%), con tamaños de partícula primarios de 30, 50 y 100 nm, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (US Research Nanomaterials, Houston, EE. UU.). Se prepararon suspensiones de 150 mg L⁻¹ por pesada de la masa correspondiente de polvo, con su posterior suspensión en glicerol 1 (m/v) (Sigma Aldrich), utilizado como agente dispersante, de acuerdo con el procedimiento descrito por Taboada *et al.* [165]. Las suspensiones fueron estabilizadas a través de su sonicación en baño (P Selecta, Ultrasons, Barcelona, España) durante 5 minutos. También se estudió la alternativa de la sonicación con sonda (Vibra-Cell, Sonic & Materials Inc., Danbury, EE. UU.), en condiciones de 80% de amplitud y 50 W de potencia durante 15 minutos [33,165]. No se observaron diferencias significativas en términos de tiempos de retención y de valores de recuperación en el análisis de suspensiones en AF4-UV-Vis, por lo que se escogió la opción de la sonicación en baño.

Las suspensiones de nanopartículas de TiO₂ se prepararon diariamente, diluidas en portador hasta una concentración de 15 mg L⁻¹ y sonicadas durante 5 minutos antes de su análisis. En la etapa de optimización, se emplearon también materiales en polvo de anatasa (99,5%) de 5, 15, 40 y 100 nm de tamaños primario de partícula (US Research Nanomaterials), aunque ninguno de estos productos se separó con éxito en AF4, probablemente debido a fenómenos de adsorción irreversible en la membrana del canal.

2.2.3. Muestras

Se analizaron tres productos fotocatalíticos diferentes que incorporan nanopartículas de TiO₂: Degussa P25 (Nanoshel, Wilmington, EE. UU.), FN2 (FNnano, Levens, Reno,

EE. UU.) y el producto para recubrimientos NP Fotoactiva 23 (Ekoeaso S.L., Gipuzkoa, España). Estas muestras se suspendieron y diluyeron en agua ultrapura, con sonicación en baño durante 5 minutos antes de su análisis.

También se analizaron tres muestras de surimi congelado (de ahora en adelante denominadas como FZ12, FZ21 y FZ22) y una de surimi fresco (FH6), procedentes de supermercados de Santiago de Compostela. Se homogeneizaron masas de 100 g de cada muestra y se almacenaron en tubos de polietileno a -20°C .

2.2.4. Determinación de Ti total mediante ICP-OES e ICP-MS

El procedimiento de preparación consistió en pesar 1 g de muestra en un tubo de teflón de 100 mL para su posterior digestión en microondas (Ethos Plus, Milestone, Sorisole, Italia). En el caso de los surimis, la mezcla de ácidos fue de 4 mL de agua ultrapura, 3 mL de HNO_3 69% y 1 mL de H_2O_2 33% (m/v); para los productos fotocatalíticos y los materiales en polvo de TiO_2 , fue de 3,5 mL de HCl 37% (m/v), 0,75 mL de HNO_3 35% (m/v) y 1,5 mL de HF 48% (m/v), a los que se añadían 9 mL de H_3BO_3 (Panreac, Barcelona, España) tras su enfriamiento para eliminar restos de HF . Se aplicó un programa de tres etapas, consistente en una primera fase de incremento de temperatura de 15 minutos de duración hasta alcanzar unas condiciones de 200°C a 800 psi y 1000 W, que se mantienen constantes durante 30 minutos, y finalmente un descenso progresivo de la temperatura durante otros 15 minutos. Las muestras digeridas se diluyeron hasta 15 mL con agua ultrapura para su posterior análisis, realizado por triplicado. Por cada tanda de digestiones en microondas se prepararon, además, dos blancos de ataque.

Las condiciones de análisis empleadas para ICP-OES e ICP-MS se especifican en la Tabla 2.1. Para las medidas en ICP-MS, se utilizó una celda de colisión de gas con He para una atenuación selectiva de las interferencias poliatómicas en el isótopo ^{49}Ti . Para las cuantificaciones, se empleó el método de adición estándar, con concentraciones de Ti iónico de hasta $200 \mu\text{g L}^{-1}$, y el uso de germanio (^{74}Ge) como estándar interno, a una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ [165]. En el caso de las medidas de ICP-OES, se utilizó itrio como estándar interno.

Tabla 2.1. *Parámetros instrumentales empleados para análisis en ICP-OES e ICP-MS.*

Parámetros instrumentales para ICP-OES		
Potencia RF		2000 W
Flujo de gas (Ar)	Nebulizador	0,6 L min ⁻¹
	Auxiliar	0,5 L min ⁻¹
Longitud de onda		334,94 nm
Parámetros instrumentales para ICP-MS		
Potencia RF		1600 W
Flujo de gas (Ar)	Nebulizador	0,87 mL min ⁻¹
	Auxiliar	1,2 mL min ⁻¹
KED	Voltaje de entrada	-5 V
	Voltaje de salida	-5 V
	Offset de celda de colisión	-16
	Gas A de celda (He)	1,00 V
Analito / ratio masa-carga	Ti	48,9
	Ge (estándar interno)	73,9

2.2.5. Ensayos de lixiviación con producto para recubrimientos NP Fotoactiva 23

El producto fotocatalítico se aplicó sobre unas baldosas cerámicas esmaltadas por una de sus caras y previamente cortadas mediante sierra de diamante en pequeñas piezas cuadradas de tamaño 1,5 x 1,5 cm (dimensiones que facilitan su posterior observación en SEM). Cada uno de los recubrimientos se realizó únicamente sobre una de las caras de estas piezas, que bien podía ser la parte esmaltada o la porosa, para estudiar así las posibles diferencias en las cantidades de Ti liberadas.

La aplicación del recubrimiento consistió en mojar un pincel en el producto líquido para después extenderlo sobre la cerámica, de forma que quedara un film líquido lo más homogéneo posible a simple vista en su superficie, de acuerdo a las indicaciones dadas por el fabricante. Las piezas cerámicas recubiertas se dejaban 5 minutos a temperatura ambiente sobre un vidrio de reloj y se secaban en estufa a 150°C durante 15 minutos. Una

vez secas, las piezas se sumergían en 6 ml de agua ultrapura en vasos de teflón y se dejaban en agitación durante 24 horas a 99 rpm y a temperatura ambiente. Tras la agitación, se retiraban las piezas con pinzas y el lixiviado se trasvasaba a tubos de 15 ml, a partir de los cuales se realizaría su posterior digestión ácida y el análisis de contenidos totales de Ti mediante ICP-OES.

2.2.6. Extracción de TiO₂ NPs en muestras de surimi mediante digestión alcalina

La digestión alcalina consistió en la suspensión de 0,25 g de muestra en 2 mL de TMAH (10% v/v) y su sonicación en baño de ultrasonidos a 37 kHz durante 2 horas. Tras la digestión, los extractos se centrifugaban a 3900 rpm, a una temperatura de 8°C, durante 15 minutos. Se tomaba 1 mL de sobrenadante que se diluía 1:10 en el correspondiente portador (Novachem 0,05%) para su análisis posterior mediante AF4-ICP-MS o para ser guardado en tubos de 10 mL de polietileno a 4°C en caso de analizarlo mediante SP-ICP-MS. Las muestras se preparaban por triplicado, junto con tres blancos por cada serie de muestras digeridas, en las mismas condiciones descritas.

2.2.7. Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4)

Se ha empleado un sistema AF4 AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg, Alemania), con un canal de dimensiones reducidas (SLC) o canal corto: 14 cm de longitud, de 2 a 0,5 cm de anchura y 350 µm de espesor. Este tipo de canal ha sido presentado a lo largo del Capítulo 1, con el que se demostró la mejora de la eficiencia de separación respecto a otro canal de dimensiones convencionales. En la Tabla 2.2 se muestra el programa de separación aplicado durante los análisis correspondientes.

Tabla 2.2. Programa de separación aplicado en AF4. Caudal de salida: 1 mL min⁻¹.

Etapa	Tiempo (min)	Flujo cruzado (mL min ⁻¹)
Inyección/focalización	4 + 1	Caudal de inyección: 0,2 mL min ⁻¹
	10-30	Constante
Elución	3	Decrecimiento lineal
	2	Constante

Durante la optimización del método, se estudió el uso de tres tipos de membranas de ultrafiltración diferentes en la pared de acumulación del canal: dos de celulosa regenerada (RC), con tamaños de poro de 5 y 10 kDa, y uno de polietersulfona (PES), con un tamaño de poro de 5 kDa (Postnova Analytics). Las membranas se acondicionaron en primer lugar con la inyección de una suspensión de TiO₂ NPs de rutilo de 30 nm, sin aplicar ningún flujo cruzado en el canal. Después, la misma suspensión se inyectaba de forma sucesiva empleando el programa descrito en la Tabla 2.2, hasta que los tiempos de retención y los valores de recuperación obtenidos eran estables. Por último, se inyectaba portador en el sistema en varias ocasiones hasta que no se detectara ninguna señal respecto a la línea base. Este procedimiento se aplicaba cada vez que se reemplazaba la membrana.

Se estudiaron diferentes composiciones para el portador: agua ultrapura, pirofosfato de sodio 1 mM en agua ultrapura a pH 10, dodecilsulfato de sodio 0,01% (m/v) en agua ultrapura a pH 8 y el surfactante mixto Novachem 0,05% (v/v), con el que se obtuvieron los mejores resultados de separación. Para la filtración del portador, se emplearon filtros de nylon de 0,2 µm (Merck, Millipore, Irlanda), antes de su utilización en el sistema AF4.

A lo largo de todo el capítulo se utilizó un *loop* de 100 µL para la introducción de muestra. A la salida del canal, el portador era analizado por un detector UV-Vis de matriz de diodos (Shimadzu, Duisburgo, Alemania), con registro de señales de absorción en el rango de longitudes de onda comprendido entre 200 y 650 nm. En el caso concreto del TiO₂, se utilizó una longitud de onda de 350 nm, aunque se registraba el espectro completo cada 0,6 segundos.

Todas las variables mencionadas se analizaron en términos de tiempos de retención, repetitividad, resolución y recuperación, a través de los fractogramas obtenidos mediante AF4-UV-Vis. La resolución se calculó relacionando los tiempos de retención entre picos y el valor de anchura promedio, como describen Mitrano *et al.* [135]. Para las recuperaciones se siguió el procedimiento especificado por Bolea *et al.* [136], pero calculado para el isótopo ⁴⁹Ti en las señales de ICP-MS, y una longitud de onda específica de 350 nm para las señales de UV-Vis. El procesamiento de datos se realizó a través del software OriginPro Data Analysis, en su versión 2019b (OriginLab Corporation, Northampton, EE. UU.).

2.2.7.1. Caracterización mediante AF4-DLS

El sistema AF4 se acopló a un detector DLS (Zetasizer Nano ZS, ZEN3600, Malvern, Worcestershire, Reino Unido), equipado con una celda de flujo (ZEN 0023) para la caracterización de tamaños de las fracciones separadas en los análisis. La temperatura se fijó en 25°C para todas las medidas. Las señales de intensidad y las estimaciones de diámetros hidrodinámicos se registraban cada 3 segundos, con valores por defecto para el resto de parámetros instrumentales.

2.2.7.2. Detección elemental y determinación de TiO₂ NPs mediante AF4-ICP-MS

AF4 se acopló a un espectrómetro de masas ICP (ELAN DRC-e, PerkinElmer, Toronto, Canadá) para la detección elemental y cuantificación de titanio. El caudal de salida procedente de AF4 fue dirigido directamente al sistema de nebulización del espectrómetro, constituido por un nebulizador concéntrico de vidrio y una cámara ciclónica (Glass Expansion, Merlbourne, Australia). Las lecturas en ICP-MS consistieron en 20 barridos con un tiempo de lectura (*dwell time*) de 50 ms, con valores por defecto para el resto de parámetros instrumentales.

La cuantificación de TiO₂ se basó en el registro de señales para el isótopo ⁴⁹Ti, empleando ⁷⁴Ge como estándar interno. A partir de una calibración *on-line* con estándares de titanio iónico diluidos en ácido nítrico (1%), se transformaban las señales procedentes de ICP-MS para las muestras en valores de concentración, finalmente calculados en masa a partir de la integración del área de los picos obtenidos en los fractogramas en AF4.

2.2.8. Determinación de TiO₂ NPs mediante SP-ICP-MS

El análisis individual de partículas mediante ICP-MS se realizó gracias a la colaboración con el Grupo de Elementos Traza, Espectroscopía y Especiación (GETEE) de la Universidad de Santiago de Compostela. Se empleó un equipo NexION 300X (PerkinElmer, Waltham, EE. UU.), con un sistema de muestreo automático SeaFast SC2 DX (Elemental Scientific, Omaha, EE. UU.).

Las condiciones de análisis se muestran en la Tabla 2.3. El tratamiento de datos se realizó con el software Syngistix Nano Application (PerkinElmer). Las eficiencias de transporte se calcularon a partir del análisis de un patrón de nanopartículas de oro de 60 nm, procedente del NIST, preparado con una concentración de 518 ng L⁻¹ en agua

ultrapura. Se obtuvieron eficiencias de entre 1,5 y 3,5%, en concordancia con los valores obtenidos en otros estudios en las mismas condiciones de preparación [106].

Los resultados de distribuciones de tamaño de partículas de TiO₂ y de concentraciones en masa se determinaron a través de calibraciones con estándares de titanio iónico, preparadas con concentraciones desde 0 a 20 µg L⁻¹ [98]. Los extractos de TMAH se diluyeron 1:100 en Tritón X-100 0,05% (v/v) para los análisis en SP-ICP-MS (por triplicado). Antes de las medidas, las mezclas se sonicaban en baño de ultrasonidos durante 5 minutos.

Tabla 2.3. *Parámetros instrumentales para el análisis mediante SP-ICP-MS.*

Isótopo monitorizado	⁴⁹ Ti
Densidad	4,2 g cm ⁻³
Fración en masa	59,9%
Caudal de muestra	0,41 – 0,43 mL min ⁻¹
Tiempo de lectura	100 µs
Tiempo total de adquisición	100 s

2.2.9. Estudio mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Las imágenes de FESEM para los materiales en polvo de rutilo, con partículas de tamaños nominales de 30, 50 y 100 nm, y para el producto fotocatalítico se obtuvieron usando un equipo MERLIN™ FESEM, equipado con una columna Genimi (Carl Zeiss Nano Technology Systems, Jena, Alemania). El microscopio cuenta además con un microanalizador X-Max de rayos X (Oxford Instruments, Abington, Reino Unido) para los análisis por espectrometría de dispersión de rayos X (EDS). Antes del análisis, las muestras se recubrieron con carbono para aumentar su conductividad con un equipo Leica EM SCD500 (Leica Microsystem, Viena, Austria). Para la obtención de las imágenes en FESEM con mayor resolución se empleó el detector *in-lens* de electrones secundarios del mismo microscopio, trabajando con un haz de 3 y 5 kV y una corriente de 100 pA. Los espectros EDS se llevaron a cabo a 8 kV.

Para la observación de los materiales con TiO₂ NPs en FESEM, se depositaron unas gotas de la suspensión correspondiente (después de sonicarse) sobre las rejillas portamuestras de cobre y se dejaron secar antes de realizar su recubrimiento con carbono.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Estudio de las condiciones de separación de TiO₂ NPs en AF4

Las diferentes variables experimentales relacionadas con la separación de nanopartículas de dióxido de titanio en AF4 se han estudiado en varios trabajos de la bibliografía [89,142,151,172]. En ellos, el canal, la composición del portador, el tipo de membrana y los ratios de caudales internos se optimizaron utilizando diferentes suspensiones de NPs o estándares, como el NM-104, cuya estructura cristalina corresponde al rutilo [142,151,172], o un material en polvo de TiO₂ como el Aeroxide P25 (70-80% anatasa) [89]. En el presente capítulo, se han empleado suspensiones de rutilo de varios tamaños nominales (ver Sección 2.2.2), suspendidas en glicerol 1% (m/m), de acuerdo con el procedimiento descrito por Taboada *et al.* [169], en el que se estudió la estabilidad de las partículas de TiO₂ en estos mismos materiales para su posterior análisis en SP-ICP-MS.

Se estudiaron dos tipos de materiales de membrana: polietersulfona (PES) y celulosa regenerada (RC), en ambos casos con tamaños de poro de 5 kDa. Aunque se obtienen valores absolutos de potencial zeta más altos con el uso de PES, lo que implica un incremento de las repulsiones electrostáticas para especies con carga negativa, son las membranas de RC las más comunes en la caracterización de TiO₂ NPs mediante AF4 [89]. En el presente estudio, se observaron diferencias en los tiempos de retención para el material en polvo de rutilo con nanopartículas de 30 nm de tamaño nominal, cuyos fractogramas se muestran en la Figura 2.1, siendo menores con la membrana de PES. En términos de recuperación, se obtuvieron valores del 70% frente al 45% usando RC y PES, respectivamente, por lo que se descartó la membrana de polietersulfona.

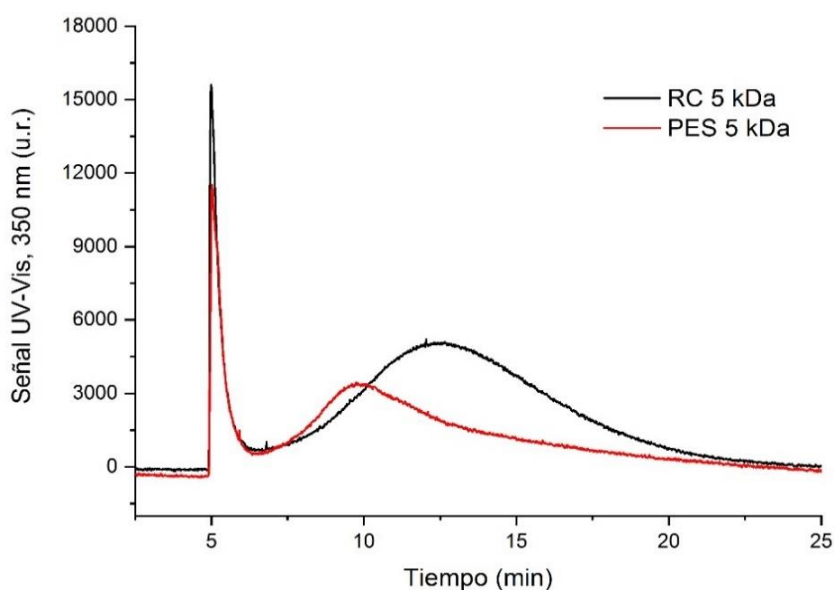


Figura 2.1. Fractogramas para material en polvo de rutilo con TiO_2 NPs (30 nm de tamaño nominal) en función del tipo de membrana empleada: celulosa regenerada (RC) o polietersulfona (PES). En ambos casos, el tamaño de poro fue de 5 kDa. Análisis mediante AF4-UV-Vis.

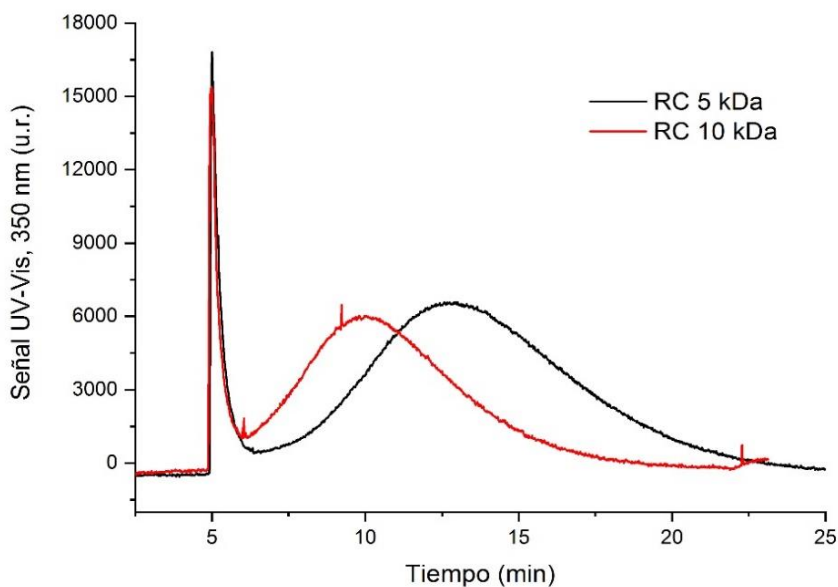


Figura 2.2. Fractogramas para material en polvo de rutilo con TiO_2 NPs (30 nm de tamaño nominal) en función del tamaño de poro de la membrana de celulosa regenerada empleada. Análisis mediante AF4-UV-Vis.

También se evaluó el efecto del tamaño de poro en la separación comparando membranas de RC de 5 y 10 kDa. El incremento del tamaño de poro tiene una influencia en la carga de la membrana que, según se pudo observar de forma experimental con la de 10 kDa, supuso una reducción de los tiempos de retención (ver Figura 2.2). Sin embargo, su uso implicó una reducción de los valores de recuperación por debajo del 50%, por lo que se escogió la membrana de RC de 5 kDa como la mejor opción para la separación de TiO₂ NPs.

Si la membrana resulta un factor importante debido a las interacciones potenciales con las partículas, la composición del portador también debe escogerse con cuidado para asegurar su compatibilidad con el analito y así mejorar el proceso de separación [88]. Se estudiaron cuatro tipos de portadores: agua ultrapura, pirofosfato de sodio 1 mM (m/v) (NaPP, pH 10), el surfactante aniónico dodecilsulfato de sodio 0,01% (v/v) (SDS, pH 8) y el surfactante mixto Novachem 0,05% (v/v) (pH 8-10). La elección de estos portadores respondió a diferentes alternativas consideradas en la estabilización de NPs [89].

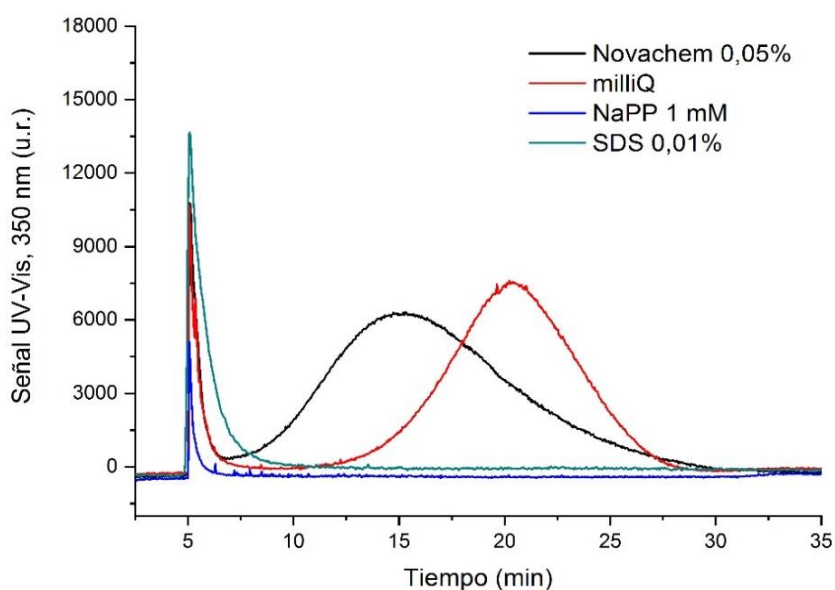


Figura 2.3. Fractogramas para material en polvo de rutilo con TiO₂ NPs (30 nm de tamaño nominal) en función del portador empleado. Análisis mediante AF4-UV-Vis.

Únicamente con agua ultrapura y el surfactante mixto se obtuvieron separaciones satisfactorias, como se muestra en la Figura 2.3. Para el caso del agua ultrapura en su posterior aplicación para matrices de mayor complejidad, como las muestras

especificadas en la Sección 2.2.3, se obtuvieron resultados de recuperación bajos. El surfactante mixto, por otro lado, contribuyó a aumentar la estabilidad de la suspensión de partículas de TiO₂, incluso para el caso de matrices complejas, algo que ya se había sido observado por Sánchez-García *et al.* [173]. Por lo tanto, se determinó que se emplearía Novachem 0,05% como portador.

El criterio para escoger las condiciones de flujo cruzado consistió en buscar los valores máximos de recuperación garantizando unos niveles de retención adecuados, de tal forma que se produjera una separación correcta del pico de las partículas respecto al tiempo de retención de volumen muerto (*void peak*). De acuerdo con la teoría de AF4, expuesta a lo largo del Capítulo 1, los niveles de retención aumentan conforme se incrementa el caudal de flujo cruzado, de modo que las partículas quedan retenidas en una zona más próxima a la membrana [58]. Esto también puede conllevar un aumento de los fenómenos de adsorción en la membrana, con la consecuente disminución de las recuperaciones [89]. Se estudiaron caudales de flujo cruzado desde 0,1 a 0,5 mL min⁻¹ en la separación de TiO₂ NPs de 30 nm de rutilo. Se observó que los tiempos de retención aumentaron de 14 a 40 minutos, respectivamente. En términos de recuperación, las condiciones de mayor retención supusieron una disminución del 15%. En vista de estos resultados, se escogieron las condiciones de separación más suaves, de 0,1 mL min⁻¹, para el resto de ensayos comprendidos en el presente capítulo.

2.3.2. Estrategias para la calibración de tamaños en AF4

Existen diferentes tipos de estrategias para la calibración de tamaños de partículas de TiO₂ en AF4. Una de las más frecuentes es la calibración directa con estándares de poliestireno (PS) para la conversión de los tiempos de retención en diámetros hidrodinámicos [151,164]. También se ha propuesto el uso de nanopartículas de otra naturaleza, como el oro [33], aunque se han encontrado discrepancias respecto a las calibraciones con PS. La determinación de diámetros hidrodinámicos también puede realizarse mediante acoplamiento con DLS [172], o de radios de giro con MALS, aunque presentan limitaciones cuando las concentraciones en las muestras son bajas o para tamaños pequeños de nanopartícula [52,174,175].

En este capítulo se propuso el uso de suspensiones de nanopartículas de TiO₂ de diferentes tamaños, procedentes de los materiales en polvo, para la calibración de tamaños

en AF4. Este enfoque permitiría reproducir unas condiciones de separación más realistas respecto a las TiO_2 NPs presentes en muestras, al ser de la misma naturaleza y sufrir el mismo tipo de interacciones que afectan a los tiempos de retención en el canal. Sin embargo, los fractogramas obtenidos para estos materiales presentaron picos de gran anchura, en los que los tiempos de elución resultaron similares a pesar de las diferencias de tamaños nominales (ver Figura 2.4), además de ser muy irreproducibles, por lo que no resultó posible su uso para las calibraciones de tamaño.

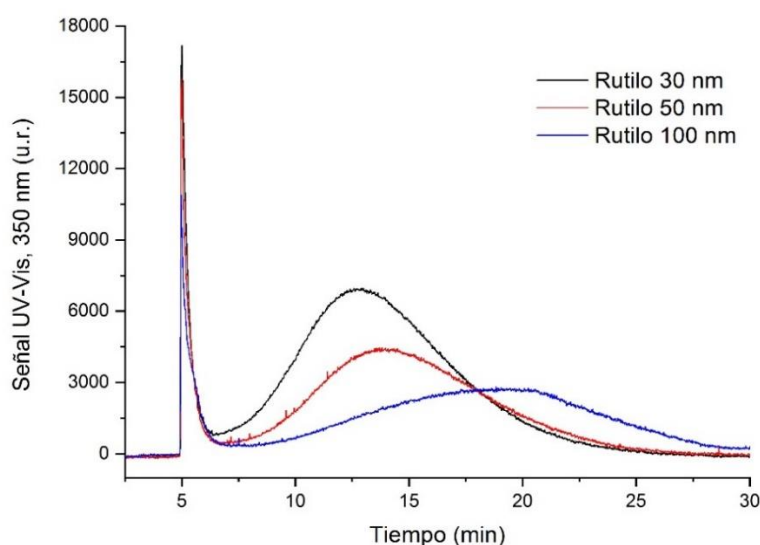


Figura 2.4. Fractogramas para materiales en polvo de rutilo con TiO_2 NPs de tres tamaños nominales diferentes. Análisis mediante AF4-UV-Vis.

La observación de estos materiales mediante FESEM confirmó la presencia de agregados con tamaños superiores a los nominales, por encima de 100 nm en los tres casos (Figura 2.5), lo cual coincide con lo observado por otros autores para productos que contienen rutilo [14,142,154]. Se concluyó, por lo tanto, que los materiales de rutilo en suspensión estaban agregados, incluso después de su sonicación en sonda en las condiciones descritas en la sección 2.2.2, lo que justifica los tiempos de retención similares y la gran dispersión de las señales observadas en AF4.

2. Caracterización de tamaños y cuantificación de partículas de dióxido de titanio mediante AF4 acoplado a DLS e ICP-MS

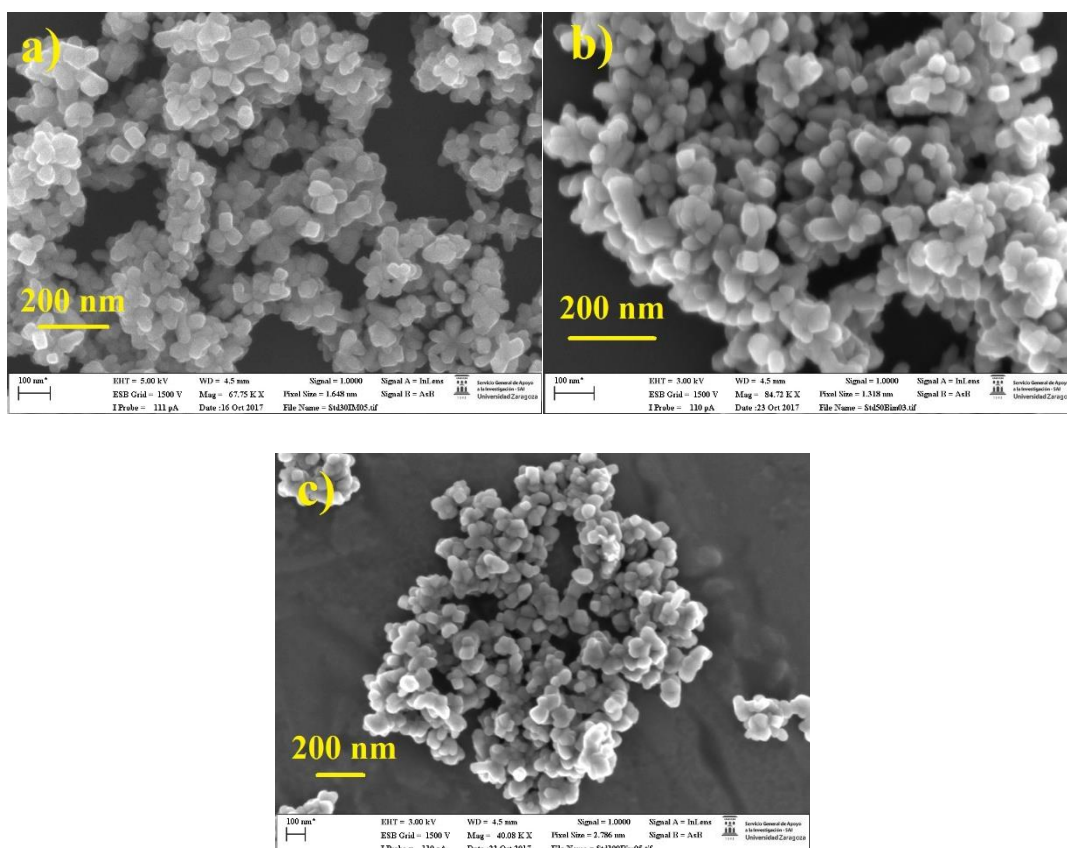


Figura 2.5. Imágenes en FESEM de electrones secundarios para materiales en polvo de rutilo con TiO_2 NPs de diferentes tamaños nominales: a) 30 nm, b) 50 nm y c) 100 nm.

Como alternativa, se emplearon estándares de tamaño de nanopartículas de óxido de silicio (SiO_2). Para estudiar su validez se determinaron los tamaños hidrodinámicos de las suspensiones de TiO_2 , comparando los resultados con los de la calibración a partir de estándares de poliestireno (PS) y los obtenidos mediante DLS sin acoplamiento, mostrados en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Caracterización de tamaños para materiales en polvo de rutilo (30, 50 y 100 nm de tamaño nominal) mediante DLS y las calibraciones con estándares de SiO_2 y PS en AF4 ($n=3$). Se muestran los índices de polidispersidad (PDI) para los resultados de DLS. Los tamaños determinados mediante AF4 corresponden a los máximos de pico (media \pm desviación estándar ($n=3$), con los rangos de diámetros a media altura de pico entre paréntesis).

Tamaño nominal TiO_2 NPs (nm)	Tamaño mediante DLS nm (PDI)	AF4 vs. SiO_2 nm (Rango)	AF4 vs. PS nm (Rango)
30	346 ± 14 ($0,30 \pm 0,01$)	268 ± 16 (120 - 420)	240 ± 14 (100 - 380)
50	329 ± 23 ($0,22 \pm 0,03$)	325 ± 8 (170 - 480)	295 ± 8 (150 - 440)
100	348 ± 6 ($0,20 \pm 0,01$)	535 ± 10 (300 - 765)	495 ± 9 (275 - 710)

La similitud en la caracterización de tamaños entre los estándares de PS y SiO₂ confirmó que no había efectos en los tiempos de retención en función de la naturaleza de las partículas, para las condiciones de separación del estudio. Se observa que en todos los casos se determinaron valores muy superiores a los tamaños nominales proporcionados por el fabricante, incluso en los análisis mediante DLS, lo que concuerda con los agregados vistos en FESEM. Los resultados de DLS fueron similares entre sí para los diferentes productos y comparables con los obtenidos mediante AF4, a excepción de la suspensión de rutilo de 100 nm, para la que se obtuvieron tamaños inferiores.

Las calibraciones de tamaños en AF4 con SiO₂ y PS NPs proporcionan resultados fiables para la caracterización de tamaños de partículas de dióxido de titanio, pudiendo emplearse ambos tipos de estándares con este propósito. Además, el uso de DLS acoplado a AF4 confirmó los resultados obtenidos con las calibraciones, aunque la caracterización presenta limitaciones para las fracciones de menor tamaño, debido a los bajos niveles de concentración en masa para estos rangos. Ambas estrategias (calibración y AF4-DLS), por lo tanto, fueron empleadas para la caracterización de tamaños de TiO₂ NPs en diferentes tipos de muestras, como se muestra en las siguientes secciones.

2.3.3. Análisis de productos fotocatalíticos

Las calibraciones de tamaños en AF4 se aplicaron a la caracterización de tamaños de TiO₂ NPs en dos productos comerciales: P25 y FN2, descritos en la Sección 2.2.3. Ambos productos suelen emplearse con fines fotocatalíticos y presentan una estructura similar, consistente en, aproximadamente, un 80% de anatasa y 20% de rutilo, con diámetros de partícula primarios entre 20 y 40 nm [176]. En el caso del P25, ha sido caracterizado en otros estudios mediante diferentes técnicas, como microscopía electrónica [176] o DLS [89,177,178]. En la Tabla 2.5 se observa que los tamaños determinados a través de la calibración con SiO₂ y PS NPs son superiores a estos valores bibliográficos, con diámetros de 150-170 nm, aunque concuerdan con los obtenidos mediante AF4-DLS. Los resultados sugieren que las nanopartículas tienden a agregarse en suspensión, tal y como mencionan otros autores, con diámetros hidrodinámicos situados entre 100 y 200 nm [89,177,178].

Tabla 2.5. *Determinación de tamaños para tres productos que contienen TiO₂ NPs, comparando los resultados mediante AF4-DLS con la calibración con estándares de tamaño de SiO₂ y PS. Ente paréntesis se muestran los rangos de tamaños correspondientes a los valores de media altura de los picos separados. Resultados expresados como la media \pm desviación estándar (n=3).*

Producto	AF4-DLS	AF4 vs. SiO ₂	AF4 vs. PS
	Tamaño promedio (nm)	Tamaño en el máximo de pico (nm)	
P25	162 \pm 2 (130 - 230)	172 \pm 1 (60 - 280)	150 \pm 1 (40* - 260)
FN2	167 \pm 3 (150 - 260)	159 \pm 13 (100 - 290)	140 \pm 12 (85* - 265)
NP Fotoactiva 23	64 \pm 1 (50 - 90)	56 \pm 4 (<10 - 95)	40 \pm 4*

* Resultados de las calibraciones por tamaño extrapolados.

Por otro lado, se analizó el producto de recubrimiento NP Fotoactiva 23. Se trata de una suspensión de nanopartículas de dióxido de titanio con una estructura cristalina basada en anatasa, con un tamaño primario de partícula alrededor de 10 nm, de acuerdo con los datos del fabricante. El producto se emplea como recubrimiento para superficies de edificios y fachadas, con capacidades de autolimpieza, y como fotocatalizador para la eliminación de contaminantes atmosféricos, como gases NO_x. La matriz del producto es ácida (pH 1,5) y muestra un aspecto translúcido, por lo que se realizó un tratamiento previo que consistió en una dilución en el portador para su análisis en AF4. En la Figura 2.6 se muestran los fractogramas para este producto con la utilización de tres sistemas de detección: DLS, ICP-MS y UV-Vis. Tal y como se observa, se eluyó un único pico a un tiempo de retención de 6,8 minutos, lo que, de acuerdo con las calibraciones con los estándares de tamaño de SiO₂ y PS, equivale a un diámetro de 56 \pm 4 y 40 \pm 4 nm, respectivamente (Tabla 2.5). Estos resultados están en consonancia con los obtenidos mediante AF4-DLS (puntos verdes mostrados en la Figura 2.6), que comprenden un rango de 50 a 90 nm. El detector de DLS proporciona una serie de medidas de diámetros hidrodinámicos (Z-Average) que se van incrementando con el tiempo de retención, de acuerdo con el modo de elución normal que tiene lugar en AF4.

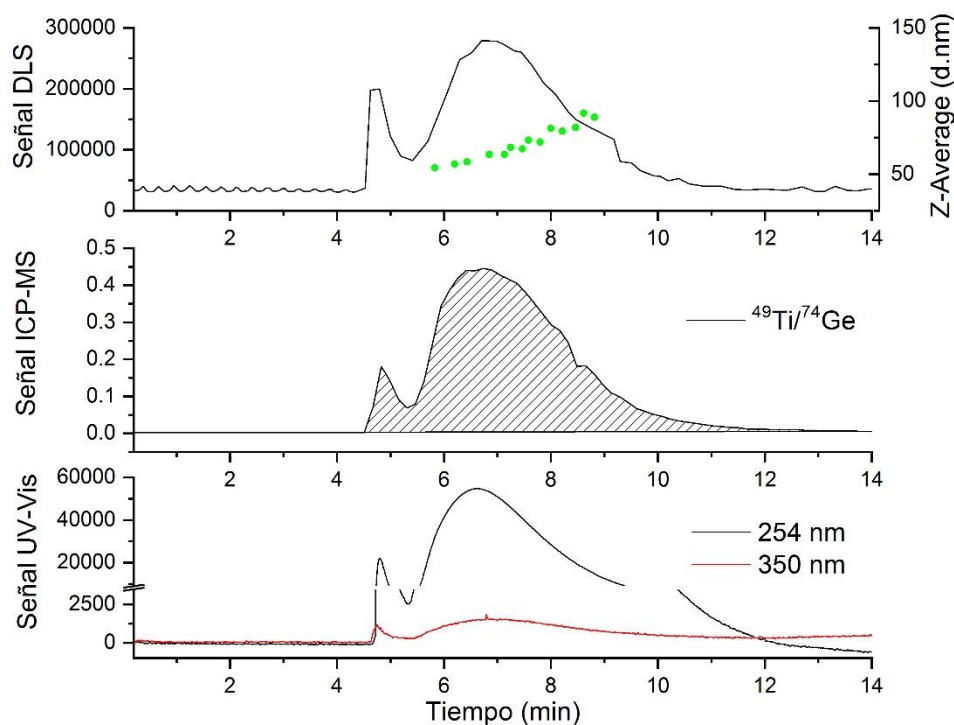


Figura 2.6. Fractogramas para el producto de recubrimiento fotocatalítico (NP Fotoactiva 23), obtenidos con tres sistemas de detección. Los puntos verdes corresponden a los diámetros hidrodinámicos determinados mediante DLS, denominados Z-Average. El área sombreada representa la zona de pico integrada para las cuantificaciones mediante ICP-MS.

La observación del producto de recubrimiento mediante FESEM permitió confirmar la presencia de agregados de nanopartículas, con tamaños primarios inferiores a 20 nm (Figura 2.7). Los resultados sugieren, como sucediera con el resto de productos fotocatalíticos analizados, la agregación de las partículas en suspensión, aunque en un menor grado a lo observado con los productos en polvo de rutilo descritos en la Sección 2.2.2.

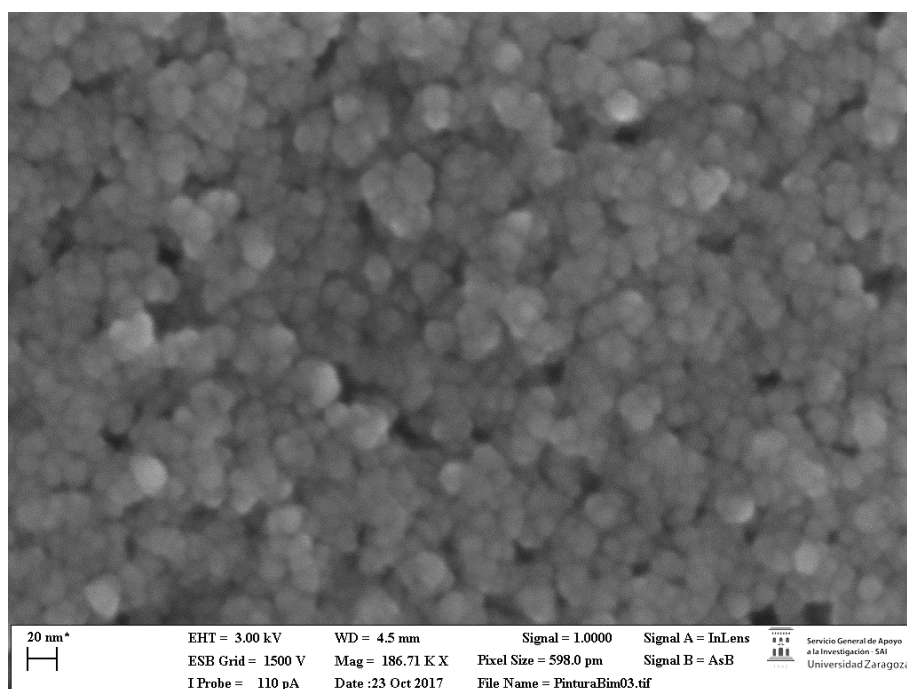


Figura 2.7. Imagen en FESEM de electrones secundarios del producto de recubrimiento fotocatalítico NP Fotoactiva 23.

2.3.3.1. Ensayos de lixiviación con producto NP Fotoactiva 23

Tras su análisis mediante AF4, se desarrollaron unos ensayos de lixiviación para el producto para recubrimientos NP Fotoactiva 23 con el objetivo de evaluar la posible migración de nanopartículas de TiO_2 bajo unas condiciones próximas a un uso real. Para ello, se aplicó el producto sobre un sustrato cerámico, como ejemplo de un tipo de material comúnmente empleado en fachadas, y se emplearon unas condiciones de exposición que simulaban una llovizna suave y continua de unas horas de duración (ver condiciones en Sección 2.2.5). En primer lugar, se analizaron los contenidos totales de Ti en los lixiviados mediante ICP-OES, siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 2.2.4. Los resultados se muestran en la Tabla 2.6. De los dos tipos de superficies estudiadas, tan solo en el caso de la esmaltada se liberó una cantidad detectable de Ti durante el ensayo, siendo los contenidos inferiores al límite de cuantificación ($0,15 \text{ mg Ti L}^{-1}$) en el caso de la superficie porosa.

Tabla 2.6. *Resultados obtenidos de los ensayos de lixiviación de Ti desde el producto para recubrimiento NP Fotoactiva 23. Concentraciones de Ti determinadas mediante ICP-OES (n=3). Resultados expresados como la media \pm desviación estándar. Límite de cuantificación (LOQ) del método determinado en 0,15 mg Ti L⁻¹.*

Cerámica	Ti lixiviado (mg L⁻¹)	Ti lixiviado (%)
Cara esmaltada	0,69 \pm 0,38	0,6 \pm 0,2
Cara porosa	< LOQ	< 0,1

Los resultados de concentración de Ti en los lixiviados se compararon con los contenidos totales en el producto, también determinados mediante ICP-OES, que junto con la masa de pintura aplicada en cada una de las piezas cerámicas permitió calcular el porcentaje de Ti lixiviado, con valores por debajo del 1% para la cara esmaltada. La observación mediante FESEM de ambas superficies cerámicas con el producto aplicado antes y después del ensayo de lixiviación permitió confirmar que las superficies esmaltadas permanecen prácticamente inalteradas tras la lixiviación; el ataque del medio ácido del propio recubrimiento sobre la cara cerámica porosa dificultaba concluir si había o no diferencias tras la lixiviación en ese lado (ver las imágenes en el Anexo 2.2). Por tanto, los resultados de ICP-OES, junto con el estudio realizado con FESEM, sugieren que el producto mantendrá sus propiedades durante bastante tiempo bajo condiciones climatológicas como las simuladas en el ensayo. Finalmente, y dado que el porcentaje de Ti liberado en los ensayos fue poco significativo, se desestimó el análisis de los lixiviados mediante AF4 para determinar la posible presencia de partículas migradas.

2.3.4. Análisis de muestras de surimi

2.3.4.1. Extracción alcalina de TiO₂ NPs en muestras de surimi

La extracción de las partículas desde una matriz sólida puede suponer la modificación de la distribución de tamaños original, por lo que este resulta un escenario de gran complejidad desde el punto de vista analítico. Se ha observado que el uso de diferentes procedimientos de tratamiento de muestra para la caracterización de TiO₂ NPs en cremas solares conlleva diferencias en las distribuciones de tamaños analizadas mediante AF4 [142]. Aunque se han descrito diferentes estrategias en la bibliografía para la

caracterización de este tipo de nanopartículas en muestras sólidas, como se ha discutido con anterioridad, esta es la primera vez que se propone el uso de una extracción alcalina para muestras alimentarias. La extracción con TMAH ha permitido obtener elevados rendimientos de extracción para nanopartículas de plata, oro o nanotubos de carbono en tejidos [141,179,180]. Algunas de las ventajas que presenta son la baja cantidad de sales que quedan en disolución tras la digestión, o el hecho de que no se añadan especies de sulfuros, a diferencia de las digestiones enzimáticas, que pueden ocasionar interferencias en ICP-MS [180].

El procedimiento de la extracción se ha optimizado para obtener los mejores resultados de recuperación de Ti y con la consideración de las distribuciones de tamaños obtenidas en su análisis mediante SP-ICP-MS, aplicado a una muestra de surimi (FZ12). En los ensayos preliminares basados en agitación mecánica para la extracción de TiO₂ NPs, se observaron bajos rendimientos, incluso con el aumento de los tiempos de extracción. Se escogió el uso de baño de ultrasonidos en lugar de sonda, por posibles contaminaciones de Ti iónico desde la propia sonda [169]. También se estudiaron el efecto del porcentaje de TMAH, los tiempos de sonicación y el volumen de extractante. El proceso de optimización se describe en detalle en el Anexo 2.1, con las condiciones finales especificadas en la Sección 2.2.6.

2.3.4.2. Determinación de tamaños de partícula de TiO₂ en surimis

Se analizaron los extractos con TMAH de cuatro muestras de surimi mediante AF4-UV-Vis-DLS-ICP-MS, para los que se emplearon las condiciones descritas en la Tabla 2.2. En términos generales, los fractogramas obtenidos a partir de la señal dispersada a través de DLS se corresponden con los perfiles de Ti registrados mediante ICP-MS para todas las muestras, lo que sugiere la naturaleza particulada del titanio presente en los extractos separados en AF4 (Figura 2.8). Las bajas señales en ICP-MS registradas en el *void peak*, a tiempos de 4,5 minutos, permiten deducir que los contenidos de titanio asociados a la fracción orgánica que pudieran quedar en la muestra tras la extracción (señal de UV-Vis a 254 nm) no son significativos respecto al total. Por lo tanto, se puede afirmar que AF4 es capaz de separar, bajo las condiciones del método optimizadas, el titanio extraído del surimi en tiempo inferior a 12 minutos.

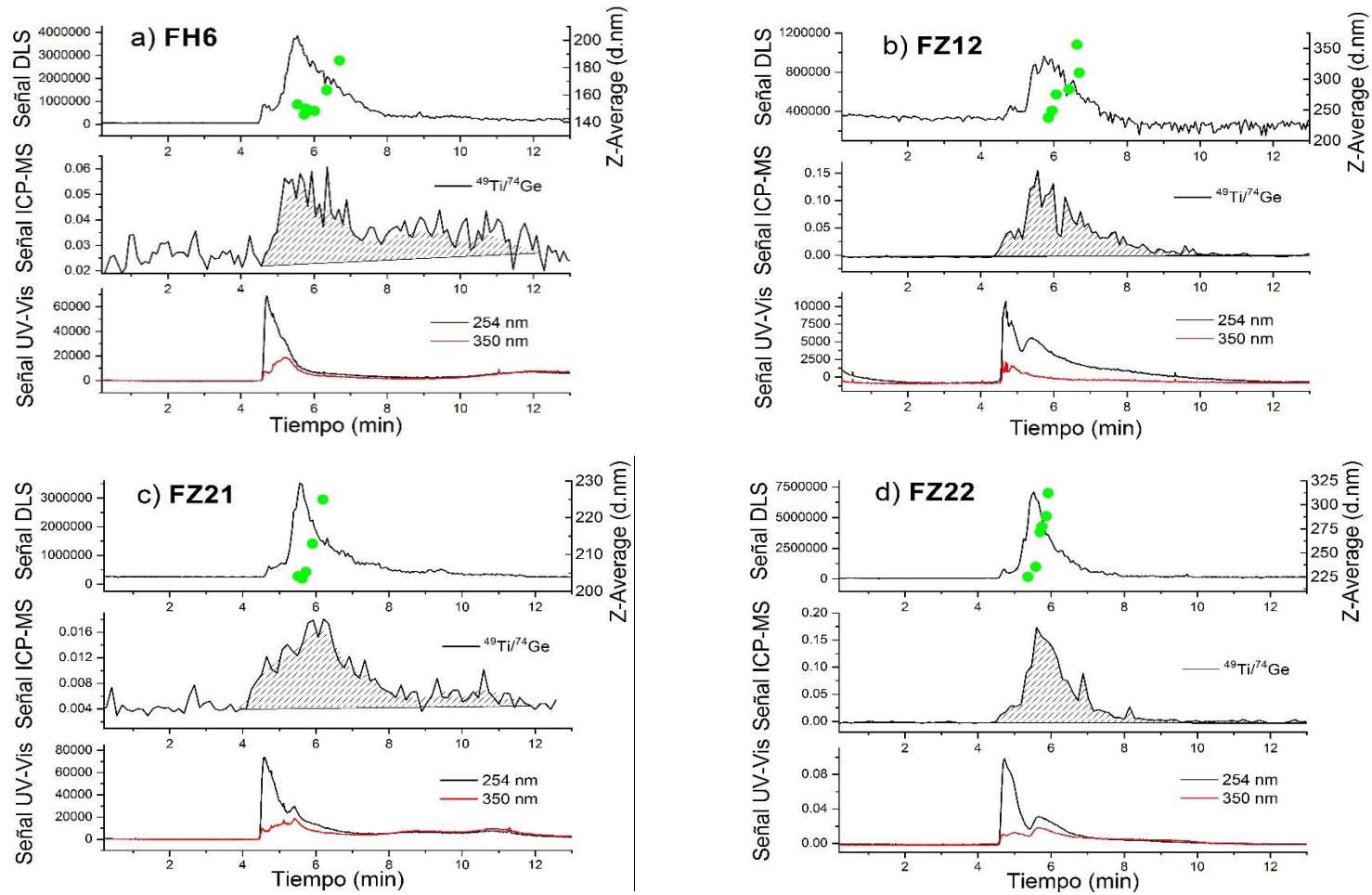


Figura 2.8. Fractogramas para muestras de surimi: a) FH6, b) FZ12, c) FZ21 y d) FZ22. Los puntos verdes corresponden a los diámetros hidrodinámicos determinados mediante DLS. Las zonas sombreadas representan las áreas de integración para la cuantificación de contenidos de Ti mediante ICP-MS. En los casos a) y c) la señal ha sido suavizada, debido a los bajos niveles de intensidad obtenidos.

En relación con los diámetros hidrodinámicos determinados mediante DLS (representados por puntos verdes en los fractogramas), los tiempos de adquisición de datos son reducidos, de 3 segundos, por lo que muchas de las medidas no se ajustan a los criterios de correlación establecidos para el análisis y solo se muestran unos pocos valores, que normalmente corresponden a los valores más altos de señal dispersada. Esta limitación en los detectores de DLS puede conllevar sobreestimaciones en las distribuciones de tamaños, dado que la dispersión correspondiente a las partículas de menor tamaño es mucho menor que la proporcionada por las de mayor tamaño, con una relación a la sexta potencia. De este modo, la detección de las partículas más pequeñas puede verse limitada, a lo que además hay que sumar los bajos niveles de concentración de las muestras analizadas.

Los resultados de los diámetros hidrodinámicos obtenidos mediante AF4-DLS se muestran en la Tabla 2.7. Los rangos de tamaños hacen referencia a todas las medidas de DLS, mientras que el valor del diámetro corresponde al determinado en el máximo de pico de señal de dispersión. En general, todos los resultados son superiores a 140 nm, con diámetros de hasta 350 nm. Estos valores concuerdan con los determinados en la bibliografía. En el estudio de Helsper *et al.* [151], se analizaron siete pigmentos con contenidos de TiO₂, clasificados como E171, para los que se obtuvieron tamaños de entre 350 y 480 nm mediante AF4-UV, 130-210 nm por SP-ICP-MS y rangos de entre 250 y 400 nm mediante SEM (en este caso se confirmó su agregación, con tamaños primarios de 60-300 nm). Basados en el análisis con imágenes TEM, Fiordalisco *et al.* [150] observaron amplias distribuciones de tamaños primarios de TiO₂ en productos alimentarios, con diámetros desde 25 hasta 410 nm, con un 12-15% de partículas por debajo de 100 nm; resultados muy similares al 10% determinado por Peters *et al.* [15] en su análisis mediante AF4-ICP-MS. Mientras que a través de SEM se determinaron tamaños de 100-200 nm, el análisis mediante DLS para las mismas muestras dio como resultado diámetros de 330 y 390 nm [150], diferencias que se justifican al referirse a diámetros hidrodinámicos en el último caso. Se obtuvieron valores de tamaño incluso superiores mediante DLS en el estudio de Chen *et al.* [181], para el que, en unas condiciones de pH 5 y fuerza iónica del medio de 10 mM, se obtuvieron resultados de hasta 800 nm.

Tabla 2.7. Caracterización de tamaños de partículas de TiO_2 en muestras de surimi mediante AF4-DLS (diámetro hidrodinámico) y SP-ICP-MS (diámetro esférico equivalente, $n=3$), con los rangos de tamaños mostrados entre paréntesis. Los resultados procedentes de SP-ICP-MS corresponden a los tamaños más frecuentes, en nm.

Muestra	AF4-DLS	SP-ICP-MS
	Tamaño en el máximo de pico (nm)	Tamaño más frecuente (nm)
FH6	153 (140 - 200)	45 ± 1 (36 - 151)
FZ12	237 (225 - 350)	73 ± 1 (36 - 251)
FZ21	204 (200 - 230)	38 ± 2 (36 - 90)
FZ22	235 (225 - 325)	69 ± 1 (36 - 362)

En este caso, la presencia de una fracción de tamaños inferiores a 100 nm no pudo ser confirmada mediante AF4-DLS, debido a las señales de intensidad dispersada tan bajas. Como en análisis anteriores, se aplicó la calibración con estándares de SiO_2 NPs para la transformación de tiempos de retención en tamaños hidrodinámicos. Sin embargo, la caracterización de tamaños mediante esta estrategia dio como resultado diámetros muy por debajo de los determinados por DLS, lo que sugiere que los tiempos de retención en AF4 fueron menores a los esperados. Un factor que puede influir en la separación en muestras complejas es su propia matriz, cuyos efectos en AF4 han sido señalados por otros autores [160], y que puede causar alteraciones en las fuerzas de atracción o repulsión entre las partículas y la membrana, cuya interacción es un factor determinante en la separación en AF4, como se ha discutido en la sección 2.3.1. El uso de estándares de tamaños de una naturaleza similar al analito en las muestras permite minimizar las variaciones que puedan darse en estas interacciones, aunque todavía pueden tener lugar efectos de matriz.

Para estudiar el efecto matriz se compararon los tiempos de retención de una suspensión de TiO_2 NPs, de 30 nm de tamaño nominal, preparada en medios diferentes: agua ultrapura, TMAH 10% (v/v) y el extracto del surimi FZ12. Por un lado, los tiempos de separación en agua ultrapura y TMAH fueron comparables, con resultados de 18 minutos; mientras que para el extracto de muestra los tiempos se redujeron hasta 7 minutos. Los resultados sugieren que los tiempos de elución son modificados por la

matriz, siendo menores a los previstos a través de la calibración con SiO₂ o PS. En otros estudios también se ha observado la alteración de la estabilidad de las nanopartículas de TiO₂ por la presencia de algún ligando orgánico [182,183], que puede afectar no solo a la composición química de las NPs, sino también a su carga superficial, lo que finalmente conlleva efectos en la interacción membrana-analito. Las estrategias basadas en la calibración de tamaños con suspensiones de nanopartículas de tamaño conocido también están influenciadas por el efecto matriz presente, por lo que no resultan válidas en este escenario. La dilución de las muestras podría minimizar este efecto, aunque los bajos contenidos de titanio en las muestras limitan esta posibilidad.

Debido a las limitaciones de detección a través de DLS para la caracterización de tamaños por debajo de 100 nm y la imposibilidad de emplear la estrategia de calibración con estándares, la distribución de tamaños de las TiO₂ NPs se determinó mediante SP-ICP-MS. Se analizaron las mismas cuatro muestras de surimi, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2.7. El límite de detección en tamaño para las nanopartículas de dióxido de titanio se estableció en 43 nm, con un criterio de 5σ , un valor en concordancia con otros estudios centrados en el análisis de este mismo tipo de NPs mediante SP-ICP-MS [165,169]. Las distribuciones de tamaños se muestran en la Figura 2.9. Para las muestras FH6 y FZ21, el rango de tamaños detectado comprendió desde 43 hasta 150 y 90 nm, respectivamente. Para las muestras FZ12 y FZ22, el rango fue más amplio, desde 43 hasta 250 y 360 nm.

Estos resultados confirman la presencia de TiO₂ en forma de nanopartículas en los extractos de surimi, aunque no fue posible obtener la distribución completa debido al límite de detección en tamaño del método. Las diferencias observadas respecto a los resultados obtenidos mediante AF4-DLS, mostrados en la Tabla 2.6, están justificadas por la naturaleza diferente de los parámetros analizados: diámetros hidrodinámicos para AF4 frente a diámetros equivalentes en SP, y por los límites de detección en tamaño alcanzados en cada uno de ellos, superiores en el caso de AF4-DLS.

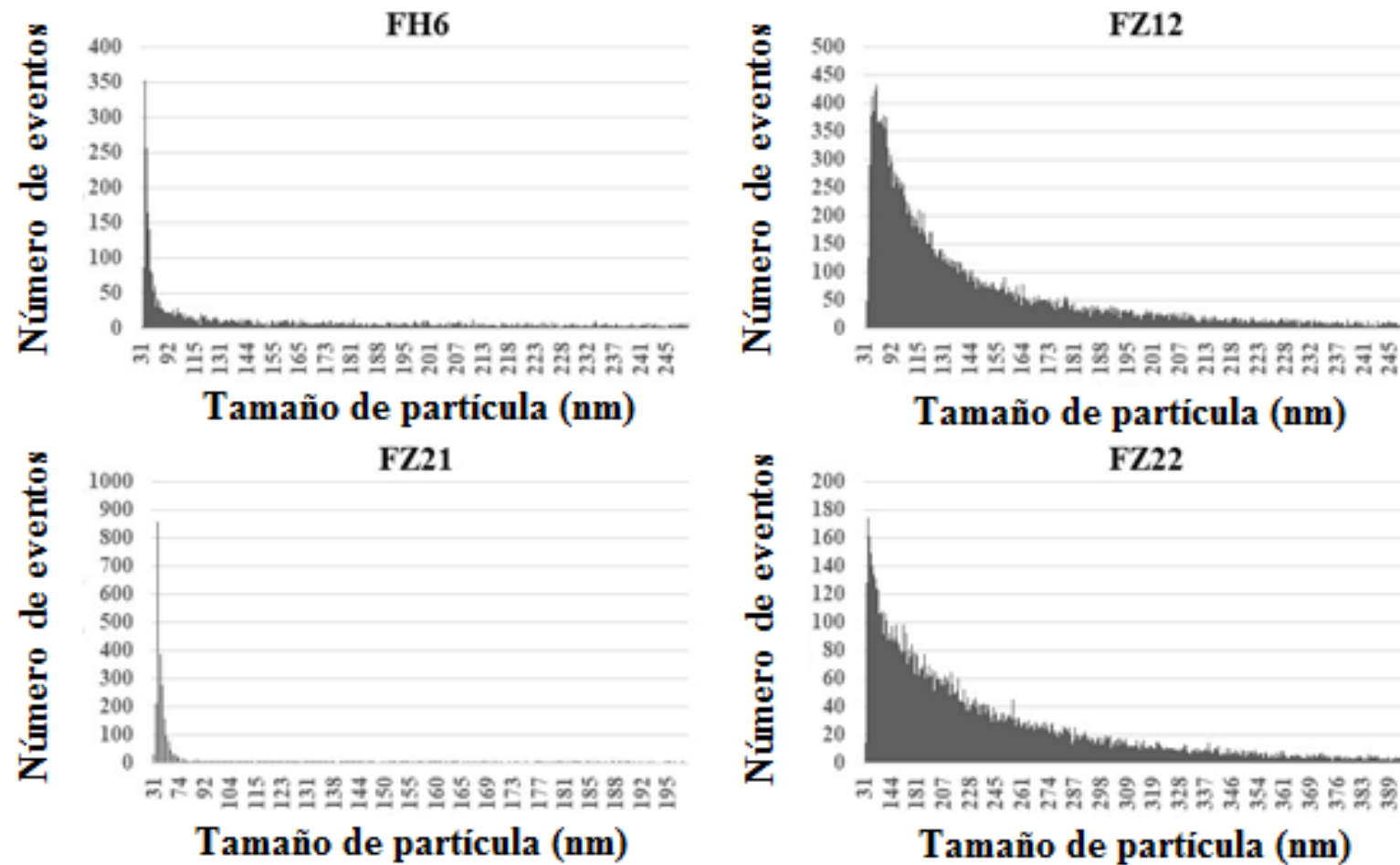


Figura 2.9. Distribuciones de tamaño de TiO_2 NPs en las diferentes muestras de surimi, analizadas mediante SP-ICP-MS.

2.3.5. Validación de la extracción alcalina y la cuantificación de TiO₂ NPs mediante AF4-ICP-MS

La eficiencia de la extracción con TMAH en surimis se evaluó a través de la cuantificación de contenidos totales de Ti en los extractos mediante ICP-OES y de la comparación con los resultados obtenidos con la digestión ácida de las muestras, de acuerdo con los procedimientos descritos en las Secciones 2.2.4 y 2.2.5, respectivamente.

En el caso de las muestras FH6 y FZ21, las concentraciones estuvieron por debajo del límite de cuantificación obtenido mediante ICP-OES (2,80 µg Ti g⁻¹) para los extractos con TMAH, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2.8. En términos generales, aunque se obtuvieron contenidos de titanio más altos para las muestras tratadas con la digestión alcalina, las diferencias no son significativas (analizadas con un test-t para un nivel de confianza del 95%). De este modo se confirmó que el tratamiento con TMAH permite extraer contenidos similares a los obtenidos mediante digestión ácida, que a su vez corresponden de forma cuantitativa a los contenidos totales de Ti presentes en las muestras de surimi.

Tabla 2.8. Concentraciones de Ti total determinadas en muestras de surimi. Procedimientos de cuantificación basados en: digestión alcalina seguida de análisis mediante ICP-OES (n=2), digestión ácida con determinación mediante ICP-MS (n=3) y AF4-ICP-MS (n=2). Resultados expresados como la media ± desviación estándar.

Surimi	Titanio (µg g ⁻¹)		
	Extracción TMAH ^a	Digestión ácida ^b	AF4-ICP-MS ^c
FH6	2,91 ± 0,25	2,29 ± 0,37	3,14 ± 0,10
FZ12	16,39 ± 2,28	12,40 ± 1,00	11,75 ± 1,13
FZ21	< LOQ	3,16 ± 0,78	3,83 ± 0,16
FZ22	13,50 ± 4,51	9,69 ± 1,10	14,55 ± 1,46

^a Cuantificación en extractos mediante ICP-OES, a excepción del resultado para la muestra FH6, determinada mediante ICP-MS.

^b Digestión ácida asistida por microondas seguida de cuantificación mediante ICP-MS.

^c Tras la extracción con TMAH.

El procedimiento para la cuantificación de TiO₂ NPs extraídas mediante AF4-ICP-MS se validó a través del análisis de un producto comercial de TiO₂ en forma de polvo, con partículas de tamaño nominal de 30 nm. En primer lugar, mediante el análisis de este tipo de producto, preparado en una suspensión de 500 µg L⁻¹, por ICP-MS y empleando estándares de Ti iónico, se determinaron contenidos en concordancia con los cuantificados a través de ICP-MS tras su digestión ácida (procedimiento descrito en la Sección 2.2.4). Posteriormente, se evaluó la cuantificación obtenida mediante AF4-ICP-MS con el análisis de la suspensión de 500 µg L⁻¹ del producto en polvo, obteniéndose una recuperación por encima del 85%. El límite de cuantificación del método basado en AF4-ICP-MS fue 2,10 µg Ti g⁻¹ (calculado como 10 veces la desviación estándar de la línea base, dividido entre la sensibilidad). La repetitividad se estudió a través de la inyección de la suspensión del producto de TiO₂, con resultados del 2% en términos de tiempos de retención (tiempos en el máximo de pico) y del 4% en concentración (área del pico integrada en los fractogramas), expresados como desviación estándar relativa (n=3).

2.3.6. Cuantificación de partículas de TiO₂ en los productos analizados

En la bibliografía se describen dos tipos de estrategias para la cuantificación de TiO₂ mediante AF4-ICP-MS. La primera corresponde a la calibración externa con productos que contienen nanopartículas de dióxido de titanio sintéticas, que son empleados como estándares. Es el caso de productos como P25 o NM-100, que suelen ser diluidos en agua ultrapura [152] o en surfactantes como Tritón X-100 [31] y posteriormente diluidos en soluciones acuosas a diferentes concentraciones. La segunda estrategia emplea estándares de Ti iónico para la preparación de calibraciones *on-line* [14,15], que es la escogida en el presente capítulo.

Los resultados de los análisis mediante AF4-ICP-MS se muestran para los extractos de surimi (Tabla 2.8) y el producto de recubrimiento fotocatalítico (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Concentraciones de Ti total determinadas en el producto de recubrimiento fotocatalítico NP Fotoactiva 23. Resultados expresados como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

Muestra	Titanio (mg g ⁻¹)	
	Digestión ácida*	AF4-ICP-MS
Producto de recubrimiento	19,87 \pm 1,25	16,86 \pm 2,54

* Digestión ácida asistida por microondas seguida de cuantificación mediante ICP-OES.

En general, se observa la concordancia de los resultados obtenidos en comparación con los contenidos totales de Ti, lo que confirma que la aplicación del procedimiento de cuantificación con la calibración con estándares iónicos resulta adecuada. Cabe destacar los altos valores de recuperación obtenidos (por encima del 80%) en todos los casos, junto a la capacidad del método para la cuantificación de concentraciones en un rango muy próximo al límite de detección, como en las muestras de surimi FH6 y FZ21. Estos valores de recuperaciones son satisfactorios, considerando los obtenidos en otros estudios en los que se emplea AF4 para la separación de TiO₂ NPs en muestras complejas [14,15,126,135,151,184], y los niveles de concentración tan bajos presentes en las muestras, con resultados de $\mu\text{g g}^{-1}$.

De acuerdo con los fractogramas mostrados en la Figura 2.8 para las muestras de surimi, el área integrada corresponde a la fracción particulada del Ti extraído, por lo que todo el titanio presente y extraído de las muestras se encuentra en forma de partículas, con los rangos de tamaños determinados en la Sección 2.3.4.2 y mostrados en la Tabla 2.7. Estos resultados se confirmaron también a través de la cuantificación de la fracción de Ti disuelto mediante SP-ICP-MS, con concentraciones por debajo del 1% respecto al total de Ti determinado en las muestras. Se concluye, por lo tanto, que el procedimiento desarrollado es capaz de extraer las partículas de TiO₂ en las muestras de surimi y de caracterizar de forma cuantitativa los tamaños de las partículas adicionadas como E171, que permanecen inalteradas, de acuerdo a las distribuciones de tamaños originales obtenidas para este aditivo alimentario [151].

2.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método basado en la combinación de AF4 acoplado a DLS y a ICP-MS como sistemas de detección, demostrando ser una estrategia aplicable a la caracterización de tamaños y a la cuantificación de partículas de TiO₂ en diferentes tipos de productos. En estos materiales, la incorporación de las partículas es debida a sus propiedades fotocatalíticas, como es el caso del material para recubrimientos, o a su capacidad blanqueadora en aditivos alimentarios (E171), como en los surimis. El uso de TMAH como medio para la extracción de partículas permite obtener valores de recuperación de TiO₂ elevados en AF4, lo que constituye generalmente uno de los problemas de mayor relevancia en la cuantificación mediante AF4-ICP-MS. Esta es la primera vez que se caracterizan y cuantifican con éxito partículas de TiO₂ en productos alimentarios en rangos de concentración del orden de los $\mu\text{g g}^{-1}$, aunque estos niveles pueden suponer ciertas limitaciones cuando se utiliza AF4-DLS para la caracterización de tamaños. En el caso de los surimis, SP-ICP-MS permite superar estas limitaciones debido a sus bajos límites de detección en concentración en número de partículas, aunque la información obtenida en las distribuciones de tamaños de partícula pueda verse afectada por limitaciones relacionadas con el tamaño mínimo detectable en las muestras.

Se han desarrollado distintas estrategias basadas en el uso de estándares para la calibración de tamaños en AF4. Su aplicación es satisfactoria para la caracterización de TiO₂ NPs en productos industriales; sin embargo, pueden verse afectadas por efectos de matriz en escenarios más complejos, como es el análisis de productos alimentarios. Los resultados presentados a lo largo del capítulo confirman las dificultades de la técnica AF4 para la caracterización de tamaños cuando los estándares empleados para la calibración tienen un comportamiento diferente al de las nanopartículas en la muestra; es en esos casos cuando el uso de detectores que proporcionan información en tamaño de forma independiente, como DLS, se muestran esenciales, a pesar de las limitaciones para detectar las fracciones de menor tamaño. Los resultados de distribuciones de tamaños de partículas de TiO₂ obtenidos a partir de la extracción alcalina en surimis se corresponden con los del aditivo alimentario E171, confirmando además la presencia de una fracción en la escala nanométrica, aunque los métodos empleados basados en AF4 y SP-ICP-MS presentan limitaciones para su análisis en este rango de tamaños.

***3. CARACTERIZACIÓN DE
MICROPARTÍCULAS DE
ALUMINOSILICATOS MIGRADOS
DESDE ENVASES PLÁSTICOS
MEDIANTE SP-ICP-MS***

3.1. INTRODUCCIÓN

El silicio y el aluminio son dos de los elementos más abundantes en la corteza terrestre. De su combinación con oxígeno se originan los aluminosilicatos, que presentan disposiciones atómicas y moleculares muy variadas, lo que determina sus propiedades fisicoquímicas [185]. Entre ellos destacan las arcillas, que presentan estructuras laminares conformadas por dos tipos de capas: una primera con unidades tetraédricas de SiO_4 y una segunda con contenidos de aluminio en unidades octaédricas de AlO_6 [186].

La adición de arcillas a otros materiales tiene aplicaciones en áreas muy diversas, como la farmacéutica, cosmética, agraria, biomédica y medioambiental [187]. Debido a su disponibilidad, bajo coste, facilidad de procesamiento y alta estabilidad como material, su uso también se ha visto potenciado en la producción de envases para alimentos, principalmente a través del uso de la montmorillonita [188,189]. La incorporación de este mineral en una matriz polimérica, como el plástico, hace que mejoren muchas de las propiedades del producto final, un híbrido denominado material compuesto, que presenta una serie de ventajas respecto a los envases plásticos convencionales. Una de las principales mejoras es la del efecto barrera, en el que la propia estructura laminar de las arcillas dificulta el recorrido de las moléculas gaseosas a través del material, reduciendo su permeabilidad y manteniendo el producto interior fresco durante más tiempo [190,191]. Otras propiedades que confiere al material compuesto son mayor resistencia física y mecánica a fuerzas de tensión y calor, capacidades ignífugas, biodegradabilidad y protección contra la corrosión [186,192].

Todas estas mejoras han suscitado un gran interés por estos materiales compuestos y por el análisis de los mismos, en un intento por entender mejor su estructura, las interacciones entre arcilla-polímero y los efectos de ciertos parámetros durante la síntesis en las características finales de los productos [193]. Para ello se han empleado gran variedad de técnicas analíticas, entre las que destacan la difracción de rayos X (*X-Ray Diffraction*, XRD), utilizada para diferenciar entre las estructuras intercaladas o exfoliadas en los compuestos [194–196], y las técnicas de microscopías electrónicas de transmisión (TEM) [197–199] y de barrido (SEM) [195,200] o la microscopía de fuerzas atómicas (*Atomic Force Microscopy*, AFM) [201,202] para el estudio de su morfología. Otra técnica frecuente es la espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*, FTIR), empleada para la identificación de grupos funcionales superficiales [194,197,203]. Además, existen múltiples métodos para evaluar

las propiedades físicas y térmicas de los compuestos, como, por ejemplo, los análisis mecánicos dinámicos (*Dynamic Mechanical Analysis*, DMA) o los termogravimétricos (*Thermogravimetric Analysis*, TGA) [203,204].

Paralelamente, y como consecuencia de la creciente aplicación de arcillas para el envasado de alimentos, ha aumentado la necesidad de estudiar los riesgos para la salud humana que puede suponer su incorporación a este tipo de materiales. Con el uso del envase, la principal vía de exposición de las arcillas es a través de su liberación desde el sustrato plástico hacia el alimento que contenga en su interior, que será finalmente ingerido [205]. Por este motivo, se han realizado estudios de migración de arcillas desde envases, que suelen emplear medios que simulan alimentos, siguiendo procedimientos descritos por reglamentos como el UE nº 10/2011 [206] o la norma UNE-EN 1310-1 [207] para materiales plásticos. Los procedimientos establecidos varían en función del tipo de alimento que van a envasar, la duración del contacto y el almacenamiento considerado. Esto dificulta la comparación entre estudios, pues se ha observado que la migración de Al y Si es dependiente de los tiempos de exposición y la temperatura de los ensayos [208].

Aunque el reglamento UE nº 10/2011 llega a establecer un límite general de 10 mg de migración global de sustancias por dm^2 de superficie de contacto del envase, no especifica en qué formas, por lo que no hay ninguna restricción específica para el caso de partículas [209]. Como consecuencia, la evaluación de la migración de nanomateriales suele estar basada fundamentalmente en la cuantificación elemental mediante ICP-OES o ICP-MS de contenidos totales de los constituyentes de los nanomateriales adicionados, como Ag [210,211], TiO_2 [212,213], ZnO [211] o, en el caso de las arcillas, Al o Si [214–216] y Mg [217] en los medios simuladores. En este tipo de estudios se ha confirmado la presencia de elementos procedentes de los nanomateriales empleados en los envases, pero apenas existe información sobre las formas en las que migran. Tan solo un número reducido de trabajos se centran en la obtención de información sobre la fracción de partículas migradas, que suelen basarse fundamentalmente en técnicas de microscopía electrónica [218–220], en AF4 acoplado a ICP-MS [218,221] y en la detección individual de partículas mediante ICP-MS (SP-ICP-MS) [222,223]. En el caso concreto de las arcillas, Nasiri *et al.* [224] y Echegoyen *et al.* [225] estudiaron la presencia de partículas migradas a través de SEM, observándose en este último que el Al no solo estaba presente en forma disuelta, con su detección mediante SP-ICP-MS, sino también como partículas.

La detección individual de partículas mediante ICP-MS se ha convertido en una técnica de referencia para el análisis de nanomateriales fundamentalmente inorgánicos, debido a sus capacidades únicas para la detección, caracterización y cuantificación de partículas en suspensiones [102]. En lo referente al análisis de arcillas, estos materiales presentan estructuras laminares con espesores en el rango de los nanómetros y dimensiones laterales que pueden extenderse desde decenas de nanómetros hasta varias micras, como es el caso de la montmorillonita: una de las arcillas más empleadas en la fabricación de envases alimentarios [193,224]. Este tipo de estructuras pueden suponer un problema para el análisis en técnicas basadas en ICP-MS, pues la eficiencia de transporte para partículas de elevado tamaño tiende a disminuir [226], con rendimientos de nebulización por debajo del 1% para diámetros comprendidos entre 2 y 5 μm en sistemas de nebulización convencionales [227,228], o ni tan siquiera llegan a ser transportadas hasta el plasma [229]. Para solucionar estas limitaciones, en la actualidad se están estudiando nuevos sistemas de introducción de muestra, para los que se contempla tanto el uso de cámaras que reducen los caudales de muestra empleados [230,231] como el desarrollo de sistemas que inyectan directamente la suspensión a analizar en el plasma, sin el uso de cámaras [232,233].

Además de la geometría de los aluminosilicatos, el análisis de este tipo de partículas presenta otro tipo de limitaciones mediante ICP-MS. En el caso del Si, el análisis viene dificultado por la presencia de interferencias poliatómicas de elementos presentes en el propio plasma (como las procedentes de $^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$ o $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$ que se superponen a la señal del isótopo más abundante del Si ($m/z=28$)) [234], para las que la solución suele basarse bien en el uso de instrumentos de alta resolución [235] o en el uso de celdas de colisión [236] o de reacción [237] para instrumentos con analizador de cuadrupolo, así como configuraciones de ICP-MS/MS o de triple cuadrupolo [234], aunque todas ellas pueden conllevar pérdidas de sensibilidad en el ion de interés. La determinación de aluminio, en cambio, supone una alternativa para evitar los problemas de interferencias, aunque la falta de materiales de referencia o de estándares de partículas de Al_2O_3 plantea dificultades para el análisis de aluminosilicatos mediante SP-ICP-MS.

El objetivo de este capítulo es el desarrollo de una metodología de *screening* que permita la detección y la caracterización de partículas de aluminosilicatos migradas desde envases plásticos. Para ello, se utilizará la técnica de detección individual de partículas mediante ICP-MS. El desarrollo del método se basa en la monitorización de Si y Al, en

el uso de una serie de estándares de partículas de SiO_2 y una suspensión comercial de Al_2O_3 , lo que permite estudiar los rangos de tamaños de partícula analizables. Este rango queda determinado por unos límites tanto inferior como superior que se estudian en profundidad. Una vez desarrollada, la metodología se aplica al análisis de una arcilla natural (caolín) para comprobar la caracterización de tamaño de partículas de caolinita presentes en la muestra, en comparación con los resultados en TEM. Finalmente, se analizan las partículas de aluminosilicatos migradas desde dos tipos de envases plásticos que emplean arcillas (montmorillonita) para la formación de materiales compuestos.

3.2. EXPERIMENTAL

3.2.1. Instrumentación

El análisis mediante detección individual de partículas se ha realizado con un espectrómetro de masas con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) Perkin Elmer NexION 2000B (Toronto, Canadá). Se estudiaron dos tipos de sistemas de introducción de muestra: uno consistente en una cámara ciclónica con un nebulizador concéntrico de vidrio (Meinhard), y otro sistema con cámara Asperon (Perkin Elmer) equipado con un nebulizador de focalización de flujo (Ingeniatics, Sevilla, España). Los parámetros instrumentales y de adquisición de datos en modo individual para ambos sistemas se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. *Parámetros instrumentales y de adquisición de datos en SP-ICP-MS en función del tipo de cámara: ciclónica o Asperon.*

Cámara	Ciclónica	Asperon
Parámetros instrumentales		
Potencia RF	1600 W	1600 W
Flujo de gas (Ar)		
Plasma	15 L min ⁻¹	15 L min ⁻¹
Auxiliar	1,2 L min ⁻¹	1,2 L min ⁻¹
Nebulizador	1,0 L min ⁻¹	1,0 L min ⁻¹
Auxiliar (Make-up)	—	0,2 L min ⁻¹
Caudal de introducción de muestra	370 $\mu\text{L min}^{-1}$	13 $\mu\text{L min}^{-1}$

Tabla 3.1 (continuación)

Cámara	Ciclónica	Asperon
Parámetros de adquisición de datos		
Tiempo de lectura	100 μ s	100 μ s
Lecturas por réplica	300000, 600000	600000
Tiempo total de adquisición	30 s, 60 s	60 s
Isótopos monitorizados	^{28}Si , ^{29}Si	^{29}Si , ^{27}Al

La determinación de los contenidos totales de aluminio en las muestras se realizó con el mismo equipo ICP-MS en modo convencional. En este caso, se empleó la cámara ciclónica con un nebulizador concéntrico de vidrio como sistema de introducción de muestra, con las mismas condiciones instrumentales especificadas en la Tabla 3.1. La adquisición de datos se realizó para tiempos de lectura de 50 ms, con 20 barridos por réplica, y un total de 10 réplicas por medida. El isótopo monitorizado fue ^{27}Al , empleando ^{45}Sc como estándar interno.

La obtención de las imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó con un microscopio FEI Tecnai F30 (FEI Technologies Inc., EE. UU.), con voltajes de trabajo de 200 y 300 KV. El microscopio está equipado con un detector anular de alto ángulo (*High-Angle Annular Dark-Field*, HAADF) para hacer imágenes de contraste Z, con un espectrómetro EDS para hacer microanálisis de rayos X y con un filtro de energía (Gatan Tridiem, EE. UU.) para hacer espectroscopía de pérdida de energía de electrón (*Electron Energy Loss Spectroscopy*, EELS) e imagen filtrada en energía (*Energy-Filtered Transmission Electron Microscopy*, EFTEM). El análisis elemental en las muestras se llevó a cabo mediante un sistema EDS y la determinación de espesores de partícula se calculó por EELS. El software de trabajo de EELS (DigitalMicrograph, Gatan Inc., EE. UU.) tiene un sub-menú que permite calcular el espesor absoluto y el relativo de una muestra a partir del espectro EELS de baja-pérdida (*low-loss spectrum*); para ello utiliza tres métodos: log-ratio (absoluto), log-ratio (relativo) y la regla de la suma de Kramers-Kronig [238].

Para la observación en TEM de los materiales, unas gotas de una suspensión de los mismos se depositaron sobre las rejillas portamuestras de cobre y se dejaron secar antes de proceder a su recubrimiento con una capa de carbono. Este se realizó con el objetivo

de mejorar su conductividad y se preparó con un equipo de vacío Leica EM SCD500 (Leica Microsystem, Viena, Austria).

Las dimensiones de las partículas obtenidas con las imágenes en TEM se determinaron a partir de la herramienta de procesamiento de imágenes digitales ImageJ versión 1.8.0 (National Institute of Health, EE. UU.).

3.2.2. Estándares, suspensiones de partículas y disoluciones

A lo largo del desarrollo metodológico se utilizaron distintos estándares de tamaño de partículas de SiO₂. Todos los estándares se suministraron en forma de suspensiones. Las correspondientes a los estándares de 150 y 2000 nm de tamaño nominal fueron obtenidas de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), mientras que las de 300, 500 y 1000 nm procedieron de NanoComposix (San Diego, EE. UU.). En este último caso, las concentraciones de partículas en número fueron $3,9 \times 10^{14}$, $6,7 \times 10^{13}$ y $8,6 \times 10^{12}$ partículas L⁻¹, respectivamente (concentración calculada considerando una densidad de partícula de 2,2 g/cm³ de acuerdo con el fabricante). En el caso del aluminio, se dispuso de una suspensión de partículas de Al₂O₃ con diámetros nominales comprendidos entre 30 y 60 nm (Sigma Aldrich).

Los rendimientos de nebulización se determinaron con un patrón de nanopartículas de oro (diámetro promedio certificado de $49,9 \pm 2,2$ nm), comercializado por NanoComposix. Los cálculos se realizaron de acuerdo con el método desarrollado por Pace *et al.* [106], conocido como método de frecuencia de nanopartículas. En él, el rendimiento de nebulización se calcula a través del caudal de introducción de muestra y la Ec. 7, especificada en la Sección 3.2 del Apartado I de la Tesis Doctoral.

Para su análisis en SP-ICP-MS, las suspensiones se diluyeron en agua ultrapura (18 MΩ cm de resistividad), obtenida a partir de un equipo de purificación Milli-Q (Millipore Co., Bedford, MA, EE. UU.). Su preparación se realizó por pesada en balanza analítica (GH-200, A&D, California, EE. UU.). Antes de su análisis, las suspensiones se sonicaron en baño de ultrasonidos (P Selecta, Ultrasons, Barcelona, España) durante 5 minutos.

Las disoluciones correspondientes a las calibraciones para las determinaciones de Si y Al, así como la disolución del estándar interno de Sc, se prepararon a partir de estándares de 1000 mg L⁻¹ para cada elemento (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España). En el

caso de Si, las diluciones se realizaron en agua ultrapura, mientras que para Al y Sc se prepararon en HNO₃ 1% (v/v) (J.T. Baker, Países Bajos).

3.2.3. Muestras

El análisis de partículas de aluminosilicatos se llevó a cabo en una suspensión preparada a partir de una arcilla natural (caolín) en agua ultrapura y en lixiviados procedentes de dos tipos de productos plásticos proporcionados por el Instituto Tecnológico del Embalaje, Transporte y Logística (ITENE, Valencia, España): una botella (material #1) y unos envases de tereftalato de polietileno (PET) (material #2). En el caso del caolín, se trata de un material sólido en polvo suministrado por Laboratorios Enosán S.L (Zaragoza, España). De acuerdo con los análisis granulométricos realizados para esta misma muestra, llevados a cabo mediante sedimentación controlada por absorción de rayos X, el caolín presenta tamaños de partícula comprendidos entre valores inferiores a 1 µm y 100 µm, El análisis mediante SP-ICP-MS se llevó a cabo únicamente para la fracción inferior a 1 µm. Para aislar dicha fracción, el producto original se puso en suspensión en agua ultrapura, a una concentración inicial de 1000 mg L⁻¹ de caolín. La suspensión se decantaba durante 1 hora, tras la cual se retiraban 15 mL de sobrenadante, que finalmente se centrifugaban durante 5 minutos a 1200 rpm. Estas condiciones resultan del cálculo realizado considerando que las partículas caracterizadas eran de caolinita (Al₂Si₂O₅(OH)₄), que es la estructura cristalina principal de la muestra, de acuerdo con su análisis por difracción de rayos X, con una densidad de partícula de 2,6 g cm⁻³. Las fracciones en masa para Al y Si son del 18,0 y 21,7%, respectivamente, determinadas a partir de su fracción molar.

Los materiales #1 y #2 son materiales plásticos compuestos que emplean arcillas para modificar las propiedades físicas del producto final. En ambos casos, las partículas de aluminosilicatos contenidas correspondieron a montmorillonita (Na,Ca)_{0,33}(Al, Mg)₂(Si₄O₁₀)(OH)₂·nH₂O), una de las arcillas más frecuentemente usadas en el sector de los envases debido a su alta área superficial y compatibilidad con sustratos plásticos [193,205]. La densidad de este tipo de arcilla es de 2,8 g cm⁻³, con una fracción en masa de aluminio del 11,7%, determinada a partir de su fracción molar.

3.2.4. Ensayos de migración

En una primera aproximación, se realizaron ensayos de migración con el material #1. Se emplearon dos medios lixiviantes: agua ultrapura y ácido acético 3% (v/v), que son considerados dos simuladores comunes de alimentos [207]. Los ensayos consistieron en la suspensión de un fragmento de material #1 de dimensiones de 2,5 x 5 cm en 50 mL del medio correspondiente, por lo que la superficie de contacto fue de 25 cm² al estar sumergido por ambas caras. Se prepararon suspensiones suficientes para analizar por triplicado cada medio lixiviante y se dejaron en agitación con el uso de un agitador rotatorio de laboratorio. Tras 24 horas, los fragmentos de plástico de botella se retiraron del medio lixiviante, que sería posteriormente analizado.

Para los ensayos de migración con envases de PET (material #2), se siguió el procedimiento descrito por el Reglamento UE n° 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Se empleó únicamente ácido acético 3% (v/v) como medio lixiviante. A diferencia del caso del material #1, en vez de fragmentos se emplearon los envases completos, que se rellenaban con 200 mL de medio lixiviante. Los lixiviados se realizaron por triplicado, en los que los envases se cubrían con vidrios de reloj envueltos en Parafilm al no disponer de tape, con el objetivo de evitar su posible contaminación. Las muestras se dejaron en estufa a 60 °C durante 10 días, tras los cuales los medios se trasvasaron a tubos de 50 mL de polipropileno (PP) para su posterior análisis.

En ambos tipos de ensayos, los medios se analizaron sin realizar ninguna dilución tanto en el análisis mediante SP-ICP-MS como en la observación con TEM. En el caso de las determinaciones de concentraciones de Al por ICP-MS, fue necesario un procedimiento de ataque adicional, descrito en el siguiente apartado.

3.2.5. Determinación de los contenidos totales de Al mediante ICP-MS

Las muestras con aluminosilicatos correspondientes al caolín natural y al material #1 fueron digeridas para determinar los contenidos totales de aluminio por ICP-MS. Para su digestión se siguió el procedimiento descrito por Gaines [239], enfocado al análisis elemental de zeolitas con ICP-OES y que ha sido empleado con éxito para la determinación de Al en aluminosilicatos [240,241].

El procedimiento se basa en el uso de dos reactivos: UA-1 y UNS-1 (Inorganic Ventures, Christiansburg, EE. UU.). El primero consiste en un reactivo ácido compuesto por HCl 20% (v/v) y HF 80% (v/v); mientras que el UNS-1 es un reactivo neutralizante y estabilizante que contiene trietilentetramina (10-25% (v/v)). Este procedimiento hace innecesario el uso de ácido bórico para la eliminación del HF adicionado en exceso al trabajar a un pH en el que los fluoruros se encuentra mayoritariamente desprotonados. El procedimiento consta de los siguientes pasos, adaptados a las condiciones de las muestras tratadas en este capítulo:

1. Se pesa una determinada cantidad de muestra en una botella de polietileno de baja densidad (LDPE) de 250 mL. En función de la muestra, la cantidad tomada fue:

—Para la muestra de caolín, 50 mg del polvo original.

—Para la fracción de tamaños de partícula inferiores a 1 μm en el caolín, 1 mL de suspensión (sobrenadante tras centrifugación).

—Para los ensayos de migración, ya sean del material #1 o del #2, 5 mL de medio lixivante.

2. En el caso de muestras sólidas, se añaden 10 gotas de agua ultrapura sobre la muestra y se remueven con suavidad, para que esta quede hidratada y no se aglomere.

3. Se añaden 5 mL de reactivo UA-1 y 0,25 mL de HNO₃ 70% (v/v) J.T. Baker. Se cierra la botella y se agita durante 2 minutos.

4. Se añaden 25 mL de UNS-1. Se ajusta el peso final a 100 g con agua ultrapura. La disolución final se mezcla invirtiéndola al menos 50 veces.

Al final del procedimiento se realizó una dilución final 1:100 en agua ultrapura para evitar un posible efecto corrosivo del HF en la cámara empleada para los análisis mediante ICP-MS. Incluso con esta dilución, se observó un efecto matriz en la determinación, por lo que los análisis se llevaron a cabo mediante adición estándar. Para ello, se realizaron adiciones a partir de una disolución estándar de 1000 mg L⁻¹ de Al (Panreac) en las suspensiones de análisis ya digeridas.

Este procedimiento de puesta en disolución fue validado mediante la determinación del contenido en Al total por ICP-MS en el caolín, comparándolo con el obtenido mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X (*X-Ray Fluorescence*, XRF). El

contenido de aluminio en la muestra fue del $18,0 \pm 2,4\%$ en masa, comparable al obtenido mediante XRF, que fue de 17,1% de Al, y analizado con un test-t para un nivel de confianza del 95%. Además, se realizó un ensayo de recuperación del procedimiento mediante adición de una concentración conocida de un estándar de Al al inicio del proceso, con un resultado del 94%.

En el caso del material #2, los análisis de contenidos totales de Al mediante ICP-MS se llevaron a cabo por el JRC (European Commission's Joint Research Centre) en Ispra, Italia. En lugar del procedimiento descrito anteriormente, las muestras fueron digeridas con HF y a continuación neutralizadas con NaOH y HNO₃ para su posterior análisis mediante ICP-MS.

3.2.6. Tratamiento de datos en SP-ICP-MS

A lo largo del capítulo se ha empleado un criterio de 5 sigma para la detección de picos, con el establecimiento de valores críticos siguiendo la Ec. 12, especificada en la Sección 3.3 del Apartado I de la Tesis Doctoral. La determinación de los límites de detección en tamaño y en número del método se han calculado siguiendo las siguientes ecuaciones [101,242], siendo la expresión del LOD en tamaño equivalente al valor crítico en el caso del tamaño, de acuerdo con lo expuesto por Laborda *et al.* [101]:

$$LOD_{\text{tamaño}} = X_C^{tam} = \left(\frac{15\sigma_B}{\frac{1}{w_p}\pi\rho F_P K_{ICP-MS} K_M t_{dwell}} \right)^{1/3} \quad (3.1)$$

$$LOD_{\text{núm}} = \frac{5\sqrt{Y_{N,B}}+3}{\eta Q_{muestra} t_i} \quad (3.2)$$

donde σ_B es la desviación estándar de la línea base, w_p la anchura de un evento de partícula en términos de tiempo, ρ la densidad, F_P es la fracción en masa del elemento en la partícula a analizar, el factor K_{ICP-MS} hace referencia al ratio entre el número de iones detectados frente al número de átomos del analito introducidos en el sistema, K_M es el factor correspondiente al isótopo de análisis, t_{dwell} es el tiempo de lectura, $Y_{N,B}$ es el número de eventos detectados en el blanco, η es la eficiencia de transporte del analito, $Q_{muestra}$ hace referencia al caudal de introducción de muestra y t_i al tiempo de análisis.

Los datos procedentes de los análisis mediante SP-ICP-MS se procesaron con el software de Syngistix Nano Application versión 2.5 (Perkin Elmer) y con el programa de análisis OriginPro 2019b (OriginLab Corporation, Northampton, EE. UU.).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Estudio de las principales variables en el desarrollo de un método basado en SP-ICP-MS para el análisis de partículas de óxido de silicio y óxido de aluminio

En los trabajos publicados hasta la fecha, el análisis de partículas de óxido de silicio y óxido de aluminio mediante SP-ICP-MS se limita a instrumentos con analizador de cuadrupolo, en los que se suelen emplear tiempos de lectura de milisegundos, siendo 3 ms la opción más frecuente [51,234,237,243,244]. El análisis de partículas de Al_2O_3 presenta el inconveniente de que no existen materiales de referencia o estándares de partículas comerciales, a diferencia del SiO_2 , para el que se pueden encontrar tanto materiales de referencia procedentes del JRC (European Commission's Joint Research Centre), como estándares con un amplio rango de tamaños nominales, que comprenden desde 20 nm hasta 2 μm .

Tal y como se ha comentado en la introducción, la determinación de silicio mediante ICP-MS con analizadores de cuadrupolo presenta el inconveniente de las interferencias poliatómicas en los isótopos más abundantes, con contribuciones en la señal debidas a iones poliatómicos que contienen nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y/o carbono (Tabla 3.2), especialmente relevantes en el caso del isótopo ^{28}Si . Para solventar este tipo de interferencias, se ha descrito el uso de celdas de colisión con helio [164,245] o de reacción con gases como hidrógeno [24,237] o metano [51], aunque estas soluciones conllevan limitaciones por pérdidas de sensibilidad del ion de interés [246].

Tabla 3.2. *Interferencias poliatómicas para isótopos 28 y 29 de silicio en ICP-MS [247].*

Isótopo	Abundancia (%)	Interferencias
^{28}Si	92,21	$^{14}\text{N}_2^+$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$
^{29}Si	4,67	$^{14}\text{N}^{15}\text{N}^+$, $^{14}\text{N}_2^1\text{H}^+$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^+$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^+$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$

En el caso particular de SP-ICP-MS, este tipo de limitaciones, a las que se pueden sumar problemas asociados al ensanchamiento de picos para configuraciones MS/MS [248], hacen que, en el análisis de partículas de óxido de silicio con analizadores de cuadrupolo, la mejora de la relación señal de partícula respecto a la línea base sea mayor con el uso de tiempos de lectura de microsegundos que a través de la eliminación de interferencias con celdas, tal y como describió Montaña *et al.* [249]. En este contexto se optó por trabajar en ausencia de gases, utilizando tiempos de lectura en el rango de los microsegundos.

Las condiciones de análisis del presente capítulo se han mostrado en la Tabla 3.1, en la Sección 3.2.1. El tiempo de lectura se fijó en 100 μ s, un valor que garantizó una adecuada definición de los picos, así como su correcta detección de forma individual respecto a la señal de fondo. Se descartó el uso de tiempos de lectura menores porque, en el rango de los microsegundos, su disminución supone un empeoramiento de los límites de detección en tamaño [101]. Por otra parte, el uso de 200 μ s implica una reducción del número de puntos que definen los picos por partícula detectada, que en el caso del SiO₂ quedaría reducido a 3-4 puntos al presentar unas anchuras promedio de 500-800 μ s, además de no observarse mejoras significativas en los límites de detección en tamaño.

Además de las limitaciones mencionadas, el análisis mediante SP-ICP-MS puede representar un desafío en relación con la nebulización de partículas de gran tamaño, lo cual es de gran relevancia en el análisis de nanomateriales basados en aluminosilicatos. En el caso de las partículas de SiO₂, Montaña *et al.* [249] y Bolea-Fernández *et al.* [234] observaron limitaciones en la capacidad de transporte para tamaños superiores a 500 nm con sistemas de introducción de muestra basados en el uso de nebulizadores Miramist con una cámara ciclónica y con una cámara tipo Scott, respectivamente. Por este motivo, se estudió como alternativa el uso de la cámara Asperon, cuyo sistema de introducción está enfocado al análisis de células, entre otras aplicaciones, ya que mejora el transporte de estas especies en el orden de las micras manteniendo su integridad. En comparación con las cámaras convencionales, se caracteriza por emplear un caudal auxiliar (*make-up*) que crea un flujo tangencial a las paredes de la cámara, por lo que se evitan pérdidas de partículas en ellas. Además, el caudal auxiliar permite controlar el tiempo de residencia de las partículas en el plasma, mejorando los procesos de volatilización, atomización e ionización. Este tipo de cámara se ha descrito para la detección de microplásticos por

parte de Laborda *et al.* [228], nebulizando con éxito partículas de hasta 5-6 μm de diámetro.

Para el desarrollo del método basado en SP-ICP-MS, se estudiaron las prestaciones de dos cámaras: ciclónica y Asperon, descritas en la Sección 3.2.1. Ambas fueron comparadas en términos de caracterización de tamaños y rendimientos de nebulización, en su aplicación para el análisis de estándares de SiO_2 de tamaños de partícula nominal desde 150 hasta 2000 nm.

3.3.1.1. Comparación de las prestaciones de las cámaras de nebulización en el análisis de partículas de óxido de silicio mediante SP-ICP-MS

En la Tabla 3.3 se muestra el resumen de las prestaciones analíticas obtenidas con las dos cámaras utilizadas en cuanto a límites de detección en tamaño y en número. En el caso de la cámara ciclónica y el análisis del isótopo ^{28}Si , se obtuvo una señal de fondo promedio de 75 cuentas de intensidad en agua ultrapura, para la que se determinó un valor crítico de 130 cuentas (utilizando un criterio de 5σ), lo que en términos de tamaño de partícula de SiO_2 equivale a 270 nm. Utilizando el isótopo ^{29}Si , con una abundancia casi 20 veces menor respecto al isótopo ^{28}Si e interferencias poliatómicas de menor relevancia, se redujo la intensidad promedio de la línea base a 20 cuentas, con un valor crítico aplicado de 50 cuentas. Sin embargo, en lo que a límites de detección se refiere, apenas hubo variación, con valores muy próximos tanto en tamaño como en número para ambos isótopos. La cámara Asperon, cuyas condiciones se reflejan en la Tabla 3.1, requiere de caudales de introducción de muestra más bajos que la ciclónica, por lo que las condiciones de sensibilidad cambiaron para el ^{29}Si , tal y como se refleja en la Tabla 3.3. Debido a los elevados niveles de incertidumbre en la línea base, que serán estudiados en profundidad más adelante (Sección 3.3.1.2), el límite de detección en tamaño fue de 425 nm de diámetro, aunque el valor crítico empleado de 100 cuentas permitió la discriminación de falsos positivos, con 5 eventos detectados para el agua ultrapura, lo que permite obtener un LOD en número similar a los obtenidos con la cámara ciclónica. Debido a los problemas de saturación del detector observados con el límite superior en tamaño para el isótopo ^{28}Si , que se discutirán a continuación, las condiciones de medida con la cámara Asperon se limitaron al isótopo ^{29}Si .

Tabla 3.3. *Prestaciones analíticas obtenidas para ambas cámaras en SP-ICP-MS. Intensidades y número de eventos mostrados como el promedio \pm desviación estándar.*

Cámara	Analito	Sensibilidad (cuentas por $\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidad promedio blanco ^a (cuentas)	LOD _{tamaño} SiO ₂ (nm)	N ^o eventos blanco ^b	LOD _{núm} (part. SiO ₂ L ⁻¹)
Ciclónica	²⁸ Si	0,46	75 \pm 11	270	11 \pm 4	1,17 \times 10 ⁶
	²⁹ Si	0,18	21 \pm 6	300	15 \pm 3	1,60 \times 10 ⁶
Asperon	²⁹ Si	0,04	28 \pm 14	425	5 \pm 3	2,61 \times 10 ⁶

^a n = 600000 datos en un barrido (tiempo de lectura de 60 s)

^b n = 3 réplicas

La comparación entre ambas cámaras se completó con el estudio del rendimiento de nebulización para los estándares de SiO₂ en el rango de tamaños comprendidos entre 150 y 2000 nm. Para ello, se utilizó la concentración en número dado por el fabricante y obtenido a partir de la concentración en masa y el tamaño promedio, por lo que los rendimientos calculados se consideran aparentes. En la Tabla 3.4 se muestran los resultados para el análisis con la cámara ciclónica. El estándar de 150 nm se encuentra por debajo del límite de detección en tamaño para ambos isótopos. Por ello, su caracterización en tamaño no fue correcta, con un resultado de 310 nm de diámetro promedio determinado para ²⁸Si, que correspondería a la parte de la distribución por encima del valor crítico empleado de 270 nm. El rendimiento de nebulización es bajo respecto al del estándar de nanopartículas de oro, como consecuencia de detectar únicamente una fracción de la distribución (Figura 3.1).

Con las partículas de 500 nm no se observó el problema de discriminación de picos, con registros de intensidades de entre 1000 y 1400 cuentas en los barridos, por encima del valor crítico, para las que se determinaron unos diámetros promedio en concordancia con los datos del fabricante. El rendimiento de nebulización aparente fue superior al del estándar de 150 nm, con valores en torno al 6%. Dada la incertidumbre asociada a la determinación de los rendimientos de nebulización de los estándares de SiO₂ y teniendo en cuenta que no se tratan de estándares certificados en concentración en número, se consideran valores razonablemente próximos al rendimiento calculado con el estándar de Au NPs.

Tabla 3.4. Resultados de diámetros promedio de partícula y rendimientos de nebulización para diferentes estándares de tamaño de SiO₂ en SP-ICP-MS con cámara ciclónica, en función del isótopo de análisis. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (n=3).

Estándar SiO ₂ ^a	Isótopo de análisis	Intensidad promedio de pico (cuentas)	Diámetro promedio de partícula (nm)	Diámetro más frecuente (nm)	Rendimiento nebulización aparente (%) ^b
150 nm (145 ± 5 nm)	²⁸ Si	395 ± 135	312 ± 3	268 ± 11	2,0 ± 0,4
500 nm (452 ± 20 nm)	²⁸ Si	2482 ± 40	460 ± 1	458 ± 2	6,1 ± 0,4
1000 nm (1030 ± 22 nm)	²⁹ Si	242 ± 9	521 ± 2	464 ± 6	6,3 ± 0,2
	²⁹ Si	1652 ± 16	861 ± 5	916 ± 3	1,5 ± 0,1

^a Diámetros nominales y promedios (entre paréntesis) especificados por el fabricante.

^b Rendimiento para el estándar de Au NPs = 5,5 ± 0,1%.

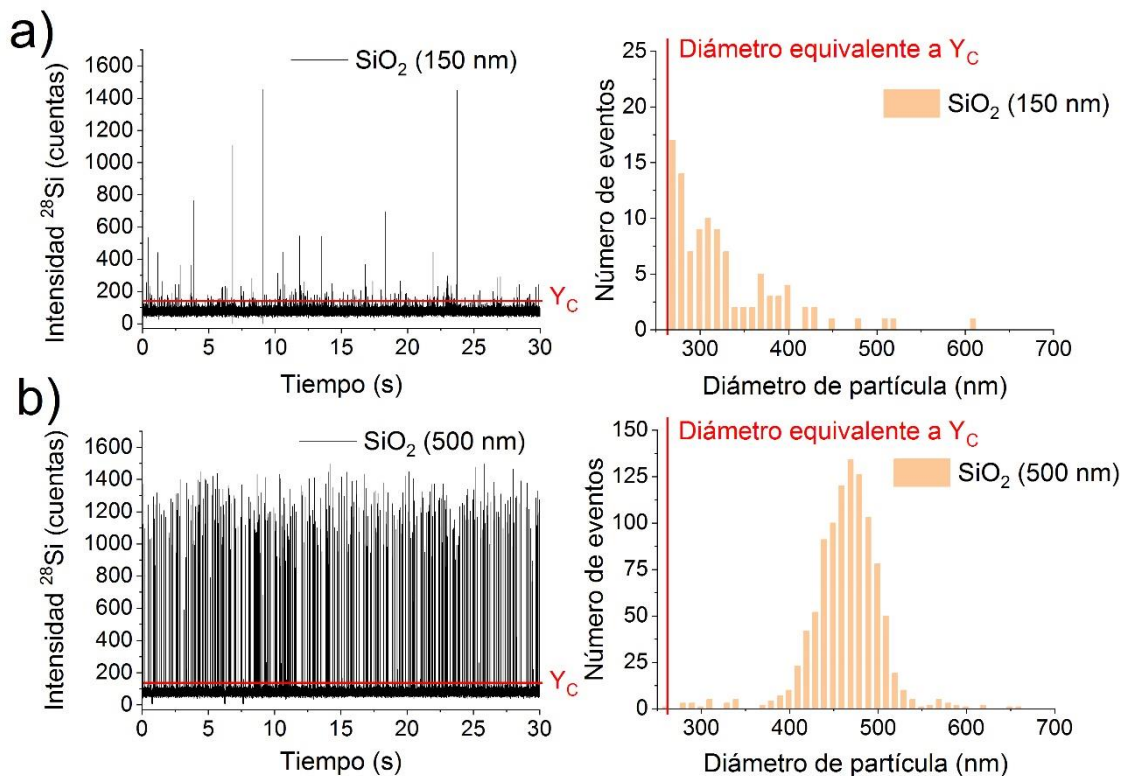


Figura 3.1. Barridos de intensidades y distribuciones de tamaños de partícula obtenidos para los estándares de tamaño de: a) 150 nm y b) 500 nm de SiO₂, analizados en SP-ICP-MS con la cámara ciclónica para el isótopo ²⁸Si. Valor crítico (Y_C) determinado en 130 cuentas, lo que equivale a un diámetro de partícula (X_C^{tam}) de 270 nm.

La medida de estándares de mayor tamaño no fue posible con el isótopo mayoritario ^{28}Si al superar el límite de cuentas medidas por el detector, problema que se abordará posteriormente. En cambio, la reducción de la sensibilidad a través de la medida del isótopo ^{29}Si permitió disminuir las intensidades de picos hasta unos rangos adecuados para el análisis del estándar de 1000 nm, sin por ello modificar significativamente los límites de detección en tamaño y número de partículas del método. En estas condiciones, para las partículas de 500 nm, pese a que la intensidad de pico promedio disminuyó desde valores de 2500 hasta 250 cuentas (Figura 3.2), fueron correctamente discriminadas respecto al valor crítico, establecido en 50 cuentas, por lo que los resultados de caracterización y rendimiento no se vieron afectados respecto al ^{28}Si . En el caso del estándar de 1000 nm, se detectaron picos correspondientes a partículas de 1 μm , aunque el rendimiento de nebulización sufrió un descenso significativo, hasta un valor del 1,5%. Estos resultados corroboraron las limitaciones que presenta la cámara ciclónica en su capacidad de transporte de micropartículas por encima de 500 nm.

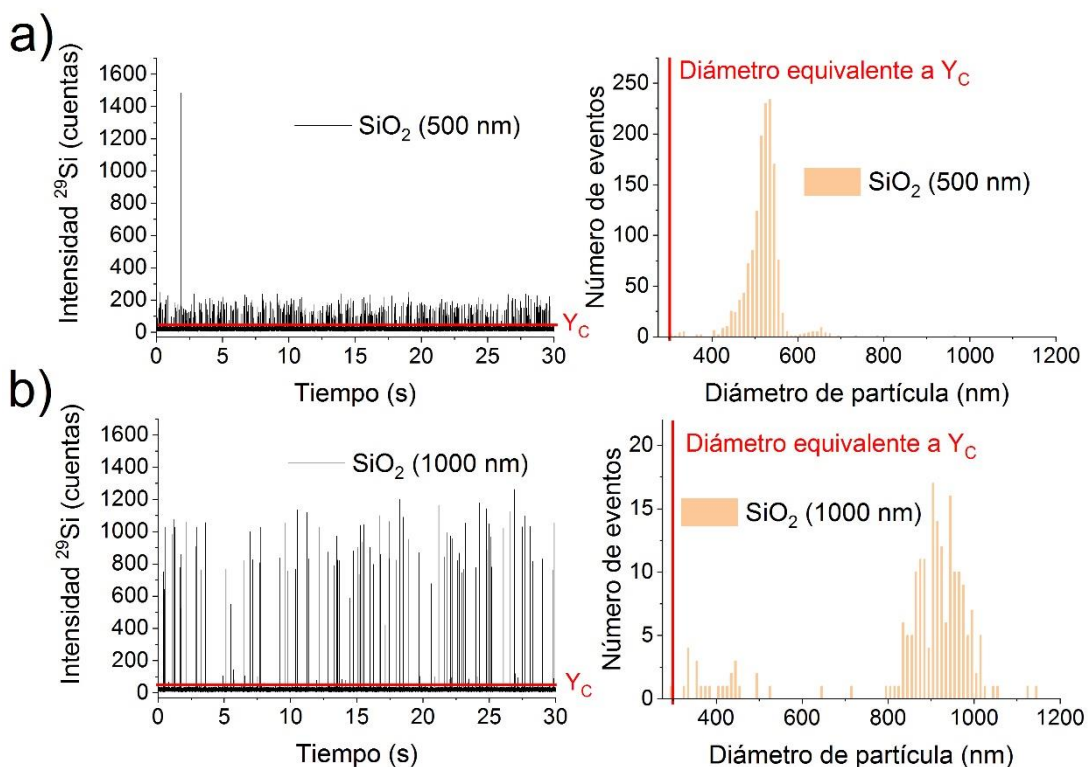


Figura 3.2. Barridos de intensidades y distribuciones de tamaños de partícula para los estándares de tamaño de: a) 500 nm y b) 1000 nm de SiO_2 , analizados en SP-ICP-MS con la cámara ciclónica para el isótopo ^{29}Si . Valor crítico (Y_c) determinado en 50 cuentas, lo que equivale a un diámetro de partícula (X_c^{tam}) de 300 nm.

Para el uso de la cámara Asperon se partió de las condiciones empleadas por Laborda *et al.* [228] con el mismo tipo de cámara para el análisis de micropartículas de poliestireno. En su trabajo, comprobaron que las condiciones en las que se obtuvieron los mejores resultados en número de partículas nebulizadas e intensidades de pico consistieron en caudales de flujo totales (suma de caudal de gas de nebulización y auxiliar) de 1,1-1,2 L min⁻¹. Siguiendo estas condiciones, se estudiaron diferentes caudales de nebulización para el análisis de partículas de SiO₂. Se comprobó que, con un caudal principal de 1 L min⁻¹ y 0.2 L min⁻¹ de auxiliar (*make-up*) se obtuvo el mayor número de eventos. El resto de condiciones con las que se analizaron los diferentes estándares de partículas de SiO₂ se especifican en la Tabla 3.1. No se ha incluido el estándar de 150 nm en el estudio debido al límite de detección en tamaño para el método, de 425 nm (Tabla 3.3). Los resultados de la caracterización de tamaños y rendimientos de nebulización para esta cámara se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. *Determinación de diámetros de partícula promedio para estándares de tamaño de 300, 500, 1000 y 2000 nm de SiO₂ en SP-ICP-MS con la cámara Asperon. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (n=3) para el isótopo ²⁹Si.*

Estándar SiO ₂ ^a	Intensidad promedio de pico (cuentas)	Diámetro promedio (nm)	Diámetro más frecuente (nm)	Nº eventos	Rendimiento de nebulización aparente (%) ^b
300 nm (285 ± 18 nm)	315 ± 79	437 ± 49	449 ± 45	143 ± 99	1,7 ± 1,2
500 nm (518 ± 20 nm)	332 ± 11	508 ± 24	479 ± 30	1286 ± 155	15,7 ± 2,2
1000 nm (1030 ± 22 nm)	1460 ± 25	852 ± 5	839 ± 22	2892 ± 128	33,4 ± 1,5
2000 nm (2040 ± 30 nm)	3058 ± 291	1078 ± 39	1149 ± 48	135 ± 80	1,8 ± 1,0

^a Diámetros nominales y promedios (entre paréntesis) especificados por el fabricante.

^b Rendimiento para el estándar de Au NPs = 41,8 ± 0,4%.

El rendimiento de nebulización obtenido con la cámara Asperon para el estándar de nanopartículas de Au fue de un 41,8%, superior al obtenido con la cámara ciclónica (5,5%), de acuerdo con lo esperado. En términos de caracterización, la determinación de tamaños para el estándar de SiO₂ de 300 nm con la cámara Asperon fue superior al valor

nominal, debido a su proximidad al valor crítico. Al establecer un criterio de 5σ , solo unos pocos picos fueron discriminados respecto a la línea base, como se puede observar en el barrido de intensidades (Figura 3.3a). Los picos detectados correspondieron a tamaños de entre 425 y 500 nm principalmente, los cuales representan la cola de la distribución real en el estándar, una fracción muy baja en número de eventos, que apenas supone un rendimiento aparente de nebulización del 1,6%. Ni la caracterización ni la cuantificación en número, por lo tanto, resultaron válidas para este estándar.

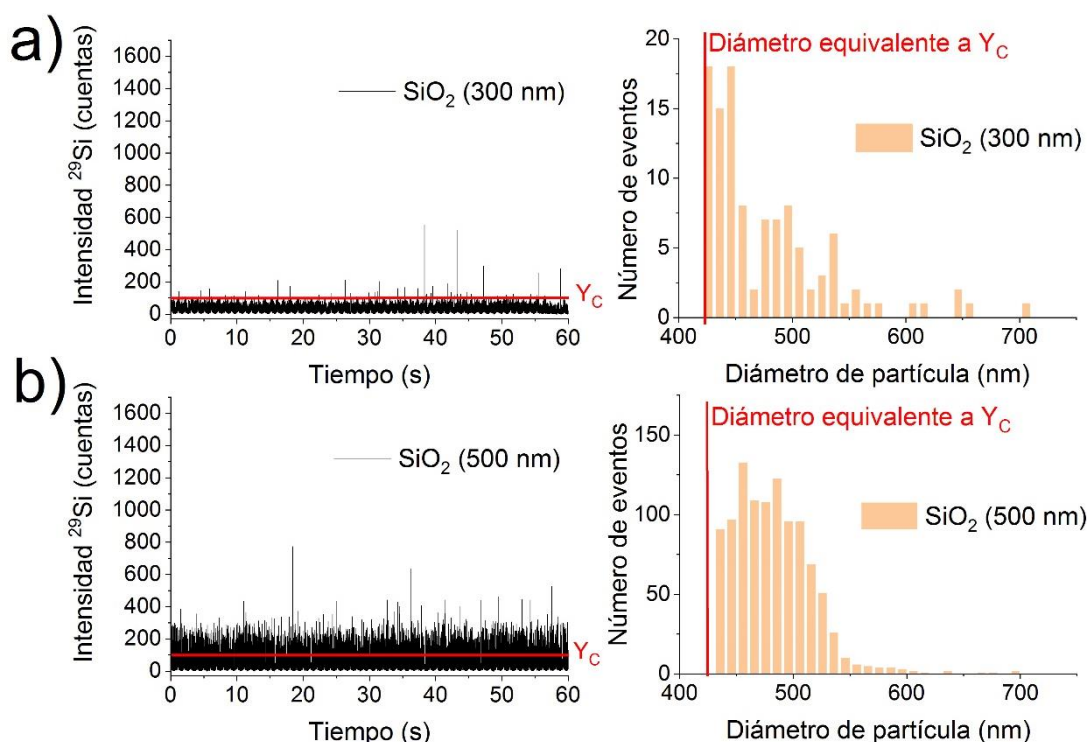


Figura 3.3. Barridos de intensidades y distribuciones de tamaños de partícula para los estándares de tamaño de: a) 300 nm y b) 500 nm de SiO_2 , analizados en SP-ICP-MS con la cámara Asperon para el isótopo ^{29}Si . Valor crítico (Y_c) determinado en 100 cuentas, lo que equivale a un diámetro de partícula (X_c^{tam}) de 425 nm.

Los resultados de tamaños promedio para los estándares de 500 y 1000 nm son similares a los determinados en el análisis con la cámara ciclónica (Tabla 3.4). En el caso del estándar de 500 nm, la parte inferior de la distribución quedó delimitada por el valor crítico, por lo que no se obtuvo completa (Figura 3.3b). Al contrario que en el caso del estándar de 300 nm, sí que se detecta la mayor parte de la distribución, con un máximo de frecuencia para tamaños de aproximadamente 500 nm, lo cual estaría en concordancia con los datos especificados por el fabricante. Pese a que el número de eventos detectados

se incrementó respecto al anterior estándar, la fracción correspondiente a las partículas de menor tamaño no pudo ser detectada, lo que justifica el rendimiento de nebulización del 15,7%, inferior respecto al obtenido para las Au NPs del 41,8%.

En el barrido de intensidades del estándar de 1000 nm se registraron intensidades de entre 800 y 1200 cuentas, por encima del valor crítico (Figura 3.4a), por lo que se pudo obtener la distribución completa de partículas. El número de eventos obtenido fue de 3000, con un rendimiento aparente del 33,4%. De nuevo, al calcularse a partir de una concentración en número estimada, puede haber diferencias significativas respecto a la calculada con el estándar de nanopartículas de oro.

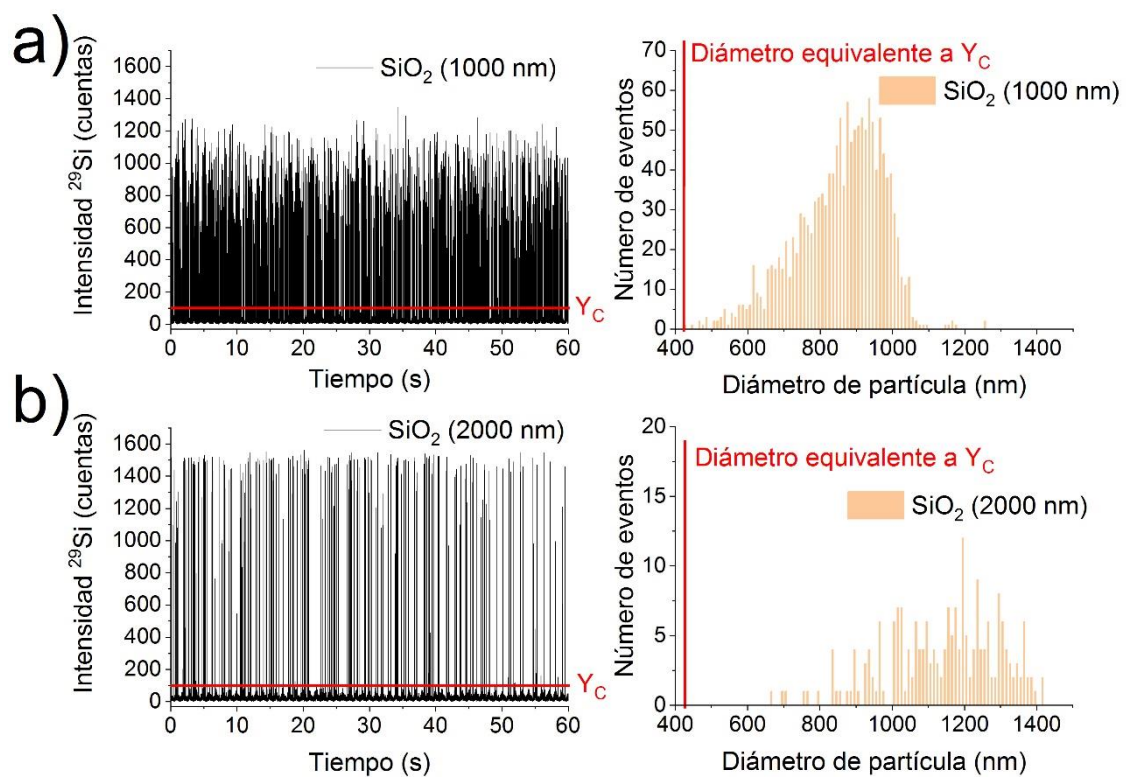


Figura 3.4. Barridos de intensidades y distribuciones de tamaños de partícula para los estándares de tamaño de: a) 1000 nm y b) 2000 nm de SiO₂, analizados en SP-ICP-MS con la cámara Asperon para el isótopo ²⁹Si. Valor crítico (Y_C) determinado en 100 cuentas, lo que equivale a un diámetro de partícula (X_{C^{tam}}) de 425 nm.

Para el estándar de 2000 nm, se observó un aumento en la intensidad promedio de pico, en el que se alcanzaron valores de 3000 cuentas, el doble respecto al estándar de 1000 nm. Sin embargo, esta diferencia apenas supone un aumento del tamaño promedio determinado (1080 nm), muy por debajo del valor nominal. Además, en la distribución

de tamaños (Figura 3.4b), se observó que la frecuencia de picos había disminuido significativamente, con 135 eventos detectados, lo cual supuso un descenso en el rendimiento de nebulización hasta valores por debajo del 2%. En este caso, se encontraron limitaciones evidentes que afectaban tanto a la caracterización en tamaño como a la cuantificación en número de partículas.

El uso de la cámara Asperon confirmó la mejora de la nebulización de partículas de SiO₂ de tamaño superior a 500 nm, con un rendimiento del 33,4% en el caso de partículas de 1 μm, frente al 1,5% obtenido con la ciclónica. Sin embargo, la cámara presenta una serie de limitaciones que impiden la cuantificación completa de partículas por debajo de 500 nm, debido al aumento del límite de detección en tamaño hasta valores de 425 nm, y la correcta caracterización y nebulización de partículas de 2 μm. En las próximas secciones se analizan en mayor profundidad estas limitaciones encontradas.

3.3.1.2. Limitaciones en el análisis de partículas de SiO₂: límite inferior

Los límites de detección en tamaño están determinados fundamentalmente por los niveles de intensidad de la línea base. En términos generales, unos niveles altos pueden condicionar la capacidad de detección de las señales correspondientes a las nanopartículas. Por ello, en primer lugar, se estudió la filtración del medio para comprobar su efecto en los niveles de señal de fondo (Anexo 3.1), aunque no se observaron mejoras significativas ni en términos de límites de detección en número ni en tamaño.

A las ya mencionadas contribuciones debidas a las interferencias poliatómicas isobáricas, se sumó la debida al ruido generado por la frecuencia de giro de la bomba peristáltica del sistema de introducción de muestra. El uso de caudales bajos con el nebulizador y la cámara Asperon (13 μL min⁻¹) hizo patente la aparición de pulsos en los barridos de intensidades debidos a la bomba, lo que se tradujo en una serie de oscilaciones superpuestas en la línea base, como puede apreciarse en la Figura 3.5.

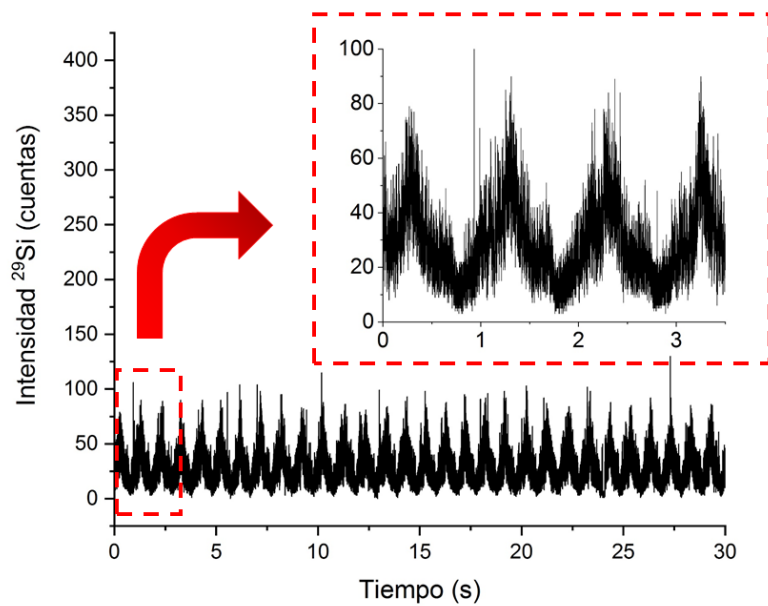


Figura 3.5. Pulsos observados en el barrido de intensidades con ^{29}Si para un blanco de agua ultrapura. Análisis en SP-ICP-MS con cámara Asperon.

Se advirtió que las oscilaciones se repetían con una frecuencia de 1 s. Durante los análisis, la bomba peristáltica funciona a 5 rpm, lo que equivale a 1/12 de vuelta por segundo. La bomba consta de 12 estructuras cilíndricas o rodillos que producen el flujo de entrada de muestra en el sistema a través de la compresión del tubo por el que circula. Al coincidir la frecuencia del pulso con el bombeo provocado por cada rodillo, se dedujo que las oscilaciones eran debidas a la propia bomba.

Para estudiar la contribución de la bomba peristáltica en la señal de fondo, se compararon los blancos de agua ultrapura con los obtenidos a través de una bomba de doble pistón, procedente de un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), en la que no se detectaron oscilaciones significativas (Figura 3.6). La ausencia de las oscilaciones se tradujo en una reducción del número de eventos superiores a 40 cuentas de intensidad, situados en la cola de la distribución mostrados en los histogramas.

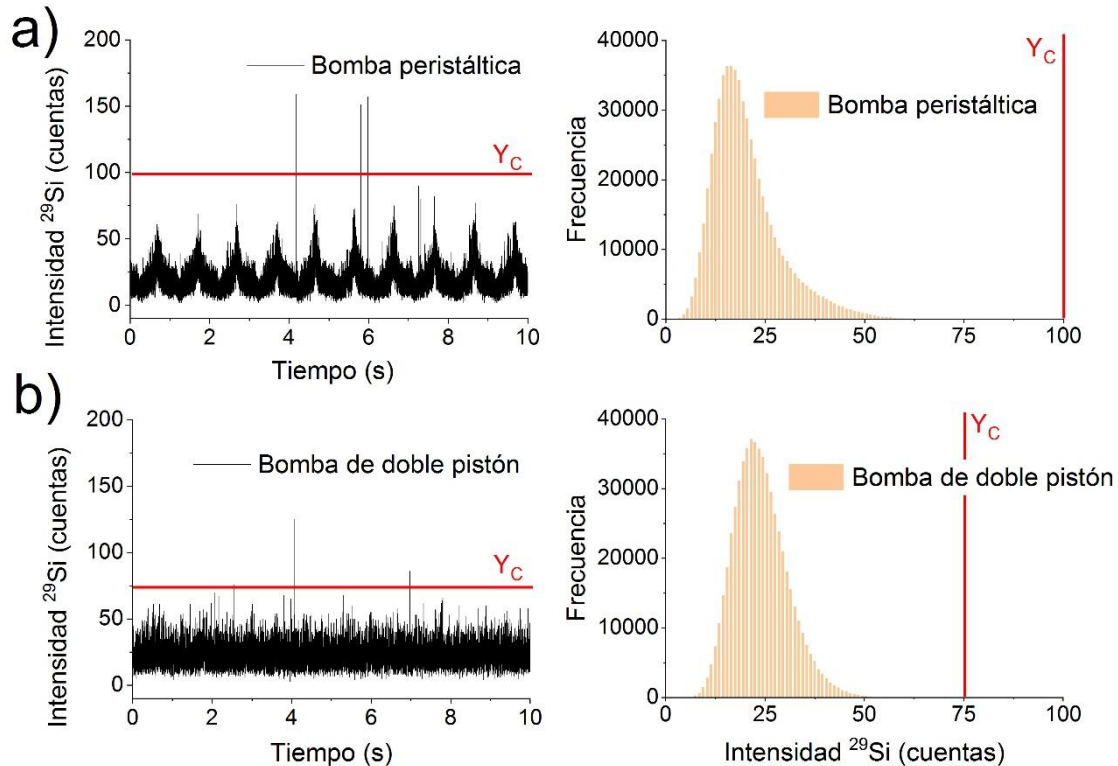


Figura 3.6. Barridos de intensidad e histogramas correspondientes a blancos de agua ultrapura con dos tipos de bombas como sistema de introducción de muestra: a) bomba peristáltica ($Y_C = 100$ cuentas) y b) bomba de doble pistón ($Y_C = 75$ cuentas).

En términos de intensidades, para ambos tipos de bombas las señales promedio se sitúan en valores de aproximadamente 20 cuentas. Sin embargo, la eliminación de los pulsos con la bomba de doble pistón tuvo incidencia en los valores de desviación estándar (σ) de la línea base (Tabla 3.6). Al disminuir la desviación estándar, la distribución de intensidades se estrecha y el valor crítico aplicado con un criterio de 5σ es menor, mejorando los límites de detección en tamaño en 54 nm respecto a la bomba peristáltica (de 402 a 348 nm). El límite de detección en número de partículas varió ligeramente entre las bombas, con un número de eventos mayor en el caso de la bomba de doble pistón. Esto indica que, pese al aumento de la incertidumbre en la línea base con la bomba peristáltica, la discriminación de picos sigue siendo correcta, puesto que el uso del criterio de 5σ implica unos valores críticos más restrictivos. Por lo tanto, aunque se consiguen reducir los límites de detección en tamaño con el uso de una bomba de doble pistón, durante el resto del estudio se continuó con la bomba peristáltica por simplicidad del sistema.

Tabla 3.6. Resultados para el análisis de agua ultrapura en función del tipo de bomba empleada para la introducción de muestra en SP-ICP-MS. Intensidades y número de eventos mostrados como el promedio \pm desviación estándar.

Bomba	Intensidad promedio	Y_c	$LOD_{\text{tamaño}}$	N°	$LOD_{\text{núm (part.)}}$
	^{29}Si (cuentas) ^a	(cuentas)	SiO_2 (nm)	eventos ^b	$\text{SiO}_2 \text{ L}^{-1}$
Peristáltica	20 ± 16	100	402	12 ± 6	$3,74 \times 10^6$
De doble pistón	23 ± 10	75	348	24 ± 7	$5,06 \times 10^6$

^a n = 600000 datos en un barrido (tiempo de lectura de 60 s)

^b n = 3 réplicas

También se valoró el uso de otro tipo de bombas, como las de infusión, aunque no fue posible emplear las condiciones de caudal de nebulización originales (1 mL min^{-1} y $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ de caudal auxiliar) al observarse inversiones en la dirección de caudales, por problemas de sobrepresión.

Alternativamente, se estudió la posibilidad de realizar un tratamiento de la línea base con el objetivo de reducir el efecto de los pulsos, mediante un suavizado de la señal. Para ello, se empleó Origin (OriginLab Inc.) como software de análisis de datos. El aislamiento y sustracción del componente de ruido debido a las oscilaciones se realizó de forma satisfactoria (ver Anexo 3.2), lo que supuso una mejora de los límites de detección en tamaño. Sin embargo, la posterior detección e integración de los picos por encima del valor crítico no resultó coherente, con resultados de rendimientos de nebulización para los estándares de SiO_2 por encima de lo esperado. Por todo ello, y considerando que los tiempos necesarios para el procesamiento del conjunto de datos para cada análisis era muy elevado, se optó por seguir trabajando con los datos tratados por el software Syngistix del equipo. Aunque el tratamiento de los datos con Origin u otro software desarrollado por otros autores [103] constituye una alternativa razonable a la que ofrecen los equipos comerciales, es necesaria cierta experiencias con el software y estar familiarizado con los conceptos matemáticos necesarios para establecer los valores críticos y la detección de picos.

3.3.1.3. Limitaciones en el análisis de partículas de SiO_2 : límite superior

El análisis de partículas de gran tamaño requiere, por un lado, asegurar que estas sean nebulizadas y transportadas hasta el plasma con unos rendimientos apreciables y que puedan conocerse y, por otro, que su ionización sea completa en el plasma, lo que

permitirá obtener una señal proporcional a su tamaño [228]. Una ionización incompleta de las partículas se traduce en una pérdida de linealidad entre la intensidad de los eventos y el número de iones que llegan al detector (descrito a través del parámetro K_{ICP-MS} en las Ecs. 8, 9 y 11 del Apartado I de la Tesis, Sección 3.2). En el caso de representar la relación entre los logaritmos de las intensidades de pico promedio y de los tamaños de partícula promedio, se debería de obtener una relación lineal cuya pendiente fuese de 3, dado que la relación entre intensidad y tamaño de partícula tiene lugar a través del diámetro al cubo. Para los estándares de SiO_2 de 500 y 1000 nm, cuya representación se realizó para los tamaños especificados por el fabricante (medidos a través de TEM), si se asume una respuesta lineal, la pendiente obtenida fue de $2,83 \pm 0,04$ (Figura 3.7), lo que indica un comportamiento razonable respecto a lo esperado, teniendo en cuenta el limitado número de estándares en la zona de trabajo óptima. Estos resultados coinciden con lo señalado por otros autores, como es el caso de Lee *et al.* [250], en el que se demostró que la linealidad se mantenía para partículas de SiO_2 entre tamaños de 400 nm a 1 μm .

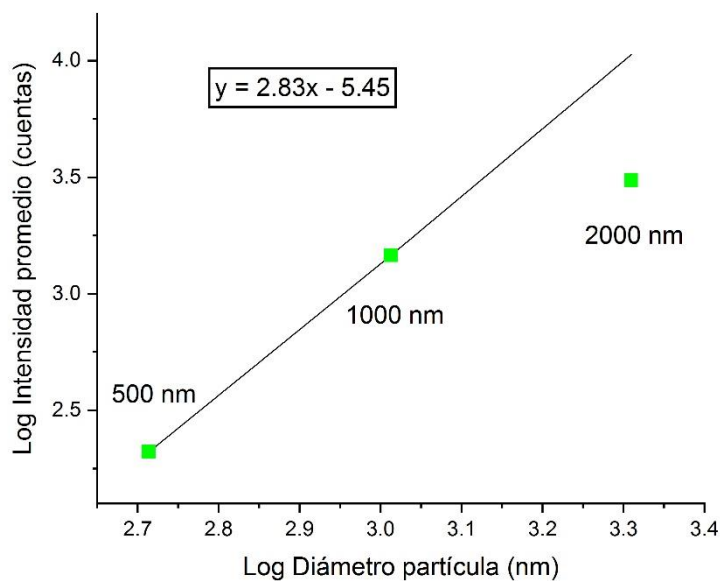


Figura 3.7. Representación de la relación entre logaritmos de la intensidad promedio por pico y el diámetro de partícula, para los estándares de 500, 1000 y 2000 nm.

En el caso del estándar de 2000 nm, sin embargo, la intensidad obtenida se aleja de la relación lineal estimada con el resto de estándares, con valores mucho más bajos de lo previsto. De acuerdo con los resultados de intensidad promedio mostrados en la Tabla 3.5, la eficiencia de detección estimada para partículas de 2 μm , si se asume que esa sea

la única fuente de pérdida de señal, sería del 24%, lo que significa una subestimación significativa del diámetro promedio a través de SP-ICP-MS.

Sin embargo, la pérdida de eficiencia de detección (como los fenómenos de ionización incompleta) para partículas de gran tamaño puede no ser el único factor que contribuya a la pérdida de intensidades de pico. El sistema de detección utilizado en este tipo de instrumentos (detector *Dual-Stage*, Perkin Elmer) consta de dos modos de registro de señales: un modo pulso y un modo analógico; pudiendo operar de forma simultánea en dual. La opción de pulso es aplicable para niveles bajos de señal, mientras que el analógico es empleado para señales de alta intensidad [251]. Con el uso de tiempos de lectura del orden de microsegundos en detección individual, la velocidad de adquisición de datos es muy elevada y el registro en el detector se realiza únicamente en modo de pulsos, puesto que la conversión a analógico requeriría de un tiempo que significaría una pérdida de señal. De esta forma, la parte del pulso por encima de cierto umbral o límite, y que correspondería a su registro en analógico, es omitida [249]. Este sería el caso de señales debidas a partículas de gran tamaño, en las que un exceso de iones alcanza el detector a niveles que sobrecargan su respuesta. En el estudio de Montaña *et al.* [249], empleando un tiempo de lectura de 100 μ s, esta pérdida de intensidades se observó para partículas de SiO₂ de 500 y 1200 nm, analizadas con el isótopo ²⁸Si.

El límite que establece el cambio de modo pulso a analógico es un factor instrumental. A través del estudio de las señales registradas para las partículas de mayor tamaño, como en el caso del estándar de 2 μ m (Figura 3.8a), el máximo de intensidad en los barridos se estableció en 1560 cuentas. En la Figura 3.8b se muestra, a modo de ejemplo, el perfil de un pico (pico #1) correspondiente al estándar de 2 μ m, para el que se observó que estaba cortado en su zona superior, debido a la proximidad de los tres puntos que componen la zona del máximo. De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de la eficiencia de detección, si se mantuviera la linealidad entre intensidades de pico y tamaños para partículas de 2 μ m, se esperarían señales (como sumatorios de intensidad) de 24000 cuentas, mientras que la obtenida para el pico #1 fue de 5600 cuentas, lo que equivale a un tamaño de partícula de 1360 nm, por debajo del valor nominal esperado de 2000 nm. De este modo, se puede establecer como límite superior $1,56 \times 10^7$ cuentas por segundo debido a la saturación del detector (1560 cuentas para un tiempo de lectura de 100 μ s).

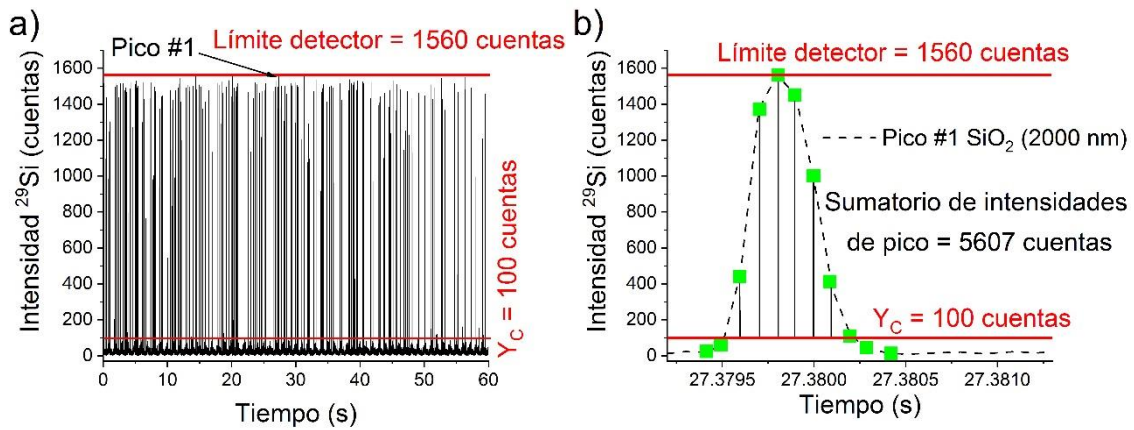


Figura 3.8. a) Barrido de intensidades para el estándar de 2000 nm en el que se estudió el límite del detector, determinado en 1560 cuentas para un tiempo de lectura de 100 μ s. b) Perfil de pico detectado en el máximo de intensidad (línea discontinua). Los cuadrados verdes corresponden a las señales transitorias que conforman un pico, cuya integración comprende la suma de intensidades marcadas por las franjas verticales.

Los picos registrados en los barridos para el estándar de 1000 nm no alcanzaron el límite de 1560 cuentas de intensidad, con valores en general entre 600 y 1300 cuentas (Figura 3.9a). Se comprobó que los picos se detectaban en su totalidad, a través del estudio del perfil de los picos cuya intensidad estaba por encima de la media (como el pico #2 mostrado en la Figura 3.9b), por lo que su caracterización no se vio afectada. Así, la señal del pico #2 (como sumatorio de intensidades) fue de 2743 cuentas, que corresponde a un diámetro de 1050 nm.

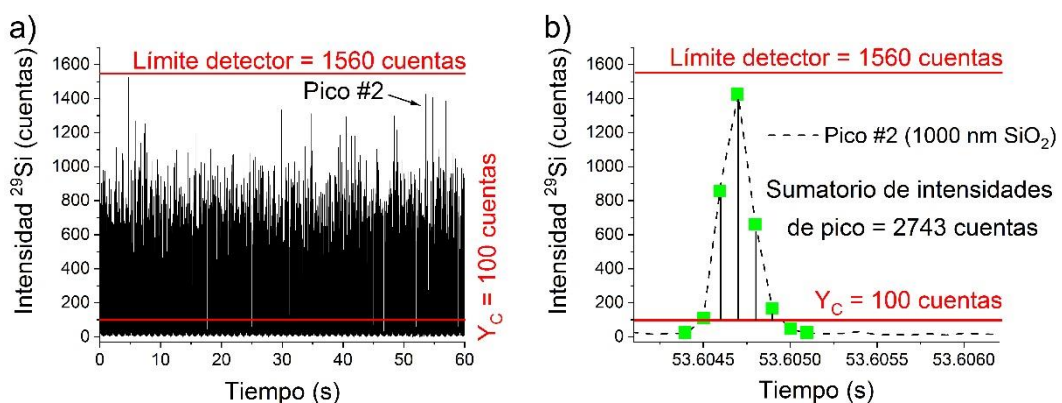


Figura 3.9. a) Barrido de intensidades para el estándar de 1000 nm en el que se estudió el límite del detector, determinado en 1560 cuentas para un tiempo de lectura de 100 μ s. b) Perfil de pico detectado en el barrido de intensidades. Los cuadrados verdes corresponden a las señales transitorias que conforman un pico, cuya integración comprende la suma de intensidades marcadas por las franjas verticales.

Se modelizó un pico para estimar el diámetro de partícula de SiO₂ a partir del cual la detección e integración se verían afectados por el límite de saturación del detector (Figura 3.10). El pico se consideró simétrico, con una altura que alcanzara las 1560 cuentas y una anchura de 800 μ s, que corresponde al valor promedio de los picos detectados en la zona del máximo, para el que se obtuvo un valor de 1200 nm de diámetro equivalente. Este tamaño constituye, por tanto, el límite superior en tamaño estimado para las condiciones utilizadas en el estudio, para el cual la caracterización en tamaño sería *a priori* correcta.

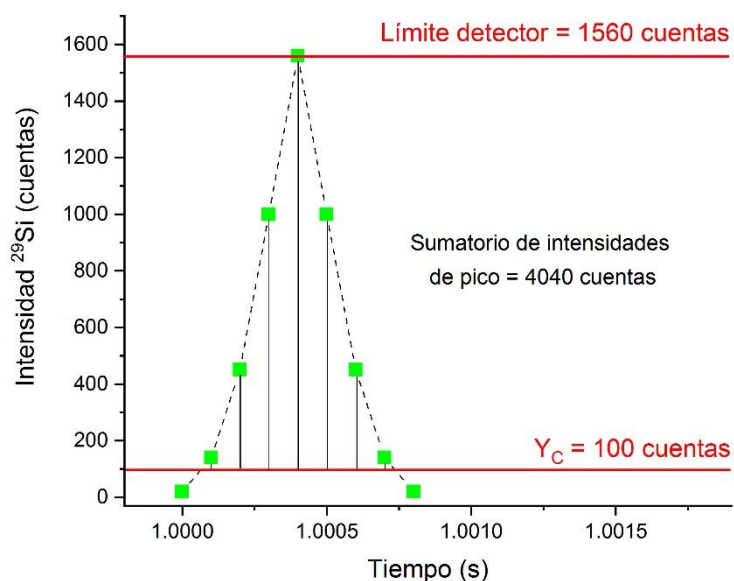


Figura 3.10. Modelo de perfil de pico para la determinación del tamaño a partir del cual la caracterización se vería afectada por el límite del detector (línea discontinua). Los cuadrados verdes corresponden a las señales transitorias que conforman el pico, cuya integración comprende la suma de intensidades marcadas por las franjas verticales.

Otro de los parámetros que pueden verse afectados por el elevado tamaño de las partículas caracterizadas es el rendimiento de nebulización, tal y como reflejan los resultados mostrados en la Tabla 3.5, y provocado por la eliminación selectiva en la cámara de nebulización, que aumenta cuanto mayor es el tamaño de las partículas introducidas. El descenso en el número de eventos observado con el estándar de 2 μ m (130 partículas) está relacionado con problemas en el transporte de las partículas hasta el plasma. Para tamaños de partícula tan grandes, son recurrentes los resultados de bajos rendimientos de nebulización [228]. Durante los análisis del estándar de 2000 nm, se observó además que el número de eventos detectados fue disminuyendo de forma

progresiva respecto a las primeras medidas, lo que implica un fenómeno de sedimentación durante el tiempo de medida. Así, se observó que tras aplicar a la suspensión un sistema de agitación constante durante su introducción en el sistema, el número de eventos volvió a estabilizarse, con valores similares a los iniciales (Tabla 3.8). El uso de un muestreador que incluyera agitación de muestra resolvería estos problemas, aunque no los relacionados con el rendimiento de nebulización. El hecho de que con esta misma cámara y nebulizador se hayan podido introducir partículas de plásticos de hasta 4 μm de diámetro con unos rendimientos de nebulización aceptables [228] sugiere que la densidad de las partículas de óxido de silicio, mucho mayor a la del poliestireno (entre 1,80 y 2,20, frente a 1,04 g cm^{-3} para el poliestireno), tiene un papel fundamental en el transporte de las partículas en el interior de la cámara.

Tabla 3.8. Resultados del análisis del estándar de partículas de 2 μm en función de su evolución temporal (sedimentación en la suspensión) y tras agitación durante su introducción en el sistema.

Estándar 2 μm	Nº eventos	Intensidad promedio ^{29}Si (cuentas)	Tamaño promedio SiO_2 (nm)	Rendimiento de nebulización aparente (%)
Réplica I	211	3368	1122	2,7
Réplica II	23	2667	1027	0,3
Réplica III	7	2092	952	0,1
Con agitación (n=3)	173 \pm 35	3229 \pm 228	1100 \pm 33	2,2 \pm 0,5

3.3.1.4. Análisis de aluminosilicatos a través del isótopo ^{27}Al

Las limitaciones observadas en el caso del silicio, fundamentalmente debidas a los altos niveles de señal de fondo, que afectan a la capacidad para detectar partículas de menor tamaño, hicieron que se estudiaran otras alternativas para la caracterización de nanomateriales basados en aluminosilicatos. Así, se estudió la posibilidad de utilizar el aluminio como analito, ya que para el ^{27}Al , su único isótopo natural, no hay contribuciones significativas en la señal debidas a interferencias poliatómicas. En las mismas condiciones de medida, para los blancos de agua ultrapura se registraron intensidades de línea base inferiores al caso del ^{29}Si . La reducción de los niveles de fondo, sumado a una mayor sensibilidad para este elemento, permitió mejorar las relaciones de señales respecto a la línea base, así como el límite de detección en tamaño, resultando

similar en número (Tabla 3.9) y, por tanto, ampliando el rango de aplicación del método en SP-ICP-MS hacia tamaños menores.

Tabla 3.9. Condiciones de sensibilidad y límites de detección determinados en función del isótopo de medida en SP-ICP-MS. Intensidades y número de eventos mostrados como el promedio \pm desviación estándar.

Analito	Sensibilidad (cuentas por $\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidad promedio blanco ^a (cuentas)	LOD _{tamaño} (nm)	Nº eventos blanco ^b	LOD _{núm} (part. L ⁻¹)
²⁹ Si	0,04	28,21 \pm 14,06	425 (SiO ₂)	5 \pm 3	2,61 \times 10 ⁶ (SiO ₂)
²⁷ Al	26,32	0,10 \pm 0,31	35 (Al ₂ O ₃)	20 \pm 4	4,67 \times 10 ⁶ (Al ₂ O ₃)

^a n = 600000 datos en un barrido (tiempo de lectura de 60 s)

^b n = 3 réplicas

A diferencia de las partículas de óxido de silicio, en el caso del aluminio no existen materiales de referencia o estándares de partículas comerciales bien caracterizados. Únicamente se dispuso de una suspensión de partículas de Al₂O₃, con diámetros nominales comprendidos entre 30 y 60 nm, comercializada por Sigma-Aldrich. Esta suspensión se utilizó para tener una estimación de los tamaños obtenidos por SP-ICP-MS con ²⁷Al, con la limitación de tener valores muy próximos al LOD en tamaño. Con las condiciones especificadas en la Sección 3.2.1, se detectaron partículas cuya distribución de tamaños se muestra en la Figura 3.11.

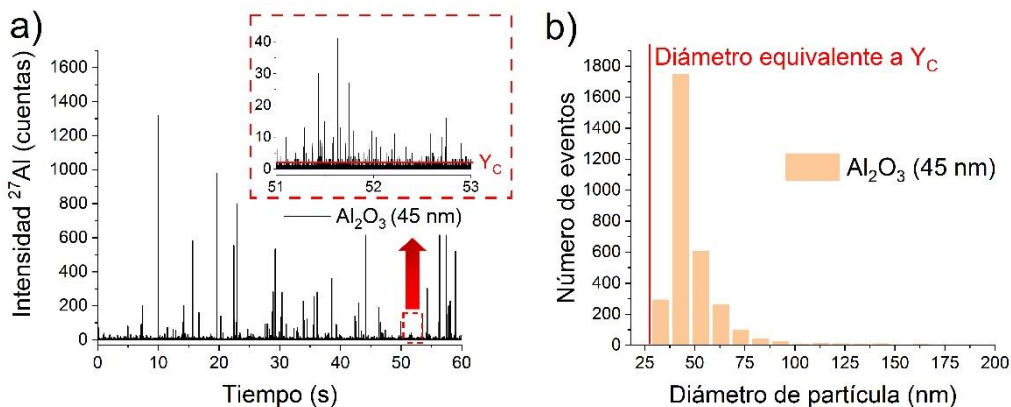


Figura 3.11. a) Barrido de ²⁷Al y b) distribución de tamaños de partícula correspondientes al estándar de Al₂O₃ de 45 nm de tamaño nominal. Valor crítico (Y_C) determinado en 2 cuentas, lo que equivale a un X_C^{tam} de 35 nm con un criterio de 5 σ .

Los resultados (Tabla 3.10) se ajustaron a lo especificado por el fabricante, con una distribución que comprende desde el valor crítico (35 nm) hasta 70 nm. El rendimiento de nebulización se estimó a partir de la concentración y diámetro promedio de la suspensión comercial, resultando en un $34,9 \pm 0,4\%$, próximo al calculado con el estándar de nanopartículas de Au ($41,8 \pm 0,4\%$). Teniendo en cuenta que la distribución obtenida es incompleta al estar tan próxima al valor crítico y tratarse de una suspensión y no de un estándar, se considera un resultado aceptable.

Tabla 3.10. *Determinación de diámetros de partícula promedio para la suspensión de Al_2O_3 en SP-ICP-MS con la cámara Asperon. Entre paréntesis se muestran los tamaños más frecuentes. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$) para el isótopo ^{27}Al .*

Estándar Al_2O_3 *	Intensidad promedio de pico (cuentas)	Diámetro promedio (nm)	Nº eventos	Rendimiento de nebulización aparente (%)
45 nm (30 - 60 nm)	21 ± 2	50 ± 1 (43 ± 2)	3128 ± 36	$34,9 \pm 0,4$

* Diámetros promedio y distribución (entre paréntesis) especificados por el fabricante, determinados a través de TEM.

3.3.2. Aplicación del método a la caracterización de un caolín natural

Antes de llevar a cabo la caracterización del material migrado desde los productos plásticos, se estudiaron las prestaciones del método utilizando el isótopo ^{27}Al aplicado a un aluminosilicato natural como el caolín. En vista de los problemas observados en la nebulización de los estándares de óxido de silicio por encima de 1000 nm, se preparó una suspensión del material aislando la fracción inferior a 1 μm mediante centrifugación, de acuerdo con el procedimiento descrito en la Sección 3.2.3. El análisis de este material permite estudiar la distribución de tamaños en una región de diámetros de partícula superiores a la de la suspensión comercial descrita anteriormente. El análisis se llevó a cabo también utilizando el isótopo ^{29}Si (Figura 3.12a), lo que permitió establecer una comparación entre los rangos de tamaños que pueden determinarse con ambos isótopos. A pesar de su estructura laminar, en la caracterización de tamaños se optó, como aproximación, por representar el diámetro de partícula equivalente, considerando las partículas de caolinita como esferas.

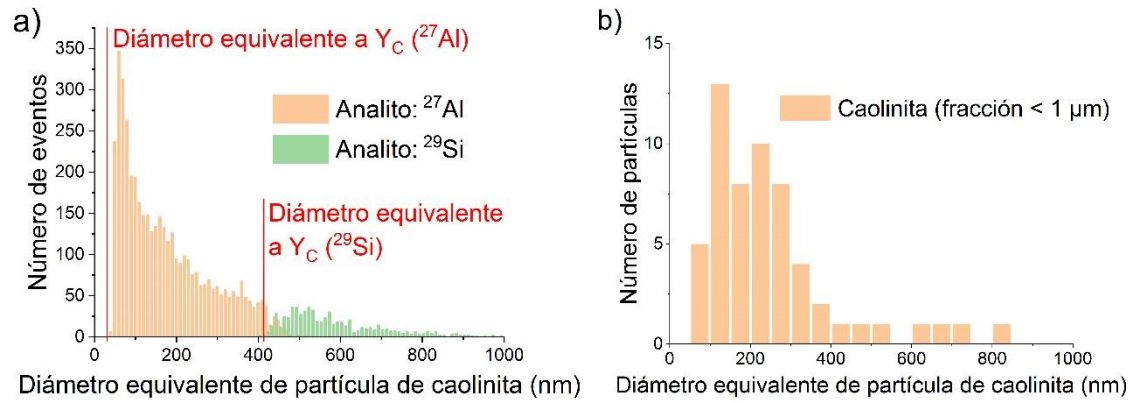


Figura 3.12. Distribuciones de tamaños de partícula correspondientes a la fracción inferior a $1 \mu\text{m}$ de caolín obtenidas mediante: a) SP-ICP-MS en función del isótopo medido y b) TEM. Tamaños expresados como diámetros equivalentes de caolinita, considerando las partículas como esferas. X_c^{tam} determinado en 35 y 425 nm de diámetro equivalente para ^{27}Al y ^{29}Si , respectivamente.

Con el ^{29}Si , el rango detectable comprendió tamaños desde 425 nm hasta 1000 nm, que fue la región analizable de acuerdo con lo discutido con los estándares de partículas de SiO_2 . En cambio, con el ^{27}Al fue posible detectar la fracción de menor tamaño, con diámetros equivalentes desde 35 nm (tamaño correspondiente al valor crítico) hasta 500 nm, aproximadamente.

En la Tabla 3.11 se muestran los resultados del análisis de la fracción inferior a $1 \mu\text{m}$ de caolín en suspensión obtenidos con ambos isótopos. De los datos se puede concluir que la fracción de menor tamaño detectada mediante ^{27}Al , aunque mucho menor en términos de concentración en masa, es muy significativa en número, con una concentración de partículas cinco veces superior a la detectada utilizando ^{29}Si .

Tabla 3.11. Resultados del análisis de la fracción inferior a $1 \mu\text{m}$ de caolín en SP-ICP-MS, clasificados en función del isótopo. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

Analito	Tamaño equivalente promedio (nm)	Concentración en masa en distribución ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Nº eventos	Concentración en número (part. caolinita L^{-1})
^{29}Si	578 ± 4	$7,66 \pm 0,41$	625 ± 28	$1,15 \times 10^8 \pm 0,05 \times 10^8$
^{27}Al	143 ± 1	$1,13 \pm 0,07$	3175 ± 165	$5,85 \times 10^8 \pm 0,31 \times 10^8$

Se observó que el caolín, pese a analizar únicamente la fracción por debajo de una micra, es un material muy polidisperso, con partículas detectadas en un amplio rango de tamaños. Debido a la complementariedad de los rangos detectables con ^{27}Al y ^{29}Si , la posibilidad del análisis de los dos isótopos permitiría la caracterización de partículas en prácticamente toda la región inferior a 1000 nm. Sin embargo, su aplicación con un analizador de cuadrupolo resulta laboriosa por la necesidad de realizar calibraciones con estándares del elemento disuelto para cada isótopo y la medida secuencial de los elementos, así como establecer las condiciones de medida en cada caso, sumado al tratamiento posterior de los datos brutos para obtener la información complementaria. Este trabajo se simplificaría, en cambio, trabajando con analizadores simultáneos como los de tiempo de vuelo (TOF), que actualmente están siendo empleados en el análisis individual de nanopartículas [49,252–254], aunque sus aplicaciones son todavía escasas.

Los contenidos totales de aluminio determinados por detección individual se compararon con los obtenidos mediante ICP-MS, de acuerdo con el procedimiento descrito en la Sección 3.2.5, y se muestran en la Tabla 3.12. A partir de estos datos, se observó que una fracción de Al presente en la suspensión corresponde a formas disueltas (18%), aunque la recuperación respecto al total determinado mediante ICP-MS fue baja. A la vista de la distribución de tamaños mostrada en la Figura 3.12, se puede deducir que la baja recuperación estaría justificada por la distribución incompleta que se obtiene de la suspensión analizada.

Tabla 3.12. Resultados de contenidos de aluminio determinados por detección individual (como total: suma de la fracción disuelta y la particulada) e ICP-MS para la fracción inferior a 1 μm en caolín. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

Concentración de Al (mg L^{-1}) SP-ICP-MS	Concentración de Al (mg L^{-1}) ICP-MS	Recuperación Al SP-ICP-MS (%)
$2,28 \pm 0,06$ (total) (del cual un 18% Al es disuelto)	$10,93 \pm 0,23$ (total)	$20,9 \pm 0,7$

Para tratar de justificar esta baja recuperación, se estudió la muestra de caolín por debajo de 1 μm a través de microscopía electrónica. Las imágenes en TEM mostraron la presencia de algunos agregados (Figura 3.13).

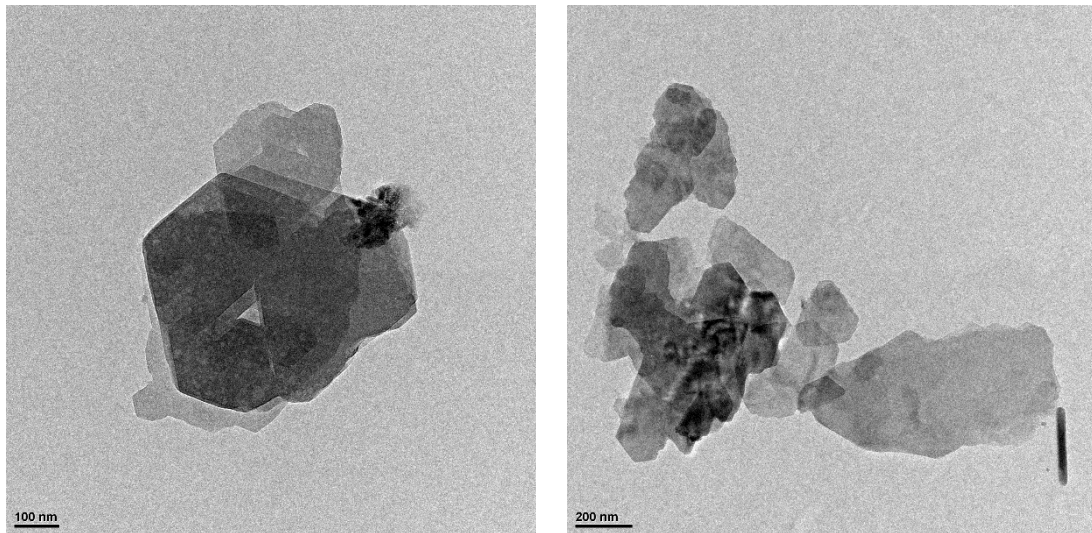


Figura 3.13. Imágenes en TEM de partículas de caolín para la fracción inferior a 1 μm .

Se establecieron las dimensiones de las partículas observadas en TEM a través de la herramienta de procesamiento de imágenes digitales ImageJ. Con estos resultados, junto a la determinación de espesores por espectroscopía de pérdida de energía de electrones (EELS) según lo descrito en la Sección 3.2.1, se eligieron unos valores promedio de aproximadamente 50 nm para las láminas individuales y de 80 nm para los agregados, y se calcularon los volúmenes de las partículas observadas (ver Anexo 3.4). A partir de estos volúmenes se calcularon los diámetros equivalentes (resultados en Anexo 3.5), de forma que pudieran compararse con los resultados obtenidos mediante SP-ICP-MS. Las distribuciones de tamaños equivalentes de partícula obtenidas mediante TEM y SP-ICP-MS fueron similares, como puede observarse en la Figura 3.12. Los resultados por TEM (Figura 3.12b) mostraron que la fracción no detectada mediante la detección individual de partículas con el isótopo ^{27}Al no pertenece a diámetros equivalentes inferiores a 35 nm, sino que el mayor número de partículas corresponde a diámetros equivalentes de entre 50 y 300 nm, siendo las de 100 nm las más frecuentes. Además, se confirmó la presencia de partículas de tamaño equivalente superior a 500 nm, correspondiente a los agregados observados en TEM. Las diferencias observadas en las distribuciones para la fracción más pequeña en SP-ICP-MS pueden deberse a la dificultad para visualizar partículas de menor tamaño en los agregados, o a la agregación que puede producirse durante la preparación de muestra en TEM.

La presencia de esta fracción por encima de 500 nm, observada también mediante SP-ICP-MS con el isótopo ^{29}Si y no detectada en el caso del isótopo ^{27}Al , parece indicar

que la disminución de la recuperación en masa para el Al podría ser causada por la saturación del detector, que impediría detectar y caracterizar de forma correcta las partículas de mayor tamaño. El estudio del perfil de un pico detectado en el barrido para el caolín en la zona del máximo de intensidad, confirmó que estos picos no eran integrados en su totalidad, con un límite del detector determinado en 1625 cuentas (Figura 3.14), un valor similar al observado en los estudios con Si en la Sección 3.3.1.3.

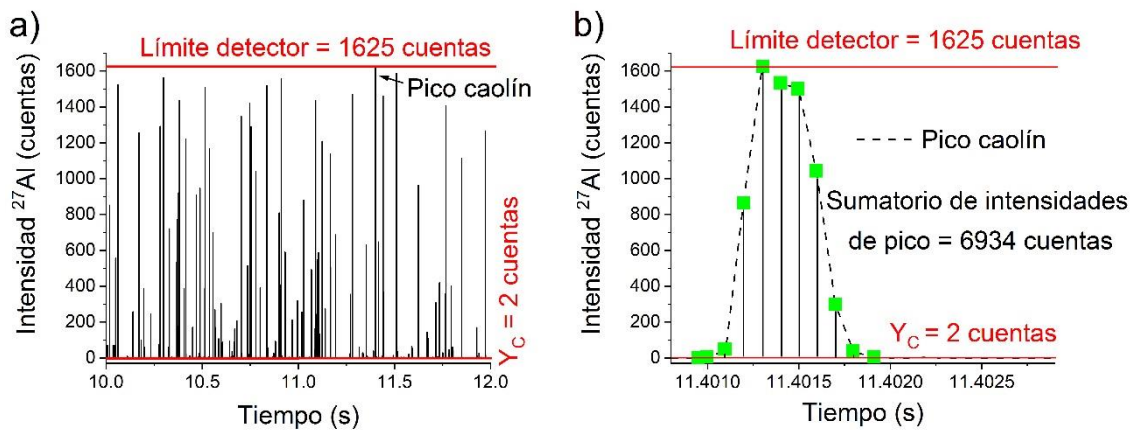


Figura 3.14. a) Barrido de intensidades para la fracción inferior a $1\ \mu\text{m}$ de caolín. b) Perfil de pico detectado en el máximo de intensidad (línea discontinua), analizado para el estudio del límite del detector, determinado en 1625 cuentas. Los cuadrados verdes corresponden a las señales transitorias que conforman un pico.

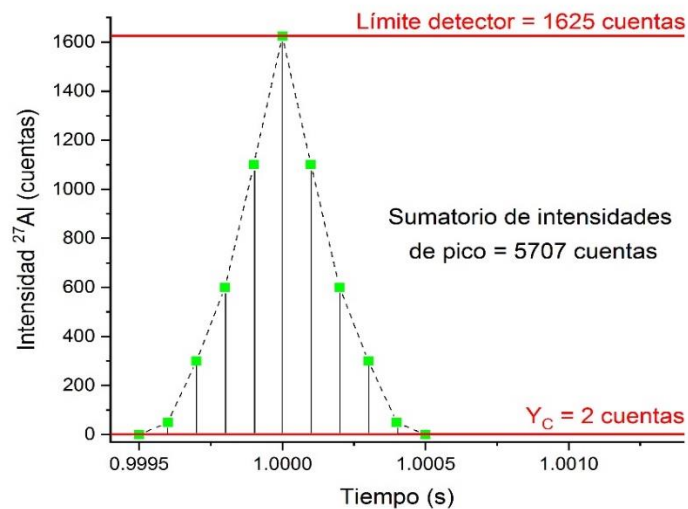


Figura 3.15. Modelo de perfil de pico para la determinación del tamaño a partir del cual la caracterización se vería afectada por el límite del detector, estimado en 420 nm. Los cuadrados verdes corresponden a las señales transitorias que conforman el pico, cuya integración comprende la suma de intensidades marcadas por las franjas verticales.

De forma análoga a los estándares de SiO_2 , se realizó una modelización del pico que alcanzara este máximo, considerándolo simétrico y con una anchura de $800 \mu\text{s}$, obteniéndose un límite de 420 nm de diámetro equivalente para partículas de caolinita, utilizando el Al para su detección y caracterización (Figura 3.15).

Una alternativa al uso del isótopo ^{29}Si para incrementar el límite superior de tamaños es disminuir la sensibilidad con el ^{27}Al , a través de la modificación de algún parámetro instrumental como el voltaje del deflector. Con un cambio en las condiciones del voltaje con las que se ha trabajado hasta el momento, de $-13,25 \text{ V}$ (óptimo), a $-1,75 \text{ V}$, el rango detectable para el aluminio se desplazó hasta un límite inferior de 115 nm y uno superior de 950 nm (Figura 3.16).

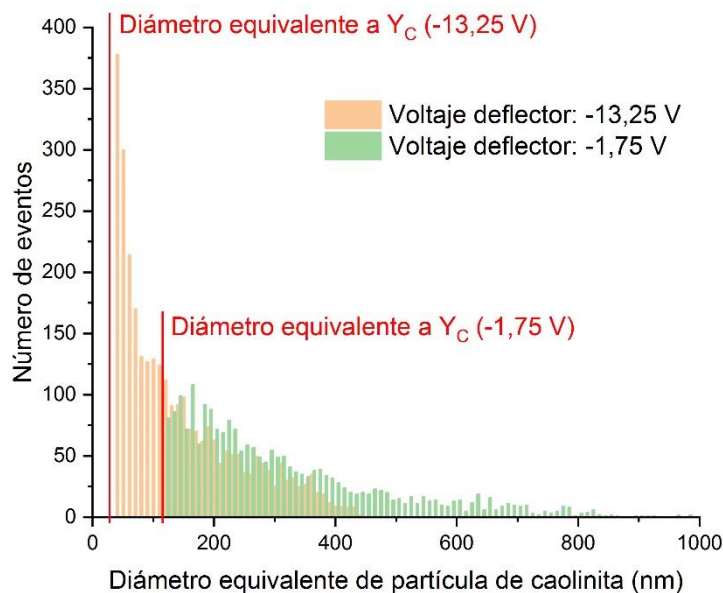


Figura 3.16. Distribución de tamaños de partícula correspondiente a la fracción inferior a $1 \mu\text{m}$ de caolín, en función del voltaje del deflector. Tamaños expresados como diámetros equivalentes, considerando las partículas esféricas. X_C^{tam} determinado en 35 y 110 nm de diámetro equivalente para voltajes de $-13,25$ y $-1,75 \text{ V}$, respectivamente.

Al igual que sucediera con el ^{29}Si , las condiciones de menor sensibilidad conllevan una pérdida de la parte de la distribución de menor tamaño, con sus implicaciones en el número de eventos y la concentración de partículas en número detectados (Tabla 3.13). Sin embargo, en términos de masa, supusieron un aumento de $5,5$ veces los contenidos de aluminio al ampliar la distribución hacia tamaños mayores, que suponen una fracción

en masa superior. Con la combinación de las distribuciones obtenidas para cada voltaje del deflector, es posible la caracterización de partículas de caolín en un rango que comprende desde 35 nm hasta aproximadamente 1 μm . En tal caso, la masa de Al detectada en la distribución a través de SP-ICP-MS es de $6,26 \mu\text{g L}^{-1}$, lo que supone una recuperación de $115 \pm 12\%$ respecto a los contenidos determinados mediante ICP-MS.

Tabla 3.13. Resultados del análisis de la fracción inferior a 1 μm de caolín con ^{27}Al , en función del voltaje del deflector utilizado, y para la combinación de ambas condiciones. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

Voltaje deflector	Sensibilidad Al (cuentas por $\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración en masa en distribución ($\mu\text{g Al L}^{-1}$)	Nº eventos	Concentración en número (part. caolinita L^{-1})
-13,25 V	26,32	$1,13 \pm 0,07$	3175 ± 165	$5,85 \times 10^8 \pm 0,31 \times 10^8$
-1,75 V	0,15	$6,23 \pm 0,36$	2240 ± 70	$4,13 \times 10^8 \pm 0,14 \times 10^8$
Combinación de distribuciones para ambos voltajes		Concentración en masa en distribución ($\mu\text{g Al L}^{-1}$)	Recuperación Al SP-ICP-MS (%)	
		$6,26 \pm 0,52$	$115,4 \pm 11,7$	

Estos resultados sugieren que no hay limitaciones debidas a la nebulización e ionización de las partículas de caolín en la fracción de estudio en SP-ICP-MS y que la determinación complementaria de los isótopos ^{27}Al y ^{29}Si , o bien la modificación de la sensibilidad para ^{27}Al , permite ampliar el rango de tamaños analizable, obteniéndose una recuperación completa en masa en el último caso. La validación en cuanto a distribución en número requeriría de materiales certificados en número para el rango de tamaños analizados, o la comparación con un procedimiento alternativo. En este caso se considera que, aunque el análisis mediante TEM no proporcionó una población suficiente para obtener una distribución fiable de la suspensión de caolín analizada, las distribuciones en número muestran cierta similitud, por lo que se considera adecuado el procedimiento propuesto para la detección de micropartículas de aluminosilicatos de hasta 1 μm basado en el uso del isótopo ^{27}Al .

3.3.3. Análisis de partículas de aluminosilicatos migrados desde envases plásticos

3.3.3.1. Migración desde botella (material #1)

El método basado en SP-ICP-MS se utilizó para estudiar la migración de micropartículas de aluminosilicatos desde envases plásticos. En una primera aproximación se analizó el material #1, que incorpora montmorillonita, y que se escogió porque se habían realizado ensayos con anterioridad en este tipo de envase por parte del grupo de investigación, en los cuales se pudo comprobar que se producía liberación de partículas. Se emplearon dos medios lixiviantes: agua ultrapura y ácido acético 3% (v/v), siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.2.4. De acuerdo con la norma UNE-EN 1310-1 [207], ambos medios son considerados como dos de los principales simuladores de comida para gran variedad de productos alimentarios en ensayos de migración. El uso de ácido acético 3% permite acidificar ligeramente las condiciones para simular un medio más agresivo que el agua ultrapura [208].

En la Tabla 3.14 se presentan los niveles de intensidad de la línea base con ambos simuladores, así como el número de eventos detectados, con los respectivos límites de detección. Se observó que el uso de ácido acético como medio produjo el aumento de los niveles de intensidad de la línea base para el ^{27}Al , así como de su incertidumbre, y el número de eventos detectados en los blancos. Como consecuencia, los límites de detección en tamaño y número de partículas de montmorillonita empeoraron respecto a los obtenidos con el agua ultrapura.

Tabla 3.15. Intensidades de línea base y límites de detección determinados en función del medio lixiviante empleado en los ensayos de migración. Intensidades y número de eventos mostrados como el promedio \pm desviación estándar.

Medio	Intensidad promedio Al (cuentas) ^a	LOD _{tamaño} montmorillonita (nm)	Nº eventos ^b	LOD _{núm} (part. montmorillonita L ⁻¹)
Agua ultrapura	0,3 \pm 0,6	65	20 \pm 4	4,67 \times 10 ⁶
Ácido acético 3%	2 \pm 3	98	55 \pm 13	7,38 \times 10 ⁶

^a n = 600000 datos en un barrido (tiempo de lectura de 60 s)

^b n = 3 réplicas

Los resultados tras los ensayos de migración se muestran en la Tabla 3.15. En función del medio lixiviante, se observan diferencias en los contenidos migrados desde el material

#1. En agua ultrapura, el número de partículas detectadas fue significativamente superior a los detectados en ácido acético 3%, en cuyo caso los resultados se sitúan por debajo del límite de detección en número. Con el uso de ácido acético, además, los contenidos de Al disuelto aumentaron.

Tabla 3.15. Resultados obtenidos en SP-ICP-MS para ensayos de migración del material #1 en función del medio empleado. Intensidades y número de eventos mostrados como el promedio \pm desviación estándar ($n=3$).

Medio lixiviante	Y_C en tamaño (nm)	Concentración en número (part. montmorillonita L^{-1})	Concentración Al disuelto ($\mu g L^{-1}$)
Agua ultrapura	65	$2,4 \times 10^8 \pm 0,7 \times 10^8$	$0,4 \pm 0,1$
Ácido acético 3% (v/v)	90	$< LOD_{n\acute{u}m}^*$	$3,1 \pm 0,7$

* $LOD_{n\acute{u}m} = 7,38 \times 10^6$ partículas L^{-1}

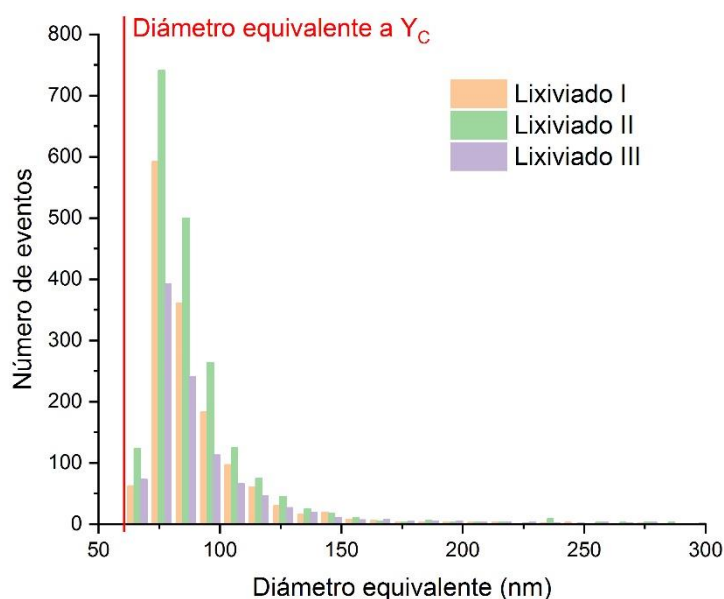


Figura 3.17. Distribución de tamaños de partículas migradas desde el material #1 en agua ultrapura. Tamaños expresados como diámetros equivalentes, considerando las partículas como esferas. X_c^{tam} determinado en 65 nm de diámetro equivalente.

Para los lixiviados en agua ultrapura se obtuvieron distribuciones de tamaño de partícula equivalente comprendidas entre 65 y 300 nm, con la región de diámetros inferiores a 100 nm como la más frecuente (Figura 3.17), aunque la proximidad al valor crítico implica que la distribución sea, probablemente, incompleta. Transformando esta concentración en número a concentración en masa, se obtiene que la fracción en forma

de partículas supone un 15% respecto del total cuantificado mediante SP-ICP-MS (el 85% restante se encuentra disuelto), tal y como se refleja en la Tabla 3.16.

De manera similar al estudio de la suspensión del caolín natural (Sección 3.3.2), se determinó la concentración de Al total en masa presente en el medio lixivante mediante ICP-MS (procedimiento de ataque de muestra descrito en la Sección 3.2.5). Los contenidos de Al migrados, en términos de masa por superficie de contacto del material #1, resultaron tener valores de $0,07 \pm 0,02 \text{ mg dm}^{-2}$. En comparación con los resultados de ICP-MS, tan solo un 0,2% del total de Al es detectado mediante detección individual de partículas (Tabla 3.16). Tanto las determinaciones con SP-ICP-MS como la cuantificación con ICP-MS presentan una elevada incertidumbre, debido a la variación de los contenidos migrados desde el material #1 entre las réplicas de lixiviados llevadas a cabo.

Tabla 3.16. Resultados de ensayos de migración del material #1 en agua ultrapura, analizados en SP-ICP-MS e ICP-MS. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

Tamaño equivalente promedio (nm) SP-ICP-MS	Concentración Al ($\mu\text{g L}^{-1}$) SP-ICP-MS	Concentración Al ($\mu\text{g L}^{-1}$) ICP-MS	Recuperación Al SP-ICP-MS (%)
98 ± 5	$0,5 \pm 0,1$ (total) (85% Al disuelto)	$365,2 \pm 98,9$	$0,2 \pm 0,1$

Esta baja recuperación obtenida implica que la mayor parte del Al migrado no es detectada mediante SP-ICP-MS. Se siguió la estrategia de ampliar el intervalo de tamaños con la modificación de la sensibilidad mediante el uso de un voltaje distinto en el deflector, pero no se tradujo en una mejora significativa de los resultados. La Figura 3.18 muestra las distribuciones en tamaño para ambas condiciones. Así, se observa que el tamaño más frecuente aumentó al usar un voltaje no óptimo (-1,75 V), probablemente debido al aumento del valor crítico obtenido, pero sin diferencias significativas en la región de mayores tamaños. Los resultados no variaron en términos de tamaño promedio ni de concentración en masa, como se puede observar en la Tabla 3.17, lo que confirma que no hubo limitaciones por saturación del detector.

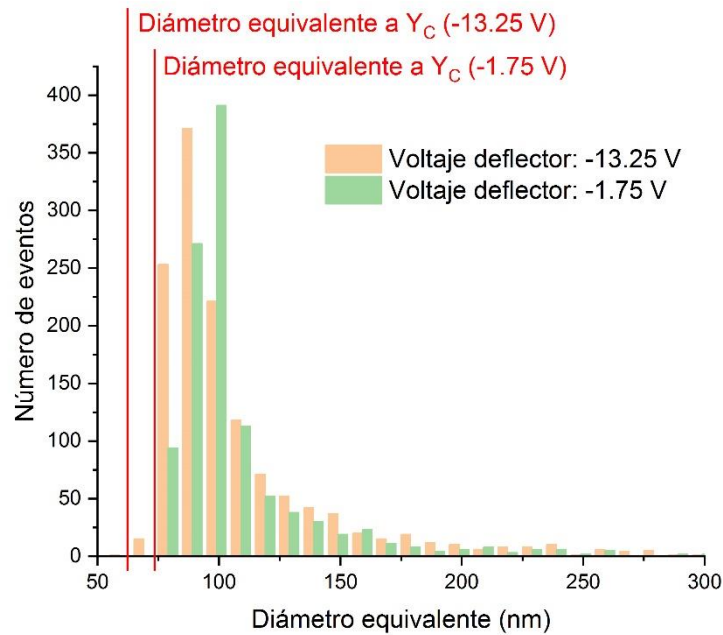


Figura 3.18. Distribución de tamaños de partículas migradas desde el material #1 en agua ultrapura, en función del voltaje del deflector. Tamaños expresados como diámetros equivalentes, considerando las partículas como esferas. X_C^{tam} determinado en 65 y 75 nm de diámetro equivalente para voltajes de -13,25 y -1,75 V, respectivamente.

Tabla 3.17. Resultados de ensayos de migración del material #1 en agua ultrapura, en función del voltaje del deflector utilizado. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

Voltaje deflector (V)	Sensibilidad Al (cuentas por $\mu\text{g L}^{-1}$)	Tamaño equivalent e promedio (nm)	Concentración en masa en distribución ($\mu\text{g Al L}^{-1}$)	Nº eventos	Concentración en número (part. montmorillonita L^{-1})
-13,25	17,41	114 \pm 5	0,13 \pm 0,03	1245 \pm 81	2,74 $\times 10^8 \pm 0,22 \times 10^8$
-1,75	1,61	110 \pm 1	0,13 \pm 0,01	1143 \pm 17	2,51 $\times 10^8 \pm 0,04 \times 10^8$

Las suspensiones obtenidas en los ensayos de migración también fueron estudiadas mediante TEM. En las imágenes se observó un número escaso de partículas, que en su mayoría resultaron de gran tamaño, del orden de varias micras (Figura 3.19a) y con altos contenidos en carbono (ver espectros en Anexo 3.5). En el interior de estos microfragmentos están contenidas unas estructuras hexagonales (entre 50 y 100 nm de longitud), como las que se señalan en la Figura 3.19b, cuyos espectros EDS confirmaron

la presencia de aluminio y silicio, por lo que corresponderían a las partículas de arcilla presentes en la estructura del material #1. A diferencia del caso del caolín, con el material #1 no se pudieron determinar espesores de partícula mediante EELS, debido a la dificultad para encontrar partículas individuales en TEM. Sin embargo, si se considera un valor de 50 nm como una aproximación y una forma esférica, estas estructuras presentan unos diámetros equivalentes de entre 70 y 125 nm, que corresponderían a la fracción analizada en SP-ICP-MS en los medios lixiviados, mostrados en la Figura 3.18.

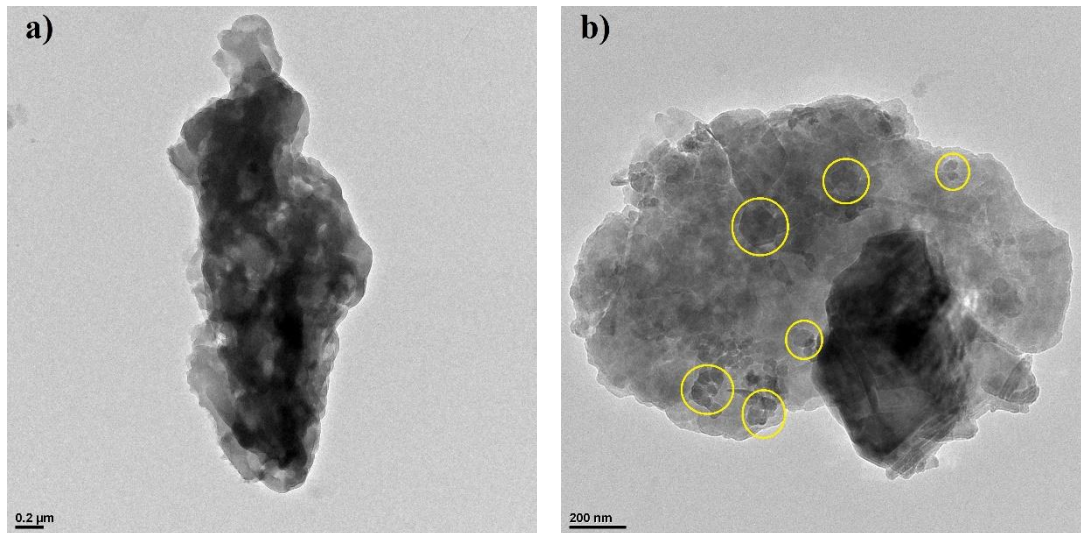


Figura 3.19. Imágenes TEM de partículas migradas desde el material #1. a) Fragmentos de varias micras con altos contenidos de carbono y b) estructuras hexagonales con presencia de aluminio y silicio en el interior de los fragmentos de gran tamaño, resaltadas con círculos amarillos.

De este modo, se dedujo que lo que migra desde el material #1 podrían ser microfragmentos de plástico, en cuyo interior estarían embebidos los aluminosilicatos. Debido a que la fracción de Al es reducida en estas partículas migradas, su caracterización mediante SP-ICP-MS resulta en diámetros equivalentes de 100 nm o tamaños inferiores, aunque la distribución obtenida no sería representativa, porque apenas supone un 0,2% en masa del Al total migrado. Si bien en estudios como el de Laborda *et al.* [228] se consiguieron nebulizar partículas de plástico de hasta 6 micras, la presencia de las arcillas en el interior dota de mayor densidad al compuesto, lo que podría modificar los rendimientos de nebulización e ionización de las partículas observadas mediante TEM y justificaría la baja recuperación obtenida en SP-ICP-MS. En cualquier caso, se trata de una hipótesis, ya que el número de partículas observadas mediante TEM fue escaso, resultando difícil establecer si este tipo de partículas son las que mayoritariamente migran al medio lixivante y suponen el mayor porcentaje en masa de Al presente en el lixiviado.

3.3.3.2. Migración desde envases de PET (material #2)

Además del material #1, se estudió la migración de partículas de aluminosilicatos desde un material #2, que consiste en un material termoplástico que incorpora montmorillonita como aditivo. Este tipo de envases cuentan con numerosas aplicaciones para productos como agua, zumo, bebidas carbonadas, cerveza, té y aceites [205]. Los ensayos de migración se realizaron siguiendo el Reglamento UE nº 10/2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, en el que se especifican los medios simuladores de alimentos, así como las condiciones de los estudios de migración. Este reglamento ha sido utilizado por diferentes autores para los estudios de migración tanto de nanopartículas [210,255] como de arcillas [208]. Para los ensayos con el material #2 se siguió el procedimiento descrito en la Sección 3.2.4, en los que se utilizó ácido acético 3% (v/v) como medio.

De acuerdo con los resultados mostrados anteriormente en la Tabla 3.14, el uso de ácido acético conlleva un aumento en la intensidad de la línea base para el ^{27}Al , lo que supone el aumento del valor crítico aplicado para la discriminación de picos, que en este caso fue de 110 nm. En el análisis de los contenidos migrados con SP-ICP-MS (Figura 3.20) apenas se detectaron picos de partículas por encima del valor crítico, con una frecuencia alrededor de 10 eventos, por debajo del LOD en número.

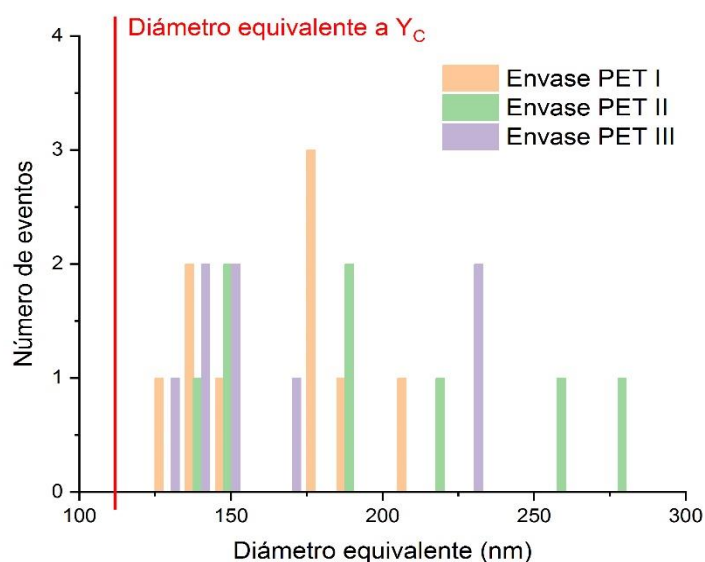


Figura 3.20. Distribución de tamaños de partículas migradas desde el material #2 en ácido acético 3% (v/v). Tamaños expresados como diámetros equivalentes, considerando las partículas como esferas. X_C^{tam} determinado en 110 nm de diámetro equivalente.

Como ya se observara en el análisis de migración con el material #1, los contenidos de Al disuelto fueron elevados, con valores promedio de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, lo que produjo un empeoramiento del límite de detección en tamaño y en número de partículas. En todos los casos, las partículas detectadas para los envases estuvieron por debajo del $\text{LOD}_{\text{núm}}$, que fue determinado en $5,16 \times 10^6$ partículas L^{-1} (Tabla 3.18). En la observación mediante TEM se detectó un número reducido de partículas que contenían Al y Si en su interior, tal y como se muestra en la Figura 3.21.

Tabla 3.18. Resultados de los ensayos de migración desde el material #2 en ácido acético 3% (v/v). Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

Réplicas del material #2	Nº eventos	Concentración en número (part. montmorillonita L^{-1})*	Concentración Al disuelto ($\mu\text{g L}^{-1}$)
I	9 ± 1	$< \text{LOD}_{\text{núm}}$	$21,9 \pm 0,5$
II	11 ± 4	$< \text{LOD}_{\text{núm}}$	$16,8 \pm 3,8$
III	10 ± 3	$< \text{LOD}_{\text{núm}}$	$20,8 \pm 0,3$

* $\text{LOD}_{\text{núm}} = 5,16 \times 10^6$ partículas L^{-1}

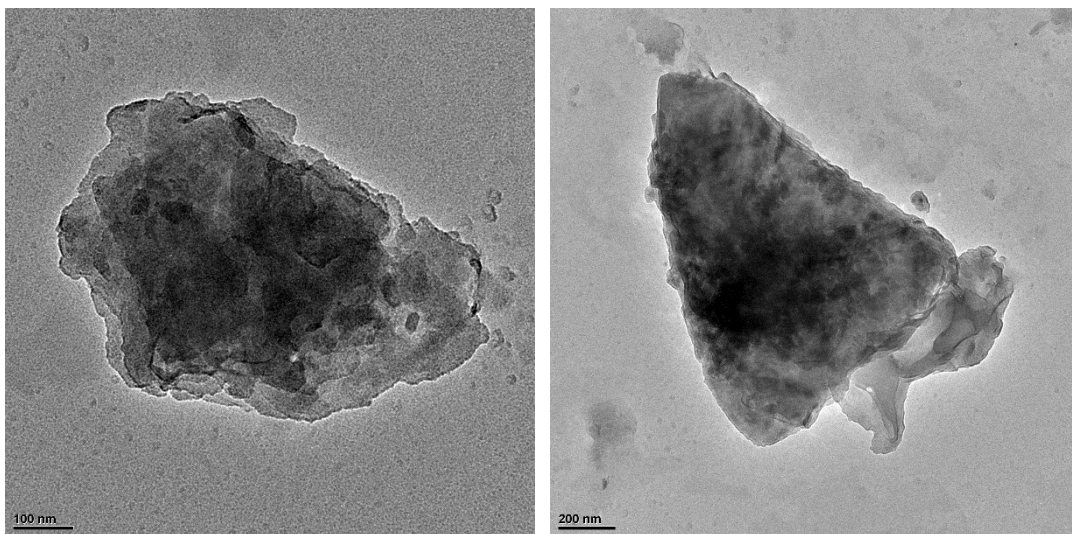


Figura 3.21. Imágenes en TEM de partículas migradas desde el material #2.

Las concentraciones de Al disuelto obtenidas para los ensayos con el material #2 se compararon con los contenidos totales determinados por ICP-MS (Tabla 3.19). Los resultados permiten confirmar que la cuantificación mediante SP-ICP-MS es correcta (analizadas con un test-t para un nivel de confianza del 95%), en la que prácticamente la totalidad del aluminio está presente en forma disuelta, ya que las partículas que puedan haber migrado, por debajo del $\text{LOD}_{\text{núm}}$, no supondrían una contribución relevante en

términos de masa. De acuerdo con lo observado para los ensayos de migración tanto con el material #1 como con el #2, con el uso de ácido acético 3% como medio lixivante es posible que las partículas migradas se disuelvan, lo que justificaría las concentraciones de partículas por debajo de los límites de detección en número y el aumento de los niveles de Al disuelto, comparado con el uso de agua ultrapura.

Tabla 3.19. *Contenidos de Al en ensayos de migración del material #2 en ácido acético 3% (v/v). Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (n=3).*

Concentración Al disuelto ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración Al total ($\mu\text{g L}^{-1}$)
SP-ICP-MS	ICP-MS
19,8 \pm 3,0	21,6 \pm 1,9

3.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una metodología basada en SP-ICP-MS para la detección, caracterización por tamaño y cuantificación de partículas de aluminosilicatos y se ha aplicado de forma satisfactoria en ensayos de migración desde envases que las contienen. Estos estudios han permitido confirmar la presencia de micropartículas migradas en agua ultrapura como agente extractante desde uno de los materiales (material #1), con tamaños entre 65 nm (correspondiente al límite de detección) y 300 nm de diámetro equivalente, con un tamaño promedio de 114 nm.

Aunque el uso de tiempos de integración en el rango de los microsegundos permite reducir los niveles de señal de fondo, evitando el uso de celdas de colisión o de reacción para la disminución de las interferencias poliatómicas en el caso del Si, los límites de detección en tamaño obtenidos, por encima de los 270 nm en todos los casos, limita en cierta medida el uso del silicio para la caracterización de aluminosilicatos en rangos de tamaños como los observados. En este trabajo se ha propuesto el uso del isótopo ^{27}Al , con unos niveles de línea base mucho menores a los del Si, incluso para el isótopo ^{29}Si , alcanzándose límites de detección de 35 nm.

En el caso de los límites superiores de tamaño, están determinados fundamentalmente por los rendimientos de nebulización y por el límite de saturación del detector. En relación con el primero, se ha comparado el uso de una cámara Asperon con el de una cámara

ciclónica, conjuntamente con el uso de un nebulizador que permite la introducción de micropartículas de gran tamaño. El uso de este tipo de cámaras permite alcanzar unos rendimientos de nebulización estimados para partículas de SiO₂ de 1 μm cercanos a los obtenidos en el rango de los nm y calculados a partir del estándar de Au NPs de 50 nm (33% frente al 42%). Se ha de tener presente, en cambio, que la estructura laminar de las partículas de aluminosilicatos, con dimensiones del orden de los nanómetros de espesor, pero que puede ser de hasta varias micras en las otras dos dimensiones, puede influir en la correcta estimación de estos rendimientos, teniéndose que asumir comportamientos similares a los obtenidos con estándares de tamaño bien caracterizados y disponibles comercialmente.

Por otro lado, el límite de saturación del detector es un parámetro instrumental y su efecto sobre el límite superior depende de la sensibilidad para el isótopo medido. La modificación de aquellos parámetros que afectan a la sensibilidad, como el voltaje del deflector, permite modular el rango de tamaños detectables mediante SP-ICP-MS. Esta estrategia ha permitido ampliar y completar el rango de tamaños detectados con el ²⁷Al en la caracterización de una suspensión de un aluminosilicato natural (caolín) previamente fraccionado a tamaños inferiores a 1 μm. Así, el uso de dos condiciones de sensibilidad (alta y baja mediante la modificación del voltaje del deflector del instrumento) ha permitido cuantificar el Al presente en la suspensión con una recuperación cuantitativa respecto al contenido determinado mediante ICP-MS previa digestión ácida. La distribución de tamaños obtenida con las dos condiciones de sensibilidad se ha comparado con la obtenida mediante TEM, obteniéndose resultados similares, excepto en la región de menores tamaños, probablemente debido a la agregación de partículas individuales y a la dificultad de establecer su tamaño en las imágenes de TEM.

Finalmente se ha comprobado que los medios lixiviantes utilizados en los ensayos de migración tienen una gran influencia sobre las formas migradas. Así, el uso de una disolución al 3% (v/v) de ácido acético como agente extractante hace que aumente la concentración de Al migrado respecto al agua ultrapura y que no se detecten micropartículas por encima de los límites de detección en número obtenidos mediante SP-ICP-MS. Estos resultados sugieren la posibilidad de que se produzca la solubilización de las micropartículas migradas desde los envases estudiados. En cualquier caso, las diferencias observadas entre los dos envases estudiados, según las imágenes de TEM,

impiden establecer conclusiones generales en este sentido, ya que en uno de ellos (material #1) se observó la migración de micropartículas de plásticos en cuyo interior se encuentran las partículas de aluminosilicatos, sin embargo, en el otro (material #2) el espesor de las micropartículas impidió detectar la presencia de otras estructuras en su interior (aunque sí se detectaron Al y Si por EDS).

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El uso de metodologías basadas en el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo (AF4) acoplado a distintas técnicas como DLS e ICP-MS, así como en la detección individual de partículas SP-ICP-MS ha permitido detectar, caracterizar y cuantificar nanopartículas y micropartículas de óxidos de titanio y aluminosilicatos en diversos medios complejos. La elevada polidispersidad característica de los materiales de óxido de titanio, las diferentes geometrías de las partículas caracterizadas o las bajas concentraciones en las que se encuentran estos materiales en los sistemas estudiados, han supuesto un desafío en el desarrollo de estas metodologías, mostrando en algunos casos las limitaciones de las técnicas utilizadas.

Así, la cuantificación y caracterización por tamaño de óxidos de titanio en diversos productos como aditivos fotocatalíticos y alimentos mediante AF4, ha requerido del empleo de diversas estrategias que se adaptasen a las características propias de las partículas objeto del análisis. La ausencia de materiales bien caracterizados de óxido de titanio ha obligado al uso de otros estándares de tamaño, como partículas de poliestireno o de óxido de silicio, para la calibración del canal. Sin embargo, los tamaños estimados a través de estas calibraciones pueden verse afectados por efectos matriz que modifiquen los tiempos de retención de las partículas de óxido de titanio en las muestras analizadas, por lo que el uso de técnicas alternativas, como la microscopía electrónica, o de detectores capaces de dar información sobre el tamaño, como los basados en la dispersión de luz, son necesarios para la validación de los resultados.

La elevada polidispersidad de los materiales basados en óxido de titanio condiciona la separación de los mismos mediante AF4, al obligar a utilizar flujos cruzados elevados con la consiguiente pérdida de material por interacciones con el canal. El uso de canales de menor longitud ha demostrado ser efectivo en la mejora de la eficiencia de la separación para partículas en el rango de los nanómetros utilizando condiciones suaves de separación, compatibles con elevadas recuperaciones. Estas condiciones han resultado determinantes en la cuantificación de micropartículas de óxido de titanio en muestras de alimentos en concentraciones del orden de los $\mu\text{g g}^{-1}$.

La detección y caracterización de nanoarcillas en ensayos de migración desde envases plásticos supone un desafío metodológico, en gran parte debido a los bajos niveles de concentración esperados y a las propias dimensiones de las partículas migradas, con un espesor en el rango de los nanómetros, pero que pueden alcanzar varias micras en el resto de dimensiones por la propia estructura laminar del material utilizado. Estos condicionantes limitan el uso de AF4-ICP-MS, por lo que este estudio se ha centrado en el desarrollo de un procedimiento basado en SP-ICP-MS, evaluándose las distintas variables que afectan a sus prestaciones. La variación en los rendimientos de nebulización de las partículas de mayor tamaño respecto a los calculados con estándares de nanopartículas, junto con los problemas de saturación del detector, suponen una limitación en el rango superior de tamaños detectables mediante SP-ICP-MS. Aunque el uso de una cámara Asperon junto con un nebulizador de focalización de flujo mejora los rendimientos de nebulización de partículas de hasta 1 μm , estos siguen siendo menores a los obtenidos para partículas en el rango de los nanómetros.

Además, la cuantificación de este tipo de partículas laminares pasa por asumir un comportamiento similar en el proceso de nebulización, volatilización e ionización al correspondiente a materiales esféricos de tamaños equivalentes disponibles comercialmente y utilizados para la calibración. La caracterización de poblaciones de partículas con elevada polidispersidad, como las observadas en estos estudios, ha requerido del uso de diferentes condiciones de sensibilidad para adecuar los límites de detección y el rango de tamaños a los de las partículas detectadas. Así, el uso del isótopo ²⁷Al medido utilizando dos voltajes diferentes del deflector ha permitido la caracterización y cuantificación de una suspensión de arcilla natural (caolinita) de tamaños inferiores a 1 μm , con recuperaciones en masa del orden del 100%.

Finalmente, los ensayos de migración han revelado la presencia de micropartículas en alguno de los medios extractantes desde uno de los materiales estudiados, confirmada mediante su observación en TEM, aunque no ha sido posible validar las concentraciones determinadas.

V. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. van der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester, S. Weigel, Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1274–1285. <https://doi.org/10.1039/C4JA00357H>.
- [2] M.R. Wiesner, G. V. Lowry, P. Alvarez, D. Dionysiou, P. Biswas, Assessing the risks of manufactured nanomaterials, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 4336–4345. <https://doi.org/10.1021/es062726m>.
- [3] European Commission 2011/696 on the definition of nanomaterial, *Off. J. Eur. Union.* 24 (2011) 6–6. <https://doi.org/10.7748/ns.24.26.6.s4>.
- [4] A.G. Howard, On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic environment, *J. Environ. Monit.* 12 (2010) 135–142. <https://doi.org/10.1039/B913681A>.
- [5] M. Correia, T. Uusimäki, A. Philippe, K. Loeschner, Challenges in determining the size distribution of nanoparticles in consumer products by asymmetric flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry: The example of Al₂O₃, TiO₂, and SiO₂ nanoparticles in toothpaste, *Separations.* 5 (2018) 1–25. <https://doi.org/10.3390/separations5040056>.
- [6] F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M.T. Gómez, M.S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui, J.R. Castillo, Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples, *Anal. Chim. Acta.* 904 (2016) 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008>.
- [7] X. He, H. Zhang, H. Shi, W. Liu, E. Sahle-Demessie, Fates of Au, Ag, ZnO, and CeO₂ Nanoparticles in Simulated Gastric Fluid Studied using Single-Particle-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 31 (2020) 2180–2190. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00278>.
- [8] M.S. Chavali, M.P. Nikolova, Metal oxide nanoparticles and their applications in nanotechnology, *SN Appl. Sci.* 1 (2019) 1–30. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0592-3>.

- [9] J. Pasquet, Y. Chevalier, E. Couval, D. Bouvier, M.A. Bolzinger, Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: Interactions with common formulation ingredients, *Int. J. Pharm.* 479 (2015) 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.031>.
- [10] C. Clementi, F. Rosi, A. Romani, R. Vivani, B.G. Brunetti, C. Miliani, Photoluminescence properties of zinc oxide in paints: A study of the effect of self-absorption and passivation, *Appl. Spectrosc.* 66 (2012) 1233–1241. <https://doi.org/10.1366/12-06643>.
- [11] G. Osmond, Zinc white: a review of zinc oxide pigment properties and implications for stability in oil-based paintings, *AICCM Bull.* 33 (2012) 20–29. <https://doi.org/10.1179/bac.2012.33.1.004>.
- [12] V. Sogne, F. Meier, T. Klein, C. Contado, Investigation of zinc oxide particles in cosmetic products by means of centrifugal and asymmetrical flow field-flow fractionation, *J. Chromatogr. A.* 1515 (2017) 196–208. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.098>.
- [13] K. Phalyvong, Y. Sivry, H. Pauwels, A. Gélabert, M. Tharaud, G. Wille, X. Bourrat, M.F. Benedetti, Occurrence and Origins of Cerium Dioxide and Titanium Dioxide Nanoparticles in the Loire River (France) by Single Particle ICP-MS and FEG-SEM Imaging, *Front. Environ. Sci.* 8 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00141>.
- [14] C. Contado, A. Pagnoni, TiO₂ in commercial sunscreen lotion: Flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7594–7608. <https://doi.org/10.1021/ac8012626>.
- [15] R.J.B. Peters, G. Van Bommel, Z. Herrera-Rivera, H.P.F.G. Helsper, H.J.P. Marvin, S. Weigel, P.C. Tromp, A.G. Oomen, A.G. Rietveld, H. Bouwmeester, Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: Analytical methods to define nanoparticles, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 6285–6293. <https://doi.org/10.1021/jf5011885>.
- [16] J. Zhang, H. Kumagai, K. Yamamura, S. Ohara, S. Takami, A. Morikawa, Extra-Low-Temperature Oxygen Storage Capacity of CeO₂, *Nano.* (2011) 361–364.
- [17] K. Van Hoecke, J.T.K. Quik, J. Mankiewicz-Boczek, K.A.C. De Schampelaere,

- A. Elsaesser, P. Van Der Meeren, C. Barnes, G. Mckerr, C.V. Howard, D. Van De Meent, K. Rydzyński, K.A. Dawson, A. Salvati, A. Lesniak, I. Lynch, G. Silversmit, B. De Samber, L. Vincze, C.R. Janssen, Fate and effects of CeO₂ nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 4537–4546. <https://doi.org/10.1021/es9002444>.
- [18] M. Hayder, J. Wojcieszek, M. Asztemborska, Y. Zhou, L. Ruzik, Analysis of cerium oxide and copper oxide nanoparticles bioaccessibility from radish using SP-ICP-MS, *J. Sci. Food Agric.* 100 (2020) 4950–4958. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10558>.
- [19] M. Montalti, E. Rampazzo, N. Zaccheroni, L. Prodi, Luminescent chemosensors based on silica nanoparticles for the detection of ionic species, *New J. Chem.* 37 (2013) 28–34. <https://doi.org/10.1039/c2nj40673j>.
- [20] R. Duan, F. Xia, L. Jiang, Constructing tunable nanopores and their application in drug delivery, *ACS Nano.* 7 (2013) 8344–8349. <https://doi.org/10.1021/nn405092w>.
- [21] H. Jaganathan, B. Godin, Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 1800–1819. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.05.008>.
- [22] F. Barahona, O. Geiss, P. Urbán, I. Ojea-Jimenez, D. Gilliland, J. Barrero-Moreno, Simultaneous determination of size and quantification of silica nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled to ICPMS using silica nanoparticles standards, *Anal. Chem.* 87 (2015) 3039–3047. <https://doi.org/10.1021/ac504698j>.
- [23] R. Peters, E. Kramer, A.G. Oomen, Z.E. Herrera Rivera, G. Oegema, P.C. Tromp, R. Fokkink, A. Rietveld, H.J.P. Marvin, S. Weigel, A.A.C.M. Peijnenburg, H. Bouwmeester, Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive, *ACS Nano.* 6 (2012) 2441–2451. <https://doi.org/10.1021/nn204728k>.
- [24] R.J.B. Peters, A.G. Oomen, G. van Bommel, L. van Vliet, A.K. Undas, S. Munniks, R.L.A.W. Bleys, P.C. Tromp, W. Brand, M. van der Lee, Silicon dioxide and titanium dioxide particles found in human tissues, *Nanotoxicology.* 14 (2020) 420–

432. <https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1718232>.
- [25] B.C. Ku, D. Froio, D. Sleeves, D.W. Kim, H. Ahn, J.A. Ratio, A. Blumstein, J. Kumar, L.A. Samuelson, Cross-linked multilayer polymer-clay nanocomposites and permeability properties, *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.* 41 A (2004) 1401–1410. <https://doi.org/10.1081/MA-200035343>.
- [26] F. Laborda, E. Bolea, Characterization of Engineered Nanomaterials, in: *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.*, Elsevier, 2018: pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12677-0>.
- [27] A. Philippe, G.E. Schaumann, Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled with uv-visible, fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry detectors for sizing and quantifying colloids in environmental media, *PLoS One*. 9 (2014) 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090559>.
- [28] Y. Dan, H. Shi, C. Stephan, X. Liang, Rapid analysis of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Microchem. J.* 122 (2015) 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.04.018>.
- [29] P.J. Lu, S.C. Huang, Y.P. Chen, L.C. Chiueh, D.Y.C. Shih, Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics, *J. Food Drug Anal.* 23 (2015) 587–594. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.02.009>.
- [30] M.F. Cuddy, A.R. Poda, R.D. Moser, C.A. Weiss, C. Cairns, J.A. Steevens, A weight-of-evidence approach to identify nanomaterials in consumer products: A case study of nanoparticles in commercial sunscreens, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 26 (2016) 26–34. <https://doi.org/10.1038/jes.2015.51>.
- [31] B. Bocca, S. Caimi, O. Senofonte, A. Alimonti, F. Petrucci, ICP-MS based methods to characterize nanoparticles of TiO₂ and ZnO in sunscreens with focus on regulatory and safety issues, *Sci. Total Environ.* 630 (2018) 922–930. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.166>.
- [32] C. Adelantado, Á. Ríos, M. Zougagh, A new nanometrological strategy for titanium dioxide nanoparticles screening and confirmation in personal care products by CE-spICP-MS, *Talanta*. 219 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121385>.

- [33] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, B. Maxit, F. Séby, Towards routine analysis of TiO₂ (nano-)particle size in consumer products: Evaluation of potential techniques, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 147 (2018) 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2018.05.012>.
- [34] S. Wagner, S. Legros, K. Loeschner, J. Liu, J. Navratilova, R. Grombe, T.P.J. Linsinger, E.H. Larsen, F. Von Der Kammer, T. Hofmann, First steps towards a generic sample preparation scheme for inorganic engineered nanoparticles in a complex matrix for detection, characterization, and quantification by asymmetric flow-field flow fractionation coupled to multi-angle light scattering and , *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1286–1296. <https://doi.org/10.1039/c4ja00471j>.
- [35] J. Heroult, V. Nischwitz, D. Bartczak, H. Goenaga-Infante, The potential of asymmetric flow field-flow fractionation hyphenated to multiple detectors for the quantification and size estimation of silica nanoparticles in a food matrix Characterisation of Nanomaterials in Biological Samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3919–3927. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7831-7>.
- [36] B. Bocca, E. Sabbioni, I. Mičetić, A. Alimonti, F. Petrucci, Size and metal composition characterization of nano- and microparticles in tattoo inks by a combination of analytical techniques, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 616–628. <https://doi.org/10.1039/c6ja00210b>.
- [37] E. Topuz, L. Sigg, I. Talinli, A systematic evaluation of agglomeration of Ag and TiO₂ nanoparticles under freshwater relevant conditions, *Environ. Pollut.* 193 (2014) 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.05.029>.
- [38] A.R. Donovan, C.D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz, H. Shi, Fate of nanoparticles during alum and ferric coagulation monitored using single particle ICP-MS, *Chemosphere.* 195 (2018) 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.116>.
- [39] M. Amde, Z.Q. Tan, J. Liu, Separation and size characterization of zinc oxide nanoparticles in environmental waters using asymmetrical flow field-flow fractionation, *Talanta.* 200 (2019) 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.074>.
- [40] D. Wang, P. Wang, C. Wang, Y. Ao, Effects of interactions between humic acid

- and heavy metal ions on the aggregation of TiO₂ nanoparticles in water environment, *Environ. Pollut.* 248 (2019) 834–844. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.084>.
- [41] F. Loosli, J. Wang, M. Sikder, K. Afshinnia, M. Baalousha, Analysis of engineered nanomaterials (Ag, CeO₂ and Fe₂O₃) in spiked surface waters at environmentally relevant particle concentrations, *Sci. Total Environ.* 715 (2020) 136927. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136927>.
- [42] J. Navratilova, A. Praetorius, A. Gondikas, W. Fabienke, F. von der Kammer, T. Hofmann, Detection of engineered copper nanoparticles in soil using single particle ICP-MS, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 12 (2015) 15756–15768. <https://doi.org/10.3390/ijerph121215020>.
- [43] S. Salou, C. Cirtiu, D. Larivière, N. Fleury, Assessment of strategies for the formation of stable suspensions of titanium dioxide nanoparticles in aqueous media suitable for the analysis of biological fluids, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 1469–1481. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02412-2>.
- [44] N. Londono, A.R. Donovan, H. Shi, M. Geisler, Y. Liang, Effects of environmentally relevant concentrations of mixtures of TiO₂, ZnO and Ag ENPs on a river bacterial community, *Chemosphere.* 230 (2019) 567–577. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.110>.
- [45] B. Gomez-Gomez, M.T. Perez-Corona, Y. Madrid, Using single-particle ICP-MS for unravelling the effect of type of food on the physicochemical properties and gastrointestinal stability of ZnONPs released from packaging materials, *Anal. Chim. Acta.* 1100 (2020) 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.063>.
- [46] M. Hadioui, V. Merdzan, K.J. Wilkinson, Detection and characterization of ZnO nanoparticles in surface and waste waters using single particle ICPMS, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 6141–6148. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00681>.
- [47] A.R. Donovan, C.D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz, H. Shi, Detection of zinc oxide and cerium dioxide nanoparticles during drinking water treatment by rapid single particle ICP-MS methods, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5137–5145. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9432-0>.
- [48] A.A. Markus, P. Krystek, P.C. Tromp, J.R. Parsons, E.W.M. Roex, P. de Voogt,

- R.W.P.M. Laane, Determination of metal-based nanoparticles in the river Dommel in the Netherlands via ultrafiltration, HR-ICP-MS and SEM, *Sci. Total Environ.* 631–632 (2018) 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.007>.
- [49] I. Jreije, A. Azimzada, M. Hadioui, K.J. Wilkinson, Measurement of CeO₂ Nanoparticles in Natural Waters Using a High Sensitivity, Single Particle ICP-MS, *Molecules.* (2020).
- [50] A. Philippe, D.A. Campos, J.M. Guigner, C. Buchmann, D. Diehl, G.E. Schaumann, Characterization of the natural colloidal tio₂ background in soil, *Separations.* 5 (2018) 1–16. <https://doi.org/10.3390/separations5040050>.
- [51] F. Aureli, M. Ciprotti, M. D'amato, E.D.N. da Silva, S. Nisi, D. Passeri, A. Sorbo, A. Raggi, M. Rossi, F. Cubadda, Determination of total silicon and SiO₂ particles using an ICP-MS based analytical platform for toxicokinetic studies of synthetic amorphous silica, *Nanomaterials.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/nano10050888>.
- [52] H. Hagendorfer, R. Kaegi, J. Traber, S.F.L. Mertens, R. Scherrers, C. Ludwig, A. Ulrich, Application of an asymmetric flow field flow fractionation multi-detector approach for metallic engineered nanoparticle characterization - Prospects and limitations demonstrated on Au nanoparticles, *Anal. Chim. Acta.* 706 (2011) 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.014>.
- [53] K. Tiede, A.B.A. Boxall, S.P. Tear, J. Lewis, H. David, M. Hassellöv, Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment, *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 25 (2008) 795–821. <https://doi.org/10.1080/02652030802007553>.
- [54] S. Han, J. Choi, Y. Yoo, E.C. Jung, S. Lee, Size Monitoring in the Synthesis of Silica Nanoparticles Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF₄), *Bull. Korean Chem. Soc.* 37 (2016) 335–343. <https://doi.org/10.1002/bkcs.10675>.
- [55] S. Dekkers, P. Krystek, R.J.B. Peters, D.P.K. Lankveld, B.G.H. Bokkers, P.H. Van Hooft, H. Bouwmeester, A.G. Oomen, Presence and risks of nanosilica in food products, *Nanotoxicology.* 5 (2011) 393–405. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.519836>.
- [56] S.K. Misra, A. Dybowska, D. Berhanu, S.N. Luoma, E. Valsami-Jones, The

- complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies, *Sci. Total Environ.* 438 (2012) 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.066>.
- [57] B. Li, S.L. Chua, A.L. Ch'ng, D. Yu, S.P. Koh, H. Phang, P.K.T. Chiew, An effective approach for size characterization and mass quantification of silica nanoparticles in coffee creamer by AF4-ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 5499–5512. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02770-x>.
- [58] M.E. Schimpf, K.D. Caldwell, J.C. Giddings, *Field-Flow Fractionation Handbook*, Wiley-Interscience, 2000.
- [59] G. Greyling, A. Lederer, H. Pasch, Thermal Field-Flow Fractionation for the Investigation of the Thermoresponsive Nature of Star and Linear Polystyrene, *Macromol. Chem. Phys.* 219 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1002/macp.201800417>.
- [60] W.C. Smith, M. Geisler, A. Lederer, S.K.R. Williams, Thermal Field-Flow Fractionation for Characterization of Architecture in Hyperbranched Aromatic-Aliphatic Polyesters with Controlled Branching, *Anal. Chem.* 91 (2019) 12344–12351. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02664>.
- [61] M. Geisler, W.C. Smith, L. Plüschke, R. Mundil, J. Merna, S.K.R. Williams, A. Lederer, Topology Analysis of Chain Walking Polymerized Polyethylene: An Alternative Approach for the Branching Characterization by Thermal FFF, *Macromolecules.* 52 (2019) 8662–8671. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b01410>.
- [62] G. Greyling, H. Pasch, Tacticity separation of poly(methyl methacrylate) by multidetector thermal field-flow fractionation, *Anal. Chem.* 87 (2015) 3011–3018. <https://doi.org/10.1021/ac504651p>.
- [63] C. Contado, A. Dalpiaz, E. Leo, M. Zborowski, P.S. Williams, Complementary use of flow and sedimentation field-flow fractionation techniques for size characterizing biodegradable poly(lactic acid) nanospheres, *J. Chromatogr. A.* 1157 (2007) 321–335. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.038>.
- [64] J.C. Giddings, F.J.F. Yang, M.N. Myers, Sedimentation Field-Flow Fractionation, *Anal. Chem.* 46 (1974) 1917–1924.

- [65] J.J. Kirkland, W.W. Yau, F.C. Szoka, Sedimentation field flow fractionation of liposomes, *Science* (80-.). 215 (1980) 296–298. <https://doi.org/10.1126/science.7053578>.
- [66] C. Contado, R. Argazzi, V. Amendola, Sedimentation field flow fractionation and optical absorption spectroscopy for a quantitative size characterization of silver nanoparticles, *J. Chromatogr. A.* 1471 (2016) 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.026>.
- [67] S. Tadjiki, M.D. Montaña, S. Assemi, A. Barber, J. Ranville, R. Beckett, Measurement of the Density of Engineered Silver Nanoparticles Using Centrifugal FFF-TEM and Single Particle ICP-MS, *Anal. Chem.* 89 (2017) 6056–6064. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00652>.
- [68] A. Samontha, J. Shiowatana, A. Siripinyanond, Particle size characterization of titanium dioxide in sunscreen products using sedimentation field-flow fractionation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 973–978. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4298-z>.
- [69] S.T. Kim, H.K. Kim, S.H. Han, E.C. Jung, S. Lee, Determination of size distribution of colloidal TiO₂ nanoparticles using sedimentation field-flow fractionation combined with single particle mode of inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Microchem. J.* 110 (2013) 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.07.015>.
- [70] F. Dutschke, J. Irrgeher, D. Pröfrock, Optimisation of an extraction/leaching procedure for the characterisation and quantification of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in aquatic environments using SdFFF-ICP-MS and SEM-EDX analyses, *Anal. Methods.* 9 (2017) 3626–3635. <https://doi.org/10.1039/c7ay00635g>.
- [71] S. Tadjiki, S. Assemi, C.E. Deering, J.M. Veranth, J.D. Miller, Detection, separation, and quantification of unlabeled silica nanoparticles in biological media using sedimentation field-flow fractionation, *J. Nanoparticle Res.* 11 (2009) 981–988. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9560-3>.
- [72] S. Huppertsberg, T.P. Knepper, Instrumental analysis of microplastics—benefits and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 6343–6352.

- <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1210-8>.
- [73] W. Somchue, A. Siripinyanond, B.K. Gale, Electrical field-flow fractionation for metal nanoparticle characterization, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4993–4998. <https://doi.org/10.1021/ac300662b>.
- [74] T. Techarang, A. Siripinyanond, Use of electrical field-flow fractionation for gold nanoparticles after improving separation efficiency by carrier liquid optimization, *Anal. Chim. Acta.* 1144 (2021) 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.006>.
- [75] Y. Bi, X. Pan, L. Chen, Q.H. Wan, Field-flow fractionation of magnetic particles in a cyclic magnetic field, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 3908–3914. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.065>.
- [76] A.H. Latham, R.S. Freitas, P. Schiffer, M.E. Williams, Capillary magnetic field flow fractionation and analysis of magnetic nanoparticles, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5055–5062. <https://doi.org/10.1021/ac050611f>.
- [77] P.S. Williams, F. Carpino, M. Zborowski, Magnetic nanoparticle drug carriers and their study by quadrupole magnetic field-flow fractionation, *Mol. Pharm.* 6 (2009) 1290–1306. <https://doi.org/10.1021/mp900018v>.
- [78] T. Orita, L.R. Moore, P. Joshi, M. Tomita, T. Horiuchi, M. Zborowski, A quantitative determination of magnetic nanoparticle separation using on-off field operation of quadrupole magnetic field-flow fractionation (QMgFFF), *Anal. Sci.* 29 (2013) 761–764. <https://doi.org/10.2116/analsci.29.761>.
- [79] K.G. Wahlund, J.C. Giddings, Properties of an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel Having One Permeable Wall, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1332–1339. <https://doi.org/10.1021/ac00136a016>.
- [80] J.Y. Ahn, K.H. Kim, J.Y. Lee, P.S. Williams, M.H. Moon, Effect of asymmetrical flow field-flow fractionation channel geometry on separation efficiency, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3876–3880. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.021>.
- [81] C. Contado, Field flow fractionation techniques to explore the “nano-world,” *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2501–2518. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0180->

- 6.
- [82] B. Meisterjahn, S. Wagner, F. von der Kammer, D. Hennecke, T. Hofmann, Silver and gold nanoparticle separation using asymmetrical flow-field flow fractionation: Influence of run conditions and of particle and membrane charges, *J. Chromatogr. A*. 1440 (2016) 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.059>.
- [83] H. Kato, A. Nakamura, H. Banno, M. Shimizu, Separation of different-sized silica nanoparticles using asymmetric flow field-flow fractionation by control of the Debye length of the particles with the addition of electrolyte molecules, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 538 (2018) 678–685. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.11.067>.
- [84] D. Müller, M. Nogueira, S. Cattaneo, F. Meier, R. Drexel, C. Contado, A. Pagnoni, T. De Vries, D. Cohen, M. Portugal-Cohen, A. Demello, Integration of Inverse Supercritical Fluid Extraction and Miniaturized Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation for the Rapid Analysis of Nanoparticles in Sunscreens, *Anal. Chem.* 90 (2018) 3189–3195. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04535>.
- [85] J.S. Yang, M.H. Moon, Flow optimisations with increased channel thickness in asymmetrical flow field-flow fractionation, *J. Chromatogr. A*. 1581–1582 (2018) 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.053>.
- [86] M. Berger, C. Scherer, S. Noskov, C. Bantz, C. Nickel, W. Schupp, M. Maskos, Influence of oscillating main flow on separation efficiency in asymmetrical flow field-flow fractionation, *J. Chromatogr. A*. 1640 (2021) 461941. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461941>.
- [87] M. Marioli, W.T. Kok, Recovery, overloading, and protein interactions in asymmetrical flow field-flow fractionation, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 2327–2338. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01673-w>.
- [88] J. Gigault, J.M. Pettibone, C. Schmitt, V.A. Hackley, Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: A tutorial, *Anal. Chim. Acta.* 809 (2014) 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.021>.
- [89] N. Bendixen, S. Losert, C. Adlhart, M. Lattuada, A. Ulrich, Membrane-particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with

- titanium dioxide nanoparticles, *J. Chromatogr. A.* 1334 (2014) 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.066>.
- [90] F. Giorgi, J.M. Curran, D. Gilliland, R. La Spina, M. Whelan, E.A. Patterson, Limitations of Nanoparticles Size Characterization by Asymmetric Flow Field-Fractionation Coupled with Online Dynamic Light Scattering, *Chromatographia.* 84 (2021) 199–206. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03997-7>.
- [91] B. Bocca, B. Battistini, F. Petrucci, Silver and gold nanoparticles characterization by SP-ICP-MS and AF4-FFF-MALS-UV-ICP-MS in human samples used for biomonitoring, *Talanta.* 220 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121404>.
- [92] W. Wohlleben, C. Kingston, J. Carter, E. Sahle-Demessie, S. Vázquez-Campos, B. Acrey, C.Y. Chen, E. Walton, H. Egenolf, P. Müller, R. Zepp, NanoRelease: Pilot interlaboratory comparison of a weathering protocol applied to resilient and labile polymers with and without embedded carbon nanotubes, *Carbon N. Y.* 113 (2017) 346–360. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.11.011>.
- [93] F. Abdolapur Monikh, N. Grundschober, S. Romeijn, D. Arenas-Lago, M.G. Vijver, W. Jiskoot, W.J.G.M. Peijnenburg, Development of methods for extraction and analytical characterization of carbon-based nanomaterials (nanoplastics and carbon nanotubes) in biological and environmental matrices by asymmetrical flow field-flow fractionation, *Environ. Pollut.* 255 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113304>.
- [94] A. Gogos, R. Kaegi, R. Zenobi, T.D. Bucheli, Capabilities of asymmetric flow field-flow fractionation coupled to multi-angle light scattering to detect carbon nanotubes in soot and soil, *Environ. Sci. Nano.* 1 (2014) 584–594. <https://doi.org/10.1039/c4en00070f>.
- [95] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 217 (2003) 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00568-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00568-X).
- [96] B. Meermann, V. Nischwitz, ICP-MS for the analysis at the nanoscale—a tutorial

- review, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 1432–1468. <https://doi.org/10.1039/c8ja00037a>.
- [97] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 1220–1232. <https://doi.org/10.1039/c3ja50100k>.
- [98] F. Laborda, E. Bolea, J. Jimenez-Lamana, Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2270–2278.
- [99] I. Abad-Álvaro, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5089–5097. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9515-y>.
- [100] V. Geertsen, E. Barruet, F. Gobeaux, J.L. Lacour, O. Taché, Contribution to Accurate Spherical Gold Nanoparticle Size Determination by Single-Particle Inductively Coupled Mass Spectrometry: A Comparison with Small-Angle X-ray Scattering, *Anal. Chem.* 90 (2018) 9742–9750. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01167>.
- [101] F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 169 (2020) 105883. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105883>.
- [102] F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry as screening tool for detection of particles, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 159 (2019) 105654. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105654>.
- [103] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, A new peak recognition algorithm for detection of ultra-small nano-particles by single particle ICP-MS using rapid time resolved data acquisition on a sector-field mass spectrometer, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1723–1729. <https://doi.org/10.1039/c5ja00113g>.

- [104] R.J.B. Peters, A.K. Undas, J. Memelink, G. van Bommel, S. Munniks, H. Bowmeester, P. Nobels, W. Schuurmans, M. van der Lee, Development and Validation of a Method for the Detection of Titanium Dioxide Particles in Human Tissue with Single Particle ICP-MS, *Curr. Trends Anal. Bioanal. Chem.* 2 (2018) 74–84. <https://doi.org/10.36959/525/442>.
- [105] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, Improving the accuracy of single particle ICPMS for measurement of size distributions and number concentrations of nanoparticles by determining analyte partitioning during nebulisation, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 743–752. <https://doi.org/10.1039/c3ja50367d>.
- [106] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V.A. Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9361–9369. <https://doi.org/10.1021/ac201952t>.
- [107] Y. Dan, X. Ma, W. Zhang, K. Liu, C. Stephan, H. Shi, Single particle ICP-MS method development for the determination of plant uptake and accumulation of CeO₂ nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5157–5167. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9565-1>.
- [108] K. Loeschner, M.S.J. Brabrand, J.J. Sloth, E.H. Larsen, Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS Characterisation of Nanomaterials in Biological Samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3845–3851. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7431-y>.
- [109] M. Hadioui, C. Peyrot, K.J. Wilkinson, Improvements to single particle ICPMS by the online coupling of ion exchange resins, *Anal. Chem.* 86 (2014) 4668–4674. <https://doi.org/10.1021/ac5004932>.
- [110] D. Kang, M.H. Moon, Miniaturization of frit inlet asymmetrical flow field-flow fractionation, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3851–3855. <https://doi.org/10.1021/ac0496704>.
- [111] D. Kang, M.H. Moon, Hollow fiber flow field-flow fractionation of proteins using a microbore channel, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4207–4212. <https://doi.org/10.1021/ac050301x>.

- [112] P. Reschiglian, A. Zattoni, B. Roda, L. Cinque, D. Parisi, A. Roda, F. Dal Piaz, M.H. Moon, B.R. Min, On-line hollow-fiber flow field-flow fractionation-electrospray ionization/time-of-flight mass spectrometry of intact proteins, *Anal. Chem.* 77 (2005) 47–56. <https://doi.org/10.1021/ac048898o>.
- [113] K.H. Kim, M.H. Moon, Chip-type asymmetrical flow field-flow fractionation channel coupled with mass spectrometry for top-down protein identification, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8652–8658. <https://doi.org/10.1021/ac202098b>.
- [114] G. Yohannes, M. Sneek, S.J.O. Varjo, M. Jussila, S.K. Wiedmer, P.T. Kovanen, K. Öörni, M.L. Riekkola, Miniaturization of asymmetrical flow field-flow fractionation and application to studies on lipoprotein aggregation and fusion, *Anal. Biochem.* 354 (2006) 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.04.018>.
- [115] Z. You, F. Meier, S. Weidner, Comparison of miniaturized and conventional asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) channels for nanoparticle separations, *Separations.* 4 (2017). <https://doi.org/10.3390/separations4010008>.
- [116] D. Müller, S. Cattaneo, F. Meier, R. Welz, A.J. de Mello, Nanoparticle separation with a miniaturized asymmetrical flow field-flow fractionation cartridge, *Front. Chem.* 3 (2015) 1–6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00045>.
- [117] I. Yang, K.H. Kim, J.Y. Lee, M.H. Moon, On-line miniaturized asymmetrical flow field-flow fractionation-electrospray ionization-tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring for quantitative analysis of phospholipids in plasma lipoproteins, *J. Chromatogr. A.* 1324 (2014) 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.035>.
- [118] A. Zattoni, D.C. Rambaldi, P. Reschiglian, M. Melucci, S. Krol, A.M.C. Garcia, A. Sanz-Medel, D. Roessner, C. Johann, Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering detection for the analysis of structured nanoparticles, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 9106–9112. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.037>.
- [119] R.N. Qureshi, W.T. Kok, P.J. Schoenmakers, Fractionation of human serum lipoproteins and simultaneous enzymatic determination of cholesterol and triglycerides, *Anal. Chim. Acta.* 654 (2009) 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.060>.

- [120] A. Litzén, K.G. Wahlund, Zone Broadening and Dilution in Rectangular and Trapezoidal Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channels, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1001–1007. <https://doi.org/10.1021/ac00010a013>.
- [121] M.H. Moon, P.S. Williams, H. Kwon, Retention and efficiency in frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2657–2666. <https://doi.org/10.1021/ac990040p>.
- [122] M. Hee Moon, P.S. Williams, D. Kang, I. Hwang, Field and flow programming in frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation, *J. Chromatogr. A.* 955 (2002) 263–272. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00226-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00226-1).
- [123] J.C. Giddings, Micro-FFF: Theoretical and Practical Aspects, *J. Microcolumn Sep.* 5 (1993) 497–503.
- [124] A. Litzén, Separation Speed, Retention, and Dispersion in Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation as Functions of Channel Dimensions and Flow Rates, *Anal. Chem.* 65 (1993) 461–470. <https://doi.org/10.1021/ac00052a025>.
- [125] B. Meermann, Field-flow fractionation coupled to ICP–MS: separation at the nanoscale, previous and recent application trends, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2665–2674. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8416-1>.
- [126] C. Contado, A. Pagnoni, TiO₂ nano- and micro-particles in commercial foundation creams: Field Flow-Fractionation techniques together with ICP-AES and SQW Voltammetry for their characterization, *Anal. Methods.* 2 (2010) 1112–1124. <https://doi.org/10.1039/c0ay00205d>.
- [127] A.J. Bednar, A.R. Poda, D.M. Mitrano, A.J. Kennedy, E.P. Gray, J.F. Ranville, C.A. Hayes, F.H. Crocker, J.A. Steevens, Comparison of on-line detectors for field flow fractionation analysis of nanomaterials, *Talanta.* 104 (2013) 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.008>.
- [128] D. Bartczak, P. Vincent, H. Goenaga-Infante, Determination of size- and number-based concentration of silica nanoparticles in a complex biological matrix by online techniques, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5482–5485. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01052>.
- [129] F. Von Der Kammer, S. Legros, T. Hofmann, E.H. Larsen, K. Loeschner,

- Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 425–436. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.012>.
- [130] M. Baalousha, B. Stolpe, J.R. Lead, Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4078–4103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.063>.
- [131] O. Geiss, C. Cascio, D. Gilliland, F. Franchini, J. Barrero-Moreno, Size and mass determination of silver nanoparticles in an aqueous matrix using asymmetric flow field flow fractionation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometer and ultraviolet-visible detectors, *J. Chromatogr. A.* 1321 (2013) 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.060>.
- [132] C.A. Sötebier, F.S. Bierkandt, S. Rades, N. Jakubowski, U. Panne, S.M. Weidner, Sample loss in asymmetric flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry of silver nanoparticles, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 2214–2222. <https://doi.org/10.1039/c5ja00297d>.
- [133] S. Dubascoux, F. Von Der Kammer, I. Le Hécho, M.P. Gautier, G. Lespes, Optimisation of asymmetrical flow field flow fractionation for environmental nanoparticles separation, *J. Chromatogr. A.* 1206 (2008) 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.032>.
- [134] I. Römer, T.A. White, M. Baalousha, K. Chipman, M.R. Viant, J.R. Lead, Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4226–4233. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.034>.
- [135] D.M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1131–1142. <https://doi.org/10.1039/c2ja30021d>.
- [136] E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo, Metal associations to microparticles, nanocolloids and macromolecules in compost leachates: Size characterization by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to ICP-MS, *Anal. Chim. Acta.*

- 661 (2010) 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.021>.
- [137] K.G. Wahlund, Flow field-flow fractionation: Critical overview, *J. Chromatogr. A.* 1287 (2013) 97–112. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.028>.
- [138] K. Loeschner, J. Navratilova, R. Grombe, T.P.J. Linsinger, C. Købler, K. Mølhave, E.H. Larsen, In-house validation of a method for determination of silver nanoparticles in chicken meat based on asymmetric flow field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometric detection, *Food Chem.* 181 (2015) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.033>.
- [139] Y. jie Chang, Y. hsin Shih, C.H. Su, H.C. Ho, Comparison of three analytical methods to measure the size of silver nanoparticles in real environmental water and wastewater samples, *J. Hazard. Mater.* 322 (2017) 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.030>.
- [140] E.P. Gray, T. a. Bruton, C.P. Higgins, R.U. Halden, P. Westerhoff, J.F. Ranville, Analysis of gold nanoparticle mixtures: a comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1532. <https://doi.org/10.1039/c2ja30069a>.
- [141] B. Schmidt, K. Loeschner, N. Hadrup, A. Mortensen, J.J. Sloth, C. Bender Koch, E.H. Larsen, Quantitative characterization of gold nanoparticles by field-flow fractionation coupled online with light scattering detection and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2461–2468. <https://doi.org/10.1021/ac102545e>.
- [142] V. Nischwitz, H. Goenaga-Infante, Improved sample preparation and quality control for the characterisation of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using flow field flow fractionation on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1084–1092. <https://doi.org/10.1039/c2ja10387g>.
- [143] W. Qureshi, Rashid; Kok, Optimization of Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation, *LCGC North Am.* 29 (2010) 148–162.
- [144] L.J. Hazeem, F.A. Waheed, S. Rashdan, M. Bououdina, L. Brunet, C. Slomianny, R. Boukherroub, W. a. Elmeselmani, Cumulative effect of zinc oxide and titanium

- oxide nanoparticles on growth and chlorophyll a content of *Picochlorum* sp., *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2015) 2821–2830. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4370-5>.
- [145] J. Hou, L. Wang, C. Wang, S. Zhang, H. Liu, S. Li, X. Wang, Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms, *J. Environ. Sci.* 75 (2018) 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.010>.
- [146] S. Silva, J.M.P. Ferreira de Oliveira, M.C. Dias, A.M.S. Silva, C. Santos, Antioxidant mechanisms to counteract TiO₂-nanoparticles toxicity in wheat leaves and roots are organ dependent, *J. Hazard. Mater.* 380 (2019) 120889. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120889>.
- [147] B. Salieri, S. Righi, A. Pasteris, S.I. Olsen, Freshwater ecotoxicity characterisation factor for metal oxide nanoparticles: A case study on titanium dioxide nanoparticle, *Sci. Total Environ.* 505 (2015) 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.107>.
- [148] X. Valentini, P. Rugira, A. Frau, V. Tagliatti, R. Conotte, S. Laurent, J.M. Colet, D. Nonclercq, Hepatic and Renal Toxicity Induced by TiO₂ Nanoparticles in Rats: A Morphological and Metabonomic Study, *J. Toxicol.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/5767012>.
- [149] T. Lammel, A. Mackevica, B.R. Johansson, J. Sturve, Endocytosis, intracellular fate, accumulation, and agglomeration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in the rainbow trout liver cell line RTL-W1, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2019) 15354–15372. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04856-1>.
- [150] F. Fiordaliso, C. Foray, M. Salio, M. Salmona, L. Diomede, Realistic Evaluation of Titanium Dioxide Nanoparticle Exposure in Chewing Gum, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 6860–6868. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00747>.
- [151] J.P.F.G. Helsper, R.J.B. Peters, M.E.M. van Bommel, Z.E.H. Rivera, S. Wagner, F. von der Kammer, P.C. Tromp, T. Hofmann, S. Weigel, Physicochemical characterization of titanium dioxide pigments using various techniques for size determination and asymmetric flow field flow fractionation hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* (2016) 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9783-6>.

- [152] A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski, N. Von Goetz, Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 2242–2250. <https://doi.org/10.1021/es204168d>.
- [153] W. Dufou, H. Terrise, M. Richard-Plouet, E. Gautron, F. Popa, B. Humbert, M.H. Ropers, Criteria to define a more relevant reference samples of titanium dioxide in the context of food: a multiscale approach, *Food Addit. Contam. Part A.* 34 (2017) 653–665.
- [154] I. López-Heras, Y. Madrid, C. Cámara, Prospects and difficulties in TiO₂ nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta.* 124 (2014) 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.029>.
- [155] EFSA, EFSA statement on the review of the risks related to the exposure to the food additive titanium dioxide (E 171) performed by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES), *EFSA J.* 17 (2019). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5714>.
- [156] IARC/NORA, Identification of research needs to resolve the carcinogenicity of high priority IARC carcinogens, *Int. Agency Res. Cancer.* 42 (2009).
- [157] EFSA, Re-evaluation of titanium dioxide (E171) as a food additive. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), *EFSA J.* 4545 (2016).
- [158] M. Younes, G. Aquilina, L. Castle, K.H. Engel, P. Fowler, M.J. Frutos Fernandez, P. Fürst, U. Gundert-Remy, R. Gürtler, T. Husøy, M. Manco, W. Mennes, P. Moldeus, S. Passamonti, R. Shah, I. Waalkens-Berendsen, D. Wölfle, E. Corsini, F. Cubadda, D. De Groot, R. FitzGerald, S. Gunnare, A.C. Gutleb, J. Mast, A. Mortensen, A. Oomen, A. Piersma, V. Plichta, B. Ulbrich, H. Van Loveren, D. Benford, M. Bignami, C. Bolognesi, R. Crebelli, M. Dusinska, F. Marcon, E. Nielsen, J. Schlatter, C. Vleminckx, S. Barmaz, M. Carfí, C. Civitella, A. Giarola, A.M. Rincon, R. Serafimova, C. Smeraldi, J. Tarazona, A. Tard, M. Wright, Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive, *EFSA J.* 19 (2021). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6585>.
- [159] C. Contado, Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical

- problem, *Front. Chem.* 3 (2015) 1–20. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00048>.
- [160] M. Mattarozzi, M. Suman, C. Cascio, D. Calestani, S. Weigel, A. Undas, R. Peters, Analytical approaches for the characterization and quantification of nanoparticles in food and beverages, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 63–80. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9946-5>.
- [161] J.H. Lim, D. Bae, A. Fong, Titanium Dioxide in Food Products: Quantitative Analysis Using ICP-MS and Raman Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 13533–13540. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06571>.
- [162] B. Zhao, X. Cao, R. De La Torre-Roche, C. Tan, T. Yang, J.C. White, H. Xiao, B. Xing, L. He, A green, facile, and rapid method for microextraction and Raman detection of titanium dioxide nanoparticles from milk powder, *RSC Adv.* 7 (2017) 21380–21388. <https://doi.org/10.1039/c7ra02520c>.
- [163] V. Moreno, M. Zougagh, Á. Ríos, Analytical nanometrological approach for screening and confirmation of titanium dioxide nano/micro-particles in sugary samples based on Raman spectroscopy – Capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta.* 1050 (2019) 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.067>.
- [164] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, F. Séby, Study of the presence of micro- and nanoparticles in drinks and foods by multiple analytical techniques, *Food Chem.* 266 (2018) 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.107>.
- [165] M.V. Taboada-López, P. Herbello-Hermelo, R. Domínguez-González, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS, *Talanta.* 195 (2019) 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.023>.
- [166] M. Hadioui, G. Knapp, A. Azimzada, I. Jreije, L. Frechette-Viens, K.J. Wilkinson, Lowering the Size Detection Limits of Ag and TiO₂ Nanoparticles by Single Particle ICP-MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 13275–13284. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04007>.
- [167] M.D. Montaña, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single Particle ICP-MS: Advances toward routine analysis of nanomaterials, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5053–5074. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9676-8>.

- [168] S. Candás-Zapico, D.J. Kutscher, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Single particle analysis of TiO₂ in candy products using triple quadrupole ICP-MS, *Talanta*. 180 (2018) 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.041>.
- [169] M.V. Taboada-López, S. Iglesias-López, P. Herbelo-Hermelo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis for isolating titanium dioxide nanoparticles from bivalve mollusk before sp-ICP-MS, *Anal. Chim. Acta*. 1018 (2018) 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.075>.
- [170] I. De la Calle, M. Menta, F. Séby, Current trends and challenges in sample preparation for metallic nanoparticles analysis in daily products and environmental samples: A review, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 125 (2016) 66–96. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2016.09.007>.
- [171] S. Park, Y. Kim, Feasibility study on the extraction of TiO₂ nanoparticle exposed in the activated sludge using alkaline digestion, *J. Ind. Eng. Chem.* 41 (2016). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.07.001>.
- [172] J. Omar, A. Boix, G. Kerckhove, C. von Holst, Optimisation of asymmetric flow field-flow fractionation for the characterisation of nanoparticles in coated polydisperse TiO₂ with applications in food and feed., *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 33 (2016) 1775–1784. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1239031>.
- [173] L. Sánchez-garcía, E. Bolea, F. Laborda, C. Cubel, P. Ferrer, D. Gianolio, I. Silva, J.R. Castillo, Size determination and quantification of engineered cerium oxide nanoparticles by flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, 1438 (2016) 205–215.
- [174] D. Mahl, J. Diendorf, W. Meyer-Zaika, M. Epple, Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 377 (2011) 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.01.031>.
- [175] Y. Dieckmann, H. Cölfen, H. Hofmann, A. Petri-Fink, Particle size distribution measurements of manganese-doped ZnS nanoparticles, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3889–3895. <https://doi.org/10.1021/ac900043y>.
- [176] B. Fadeel, A.E. Garcia-Bennett, Better safe than sorry: Understanding the

- toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 362–374. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.008>.
- [177] J. Jiang, G. Oberdörster, P. Biswas, Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *J. Nanoparticle Res.* 11 (2009) 77–89. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9446-4>.
- [178] A. Teleki, R. Wengeler, L. Wengeler, H. Nirschl, S.E. Pratsinis, Distinguishing between aggregates and agglomerates of flame-made TiO₂ by high-pressure dispersion, *Powder Technol.* 181 (2008) 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2007.05.016>.
- [179] E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, I. Abad-Álvaro, C. Bladé, L. Arola, J.R.R. Castillo, Detection and characterization of silver nanoparticles and dissolved species of silver in culture medium and cells by AsFIFFF-UV-Vis-ICPMS: application to nanotoxicity tests., *Analyst.* 139 (2014) 914–22. <https://doi.org/10.1039/c3an01443f>.
- [180] G. Singh, C. Stephan, P. Westerhoff, D. Carlander, T. V. Duncan, Measurement methods to detect, characterize, and quantify engineered nanomaterials in foods, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13 (2014) 693–704. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12078>.
- [181] C. Chen, I.M. Marcus, T. Waller, S.L. Walker, Comparison of filtration mechanisms of food and industrial grade TiO₂ nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 6133–6140. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1132-5>.
- [182] Z. Ji, X. Jin, S. George, T. Xia, H. Meng, X. Wang, E. Suarez, H. Zhang, E.M.V. Hoek, H. Godwin, A.E. Nel, J.I. Zink, Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 7309–7314. <https://doi.org/10.1021/es100417s>.
- [183] A. Márquez, T. Berger, A. Feinle, N. Hüsing, M. Himly, A. Duschl, O. Diwald, Bovine Serum Albumin Adsorption on TiO₂ Colloids: The Effect of Particle Agglomeration and Surface Composition, *Langmuir.* 33 (2017) 2551–2558. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03785>.
- [184] E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, J.R. Castillo, Size characterization and

- quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2723–2732. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5201-2>.
- [185] A.C. Lopes, P. Martins, S. Lanceros-Mendez, Aluminosilicate and aluminosilicate based polymer composites: Present status, applications and future trends, *Prog. Surf. Sci.* 89 (2014) 239–277. <https://doi.org/10.1016/j.progsurf.2014.08.002>.
- [186] R. Nosrati, A. Olad, The effect of TiO₂/aluminosilicate nanocomposite additives on the mechanical and thermal properties of polyacrylic coatings, *Appl. Surf. Sci.* 357 (2015) 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.09.019>.
- [187] M. Ghadiri, W. Chrzanowski, R. Rohanzadeh, Biomedical applications of cationic clay minerals, *RSC Adv.* 5 (2015) 29467–29481. <https://doi.org/10.1039/c4ra16945j>.
- [188] A. Sorrentino, G. Gorrasi, V. Vittoria, Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.004>.
- [189] N. Bumbudsanpharoke, S. Ko, Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations, *J. Food Sci.* 80 (2015) R910–R923. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12861>.
- [190] T. V. Duncan, Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors, *J. Colloid Interface Sci.* 363 (2011) 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017>.
- [191] J.Y. Huang, X. Li, W. Zhou, Safety assessment of nanocomposite for food packaging application, *Trends Food Sci. Technol.* 45 (2015) 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.002>.
- [192] G. Choudalakis, A.D. Gotsis, Permeability of polymer/clay nanocomposites: A review, *Eur. Polym. J.* 45 (2009) 967–984. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2009.01.027>.
- [193] M. Farhoodi, Nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Characterization and Safety Evaluation, *Food Eng. Rev.* 8 (2016) 35–51. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9114-2>.

- [194] A. Kausar, K. Naeem, M. Tariq, Z.I.H. Nazli, H.N. Bhatti, F. Jubeen, A. Nazir, M. Iqbal, Preparation and characterization of chitosan/clay composite for direct Rose FRN dye removal from aqueous media: Comparison of linear and non-linear regression methods, *J. Mater. Res. Technol.* 8 (2019) 1161–1174. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2018.07.020>.
- [195] A.B. Neji, M. Jridi, H. kchaou, M. Nasri, R. Dhouib Sahnoun, Preparation, characterization, mechanical and barrier properties investigation of chitosan-kaolinite nanocomposite, *Polym. Test.* 84 (2020) 106380. <https://doi.org/10.1016/j.polymeresting.2020.106380>.
- [196] G. Manohar, K.M. Pandey, S.R. Maity, Effect of china clay on mechanical properties of AA7075/B4C hybrid composite fabricated by powder metallurgy techniques, *Mater. Today Proc.* 45 (2020) 6321–6326. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.10.740>.
- [197] S. Hokkanen, A. Bhatnagar, V. Srivastava, V. Suorsa, M. Sillanpää, Removal of Cd²⁺, Ni²⁺ and PO₄³⁻ from aqueous solution by hydroxyapatite-bentonite clay-nanocellulose composite, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 903–912. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.095>.
- [198] Y. Lu, W. Dong, W. Wang, Q. Wang, A. Hui, A. Wang, A comparative study of different natural palygorskite clays for fabricating cost-efficient and eco-friendly iron red composite pigments, *Appl. Clay Sci.* 167 (2019) 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.10.008>.
- [199] Y.Q. Gill, M. Song, U. Abid, Permeation characterization and modelling of polyethylene/clay nanocomposites for packaging, *Polym. Bull.* 77 (2020) 3749–3765. <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02930-9>.
- [200] O.A. Madyan, M. Fan, Organic functionalization of clay aerogel and its composites through in-situ crosslinking, *Appl. Clay Sci.* 168 (2019) 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.11.017>.
- [201] R. Adhikari, Atomic force microscopy of polymer/layered silicate nanocomposites (PLSNs): A brief overview, *Macromol. Symp.* 327 (2013) 10–19. <https://doi.org/10.1002/masy.201350501>.
- [202] R. Foroutan, R. Mohammadi, A.S. Adeleye, S. Farjadfard, Z. Esvandi, H.

- Arfaenia, G.A. Sorial, B. Ramavandi, S. Sahebi, Efficient arsenic(V) removal from contaminated water using natural clay and clay composite adsorbents, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26 (2019) 29748–29762. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06070-5>.
- [203] M.R. Rahman, S. Hamdan, J.L. Chang Hui, Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetric Analysis (TGA) of Wood polymer nanocomposites, *MATEC Web Conf.* 87 (2017). <https://doi.org/10.1051/mateconf/20178703013>.
- [204] Y. Zhou, M. Hosur, S. Jeelani, P.K. Mallick, Fabrication and characterization of carbon fiber reinforced clay/epoxy composite, *J. Mater. Sci.* 47 (2012) 5002–5012. <https://doi.org/10.1007/s10853-012-6376-4>.
- [205] N. Bumbudsanpharoke, S. Ko, Nanoclays in food and beverage packaging, *J. Nanomater.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/8927167>.
- [206] Reglamento (UE) n° 10/2011, D. Of. La Unión Eur. (2011).
- [207] Norma UNE-EN 13130-1. Materiales y artículos en contacto con alimentos, (2005).
- [208] M. Farhoodi, S.M. Mousavi, R. Sotudeh-Gharebagh, Z. Emam-Djomeh, A. Oromiehie, Migration of aluminum and silicon from PET/clay nanocomposite bottles into acidic food simulant, *Packag. Technol. Sci.* 27 (2014) 161–168. <https://doi.org/10.1002/pts.2017>.
- [209] C. V. Garcia, G.H. Shin, J.T. Kim, Metal oxide-based nanocomposites in food packaging: Applications, migration, and regulations, *Trends Food Sci. Technol.* 82 (2018) 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.021>.
- [210] Y. Echegoyen, C. Nerín, Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers, *Food Chem. Toxicol.* 62 (2013) 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.014>.
- [211] B. Panea, G. Ripoll, J. González, Á. Fernández-Cuello, P. Albertí, Effect of nanocomposite packaging containing different proportions of ZnO and Ag on chicken breast meat quality, *J. Food Eng.* 123 (2014) 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.09.029>.

- [212] Z. Lian, Y. Zhang, Y. Zhao, Nano-TiO₂ particles and high hydrostatic pressure treatment for improving functionality of polyvinyl alcohol and chitosan composite films and nano-TiO₂ migration from film matrix in food simulants, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 33 (2016) 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.10.008>.
- [213] W. Li, C. Zhang, H. Chi, L. Li, T. Lan, P. Han, H. Chen, Y. Qin, Development of antimicrobial packaging film made from poly(lactic acid) incorporating titanium dioxide and silver nanoparticles, *Molecules.* 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/molecules22071170>.
- [214] M.A. Busolo, J.M. Lagaron, Oxygen scavenging polyolefin nanocomposite films containing an iron modified kaolinite of interest in active food packaging applications, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 16 (2012) 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.008>.
- [215] J.Y. Huang, Y.Y. Chieng, X. Li, W. Zhou, Experimental and Mathematical Assessment of Migration from Multilayer Food Packaging Containing a Novel Clay/Polymer Nanocomposite, *Food Bioprocess Technol.* 8 (2015) 382–393. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1408-5>.
- [216] S. Maisanaba, R. Guzmán-Guillén, M. Puerto, D. Gutiérrez-Praena, N. Ortuño, Á. Jos, In vitro toxicity evaluation of new silane-modified clays and the migration extract from a derived polymer-clay nanocomposite intended to food packaging applications, *J. Hazard. Mater.* 341 (2018) 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.003>.
- [217] B. Schmidt, V. Katiyar, D. Plackett, E.H. Larsen, N. Gerds, C.B. Koch, J.H. Petersen, Migration of nanosized layered double hydroxide platelets from polylactide nanocomposite films, *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 28 (2011) 956–966. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.572927>.
- [218] G. Artiaga, K. Ramos, L. Ramos, C. Cámara, M. Gómez-Gómez, Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF4-ICP-MS, *Food Chem.* 166 (2015) 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.139>.
- [219] A.M. Metak, F. Nabhani, S.N. Connolly, Migration of engineered nanoparticles

- from packaging into food products, *LWT - Food Sci. Technol.* 64 (2015) 781–787. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.001>.
- [220] J.C. Hannon, J.P. Kerry, M. Cruz-Romero, S. Azlin-Hasim, M. Morris, E. Cummins, Assessment of the migration potential of nanosilver from nanoparticle-coated low-density polyethylene food packaging into food simulants, *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 33 (2015) 167–178. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1114184>.
- [221] B. Hetzer, A. Burcza, V. Gräf, E. Walz, R. Greiner, Online-coupling of AF4 and single particle-ICP-MS as an analytical approach for the selective detection of nanosilver release from model food packaging films into food simulants, *Food Control.* 80 (2017) 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.040>.
- [222] K. Ramos, M.M. Gómez-Gómez, C. Cámara, L. Ramos, Silver speciation and characterization of nanoparticles released from plastic food containers by single particle ICPMS, *Talanta.* 151 (2016) 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.071>.
- [223] A. Mackevica, M.E. Olsson, S.F. Hansen, Silver nanoparticle release from commercially available plastic food containers into food simulants, *J. Nanoparticle Res.* 18 (2016) 5. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3313-x>.
- [224] A. Nasiri, E. Gastaldi, N. Gontard, S. Peyron, Multi-faceted migration in food contact polyethylene-based nanocomposite packaging, *Appl. Clay Sci.* 198 (2020) 105803. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105803>.
- [225] Y. Echegoyen, S. Rodríguez, C. Nerín, Nanoclay migration from food packaging materials, *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 33 (2016) 530–539. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1136844>.
- [226] L. Ebdon, M. Foulkes, K. Sutton, Slurry nebulization in plasmas, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 213–229. <https://doi.org/10.1039/a604914a>.
- [227] M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using on line sample introduction systems: Current developments and remaining challenges, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 132 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116042>.

- [228] F. Laborda, C. Trujillo, R. Lobinski, Analysis of microplastics in consumer products by single particle-inductively coupled plasma mass spectrometry using the carbon-13 isotope, *Talanta*. 221 (2021) 121486. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121486>.
- [229] M. Loula, A. Kaňa, R. Koplík, J. Hanuš, M. Vosmanská, O. Mestek, Analysis of Silver Nanoparticles Using Single-Particle Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (ICP-MS): Parameters Affecting the Quality of Results, *Anal. Lett.* 52 (2019) 288–307. <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1459657>.
- [230] F.H. Lin, S.I. Miyashita, K. Inagaki, Y.H. Liu, I.H. Hsu, Evaluation of three different sample introduction systems for single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (spICP-MS) applications, *J. Anal. At. Spectrom.* 34 (2019) 401–406. <https://doi.org/10.1039/c8ja00295a>.
- [231] Y. Cao, J. Feng, L. Tang, C. Yu, G. Mo, B. Deng, A highly efficient introduction system for single cell- ICP-MS and its application to detection of copper in single human red blood cells, *Talanta*. 206 (2020) 120174. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120174>.
- [232] L. Mueller, H. Traub, N. Jakubowski, D. Drescher, V.I. Baranov, J. Kneipp, Trends in single-cell analysis by use of ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 6963–6977. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8143-7>.
- [233] M. Tharaud, P. Louvat, M.F. Benedetti, Detection of nanoparticles by single-particle ICP-MS with complete transport efficiency through direct nebulization at few-microlitres-per-minute uptake rates, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 923–933. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03048-y>.
- [234] E. Bolea-fernandez, D. Leite, A. Rua-ibarz, L. Balcaen, F. Vanhaecke, Characterization of SiO₂ Nanoparticles by Single Particle – Inductively Coupled Plasma – Tandem Mass Spectrometry (SP- ICP-MS / MS), *J. Anal. At. Spectrom.* (2017) 43–78.
- [235] F. Aureli, M. D’Amato, A. Raggi, F. Cubadda, Quantitative characterization of silica nanoparticles by asymmetric flow field flow fractionation coupled with online multiangle light scattering and ICP-MS/MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1266–1273. <https://doi.org/10.1039/c4ja00478g>.

- [236] F. Chainet, C.P. Lienemann, J. Ponthus, C. Pécheyrán, J. Castro, E. Tessier, O.F.X. Donard, Towards silicon speciation in light petroleum products using gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry equipped with a dynamic reaction cell, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 97 (2014) 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.04.010>.
- [237] S. Addo Ntim, S. Norris, K. Scott, T.A. Thomas, G.O. Noonan, Consumer use effects on nanoparticle release from commercially available ceramic cookware, *Food Control.* 87 (2018) 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.003>.
- [238] R.F. Egerton, *Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope*, Springer New York, 1996.
- [239] P. Gaines, Elemental analysis of zeolites, Inorganic Ventures Europe S.L., n.d. <http://www.inorganicventures.com/elemental-analysis-zeolites>.
- [240] T. Williamson, J. Han, L. Katz, G. Sant, M.C.G. Juenger, Method for experimentally determining n-a-s(H) solubility, *RILEM Tech. Lett.* 3 (2018) 104–113. <https://doi.org/10.21809/rilemtechlett.2018.63>.
- [241] T. Williamson, L.E. Katz, J. Han, H.A. Dobbs, B.F. Chmelka, G. Sant, M.C.G. Juenger, Relationship between aqueous chemistry and composition, structure, and solubility of sodium aluminosilicate hydrates, *J. Am. Ceram. Soc.* 103 (2020) 2160–2172. <https://doi.org/10.1111/jace.16868>.
- [242] L.A. Currie, Limits for Qualitative Detection and Quantitative Determination: Application to Radiochemistry, *Anal. Chem.* 40 (1968) 586–593. <https://doi.org/10.1021/ac60259a007>.
- [243] K. Loeschner, M. Correia, C. López Chaves, I. Rokkjær, J.J. Sloth, Detection and characterisation of aluminium-containing nanoparticles in Chinese noodles by single particle ICP-MS, *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 35 (2018) 86–93. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1382728>.
- [244] J. Schoon, S. Geißler, J. Traeger, A. Luch, J. Tentschert, G. Perino, F. Schulze, G.N. Duda, C. Perka, A. Rakow, Multi-elemental nanoparticle exposure after tantalum component failure in hip arthroplasty: In-depth analysis of a single case, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 13 (2017) 2415–2423. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.08.004>.

- [245] A. Sápi, A. Kéri, I. Kálomista, D.G. Dobó, A. Szamosvölgyi, K.L. Juhász, A. Kukovecz, Z. Kónya, G. Galbács, Determination of the platinum concentration of a Pt/silica nanocomposite decorated with ultra small Pt nanoparticles using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 996–1003. <https://doi.org/10.1039/c7ja00039a>.
- [246] S.D. Tanner, V.I. Baranov, A dynamic reaction cell for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-DRC-MS). II. Reduction of interferences produced within the cell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10 (1999) 1083–1094. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(99\)00081-1](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(99)00081-1).
- [247] T.W. May, R.H. Wiedmeyer, A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS Isotope Abundance Interference, *At. Spectrosc.* 19 (1998) 150–155. https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74379ATL_TableOfPolyatomicInterferences.pdf
http://www.perkinelmer.co.uk/CMSResources/Images/44-74379ATL_TableOfPolyatomicInterferences.pdf.
- [248] E. Bolea-Fernandez, D. Leite, A. Rua-Ibarz, T. Liu, G. Woods, M. Aramendia, M. Resano, F. Vanhaecke, On the effect of using collision/reaction cell (CRC) technology in single-particle ICP-mass spectrometry (SP-ICP-MS), *Anal. Chim. Acta.* 1077 (2019) 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.077>.
- [249] M.D. Montaña, B.J. Majestic, Å.K. Jämting, P. Westerhoff, J.F. Ranville, Methods for the Detection and Characterization of Silica Colloids by Microsecond spICP-MS, *Anal. Chem.* 88 (2016) 4733–4741. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04924>.
- [250] W.W. Lee, W.T. Chan, Calibration of single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1245–1254. <https://doi.org/10.1039/c4ja00408f>.
- [251] Perkin Elmer Inc., Syngistix software for ICP-MS v2.3, 2017.
- [252] A. Gondikas, F. Von Der Kammer, R. Kaegi, O. Borovinskaya, E. Neubauer, J. Navratilova, A. Praetorius, G. Cornelis, T. Hofmann, Where is the nano? Analytical approaches for the detection and quantification of TiO₂ engineered nanoparticles in surface waters, *Environ. Sci. Nano.* 5 (2018) 313–326. <https://doi.org/10.1039/c7en00952f>.

- [253] A. Hegetschweiler, O. Borovinskaya, T. Staudt, T. Kraus, Single-Particle Mass Spectrometry of Titanium and Niobium Carbonitride Precipitates in Steels, *Anal. Chem.* 91 (2019) 943–950. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04012>.
- [254] S. Bevers, M.D. Montaña, L. Rybicki, T. Hofmann, F. von der Kammer, J.F. Ranville, Quantification and Characterization of Nanoparticulate Zinc in an Urban Watershed, *Front. Environ. Sci.* 8 (2020) 1–16. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00084>.
- [255] P. Vera, Y. Echevoyen, E. Canellas, C. Nerín, M. Palomo, Y. Madrid, C. Cámara, Nano selenium as antioxidant agent in a multilayer food packaging material, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 6659–6670. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9780-9>.

VI. ANEXOS

ANEXO 1. ESTUDIO DE LA EFICIENCIA EN LA SEPARACIÓN DE NPs EN AF4 MEDIANTE EL USO DE CANALES CORTOS

A1.1. Estudio del efecto de la focalización en la eficiencia de separación en AF4

Se estudió la dispersión debida a los efectos de inyección/focalización y su efecto en la eficiencia de separación en AF4. Para ello, se modificaron los parámetros instrumentales de la etapa de focalización: el caudal del flujo cruzado y el tiempo de focalización, empleando el canal convencional. El flujo cruzado fue estudiado a tres caudales diferentes: 0,5, 1 y 1,5 mL min⁻¹ (Figura A1.1); mientras que los tiempos de focalización considerados fueron de 5, 7 y 9 min (Figura A1.2). Para cada una de estas condiciones se calculó la eficiencia experimental correspondiente (H_{exp}), mostradas en la Tabla A1.1, para comparar los efectos que puedan tener en la separación.

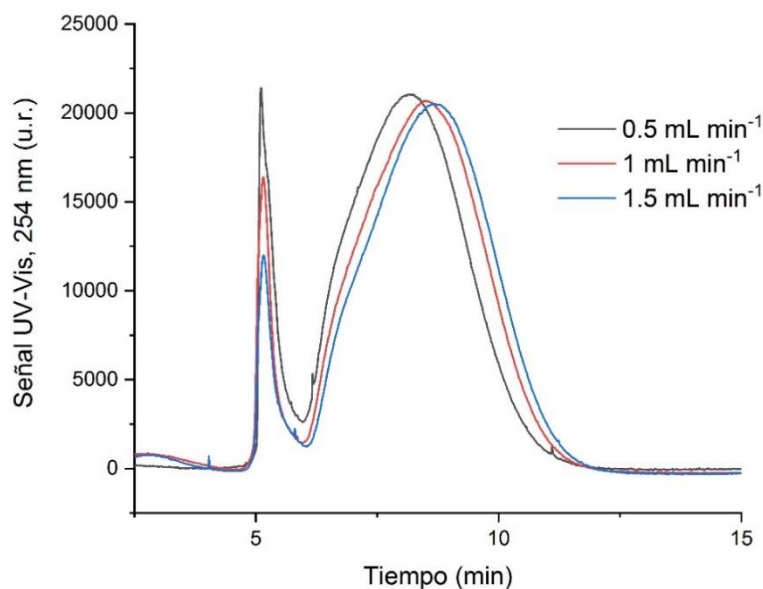


Figura A1.1. Fractogramas de separación del estándar de PS de 100 nm (suspensión de 30 mg L⁻¹) a diferentes caudales de flujo cruzado. Etapa de focalización de 5 minutos.

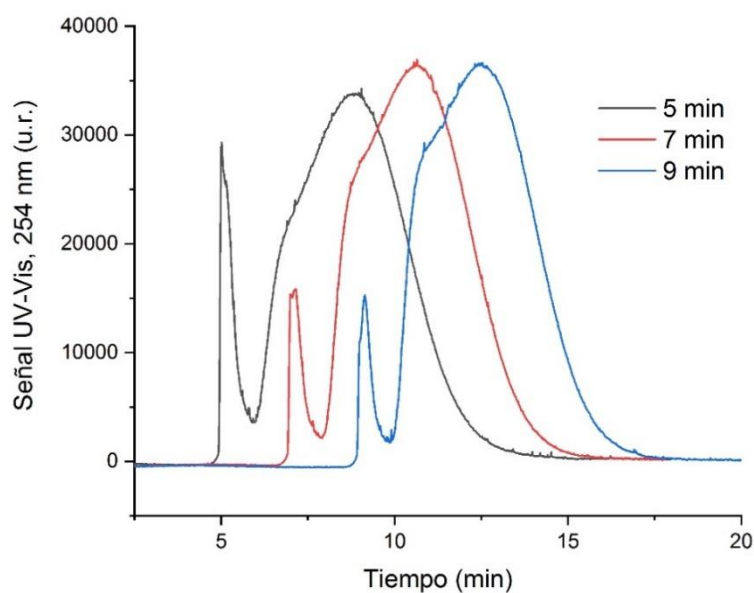


Figura A1.2. Fractogramas de separación del estándar de PS de 100 nm (suspensión de 30 mg L^{-1}) a diferentes tiempos de focalización, empleando un caudal de flujo cruzado de 0,5 $mL\ min^{-1}$.

Tabla A1.1. Resultados de eficiencias experimentales (H_{exp}) en función de dos variables que determinan la dispersión de relajación en la separación: el caudal de flujo cruzado y el tiempo de focalización. Caso específico de estándar de PS de 100 nm (suspensión 30 $mg\ L^{-1}$).

Variable instrumental: caudal de flujo cruzado en focalización				
	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Parámetro λ	H_{exp} (cm)
0,5 $mL\ min^{-1}$	4,09	2,98	$4,44 \times 10^{-2}$	2,24
1 $mL\ min^{-1}$	4,42	3,14	$4,40 \times 10^{-2}$	2,13
1,5 $mL\ min^{-1}$	4,59	3,16	$4,20 \times 10^{-2}$	1,99
Variable instrumental: tiempo de focalización				
	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Parámetro λ	H_{exp} (cm)
5 min	4,73	4,05	$3,78 \times 10^{-2}$	3,09
7 min	4,49	3,92	$4,26 \times 10^{-2}$	3,21
9 min	4,44	3,90	$4,28 \times 10^{-2}$	3,24

A1.2. Estudio de las eficiencias de separación a través del número de platos experimentales a diferentes caudales de flujo cruzado y para partículas de estándares de PS de diferentes tamaños nominales

La eficiencia de separación no solo se estudió para ambos tipos de canales a través de la altura de plato equivalente (H). Se comparó también en función del número de platos (N), un parámetro que permite la comparación de la eficiencia de separación de forma directa, aunque las longitudes de los canales sean diferentes. A partir de la Ec. 1.11, con la que se calcularon las eficiencias experimentales ($H_{exp} = \frac{L \sigma^2}{5.54 t_p^2}$), y sabiendo que $N = \frac{L}{H}$, se calculó el número de platos experimentales para ambos tipos de canales, SC y SLC.

Las eficiencias se determinaron para las mismas condiciones que en las Tablas 1.3 y 1.4, en las que la separación se realizó a diferentes caudales de flujo cruzado y para estándares de partículas de PS de distintos tamaños nominales, respectivamente. En el caso del flujo cruzado, se aplicaron caudales de 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 mL min⁻¹ para el estándar de 100 nm de PS (Tabla A1.2). En el estudio en función del diámetro nominal de partícula, se separaron estándares de tamaño de PS de 50, 100, 200 y 500 nm a un caudal de flujo cruzado de 0,1 mL min⁻¹ (Tabla A1.3).

Tabla A1.2. Resultados de eficiencias de separación en términos de altura de plato (H) y número de platos experimentales (N) en función del caudal de flujo cruzado. Los resultados se obtuvieron para el estándar de 100 nm de PS (suspensión de 30 mg L⁻¹) con un caudal de salida de 1 mL min⁻¹.

Flujo cruzado	Canal convencional (SC) Longitud efectiva (L = 23,3 cm)		Canal corto (SLC) Longitud efectiva (L = 9,8 cm)	
	H _{exp} (cm)	N _{exp}	H _{exp} (cm)	N _{exp}
0,1 mL min ⁻¹	2,28	10	0,42	24
0,2 mL min ⁻¹	0,94	25	0,30	33
0,4 mL min ⁻¹	0,42	55	0,21	46
0,8 mL min ⁻¹	0,30	79	0,16	61

Tabla A1.3. Resultados de eficiencias de separación en términos de altura de plato (H) y número de platos experimentales (N) en función del tamaño de partícula, para unas condiciones de caudales constantes: flujo cruzado de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ y caudal de salida de 1 mL min^{-1} . Se analizaron suspensiones de estándares de PS de diferentes tamaños nominales (30 mg L^{-1}): 50, 100, 200 y 500 nm.

Tamaño de partícula	Canal convencional (SC)		Canal corto (SLC)	
	Longitud efectiva ($L = 23,3 \text{ cm}$)		Longitud efectiva ($L = 9,8 \text{ cm}$)	
	$H_{\text{exp}} \text{ (cm)}$	N_{exp}	$H_{\text{exp}} \text{ (cm)}$	N_{exp}
50 nm	2,55	9	0,56	17
100 nm	2,28	10	0,42	24
200 nm	1,45	16	0,38	26
500 nm	0,79	29	0,30	32

A1.3. Comparativa de resultados de separación obtenidos para los canales de dimensiones convencionales (SC) y de longitud reducida (SLC), bajo unas mismas condiciones de velocidad de flujo cruzado

Se estudió la separación en los dos canales para unas mismas condiciones de velocidad de flujo cruzado ($|u_c|$). Para aplicarse una misma fuerza de campo es necesario aumentar el caudal de flujo cruzado en el SC hasta que sea el doble respecto al SLC, dado que el área es aproximadamente la mitad en el canal corto ($|u_c| = \frac{\dot{V}_c}{A}$). De este modo, se compararon los resultados de separación para dos estándares de tamaño de PS (100 y 200 nm) en términos de tiempo de retención, anchuras de pico, recuperaciones y resoluciones para dos velocidades de flujo cruzado: $6,5 \times 10^{-3}$ y $1,3 \times 10^{-2} \text{ mL min}^{-1} \text{ (cm}^2\text{)}^{-1}$.

Tabla A1.4. Resultados experimentales de separación para estándares de PS de 100 y 200 nm de tamaño nominal (suspensiones de 30 mg L⁻¹) para las mismas velocidades de flujo cruzado ($|u_c|$) en ambos canales. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar ($n=3$). Caudal de salida de 1 mL min⁻¹.

Velocidad de flujo cruzado ($ u_c $): 6,5×10 ⁻³ mL min ⁻¹ (cm ²) ⁻¹						
Canal (área)	Caudal de flujo cruzado	Estándar PS	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Recuperación (%)	Resolución 100-200 nm PS
SC (32,5 cm ²)	0,2 mL min ⁻¹	100 nm	6,12 \pm 0,01	2,90 \pm 0,05	71,9 \pm 1,9	1,29
		200 nm	10,37 \pm 0,13	3,67 \pm 0,07	67,3 \pm 2,5	
SLC (15,5 cm ²)	0,1 mL min ⁻¹	100 nm	3,69 \pm 0,04	1,79 \pm 0,04	88,6 \pm 2,1	1,20
		200 nm	6,59 \pm 0,07	3,06 \pm 0,03	88,2 \pm 0,4	
Velocidad de flujo cruzado ($ u_c $): 1,3×10 ⁻² mL min ⁻¹ (cm ²) ⁻¹						
Canal (área)	Caudal de flujo cruzado	Estándar PS	t_r (min)	Anchura de pico (min)	Recuperación (%)	Resolución 100-200 nm PS
SC (32,5 cm ²)	0,4 mL min ⁻¹	100 nm	9,36 \pm 0,03	2,96 \pm 0,01	72,0 \pm 1,2	1,81
		200 nm	16,31 \pm 0,11	4,71 \pm 0,03	63,6 \pm 1,6	
SLC (15,5 cm ²)	0,2 mL min ⁻¹	100 nm	5,35 \pm 0,10	2,20 \pm 0,03	82,8 \pm 0,8	1,81
		200 nm	12,16 \pm 0,01	5,21 \pm 0,01	85,5 \pm 1,1	

ANEXO 2. ANÁLISIS DE PARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO MEDIANTE AF4-DLS-ICP-MS Y SP-ICP-MS

A2.1. Optimización de la extracción alcalina de TiO₂ NPs en muestras de surimi

Se realizaron unos ensayos preliminares basados en la agitación mecánica de los lixiviados de partículas de TiO₂ en surimis, para los que se obtuvieron bajos rendimientos de extracción, incluso para tiempos prolongados. Se consideró la opción del uso de ultrasonidos para acelerar el procedimiento de extracción, en el que se empleó un sistema de baño en lugar de sonda, debido a problemas relacionados con contaminación de Ti disuelto cuando la estrategia empleada es esta última [169].

Las condiciones de frecuencia se fijaron a 7 kHz para el tratamiento en baño de ultrasonidos. Se estudiaron parámetros como el porcentaje de TMAH, el volumen de extractante y el tiempo de extracción. Para la optimización de las condiciones, se evaluaron los resultados en términos de concentraciones en número de partículas de TiO₂ y de las distribuciones de tamaño, obtenidas mediante SP-ICP-MS (Figuras A2.1 y A2.2).

El efecto del porcentaje de TMAH en la disolución de extracción se estudió para concentraciones del 5, 10, 15 y 20% (v/v), con diluciones en agua ultrapura. Además, se empleó TMAH comercial al 25% (v/v en agua). Varias submuestras de surimi FZ12 se mezclaron con un volumen fijo de TMAH de 2 mL en función del porcentaje empleado, y posteriormente se sometieron a baño de ultrasonidos durante 1 hora. Cada disolución se preparó por triplicado, con dos blancos para cada concentración de TMAH. Los resultados de la Figura A2.1a muestran que la eficiencia de extracción no depende del porcentaje de TMAH empleado, con concentraciones en número similares, comprendidas en un rango de $2,02 \times 10^9$ a $2,32 \times 10^9$ TiO₂ NPs g⁻¹. En términos de distribución de tamaño, los resultados tampoco mostraron variaciones, con tamaños promedio comprendidos entre 218 y 233 nm y tamaños más frecuentes de 116 a 153 nm (Figura A2.2a). La repetitividad de las medidas empeoró, sin embargo, cuando se utilizó el extractante con mayores niveles de concentración, por lo que se escogió el porcentaje de 10% (v/v) de TMAH para las extracciones.

El efecto del tiempo de sonicación en el aislamiento de TiO₂ NPs se evaluó en las condiciones de 10% (v/v) de TMAH en un volumen de 2 mL. Los resultados en la Figura

A2.1b muestran que, tanto para tiempos de sonicación reducidos como más prolongados, se obtuvieron altos valores de concentración de partículas de TiO_2 en número. Para tiempos de 30 minutos y 1 hora, así como para las condiciones de tiempo más largas (4 horas), se observaron concentraciones ligeramente inferiores. Estos resultados pueden ser atribuidos a un rendimiento de extracción más bajo para los casos de menor tiempo y a fenómenos de re-adsorción y/o interacciones de las partículas con productos degradados (como proteínas hidrolizadas), procedentes del surimi para tiempos de sonicación más largos. En la Figura A2.2b no se observan diferencias en las distribuciones de tamaño en función del tiempo de sonicación, con tamaños promedio de 184 a 198 nm, aunque para el menor de los tiempos de extracción se obtuvieron resultados de tamaños más grandes, con valores de 214 nm. El mismo comportamiento se observa en relación a los tamaños más frecuentes en las distribuciones, con resultados de 140 nm para un tiempo de sonicación de 30 minutos frente a los 84 ± 1 , 81 ± 5 , 78 ± 4 nm para tiempos de 1, 2 y 4 horas, respectivamente. A partir de estos resultados se dedujo que la interacción entre las partículas de menor tamaño de TiO_2 y la matriz orgánica de surimi es superior a la que pueda haber con las partículas de mayor tamaño, lo que justificaría las diferencias observadas. Basándose en estos resultados, se estableció un tiempo de 2 horas como el óptimo para la extracción.

Finalmente, se estudió el volumen de extractante empleado con una concentración de TMAH del 10% (v/v), considerando un rango de 1 a 5 mL. Los resultados en la Figura A2.1c muestran que el rendimiento de extracción disminuye cuando se emplean volúmenes de 1 y 5 mL. En términos de distribuciones de tamaños de partícula, mostrados en la Figura A2.2c, se observa que la extracción obtenida con un volumen de 1 mL se muestra ineficiente, en la que solo se lixivian las partículas de mayor tamaño. Para el resto de volúmenes no se observan diferencias en las distribuciones, por lo que se escogió un volumen de 2 mL.

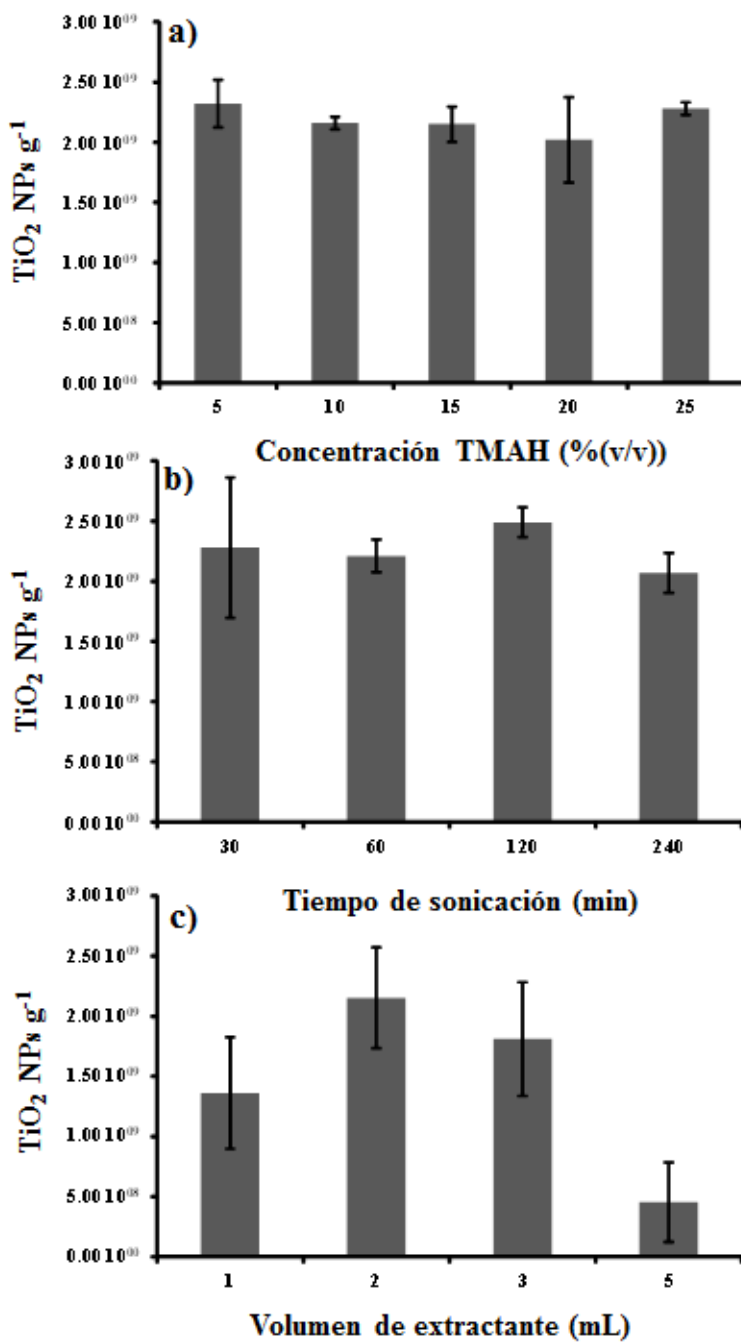


Figura A2.1. Extracción de TiO_2 NPs en surimis en términos de concentración en número, determinados mediante SP-ICP-MS, en función del efecto de a) el porcentaje de TMAH, b) el tiempo de sonicación y c) el volumen de extractante (10%, v/v).

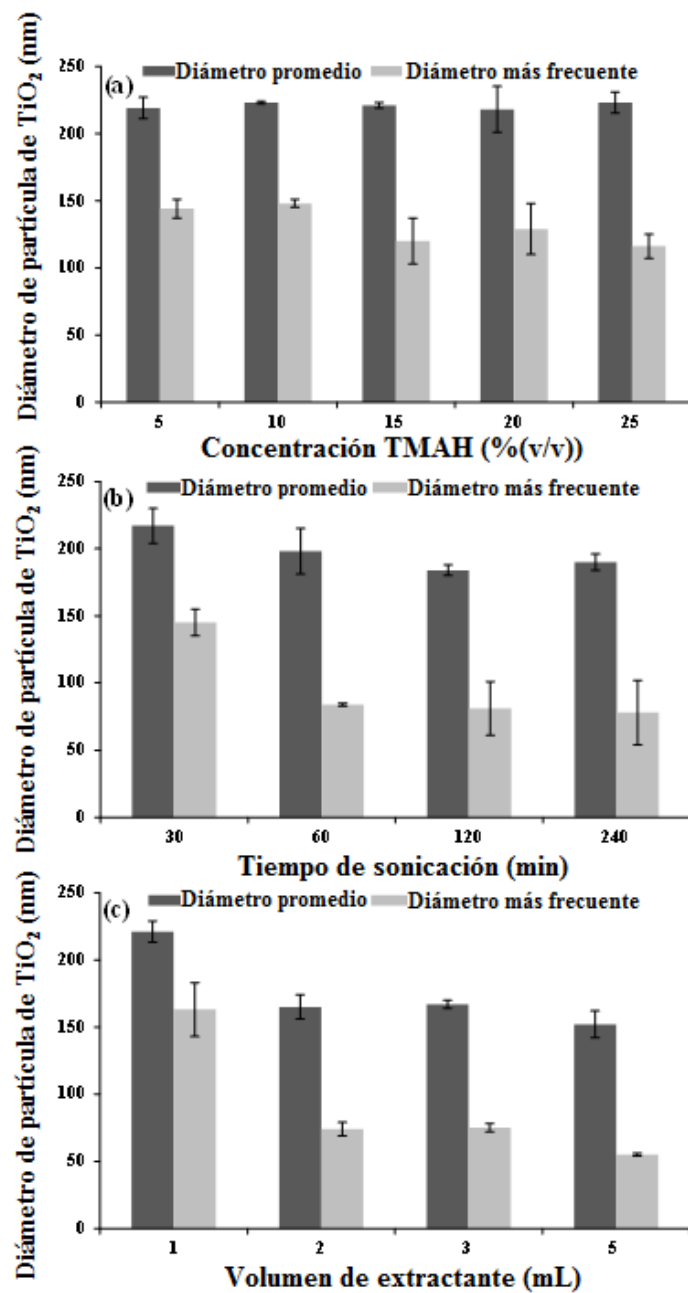


Figura A2.2. Extracción de TiO_2 NPs en surimis en términos de tamaño de partícula promedio y tamaño más frecuente, determinados mediante SP-ICP-MS, en función del efecto de a) el porcentaje de TMAH, b) el tiempo de sonicación y c) el volumen de extractante (10%, v/v).

A2.2. Estudio del producto Fotoactiva 23 aplicado sobre una superficie cerámica mediante FESEM

Para la obtención de las imágenes en FESEM de las superficies cerámicas se utilizó el detector de electrones secundarios, trabajando con una tensión de haz de 15 kV y una corriente de 150-200 pA. Las imágenes obtenidas mediante FESEM confirmaron que la aplicación del producto sobre la superficie esmaltada de la cerámica formaba un recubrimiento en apariencia homogéneo, como se muestra en la Figura A2.3.

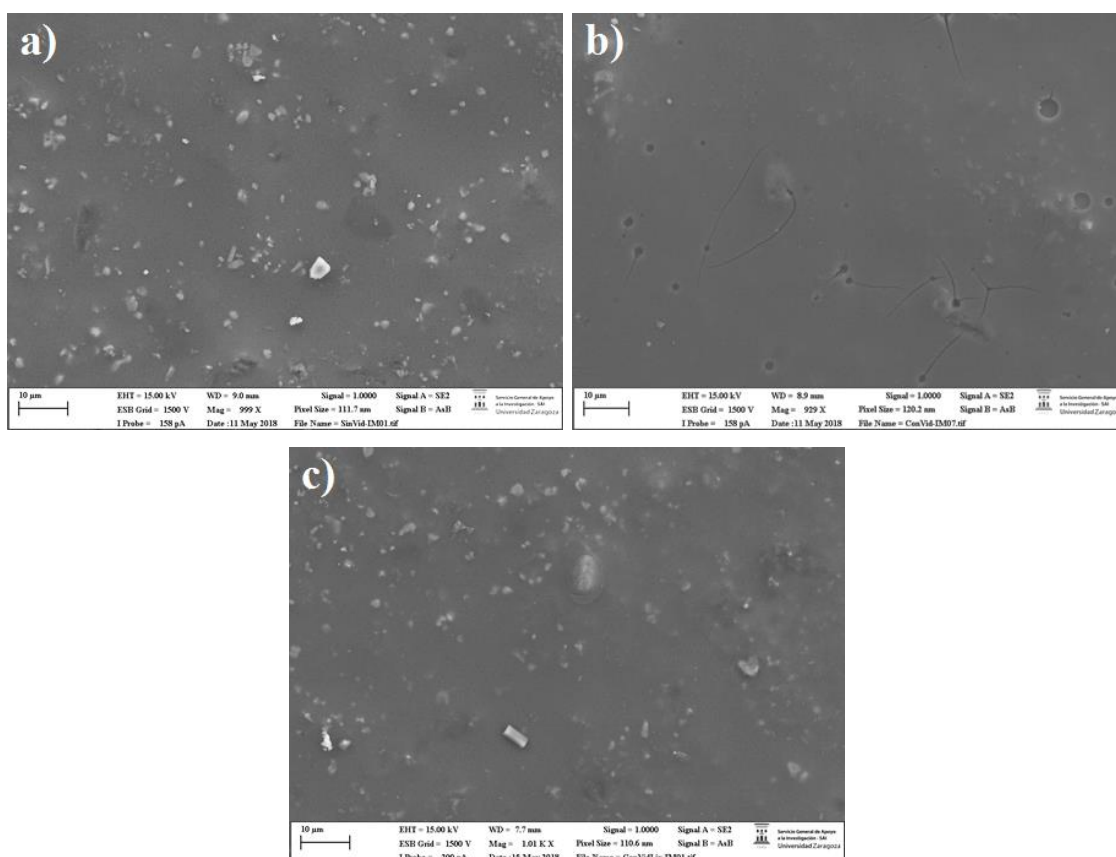


Figura A2.3. Imágenes en FESEM de electrones secundarios del producto de recubrimiento fotocatalítico NP Fotoactiva 23 aplicado sobre la superficie esmaltada de una cerámica. a) y b) Sin proceso de lixiviación. c) Tras lixiviar la cerámica con el producto aplicado. La escala representa 10 μm.

La cerámica con el producto aplicado se sometió al procedimiento de lixiviación especificado en la Sección 2.2.5. Su análisis en FESEM, mostrado en la Figura A2.3c, permitió observar que no se produjeron alteraciones significativas en la superficie tras la lixiviación. De forma análoga, se estudió la aplicación del producto sobre la cara porosa sin lixiviación (Figura A2.4a y b) y tras su lixiviación (Figura A2.4c).

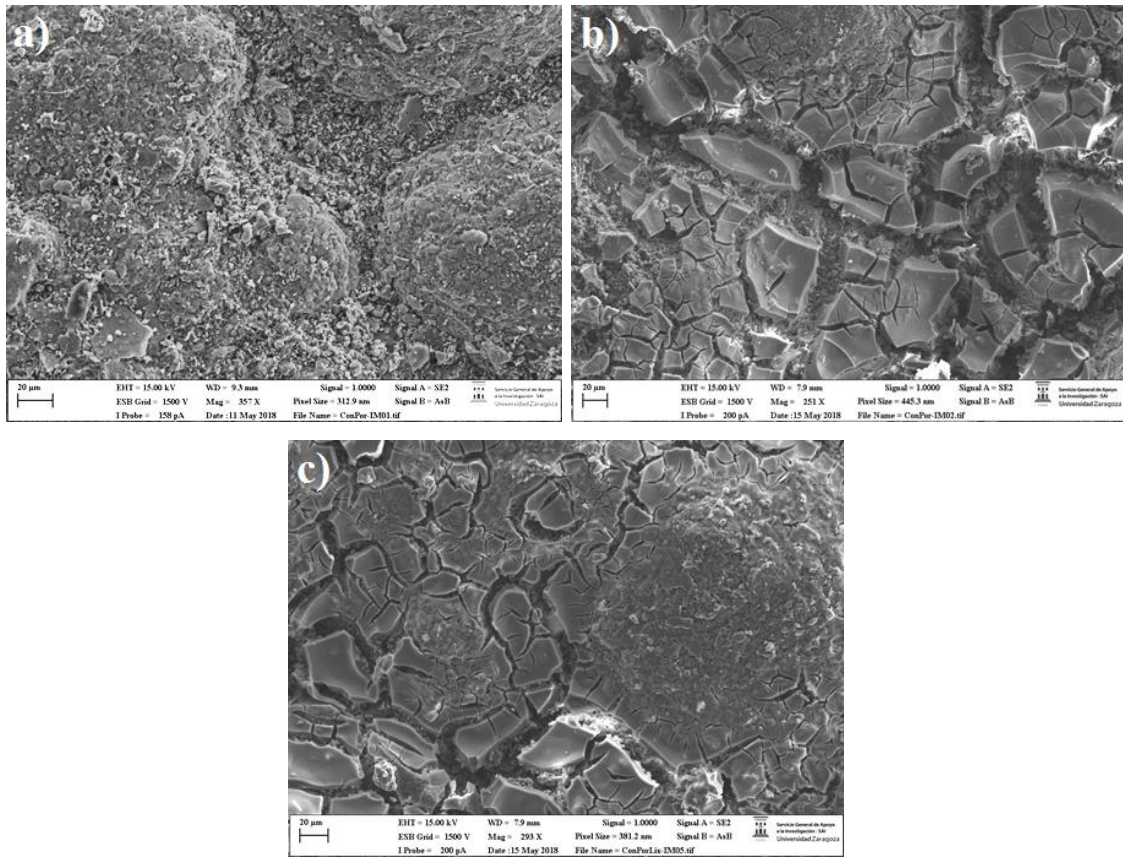


Figura A2.4. Imágenes en FESEM de electrones secundarios del producto de recubrimiento fotocatalítico NP Fotoactiva 23 aplicado sobre la superficie porosa de una cerámica. a) y b) Sin proceso de lixiviación. c) Tras lixiviar la cerámica con el producto aplicado. La escala representa 20 μm .

ANEXO 3. DESARROLLO DEL MÉTODO BASADO EN SP-ICP-MS PARA EL ANÁLISIS DE PARTÍCULAS DE ALUMINOSILICATOS

A3.1. Estudio del efecto del medio de suspensión en los niveles de línea base

Se estudió la filtración del medio (agua ultrapura) en el que se realizaron los análisis de los estándares de SiO₂ para comprobar si había algún efecto en los niveles de señal de fondo, que a su vez mejoraran los límites de detección del método. Para ello, se analizaron blancos de agua ultrapura sin filtrar y tras un proceso de filtración con filtros de 0,2 μm de tamaño de poro. De este modo, se compararon los barridos de intensidades y los histogramas en ambos casos, mostrados en la Figura A3.1.

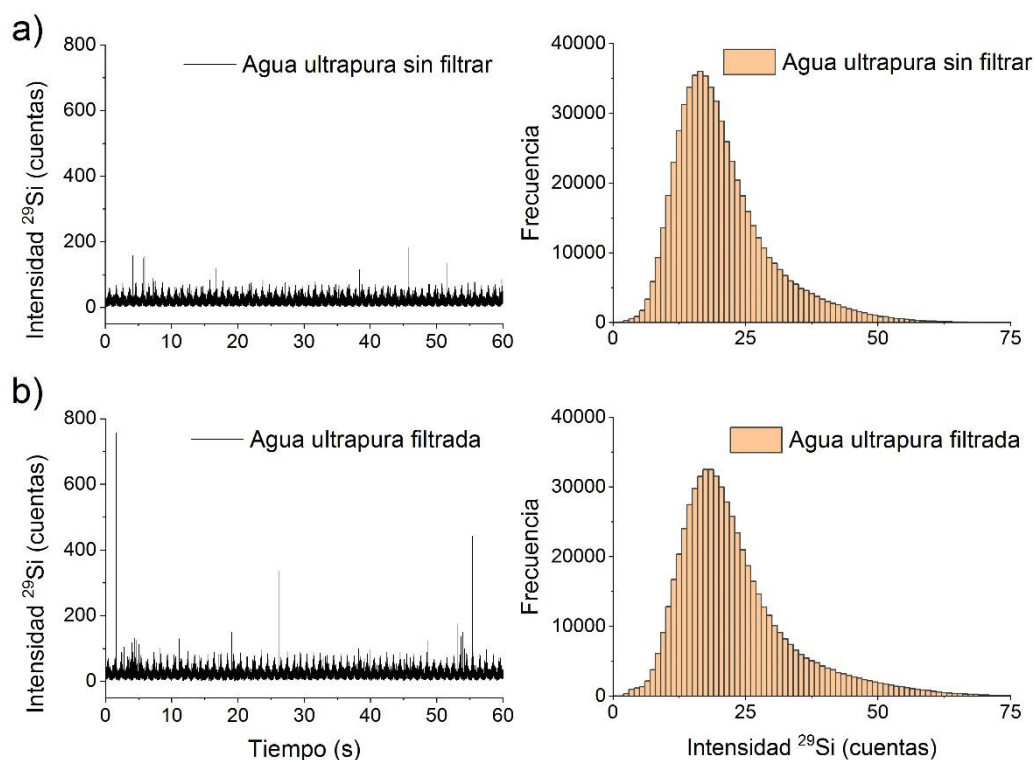


Figura A3.1. Barridos de intensidad e histogramas correspondientes al medio (agua ultrapura) en el que se realizan los análisis de los estándares de partículas de SiO₂, a) sin filtrar y b) filtrado (0,2 μm de tamaño de poro). Análisis realizados monitorizando el isótopo ²⁹Si.

No se observaron diferencias en los histogramas entre el agua ultrapura filtrada y sin filtrar, a excepción del aumento del número de eventos para intensidades superiores a 50 cuentas. Las intensidades promedio se presentan en la Tabla A3.1 con resultados muy similares, en ambos casos de alrededor de 20 cuentas, para los cuales se determinaron

unos límites de detección de aproximadamente 400 nm. El número de eventos por encima del valor crítico establecido (100 cuentas) estuvo por debajo de 15 eventos detectados, por lo que no hubo variación en el límite de detección en concentración en número de partículas. Se concluyó que la filtración del medio no tenía ninguna incidencia en la intensidad de la línea base y que, por tanto, no mejoraba los LOD para el método basado en SP-ICP-MS.

Tabla A3.1. Resultados para el análisis de agua ultrapura filtrada (0,2 μm de tamaño de poro) y sin filtrar en SP-ICP-MS para ^{29}Si . Intensidades y número de eventos mostrados como el promedio \pm desviación estándar.

Blanco agua ultrapura	Intensidad promedio (cuentas)^a	LOD_{tamaño} SiO₂ (nm)	Nº eventos^b	LOD_{núm} (part. SiO₂ L⁻¹)
Sin filtrar	20 \pm 16	402	9 \pm 3	3,32 \times 10 ⁶
Filtrado (0,2 μm)	22 \pm 18	422	13 \pm 2	3,87 \times 10 ⁶

^a n = 600000 datos en un barrido (tiempo de lectura de 60 s)

^b n = 3 réplicas

A3.2. Estudio de tratamiento de línea base con Origin Data Analysis

Con el objetivo de reducir el efecto de los pulsos procedentes de la bomba peristáltica en la línea base para el análisis con el isótopo ^{29}Si , se estudió la posibilidad de un tratamiento de datos con un software de análisis de datos (Origin Data Analysis 2019b, OriginLab Inc), como alternativa a Syngistix. Para ello, en primer lugar, se determinó qué tipo de procedimiento emplea el software desarrollado por Perkin Elmer en la discriminación e integración de picos. De acuerdo con la guía del software Syngistix (ref), la detección requiere la determinación de un valor crítico (Y_C), de forma que los picos que quedan por debajo de ese valor crítico en los barridos de intensidades se eliminan a través de un reprocesado iterativo. Se registra el máximo de cada pico detectado y se calcula el número de puntos promedio correspondientes al pico de una partícula. La señal promedio de la línea base se sustrae y se integran los picos para obtener su intensidad. A partir de los valores de intensidad se calculan los valores de masa con la calibración de estándares disueltos y, finalmente, se determinan los tamaños de partícula (Syngistix, Inc.).

Este procedimiento se comparó con un procesamiento mediante Origin. En este caso, se utilizó un suavizado inicial de la línea base con ajuste de mínimos cuadrados, en el que se aplica un factor de suavizado y un número de iteraciones determinado, con el objetivo de aislar el componente del ruido debido a la bomba peristáltica para su posterior sustracción. El resultado es la obtención de un barrido de intensidades como el que se muestra en la Figura A3.2 para el estándar de SiO₂ de 500 nm.

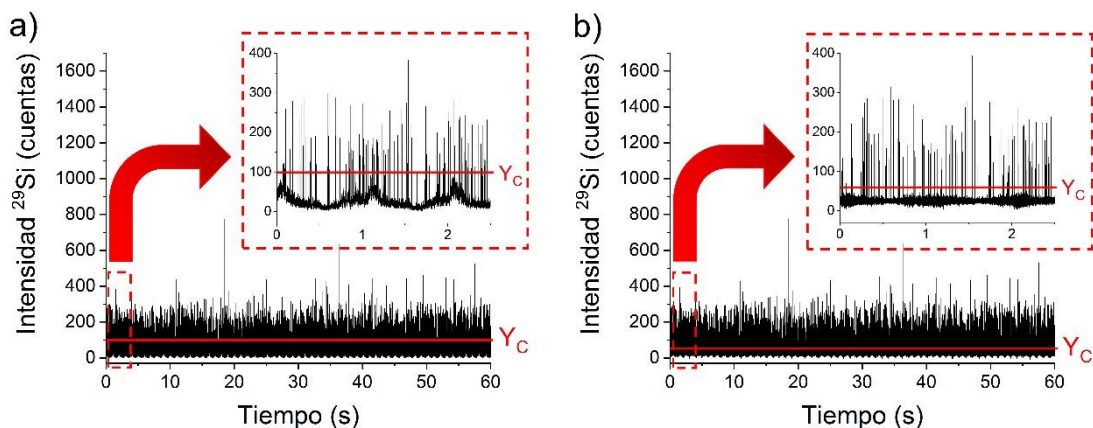


Figura A3.2. Barridos de intensidad a) sin sustracción y b) con sustracción de línea base a través de Origin, correspondientes al estándar de 500 nm de SiO₂ en SP-ICP-MS. Y_c determinado en 100 y 55 cuentas de intensidad para línea base sin tratar y tratada con Origin, respectivamente.

Con la señal de la línea base ya tratada, se aplica un valor crítico específico y se procede a la detección de picos, de forma análoga a la realizada por Syngistix. El tratamiento de la línea base con Origin supone una mejora de los niveles de incertidumbre en la línea base, como se puede observar para los blancos de agua ultrapura en la Tabla A3.2, debido a la reducción de la contribución de los pulsos. Esto conlleva una mejora en el límite de detección en tamaño para partículas de SiO₂, que se reduce en casi 100 nm. Sin embargo, el conteo de picos posterior no resulta satisfactorio, con detecciones de un número de eventos significativamente mayor, lo que produce un aumento del límite de detección en número de partículas.

Tabla A3.2. *Resultados de intensidades de línea base para blanco de agua ultrapura sin tratamiento en Syngistix y con tratamiento con Origin para ^{29}Si . No se muestran promedios ni valores de incertidumbre en el número de eventos al ser resultados específicos para medidas concretas.*

Blanco de agua ultrapura	Intensidad promedio línea base (cuentas)*	Y_C (cuentas)	$\text{LOD}_{\text{tamaño}}$ SiO_2 (nm)	Nº eventos	$\text{LOD}_{\text{número}}$ (part. $\text{SiO}_2 \text{ L}^{-1}$)
Sin tratamiento (Syngistix)	28 ± 14	100	425	5	$2,61 \times 10^6$
Con tratamiento (Origin)	25 ± 6	55	315	29860	$1,59 \times 10^8$

* n = 600000 datos en un barrido (tiempo de lectura de 60 s)

Los problemas observados en Origin para el conteo de picos se confirmaron con el análisis de los estándares de 500 y 1000 nm, con rendimientos de nebulización por encima del 100% (Tabla A3.3).

Tabla A3.3. *Resultados de número de eventos detectados como partículas en estándares de SiO_2 en función del programa de tratamiento de datos empleado. Entre paréntesis se muestran los rendimientos correspondientes al número de picos determinado. No se muestran promedios ni valores de incertidumbre, al ser resultados específicos para medidas concretas.*

Estándar SiO_2	Nº eventos Syngistix	Nº eventos Origin
500 nm	1420 (17,0%)	70510 (> 100%)
1000 nm	2789 (32,2%)	34000 (> 100%)

A3.3. Estudio del límite superior del método por saturación del detector

Se muestran los resultados tabulados de los perfiles de picos estudiados para los estándares de partículas de SiO_2 de 1000 y 2000 nm de tamaño nominal. La determinación de tamaños se calculó utilizando las Ecs. 8 y 9 de la Sección 3.2 del Apartado I de la Tesis, que relacionan señales de intensidad con masas a través de la calibración correspondiente con estándares de Si disuelto, y finalmente con tamaños conociendo la composición, forma y densidad de la partícula. Las densidades para los estándares de 1 y

2 μm fueron de 2,2 y 1,8 g cm^{-3} , respectivamente, especificadas por el fabricante (ver Sección 3.2.2).

Tabla A3.4. Resultados de determinación de tamaño para el pico #1 del estándar de 2 μm , correspondiente al perfil de la Figura 3.8b. Valor crítico (Y_c) de 100 cuentas.

Tiempo (s)	Intensidad – Y_c (cuentas)	Sum. de intensidades (cuentas)	Masa (μg)	Diámetro (nm)
27,3796	363			
27,3797	1275			
27,3798	1462			
27,3799	1350	5607	$1,12 \times 10^{-6}$	1363
27,3800	875			
27,3801	271			
27,3802	11			

Tabla A3.5. Resultados de determinación de tamaño para el pico #2, del estándar de 1 μm , correspondiente al perfil de la Figura 3.9b. Valor crítico (Y_c) de 100 cuentas.

Tiempo (s)	Intensidad – Y_c (cuentas)	Sum. de intensidades (cuentas)	Masa (μg)	Diámetro (nm)
53,6045	4			
53,6046	793			
53,6047	1325	2743	$6,31 \times 10^{-7}$	1054
53,6048	564			
53,6049	57			

Tabla A3.6. Resultados de determinación de tamaño para el pico modelizado, correspondiente a la Figura 3.10. Valor crítico (Y_C) de 100 cuentas.

Tiempo (s)	Intensidad – Y_C (cuentas)	Sum. de intensidades (cuentas)	Masa (μg)	Diámetro (nm)
1,0001	40			
1,0002	350			
1,0003	900			
1,0004	1460	4040	$9,33 \times 10^{-7}$	1201
1,0005	900			
1,0006	350			
1,0007	40			

A3.4. Determinaciones de espesores para partículas de caolinita en imágenes TEM

La determinación de un espesor promedio para el cálculo de los diámetros equivalentes de las partículas de caolinita observadas en TEM se realizó mediante espectroscopía de pérdida de energía de electrón (EELS). Para ello, se compararon los resultados obtenidos a través de dos métodos diferentes, que corresponden al log-ratio absoluto y a la suma de Kramers-Kronig (ver Sección 3.2.1). Debido a la agregación de partículas observada en las imágenes (Figura A3.3), se distinguen entre partículas individuales y agregados para determinar un valor promedio en cada caso.

El análisis con un test-t (nivel de confianza del 95%) de los resultados de espesores promedio permitió concluir que no había diferencias significativas entre los métodos aplicados. A partir de los promedios obtenidos con ambos métodos en el caso de las partículas individuales (Tabla A3.7) y de los agregados (Tabla A3.8) observados, se estimaron unos valores de 50 nm y de 80 nm, respectivamente, para el cálculo posterior de los diámetros equivalentes, al que se dedica el Anexo 3.5.

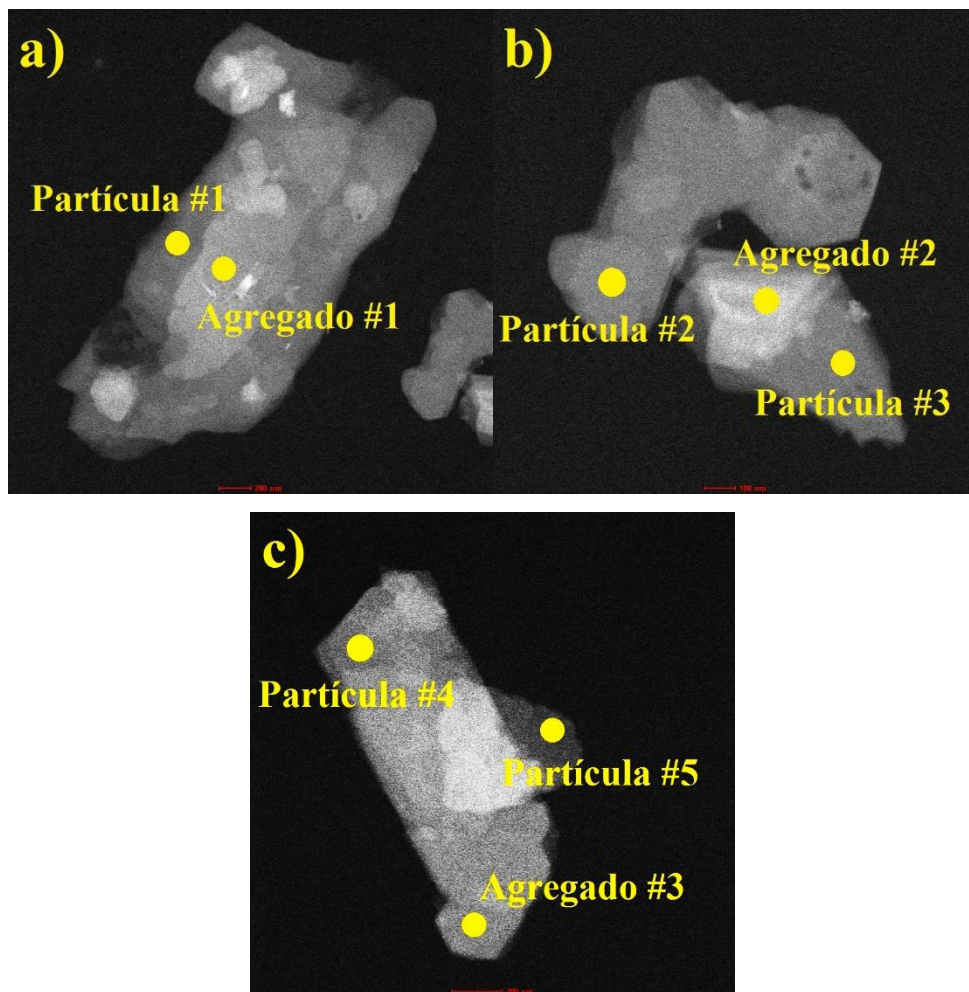


Figura A3.3. Imágenes en HAADF-TEM de partículas de caolín (fracción inferior a 1 μm) para la determinación de espesores mediante EELS.

Tabla A3.7. Determinación de espesores para partículas individuales de caolinita mediante EELS en función del método empleado. Resultados mostrados como el promedio \pm desviación estándar ($n=5$).

		Método de determinación de espesor (nm)	
		Log-ratio absoluto	Kramers-Kronig
Imagen a)	Partícula #1	58,99	53,89
Imagen b)	Partícula #2	55,49	53,77
	Partícula #3	45,60	48,26
Imagen c)	Partícula #4	55,94	53,23
	Partícula #5	64,72	57,36
Espesor promedio (nm)		56,15 \pm 6,22	53,30 \pm 2,91

Tabla A3.8. *Determinación de espesores para partículas agregadas de caolinita mediante EELS en función del método empleado. Resultados mostrados como el promedio \pm desviación estándar ($n=3$).*

		Método de determinación de espesor (nm)	
		Log-ratio absoluto	Kramers-Kronig
Imagen a)	Agregado #1	81,72	81,20
Imagen b)	Agregado #2	72,75	66,33
Imagen c)	Agregado #3	81,46	72,14
Espesor promedio (nm)		$78,55 \pm 4,31$	$73,22 \pm 6,12$

A3.5. Determinaciones de diámetros equivalentes para partículas de caolinita en imágenes TEM

Se muestran las diferentes imágenes en TEM para la muestra de caolín (fracción por debajo de 1 μm) con las dimensiones tabuladas estimadas por ImageJ. A partir de los espesores determinados por EELS en el Anexo 3.4, de 50 nm en el caso de láminas individuales y de 80 nm para agregados, se calculan los diámetros equivalentes de caolinita, para los que se obtuvo la distribución final mostrada en la Figura 3.12b.

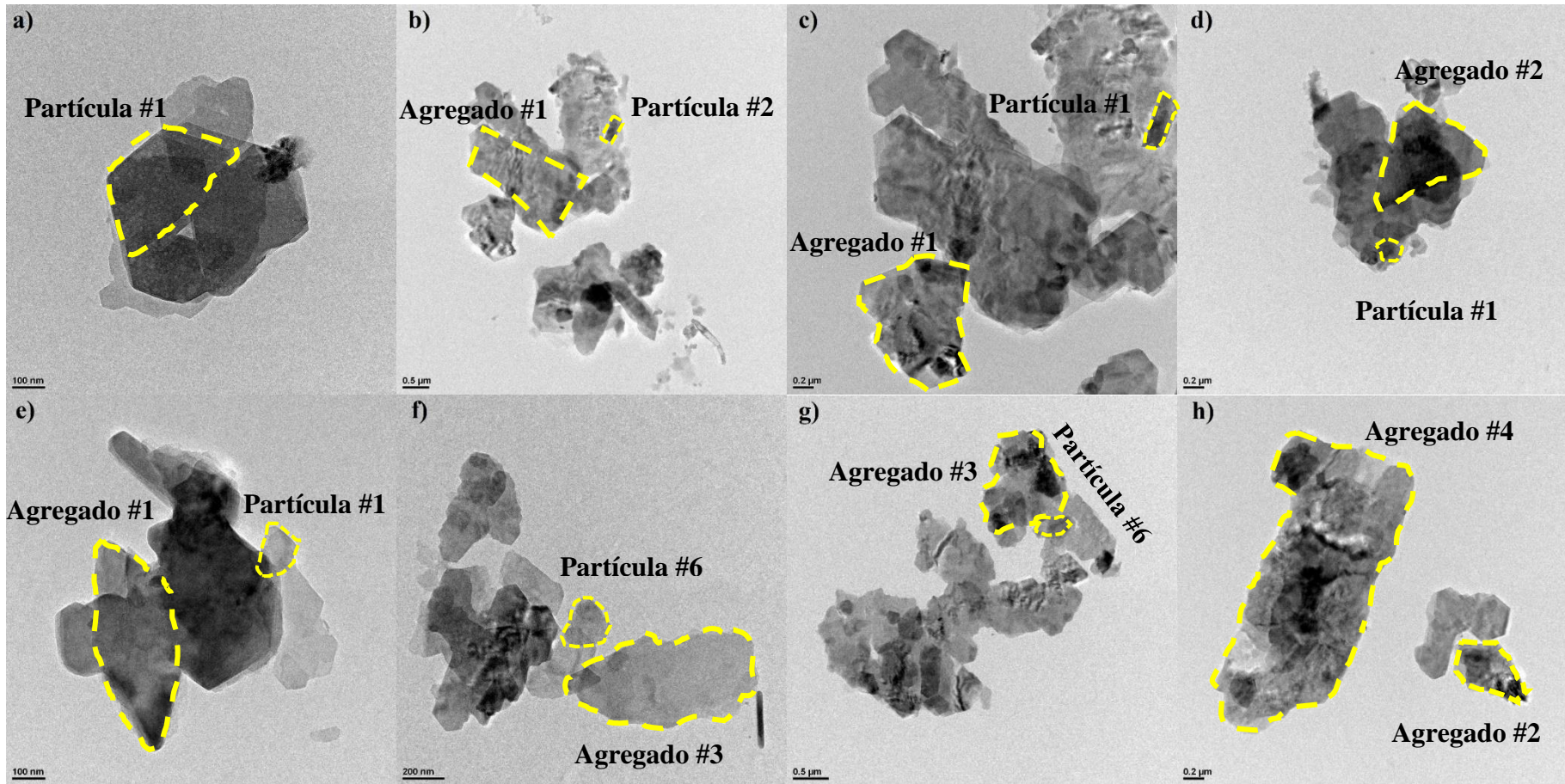


Figura A3.4. Imágenes en TEM de partículas de caolín para la fracción inferior a $1 \mu\text{m}$. En amarillo se resaltan algunos ejemplos de las partículas o agregados observados en TEM para la determinación de diámetros equivalentes, cuyas dimensiones se muestran en la Tabla A3.9.

Tabla A3.9. *Estimación de dimensiones para partículas de caolinita, según la imagen en TEM correspondiente. Para el cálculo del diámetro equivalente, se consideró un espesor de 50 nm en el caso de las partículas y de 80 nm para los agregados.*

	Dimensiones (nm)	Diámetro equivalente (nm)
Imagen a)		
Partícula #1	253 x 385	210
Partícula #2	603 x 279	252
Partícula #3	422 x 400	252
Partícula #4	350 x 221	195
Agregado #1	586 x 585	375
Imagen b)		
Partícula #1	531 x 201	217
Partícula #2	310 x 260	197
Agregado #1	2165 x 1184	732
Imagen c)		
Partícula #1	501 x 201	213
Partícula #2	85 x 105	95
Partícula #3	108 x 85	96
Partícula #4	245 x 153	153
Partícula #5	188 x 207	155
Partícula #6	227 x 158	151
Partícula #7	201 x 135	137
Partícula #8	181 x 124	129
Partícula #9	319 x 238	193
Partícula #10	438 x 241	216
Agregado #1	1104 x 959	545

Tabla A3.9 (continuación)

	Dimensiones (nm)	Diámetro equivalente (nm)
Imagen d)		
Partícula #1	223 x 173	154
Partícula #2	168 x 159	136
Partícula #3	186 x 173	145
Partícula #4	83 x 83	87
Partícula #5	199 x 131	136
Partícula #6	731 x 237	255
Partícula #7	200 x 318	183
Agregado #1	367 x 330	264
Agregado #2	1038 x 706	482
Agregado #3	1423 x 1376	669
Imagen e)		
Partícula #1	159 x 116	121
Partícula #2	114 x 63	88
Partícula #3	432 x 396	245
Agregado #1	471 x 205	254
Agregado #2	613 x 448	347
Imagen f)		
Partícula #1	530 x 183	210
Partícula #2	357 x 168	179
Partícula #3	165 x 330	173
Partícula #4	127 x 290	152
Partícula #5	226 x 197	162
Partícula #6	372 x 188	188
Partícula #7	158 x 99	115
Partícula #8	885 x 411	326
Agregado #1	720 x 590	402

Tabla A3.9 (continuación)

	Dimensiones (nm)	Diámetro equivalente (nm)
Imagen g)		
Partícula #1	367 x 295	218
Partícula #2	405 x 224	205
Partícula #3	165 x 147	132
Partícula #4	518 x 277	239
Partícula #5	537 x 320	254
Partícula #6	135 x 194	136
Partícula #7	168 x 107	120
Partícula #8	219 x 140	143
Partícula #10	167 x 136	130
Agregado #1	371 x 317	262
Agregado #2	501 x 365	304
Agregado #3	1328 x 1222	628
Imagen h)		
Partícula #1	370 x 289	217
Agregado #1	504 x 382	309
Agregado #2	849 x 516	406
Agregado #3	895 x 327	355
Agregado #4	3120 x 1196	829

A3.6. Observación de partículas migradas desde el material #1 mediante TEM

A continuación, se muestran imágenes en TEM con partículas migradas desde el material #1, que contiene montmorillonita en su interior para la mejora de propiedades en el compuesto final. Se remarcan las zonas en las que se focalizó el haz de electrones para la obtención de los espectros, obtenidos mediante EDS.

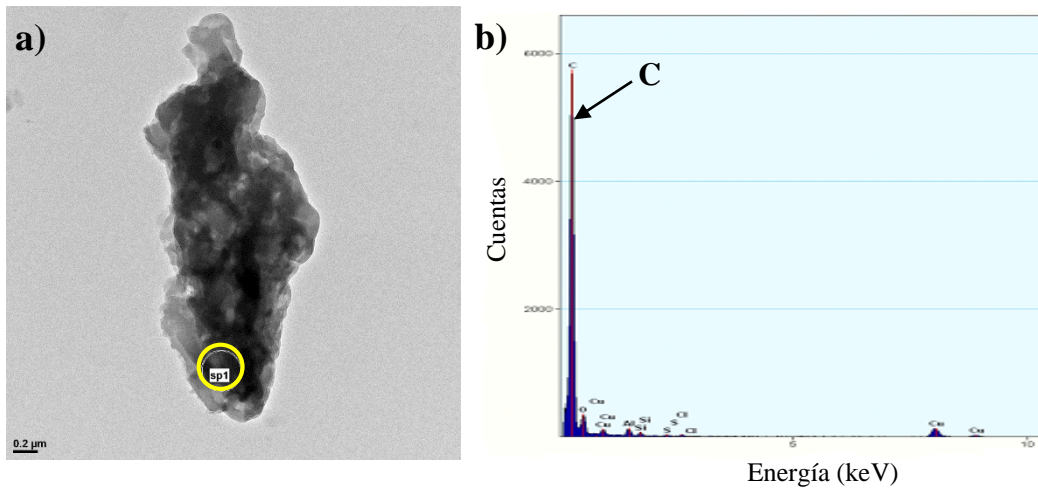


Figura A3.5. a) Imagen en TEM de un microfragmento migrado desde el material #1 con b) el espectro obtenido mediante EDS, en el que se observan altos contenidos de carbono pertenecientes al sustrato plástico.

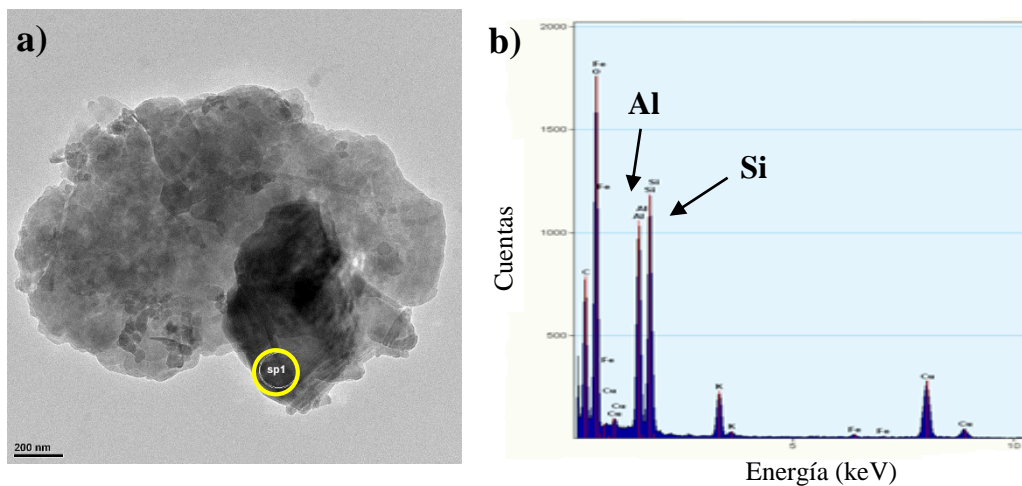


Figura A3.6. a) Imagen en TEM de un microfragmento migrado desde el material #1, con estructuras hexagonales en su interior con contenidos en O, Al y Si, correspondientes a los aluminosilicatos. b) Espectro obtenido mediante EDS.

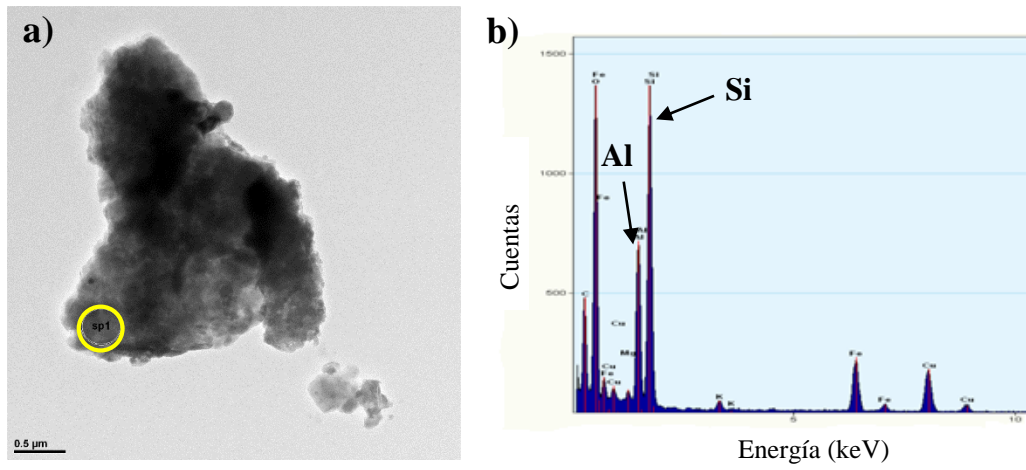


Figura A3.7. a) Imagen en TEM de microfragmento migrado desde el material #1 con b) el espectro obtenido mediante EDS, en el que se observan altos contenidos de O, así como Al y Si, pertenecientes a aluminosilicatos.

ANEXO 4. PUBLICACIONES

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- D. Ojeda, M.V. Taboada-López, E. Bolea, F. Laborda, A. Moreda-Piñeiro, J. Pérez-Arantegui, P. Bermejo-Barrera, J.R. Castillo, Detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas de dióxido de titanio en muestras complejas mediante AF4-ICP-MS, *Actual. Analítica. Soc. Española Química Analítica*. 61 (2018) 22–25.
- D. Ojeda, M.V. Taboada-López, E. Bolea, J. Pérez-Arantegui, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, F. Laborda, Size characterization and quantification of titanium dioxide nano- and microparticles-based products by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled to Dynamic Light Scattering and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chim. Acta*. 1122 (2020) 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.080>.
- D. Ojeda, P. Sánchez, E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo, How the use of a short channel can improve the separation efficiency of nanoparticles in asymmetrical flow field-flow fractionation, *J. Chromatogr. A*. 1635 (2021) 461759. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461759>.
- E. Bolea, M.S. Jimenez, J. Perez-Arantegui, J.C. Vidal, M. Bakir, K. Ben-Jeddou, A.C. Gimenez-Ingalaturre, D. Ojeda, C. Trujillo, F. Laborda, Analytical applications of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: A comprehensive and critical review, *Anal. Methods*. 13 (2021) 2742–2795. <https://doi.org/10.1039/d1ay00761k>.

DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO EN MUESTRAS COMPLEJAS MEDIANTE AF4-ICPMS

D. Ojeda¹, V. Taboada², E. Bolea¹, F. Laborda¹, A. Moreda², J. Pérez-Arantegui¹, P. Bermejo², J.R. Castillo¹

¹Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS). Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA). Universidad de Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009, Zaragoza

²Grupo de Elementos Traza, Espectroscopía y Especiación (GETEE). Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, Avenida das Ciencias s/n, 15782, Santiago de Compostela

Introducción

Uno de los casos más representativos del actual auge de los nanomateriales, en cuanto a su incorporación en gran diversidad de productos de consumo se refiere [1], es el dióxido de titanio (TiO₂). Sus propiedades relacionadas con la capacidad de refracción y de fotocatalisis en su forma nanoparticulada (1-100 nm), hacen que se esté utilizando en productos comerciales como cremas solares, cosméticos, envases y recubrimientos [2]. Además, el dióxido de titanio se utiliza como aditivo alimentario y pigmento blanqueador [3], y en otras áreas como la remediación medioambiental. Conscientes de su relevancia, el interés por estudiar sus posibles efectos potenciales tanto en la salud humana [4,5] como en el medio ambiente [6,7] ha aumentado en los últimos años.

Debido a la disparidad de tipos de muestras y posibles escenarios en los que se pueden encontrar presentes estos nanomateriales a lo largo del ciclo de vida de los productos que los contienen, se hace patente la necesidad del desarrollo de metodologías que puedan aportar información adicional y complementaria a las técnicas que se emplean habitualmente [8], como es el caso de las diferentes microscopías electrónicas o las técnicas basadas en la dispersión de radiación.

En este trabajo se plantea el uso de la técnica de Fraccionamiento en Flujo mediante Campos de Flujo Asimétrico (AF4) acoplado a absorción molecular ultravioleta-visible (UV-Vis) y espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) para la detección y caracterización de nanopartículas (NPs) de TiO₂ en muestras complejas.

Esta técnica permite la separación de partículas en función de su tamaño (coeficiente de difusión), a partir de la aplicación de un caudal perpendicular al flujo en el interior de un canal por el que circulan en régimen laminar. En el fondo del canal se sitúa una membrana permeable, de manera que especies de tamaño inferior al tamaño de corte de la membrana (habitualmente <10 kDa) se pierden y no son eluidas. El flujo perpendicular (crossflow) aplicado permite establecer el rango de tamaños en los que se produce la separación, teniendo en cuenta que a mayor crossflow mayor retención.

Desarrollo experimental

En primer lugar, se ha llevado a cabo el estudio de las condiciones que permiten la suspensión estable de las NPs de TiO₂, para su posterior separación y caracterización mediante AF4. Este estudio se ha realizado con NPs comercializadas en forma de polvo de diferentes tamaños (30, 50 y 100 nm), fundamentalmente a través de la composición del medio, así como de las condiciones de sonicación necesarias para evitar fenómenos de aglomeración. La utilización de disoluciones acuosas al 1% en glicerol y sonicando con sonda durante 15 min. (Tabla 1), permitieron obtener suspensiones estables durante un mes.

Variable	Condición optimizada
Membrana	Celulosa Regenerada 5 kDa
Estabilidad	Sonda 15 min (45% A. 25 V)
Portador	Tensoactivo mixto 0,05% (≈ FL-70)
Caudal detector flow	1 ml/min
Caudal cross flow	0,1 ml/min

Tabla 1. Condiciones optimizadas para la separación de TiO₂ NPs en AF4.

Posteriormente se estudiaron las condiciones que permitieran una correcta separación las NPs de TiO₂ de diferentes tamaños. Para ello, se partió de las condiciones óptimas descritas en la bibliografía para este tipo de NPs [2, 9-11]. En términos generales, la mayor parte de los autores utilizan membranas de celulosa regenerada (RC) y portadores de agua ultrapura con algún surfactante neutro (como el FL-70) o aniónico (SDS) en concentraciones del orden de 0,01-0,1% o alguna sal (pirofosfato de sodio 0,1% o hexametáfosfato de sodio 1 mM). Estas variables se optimizaron atendiendo al valor de recuperación que se obtenía para las distintas NPs estudiadas (cociente entre la señal obtenida en las condiciones de separación y la señal directa sin separación). Valores por encima del 80% suelen considerarse aceptables en AF4. En el caso de las tres suspensiones de TiO₂ utilizadas, se obtuvieron recuperaciones superiores al 90% con las condiciones descritas en la tabla 1. Tal y como se ha comentado con anterioridad, el crossflow aplicado es la variable que afecta fundamentalmente a la separación en el canal. Su optimización (tabla 1) permitió llevar a cabo la separación de los tres tamaños de NP (rango de 30 a 100 nm) en unos tiempos de elución entre los 12 y los 20 min en el máximo de pico (figura 1). En estas condiciones, e inyectando un volumen de muestra de 100 µL, se obtuvo un límite de detección de 0,9 µg L⁻¹ (para ⁴⁹Ti), acoplando el sistema a ICP-MS.

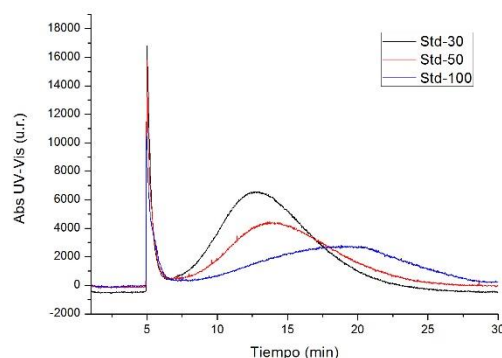


Figura 1. Fractograma con estándares de TiO₂ de diferentes tamaños separados en AF4.

Aplicación a muestras complejas

El procedimiento optimizado se aplicó a la detección y caracterización de NPs de TiO_2 presentes en dos tipos de muestras. Por un lado, una muestra sólida alimentaria (surimi), en la que el dióxido de titanio se utiliza como blanqueante (E-171), y en el que se pretende detectar la presencia de posibles nanopartículas de TiO_2 , teniendo en cuenta que el aditivo es añadido en forma de micropartículas. El otro producto es un material de construcción que se utiliza en recubrimientos con propiedades fotocatalíticas y en cuya composición aparece el dióxido de titanio en forma nanoparticulada.

En el caso del surimi, se desarrollaron dos estrategias para la extracción y puesta en suspensión de las NPs de TiO_2 : una digestión enzimática (lipasa/pancreatina), a pH 7,4, en agitación a 37°C y posterior centrifugación; y una digestión alcalina con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) al 25% (v/v), a pH 7, sonicando en baño de ultrasonidos. Previamente al estudio del surimi mediante AF4-ICP-MS, se llevó a cabo la caracterización del digerido enzimático mediante SP-ICPMS, lo que permitió confirmar la presencia de NPs TiO_2 con tamaños inferiores a los 100 nm.

La inyección del digerido enzimático en AF4-ICPMS no produjo ninguna señal que pudiera corresponder a NPs de TiO_2 (figura 2), probablemente debido a los bajos niveles de concentración y las interferencias provocadas por el uso de enzimas durante la digestión y presentes en el medio en concentración considerable (2 g L^{-1}). Para el caso de la digestión alcalina, se obtuvo un pico a un tiempo de 8,3 minutos (figura 2), pero sin separarse completamente del pico inicial (correspondiente a especies no retenidas o no focalizadas correctamente durante la etapa de inyección/focalización, previa a la separación). La recuperación para ^{49}Ti fue del 65%, lo que implica que un porcentaje considerable del Ti en la muestra se filtra a través de la membrana (tamaño $< 5\text{ kDa}$) o es retenido de forma irreversible en su superficie. Para obtener información sobre este pico a 8,3 min, se adicionaron NPs de TiO_2 de 30 nm a la muestra de surimi en medio alcalino, observándose un aumento en la señal del pico, lo que podría indicar la presencia de NPs de TiO_2 en la propia muestra.

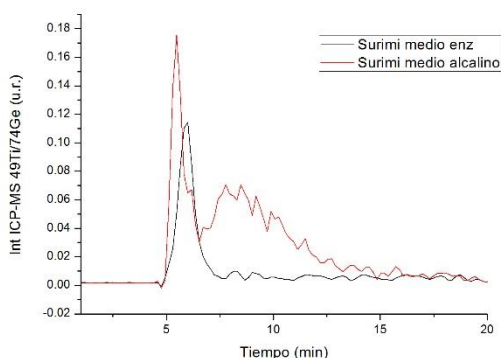


Figura 2. Fractograma de surimi. Comparativa entre los dos tipos de digestiones.

Respecto al material de construcción, no se realizó ningún tratamiento previo de la muestra al tratarse de una suspensión acuosa, que se diluyó convenientemente en el portador utilizado en AF4. Su análisis dio como resultado un fractograma con un pico bien diferenciado, correspondiente a las NPs de TiO_2 , para

un tiempo de elución de 7,1 minutos, y una recuperación para ^{49}Ti del 75% (figura 3).

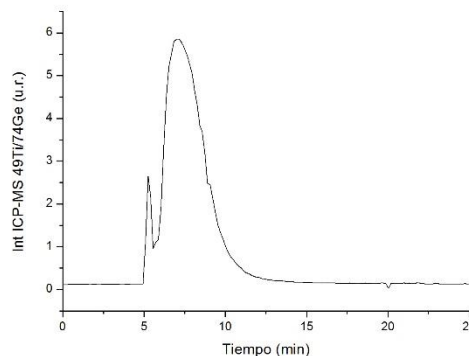


Figura 3. Fractograma del material de construcción.

Caracterización por tamaño

La técnica AF4 permite la caracterización por tamaño de las especies separadas, al ser proporcional el tiempo de elución con el diámetro hidrodinámico de las mismas. Esta relación puede establecerse bien a través de expresiones teóricas, asumiendo un comportamiento ideal de las especies durante su elución, o bien a través de una calibración externa frente a estándares de tamaño conocido, en cuyo caso es necesario asumir un comportamiento similar entre las especies que se quiere caracterizar y dichos estándares. El uso de nanomateriales de la misma naturaleza (en este caso TiO_2) puede ser una estrategia válida, siempre y cuando se disponga de los estándares adecuados, mientras que el uso de estándares de tamaño de poliestireno (PS) suele ser la práctica más habitual para caracterizar todo tipo de nanopartículas [2, 11]. En este trabajo se propone el uso de las NPs de TiO_2 disponibles comercialmente y descritas con anterioridad, NPs de óxido de silicio por tratarse también de óxidos, y NPs de poliestireno. Las tres calibraciones se presentan en la figura 4, obtenidas en las mismas condiciones que las utilizadas en la caracterización de las muestras, descritas en la tabla 1. Como puede observarse, existe una buena correlación entre los estándares de poliestireno y óxido de silicio, con pendientes muy similares, mientras que los tiempos obtenidos para las NPs de óxido de titanio corresponden a tamaños mucho mayores. Un estudio de las suspensiones inyectadas de estos estándares mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), mostró poblaciones de NPs agregadas, con tamaños superiores a los de las NPs individuales. Es posible, por tanto, que el procedimiento utilizado no permita su desagregación completa y que no sea posible su utilización como estándares de tamaño conocido.

De acuerdo con estos resultados, se procedió a la caracterización por tamaños de los picos obtenidos en las dos muestras utilizando las calibraciones frente a NPs de óxido de silicio y de poliestireno. En el caso del surimi, se determinó que el pico a 8,3 minutos se correspondía con un tamaño de NPs de 60 nm (en el máximo) de acuerdo con la calibración de PS y 80 nm para la de SiO_2 . Estos tamaños, aunque ligeramente superiores a los estimados mediante SP-ICPMS, pueden considerarse como válidos teniendo en cuenta las diferencias en los fundamentos de ambas técnicas a la hora de estimar tamaños. En el caso del material de construcción, se determinó que el pico a 7,1 min se correspondía con tamaños de 20 y 35 nm según las calibraciones de PS y SiO_2 , respectivamente.

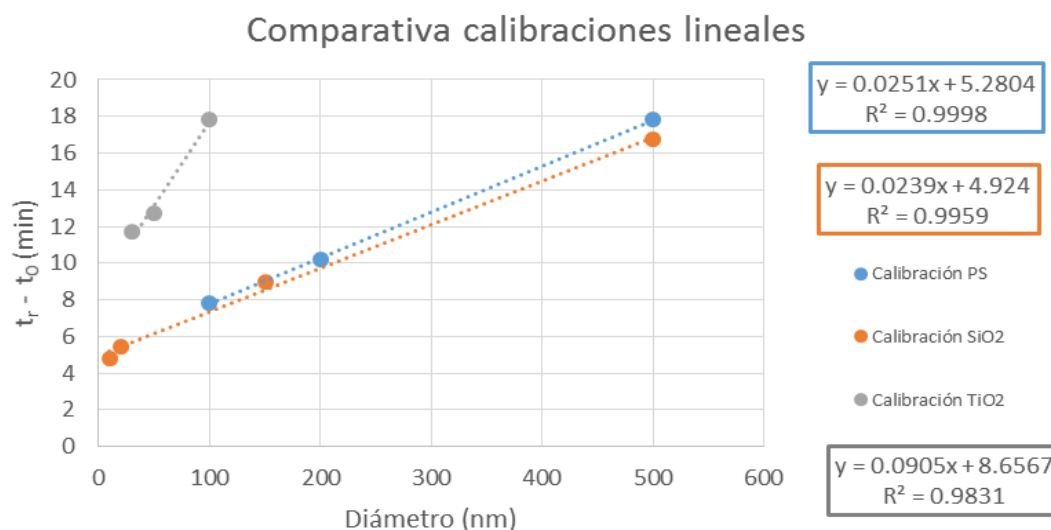


Figura 4. Comparativa calibraciones lineales según tipo de estándares empleados.

A modo de resumen, se puede concluir que se ha desarrollado un método basado en AF4-UV-Vis-ICPMS que permite la separación en función del tamaño para suspensiones de NPs de TiO₂ comerciales, con unas recuperaciones superiores al 90%. La aplicación de este método ha permitido además detectar y estimar el tamaño de NPs de TiO₂ presentes en muestras complejas, como surimis y materiales de construcción.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto CTQ2015-68094 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) de España. Agradecer también a la Sociedad Española de Química Analítica la oportunidad de presentar oralmente este estudio, así como la beca que concedió. Y a los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación, dentro de la Universidad de Zaragoza.

Referencias

- [1] Wiesner, M. R., Lowry, G. V., Alvarez, P., Dionysiou, D. & Biswas, P. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 4336–4345 (2006).
- [2] Contado, C. & Pagnoni, A. TiO₂ nano- and micro-particles in commercial foundation creams: Field Flow-Fractionation techniques together with ICP-AES and SQW Voltammetry for their characterization. *Anal. Methods* **2**, 1112 (2010).
- [3] Peters, R. J. B. *et al.* Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: Analytical methods to define nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 6285–6293 (2014).
- [4] Jones, K. *et al.* Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **233**, 95–101 (2015).

- [5] Lankott, A. *et al.* The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicol. Lett.* **208**, 197–213 (2012).

- [6] Hazeem, L. J. *et al.* Cumulative effect of zinc oxide and titanium oxide nanoparticles on growth and chlorophyll a content of Picochlorum sp. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2821–2830 (2015). doi:10.1007/s11356-015-4370-5

- [7] Salieri, B., Righi, S., Pasteris, A. & Olsen, S. I. Freshwater ecotoxicity characterisation factor for metal oxide nanoparticles: A case study on titanium dioxide nanoparticle. *Sci. Total Environ.* **505**, 494–502 (2015).

- [8] Laborda, F. *et al.* Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Anal. Chim. Acta* **904**, 10–32 (2016).

- [9] Nischwitz, V. & Goenaga-Infante, H. Improved sample preparation and quality control for the characterisation of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using flow field flow fractionation on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 1084 (2012).

- [10] Omar, J., Boix, A., Kerckhove, G. & von Holst, C. Optimisation of asymmetric flow field-flow fractionation for the characterisation of nanoparticles in coated polydisperse TiO₂ with applications in food and feed. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **33**, 1775–1784 (2016).

- [11] Bendixen, N., Losert, S., Adlhart, C., Lattuada, M. & Ulrich, A. Membrane-particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles. *J. Chromatogr. A* **1334**, 92–100 (2014).



Size characterization and quantification of titanium dioxide nano- and microparticles-based products by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled to Dynamic Light Scattering and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

David Ojeda ^a, María Vanesa Taboada-López ^b, Eduardo Bolea ^{a,*},
Josefina Pérez-Arantegui ^a, Pilar Bermejo-Barrera ^b, Antonio Moreda-Piñeiro ^b,
Francisco Laborda ^a

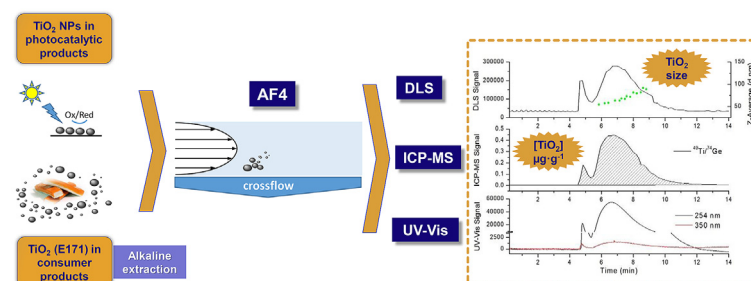
^a Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna, 12, 50009, Zaragoza, Spain

^b Trace Element, Spectroscopy and Speciation Group (GETEE), Strategic Grouping in Materials (AEMAT), Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, Universidad de Santiago de Compostela, Avenida Das Ciencias, S/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain

HIGHLIGHTS

- A method based on AF4-DLS-ICP-MS to quantify and size characterize TiO₂ nanoparticles at μg g⁻¹ range has been developed.
- Different size characterization strategies in AF4 have been evaluated.
- Alkaline extraction has been optimized and validated for TiO₂ nanoparticles determination in crab sticks.
- A nano-sized fraction of TiO₂ nanoparticles has been detected by SP-ICP-MS in these samples.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2020

Received in revised form

28 April 2020

Accepted 30 April 2020

Available online 5 May 2020

Keywords:

Asymmetric flow field-flow fractionation
Single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry
Titanium dioxide nanoparticles
Photocatalytic products
Crab sticks (surimi)
Alkaline extraction

ABSTRACT

A procedure for the size characterization and quantification of titanium dioxide (TiO₂) nano- and microparticles by Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation (AF4) coupled to Dynamic Light Scattering (DLS) and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) is described. Different strategies for size characterization with size standards and the use of the DLS signal for the estimation of hydrodynamic diameters are evaluated. The procedure has been applied to the characterization of TiO₂ nanoparticles in photocatalytic products and crab sticks (surimis), where TiO₂ is present as E171 food additive. Sizes in the range of 50–90 nm and 160–170 nm were estimated in the different photocatalytic products by AF4-DLS, in good agreement with the sizes predicted by calibration versus SiO₂ and polystyrene standards. In surimis, sizes between 140 and 350 nm were estimated by AF4-DLS, similar to those reported in literature for E171 additive. These results were also compared to those obtained by single particle ICP-MS, which allowed the detection of a nano-sized fraction of TiO₂ present in the four surimis analyzed. Titanium contents in one of the photocatalytic products determined by AF4-ICP-MS was $16.86 \pm 2.54 \text{ mg g}^{-1}$, whereas the alkaline extraction followed by AF4-ICP-MS allowed the determination of TiO₂ content in four surimis at concentration levels in the range of the μg g⁻¹ (from 3.14 ± 0.10 to $14.55 \pm 1.46 \text{ μg Ti g}^{-1}$), with channel recoveries above 85% in all cases. The method has been validated by

* Corresponding author.

E-mail address: edbolea@unizar.es (E. Bolea).

comparison with the Ti content determined by ICP-OES after microwaved assisted acid digestion of all the samples. The methodology proposed allows the complete quantification of the (nano)particulate forms of titanium in complex matrices together with their size characterization.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Titanium dioxide-based materials are used in many ways, mostly incorporated in paints and sunblocks, water-treatment agents, or incorporated to construction and building materials, thanks to their high refraction and photocatalyst properties. In these cases, anatase, or a mixture of anatase/rutile phases, with primary particle sizes of 10–50 nm, are preferred. The mass production, extensive use and uncontrolled disposal of these kind of products lead to the potential release of TiO₂ nanoparticles (NPs) to the environment, where they may exert harmful effects to individual organisms and ecosystems. The toxic effects of TiO₂ NPs on bacteria, algae [1], plants and animal cells [2] have been demonstrated [3] and, in fact, there are recent evidences that uptake of TiO₂ in fishes is nano-specific [4].

Titanium dioxide, with its whitening and brightening properties, is also widely used in cosmetic preparations and foods. It is authorized as a food color additive in the United States and Europe, labelled as E171 [5]. Given that scattering of light by TiO₂ is maximized by particles in the range of 200–300 nm [6], most commercial products that are used as pigments contain primary particles within this size. Differences in the nano- and micro-particles size distribution have been reported in E171 from several manufacturers [7,8], being highly polydisperse with sizes ranging from 30 nm to 500 nm [9,10]. However, a small fraction, variable from 10 to 36%, has been identified as nano-titanium (particle size lower than 100 nm) in most of E171 additives [5,7,9,11].

Despite the small percentage of TiO₂ nanoparticles (TiO₂ NPs) in E171, this additive may be considered as a nanomaterial according to the statement of the EU recommendation [12], in which it is suggested to move the number-based size distribution threshold from 50%, in the current nanomaterial definition, to a threshold between 1 and 50% in specific cases. Additionally, in the reevaluation about the safety of titanium dioxide as food additive, the Food Additives and Nutrient Sources (ANS) Panel recommended the request for data on the characterization of particle size distribution [11], as the first step needed for completing the risk assessment of the food additive, referring to the percentage of particles of the food additive titanium dioxide (E171) that would fall in the nano range. The extensive use of TiO₂ NPs is of concern to the scientific community regarding food safety of food containing TiO₂ NPs, and the possible risks to human health and the environment. There have been several studies to assess the TiO₂ NPs toxicity but, despite TiO₂ is considered as possible carcinogenic to humans [13], findings are not conclusive, mainly because the low bioavailability of TiO₂ NPs [14].

Nanoparticles as analytes represent a challenge in analytical chemistry because of the need for developing new analytical methodologies, not only for quantifications, but also to know size distributions, among other parameters [15]. Regarding analytical instrumentation, the analysis of TiO₂ NPs has been carried out using different approaches, such as quantitative methods based on transmission electron microscopy (TEM) [5,16], Raman spectroscopy for NPs screening [17–19], or DLS [8,20] for size characterization. In addition, inductively coupled plasma – mass

spectrometry (ICP-MS), working in the so-called single particle mode (SP-ICP-MS), has gained popularity for their quantification and characterization [10,21,22]. High sensitivity and the simultaneous assessment of number concentrations and size distributions, are the main benefits offered by SP-ICP-MS [23,24].

Asymmetrical flow field flow fractionation (AF4) is another powerful analytical tool for TiO₂ NPs separation and characterization, coupled to different detectors [6,7,10,20,25–27]. This technique has the advantage of providing size characterization combined with detailed information of the elemental composition of each size fraction when coupled to ICP-MS, and at low concentration levels. AF4 has been utilised for the analysis of TiO₂ NPs in complex matrices, mainly based on sunscreens [25–28], food products [10,20,29], pigments [7] or different personal care products [29,30]. Regardless of the sample, its analysis is commonly based on the detection of TiO₂ [7] and its size characterization, along with the determination of total titanium contents [20,25–27,29,30]. There are also some studies [6,10] where both size determination and elemental concentrations of the fraction of interest separated by AF4 were accomplished in food and cosmetics products, although adsorption processes in the AF4 separation in samples with Ti concentrations under 0.5 mg g⁻¹ led to biased results [6].

In addition to new instrumental developments, nanoparticles require that current sample pre-treatment procedures must be adapted for the isolation of these new analytes, guaranteeing their integrity and stability. Dilution of sunscreens in Triton X-100 [31] for characterization of TiO₂ by AF4 and SP-ICP-MS has been described. Suspensions in water/methanol followed by tip sonication and defatting with hexane [26], or using hexane before the extraction with water [27] have been also described. Regarding TiO₂ particles extraction from foodstuff and biological materials, water has been used as an extractant when pre-treating chewing gum coatings, sugar-coated confectionery and candies, under both mechanical and ultrasound stirring [5,25,32]. Enzymatic digestion methods, mainly using proteases, have been also developed for isolating TiO₂ NPs from surimi and seafood under conventional and ultrasounds treatments [17,33]. Other strategies for TiO₂ NPs isolation have been based on the use of organic solvents, for pre-treating sugar glass and coffee cream [12], or concentrated hydrogen peroxide and heat, followed by evaporation and 'complexation' with bovine serum albumin (BSA) for pre-treating cakes, candies and chewing gum [2].

Despite the available literature regarding NPs assessment, new developments are still required because of the low concentration in foods and environmental matrices, and the complexity of food/environmental materials. In addition, the potential of certain analytical techniques, such as those based on flow field fractionation, can be limited when the extract contains a high number of components from the sample matrix, such as enzymatic extracts. In fact, for titanium dioxide nanoparticles, its characterization based on Field-Flow Fractionation involves recurrent problems related to low resolution and low recovery rates [34].

As reviewed by de la Calle et al. [35], tetramethylammonium hydroxide (TMAH) has been found to be a powerful extractant for isolating silver nanoparticles (Ag NPs), gold nanoparticles (Au NPs)

and silicon dioxide nanoparticles (SiO₂ NPs) from complex materials. TMAH extracts has also been found to be adequate for TiO₂ NPs in activated sludge [36], since the process did not modify their initial size distribution.

The aim of the current work is to study the possibilities of using AF4 coupled to different detectors for the size characterization and quantification of TiO₂ particles at different size ranges and concentration levels (mg g⁻¹ to µg g⁻¹) in different types of samples. Strategies based on the use of size standards of different nature and the information provided by a DLS detection are evaluated. In addition, the use of an alkaline extractant for isolating TiO₂ NPs from surimi samples, in which E171 additive has been used as white pigment, is described.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

A series of monodisperse size standards based on polystyrene (0.1, 0.2 and 0.5 µm) and silicon dioxide (0.01, 0.02, 0.15 and 0.5 µm) microparticles were used for size calibration in AF4. All the standards were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland), except 0.01 and 0.02 µm standards of SiO₂, purchased from PlasmaChem (PlasmaChem GmbH, Berlin, Germany). Solutions of 30 mg L⁻¹ were prepared by dilution in the AF4 carrier solution.

Ultrapure water (18 MΩ cm of resistivity) was obtained from a Milli-Q purification device (Millipore Co., Bedford, MA, USA). Ionic titanium standard (1000 mg L⁻¹) and germanium standard (1005 mg L⁻¹) for ICP-MS and SP-ICP-MS measurements and calibrations were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Dilutions of these standards were made in nitric acid (HNO₃, 69.0%, J.T. Baker, Deventer, Netherlands). A certified reference material RM8013 (Au NPs, 60 nm) from NIST (Gaithersburg, MD, USA) was used for assessing transport efficiency in SP-ICP-MS determinations. NexION Setup Solution (Be, Ce, Fe, In, Li, Mg, Pb, U), 10 µg L⁻¹ (PerkinElmer) was used for daily ICP-MS performance. Mixed non-ionic surfactant Novachem (Postnova Analytics), tetrasodium pyrophosphate (NaPP) (Merck) and sodium dodecyl sulphate (SDS, Merck, Darmstadt, Germany), were used for carrier preparation in optimization of AF4 separation studies. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH, 25% v/v, Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, Germany) was used for the alkaline digestion of surimi samples, and Triton X-100 for sample dilution prior to analysis in SP-ICP-MS, from Sigma (Steinheim, Germany).

2.1.1. Suspensions of TiO₂ nanoparticles

Suspensions of TiO₂ nanoparticles of different sizes were used for AF4 optimization and prepared from powdered rutile (99.9%) with primary particles of 30, 50 and 100 nm sizes according to the manufacturer (US Research Nanomaterials, Houston, TX, USA). Suspensions of 150 mg L⁻¹ were prepared by weighting the corresponding mass of powder and suspended in glycerol 1% (w/v) (Sigma Aldrich) as dispersing agent, according to Taboada-López et al. [21]. Suspensions were further stabilised by bath sonication (P Selecta, Ultrasons, Barcelona, Spain) for 5 min. Probe sonication was also checked (Vibra-Cell, Sonic & Materials Inc., Danbury, USA) using a 80% amplitude and 50 W of power for 15 min, according to literature [21,25]. Since no significant differences were observed in terms of retention times and recovery values in AF4-UV-Vis analysis of the suspensions, bath sonication was preferred.

Diluted suspensions (15 mg L⁻¹) were prepared daily by further dilution in carrier and sonicated for 5 min before analysis. Anatase powders (99.5%) of 5, 15, 40 and 100 nm primary particle sizes (US Research Nanomaterials) were also used along the optimization,

although none of these products were successfully separated in AF4, probably due to irreversible adsorption onto the membrane of the channel.

2.2. Samples

2.2.1. Photocatalytic products with TiO₂ nanoparticles

Three different photocatalytic products were analyzed: Degussa P25 (Nanoshel, Wilmington, USA), FN2 (FNnano, Levensger, Reno, USA) and a coating NP Fotoactiva 23 (Ekoeaso S.L., Gipuzkoa, Spain), all of them containing titanium dioxide nanoparticles. For their analysis, they were suspended and diluted in ultrapure water, and bath sonicated for 5 min before the measurements.

2.2.2. Surimi samples

Three frozen surimi samples (coded as FZ12, FZ21, and FZ22) and one fresh surimi (FH6) were bought in local supermarkets. The samples (approximately 100 g) were homogenized by mechanical blending and stored in polyethylene bottles with hermetic seals at -20 °C.

2.3. Total Ti determination by ICP-OES and ICP-MS

1.0 g of surimi or photocatalytic product sub-samples were weighted (±0.1 mg) into a 100 mL Teflon vessel prior to digestion using an Ethos Plus microwave oven (Milestone, Sorisole, Italy). A four-steps microwave program, applying a constant power of 1000 W and reaching 200 °C, as well as an acid mixture consisting of ultrapure water (4.0 mL), 69% (w/v) HNO₃ (3.0 mL), and 33% (w/v) H₂O₂ (1.0 mL) (Panreac, Barcelona, Spain) were used for the digestion of the samples. In the case of photocatalytic products, the mixture consists of 37% (w/v) HCl (3.5 mL), 65% (w/v) HNO₃ (0.75 mL) (J T. Baker) and 48% (w/v) HF (1.5 mL) (Panreac), adding 9 mL of 5% (w/v) of H₃BO₃ (Panreac) to remove HF remnants after cooling down. Finally, acid digests were diluted to 25 mL with ultrapure water. Each sample was subjected to the current procedure in triplicate, and two blanks were performed for each set of microwave conditions.

ICP-OES and ICP-MS operating conditions for total Ti determination are listed in Table S1. For ICP-MS measurements, KED mode (He as a collision gas) was used for a selective attenuation of polyatomic interferences when using ⁴⁹Ti for measurements. The standard addition method (Ti concentrations up to 200 µg L⁻¹) and germanium (⁷⁴Ge, 10 µg L⁻¹) as an internal standard were used for quantification purposes, as described in Ref. [21]. Yttrium was used as internal standard in the case of ICP-OES measurements. Acid digests were 1:10 diluted with ultrapure water before measurements, and three replicates were performed for each acid digest.

2.4. Ultrasound assisted TMAH hydrolysis for TiO₂ NPs extraction from surimis

Alkaline digestion consisted of the suspension of 0.25 g of the sample in 2 mL of TMAH (10% v/v), then the sample was bath sonicated for 2h at a frequency of 37 kHz. After the digestion, alkaline extracts were obtained by centrifugation (8 °C, 3900 rpm, 15 min). 1 mL was taken from the supernatant and then diluted 1:10 in the corresponding carrier (Novachem 0.05%) for their later analysis in AF4-ICP-MS or stored in 10 mL polyethylene vial with hermetic seal at 4 °C in case of SP-ICP-MS analysis. Samples were treated in triplicate, and three blanks were performed for each set of sample preparation/extraction conditions.

2.5. Asymmetrical flow field-flow fractionation

The system used was an AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg, Germany). A channel of reduced dimensions was utilised, with the following dimensions: 14 cm in length, from 2 to 0.5 cm in width; and a spacer with 350 μm of thickness. Table 1 summarizes the flow conditions applied.

Three different ultrafiltration membranes were tested as accumulation wall: two of regenerated cellulose (RC) with cut-offs of 5 and 10 kDa; and one of polyether sulfone (PES) with a cut-off of 5 kDa (Postnova Analytics). Membranes were first conditioned by the injection of a suspension of TiO_2 rutile nanoparticles of 30 nm without applying any crossflow program into the channel. Afterwards the same suspension was injected applying the program described in Table 1 until retention times and recoveries were stable. Finally, the carrier was injected several times until no signal respect to baseline was obtained. This procedure was applied every time a membrane was replaced.

Different carrier compositions were studied: ultrapure water, tetra sodium pyrophosphate 1 mM in ultrapure water at pH 10, sodium dodecyl sulphate 0.01% (w/v) in ultrapure water at pH 8 and the mixed surfactant Novachem at 0.05% (v/v), which gave the optimal results. For the carrier filtration, nylon 0.2 μm filters (Merck Millipore, Ireland) were used.

A sample loop of 100 μL was used throughout the entire experimental study. The eluent at the end of the channel was analyzed by UV–Vis diode-array detector (Shimadzu, Duisburg, Germany) recording signals between 200 and 650 nm. In specific, a wavelength of 350 nm was studied for the detection of TiO_2 . A complete spectrum of the effluent was registered every 0.6 s.

All these variables were analyzed in terms of retention time, repeatability, resolution and recovery from the fractograms obtained by AF4 coupled to a UV–Vis detector. Resolution was calculated by relating the separation between peaks (in minutes) from nanopowder products of different sizes, and the average width of these two peaks, as described by Mitrano et al. [37]. Recovery calculations were done as specified by Bolea et al. [38], but calculated for ^{49}Ti for ICP-MS signals and at 350 nm of wavelength for UV–Vis.

2.5.1. AF4-DLS

AF4 was coupled to a DLS detector (Zetasizer Nano ZS, ZEN3600, Malvern, Worcestershire, United Kingdom) equipped with a flow cell (ZEN 0023) for size characterization of the fractions eluted. For all the measurements the temperature was fixed at 25.0 $^\circ\text{C}$. Signal intensity and hydrodynamic diameter estimations were collected every 3 s and default values were used for the rest of instrumental parameters.

2.5.2. Elemental detection and TiO_2 NPs determination by AF4-ICP-MS

The AF4 system was coupled to an ICP mass spectrometer (ELAN DRC-e, PerkinElmer, Toronto, Canada) for the elemental detection and quantification of titanium. The outflow from the system was delivered directly to the nebulizer of the spectrometer; a glass concentric Slurry nebulizer with a cyclonic spray chamber (Glass

Expansion, Melbourne, Australia) was used. The ICP-MS readings consisted of 20 sweeps at a dwell time of 50 ms. Default values were used for the rest of the instrumental parameters.

Quantification of TiO_2 was based on monitoring the ICP-MS signal of the isotope ^{49}Ti , using ^{74}Ge as internal standard. From an on-line calibration with ionic titanium standards diluted in nitric acid (1%), intensity signals from ICP-MS for samples were transformed into mass values by integrating the area of the peaks in the fractograms.

2.6. TiO_2 NPs determination by SP-ICP-MS

A NexION 300X ICP-MS system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) equipped with a SeaFast SC2 DX autosampler (Elemental Scientific, Omaha, NB, USA) and with the Syngistix™ Nano Application software (PerkinElmer) was used for measurements.

Operating conditions for SP-ICP-MS are listed in Table 2. Data acquisition/treatment was performed with the Syngistix™ Nano Application module, which required the determination of the sample introduction flow rate (obtained by weighing after water aspiration under selected pump conditions), and analyte transport efficiency (TE%, by using 60 nm Au NPs NIST material at 518 ng L^{-1} prepared in ultrapure water). Sample flow rates were found to vary within the 0.450–0.475 mL min^{-1} ; whereas, TE% was from 1.5 to 3.5, values in good agreement with those typically reported for Au NPs prepared in ultrapure water [39].

Calibrations by using dissolved (ionic) Ti aqueous standards from 0 to 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, allowed the determination of TiO_2 NPs size distributions and mass concentrations [40]. TMAH extracts were 1:100 diluted with 0.05% (v/v) Triton X-100 before SP-ICP-MS (measurements in triplicate), and the mixtures were sonicated (ultrasound water-bath, 37 kHz, 5 min) before SP-ICP-MS measurements.

2.7. Analysis by field emission scanning electron microscopy (FESEM)

FESEM images of TiO_2 nanopowders of nominal sizes of 30, 50 and 100 nm and the photocatalytic product were obtained using a MERLIN™ FESEM, equipped with a Gemini column (both from Carl Zeiss Nano Technology Systems, Jena, Germany). The microscope was equipped with an X-Max X-ray microanalyzer (Oxford Instruments, Abingdon, United Kingdom) to perform Energy-Dispersive X-ray spectrometry (EDX). Before FESEM-EDX analysis, samples were carbon coated to enhance conductivity. Carbon coating was performed with a Leica EM SCD500 (Leica Microsystem, Vienna, Austria) high vacuum sputter coater. FESEM images were recorded working at 3 or 5 kV with the in-Lens secondary-electron detector, in order to improve resolution, and EDX analyses were carried out at 8 kV.

Table 1
Injection and elution steps during a measurement in AF4. Detector flow 1 mL min^{-1} .

Step	Time (min)		Cross flow (mL min^{-1})
Injection/focusing	4 + 1	Injection flow 0.2 mL min^{-1}	1
Elution	10–30	Constant	0.1
	3	Linear decay	0.1 to 0
	2	Constant	0

Table 2
SP-ICP-MS operating conditions.

Operating parameters for SP-ICP-MS	
Analyte	Ti
Mass-to-charge ratio	48.9
Density	4.23 g cm ⁻³
Mass fraction	59.9%
Sample flow rate	0.41–0.43 mL min ⁻¹
Dwell time	100 μs
Sampling time	100 s

3. Results and discussion

3.1. Study of TiO₂ NPs separation conditions by AF4. Effects on elution times and recovery values

The study of different experimental variables related to AF4 separation of TiO₂ NPs has been described in literature [7,27,41,42]. Membrane, carrier composition, channel and crossflow rates have been optimized using different NPs suspensions or standards, such as NM-104 [7,27,41] (crystal structure: rutile) and TiO₂ powder (Aeroxide® P25) [42] (ca. 70–80% anatase). In this work, suspensions of rutile TiO₂ NPs of different nominal sizes (see section 2.1.) in glycerol 1% (w/w) were used for the study of AF4 separation conditions.

Polyester sulfone (PES) and regenerated cellulose (RC), both of 5 kDa as pore size, were considered as membrane materials. Although higher negative zeta potentials were expected with PES material respect to RC, which means higher electrostatic repulsions with negatively charged species, RC membranes are the most common choice for TiO₂ NPs characterization in AF4 [42]. In this case, only slight differences in retention times were found analysing rutile nanopowder (30 nm of particle nominal size), whereas higher recoveries (70% for RC vs. 45% for PES) were found, so RC was preferred. Pore size of the RC membranes were also tested, comparing 5 and 10 kDa. This increase on pore size was expected to influence the charge of the membrane, and despite reducing the retention times, 10 kDa RC membrane showed a significant decrease in recoveries to 50%, so RC membrane of 5 kDa was selected as the best option for TiO₂ NPs separation.

If membrane was important due to its potential interaction with particles, carrier composition should be chosen carefully in order to ensure compatibility with the analyte and to improve separation performance [43]. Four carriers were studied: ultrapure water, tetrasodium pyrophosphate 1 mM (w/v) (NaPP, pH 10), the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate 0.01% (v/v) (SDS, pH 8) and a mixed surfactant Novachem 0.05% (v/v) (pH 8–10). These are carrier solutions that correspond to different ways of NPs stabilization [42]. Poor signals were obtained with NaPP and SDS carriers, whereas ultrapure water showed low recoveries when analysing complex matrices. The mixed surfactant, on the other hand, contributed to increase suspension stability, even when the matrices became more complex, as it was observed in Ref. [44], so Novachem 0.05% was selected as the optimal carrier in AF4 separation.

Cross flow rate was chosen trying to maximize recoveries with adequate retention levels, so separation from the void peak were reached. It is well known that, according to AF4 theory, higher crossflows lead to higher retention times since particles are focused closer to the membrane, but it would also increase sorption phenomena with the membrane and therefore decrease recoveries [42]. Cross flows from 0.1 to 0.5 mL min⁻¹ were studied using 30 nm rutile NPs TiO₂ nanoparticles, which resulted in retention times in the range of 14–40 min, respectively, while recoveries

decreased around a 15%, as expected. Therefore, the softest condition (0.1 mL min⁻¹) was chosen for the rest of the study.

3.2. Strategies for size calibration in AF4

Different strategies have been described in literature for size calibration of TiO₂ particles by AF4. Size standards of polystyrene (PS) have been used frequently for direct calibration in AF4 to convert retention time into hydrodynamic diameter [7,20]. Some other NPs have been also proposed for AF4 calibration, such as AuNPs [25], although discrepancies between the two calibrations (Au vs. PS NPs) have been reported. Hydrodynamic diameters have been also determined on-line by DLS [41] and radius of gyration by MALS, but with some limitations when concentrations in samples are low or when nanoparticles are small [45–47].

In this work, the use of suspensions of TiO₂ nanopowders of different sizes (described in section 2.1.1) for AF4 size calibration was proposed as a first approach, to reproduce the same interactions that may affect elution times of TiO₂ NPs in the samples. However, fractograms showed wide peaks with subtle differences on the elution times (Fig. S1), which made no possible their use for size calibration. The analysis of these nanomaterials by FESEM (Fig. S2) confirmed the presence of aggregates with sizes much larger than the individual constituents, above 100 nm, which has also been reported for rutile products by some authors [10,26,27]. It was concluded that all the TiO₂ nanopowders used were aggregated in suspensions, no matter their primary sizes, and even after probe sonication under the conditions described in section 2.1.1, which justifies the similar elution times observed in AF4.

Alternatively, SiO₂ NPs were considered for size calibration in AF4. Sizes of TiO₂ suspensions were first studied and results compared to those obtained by DLS and AF4 calibrated vs. PS nanoparticles size standards. Results are shown in Table 3. The similar results obtained by AF4 for the two different calibrations confirmed that there were no effects of the nature of the NPs tested on the elution times, under the separation conditions used, and the reliability of the size of SiO₂ suspensions used.

It could be observed that larger values respect to the nominal sizes provided by the manufacturer were obtained in all cases. The analysis by DLS also showed sizes larger than the nominal values, which also suggest the presence of aggregates in suspension, which confirms the results obtained by FESEM. Values predicted by DLS were similar between them and comparable to those obtained by AF4, except in the case of the 100 nm suspension, where a smaller size was obtained.

Therefore, the size calibration of AF4 with SiO₂ NPs gives reliable results for size characterization of TiO₂ NPs when compared to those obtained using PS size standards, so both types of nanoparticles can be used for this purpose. The use of a DLS detector coupled to AF4 also confirmed the information provided by size calibration in AF4, although smaller fractions could be poorly characterized given the limitations of DLS at low concentration levels at these size ranges. In this work, strategies based on both

Table 3

Size characterization for three different rutile nanopowders (30, 50 and 100 nm of nominal sizes) by DLS and calibrations by means of AF4, from both SiO₂ and PS size standards (n = 3). For sizes by DLS, polydispersity indexes (Pdl) are shown. Sizes obtained by AF4 correspond to peak maximum (media ± s) (n = 3) and ranges (in brackets) to the width at half height of the peaks.

Nominal size TiO ₂ NPs/nm	Size by DLS nm (Pdl)	AF4 vs. SiO ₂ nm (Size range)	AF4 vs. PS nm (Size range)
30	346 ± 14 (0.30 ± 0.01)	268 ± 16 (120–420)	240 ± 14 (100–380)
50	329 ± 23 (0.22 ± 0.03)	325 ± 8 (170–480)	295 ± 8 (150–440)
100	348 ± 6 (0.20 ± 0.01)	535 ± 10 (300–765)	495 ± 9 (275–710)

Table 4

Size determination for three photocatalytic products which contains TiO₂ nanoparticles. Comparison between results from AF4-DLS (with size range between brackets at half height of the peaks) and size calibration vs. SiO₂ and PS size standards. Results expressed as media ± s (n = 3).

Product	AF4-DLS	AF4 vs. SiO ₂	AF4 vs. PS
	Mean size (nm)	Size at peak maximum (nm)	
P25	162 ± 2 (130–230)	172 ± 1 (60–280)	150 ± 1 (40 ^a - 260)
FN2	167 ± 3 (150–260)	159 ± 13 (100–290)	140 ± 12 (85 ^a - 265)
Coating	64 ± 1 (50–90)	56 ± 4 (<10–95)	40 ± 4 ^a

^a Extrapolated from calibration size range.

size calibration and DLS were applied to characterize sizes of TiO₂ particles in different types of samples.

3.3. Analysis of photocatalytic products

The use of both PS and SiO₂ NPs for size calibration was first applied to the characterization of two commercial products which contain titanium dioxide particles (P25 and FN2, described in section 2.2.1). These two products are usually employed for photocatalytic purposes and present similar composition (ca., 80% anatase/20% rutile) with primary size diameters between 20 and 40 nm [48]. In the case of P25, it has been characterized in the bibliography by different techniques, such as electron microscopy [48], or DLS [42,49,50]. Results are summarized in Table 4. It can be observed that sizes obtained by AF4 calibrated with SiO₂ and PS NPs are larger than these values (around 150–170 nm), but they are in good agreement with those obtained by AF4 when coupled to DLS. These results suggest that these NPs tend to aggregate in suspension, as observed by other authors [42,49,50] when they characterize P25 suspensions by DLS, with hydrodynamic diameters in a range between 100 and 200 nm.

3.3.1. Analysis of photocatalytic coating product

The coating product analyzed (NP Fotoactiva 23) consists of a suspension of TiO₂ nanoparticles, with a crystal structure of anatase and a primary particle size around 10 nm, according to the manufacturer. This product is used for both self-cleaning application in buildings and facades and photocatalytic removal of atmospheric contaminants as NO_x. The matrix of this product is acidic, and shows a white translucent aspect, so a simple dilution in the carrier was proposed for its analysis by AF4. Fig. 1 shows the fractograms of this product with the three detectors used. A single peak eluted at 6.8 min was obtained, which corresponds to a diameter of 56 ± 4 nm and 40 ± 4 nm with calibrations vs. SiO₂ and PS nanoparticles respectively (results shown in Table 4). Results with SiO₂ NPs calibration are in good agreement with the hydrodynamic diameter obtained by DLS (green dots in Fig. 1) with a range between 50 and 90 nm. DLS detector provides a series of hydrodynamic diameters measurements when the scattered signal is above the baseline, increasing these diameters along the time, in accordance with normal elution in AF4. The analysis of this product by FESEM (Fig. S3) shows aggregates of nanoparticles with primary

sizes smaller than 20 nm, which suggests some grade of aggregation in suspension, similarly to those products described in section 3.3, but lower than the observed for the nanopowders described in section 3.2.

3.4. Analysis of surimis

3.4.1. TiO₂ NPs extraction from surimi by TMAH

This was the most complex scenario studied, since the extraction of the TiO₂ particles from the solid matrix could modify its original size distribution. In fact, the use of different sample preparation protocols applied to the characterization of TiO₂ NPs in sunscreens has been reported to led to different particle size distributions when characterized by AF4 [27]. Although different strategies have been described in the bibliography for the size characterization of TiO₂ in solid samples, as previously discussed, this is the first time an alkaline extraction is proposed for food samples. Alkaline extraction with TMAH have proved to have high extraction efficiency of different NPs, such as Ag, Au or carbon nanotubes from tissues [51–53]. Some of the advantages are the low amount of salts remaining in solution after digestion, or the fact that no sulphur species are added (in comparison with enzymatic digestion), which can cause interferences in ICP-MS [53]. The procedure was optimized for the highest Ti recoveries and considering the size distributions obtained. Preliminary experiments based on using mechanical shaking for TiO₂ NPs extraction from surimi led to small efficiencies, even using large extraction times. Ultrasound water-bath device, instead of ultrasounds probe, was chosen because of ionic (dissolved) Ti contamination drawbacks reported when using ultrasounds probes [33]. The effect of TMAH percentage, sonication (extraction time) and the volume of the extractant solution were studied. The optimization process is described in detail in section 1 of the SI and the final conditions used are summarized in section 2.4.

3.4.2. TiO₂ particle size determination in surimi samples

TMAH extracts from four different surimi samples were analyzed by AF4-UV-Vis-DLS-ICP-MS, under the experimental conditions summarized in Table 1. Results are shown in Fig. 2. In general terms, there is a good correspondence between scattered signal from DLS and the titanium ICP-MS profile for the four samples analyzed, which suggests the particulate nature of the titanium present in the extracts and eluted in AF4. Besides, the small ICP-MS signal eluted at the void peak, around 4.5 min, implies that the titanium associated to the organic fraction remaining in the extracts from surimi matrices (UV signal at 254 nm) is not significant. Therefore, it can be stated that AF4 is able to separate, under the conditions optimized, the titanium extracted from surimi in a reasonable time (less than 12 min) thanks to the use of a channel of reduced length. Respect to the DLS hydrodynamic diameters measurement (green dots), given that the acquisition time for the cumulant analysis is reduced (3 s), many measurements do not fit the quality criteria for the correlation function and only a few values are shown, which normally corresponds to the highest scattered signals. This limitation for DLS detectors can lead to an

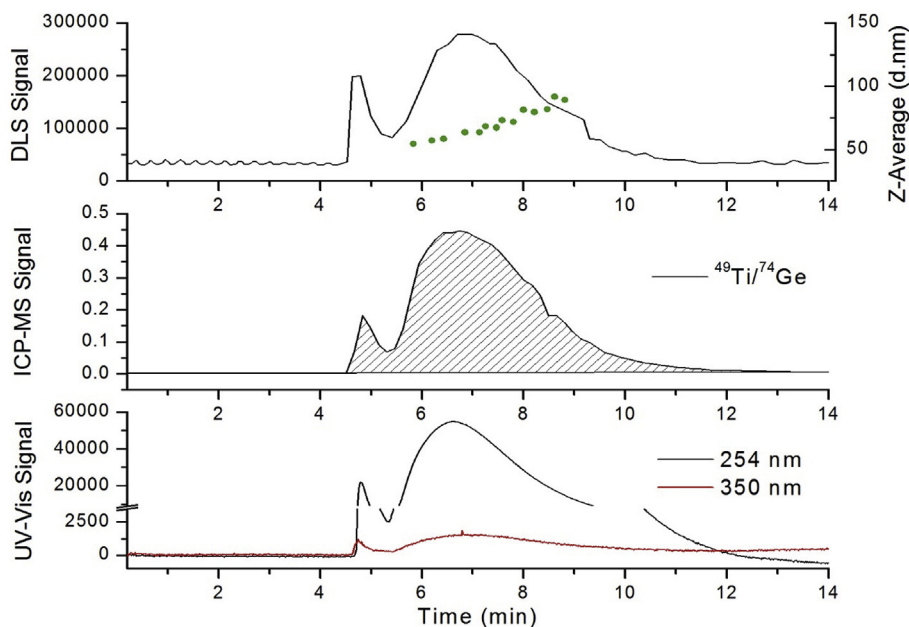


Fig. 1. Fractograms for photocatalytic coating product. Green circles correspond to Z-average (hydrodynamic diameter) measured by DLS. Striped area represents the integrated area quantified by ICP-MS. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

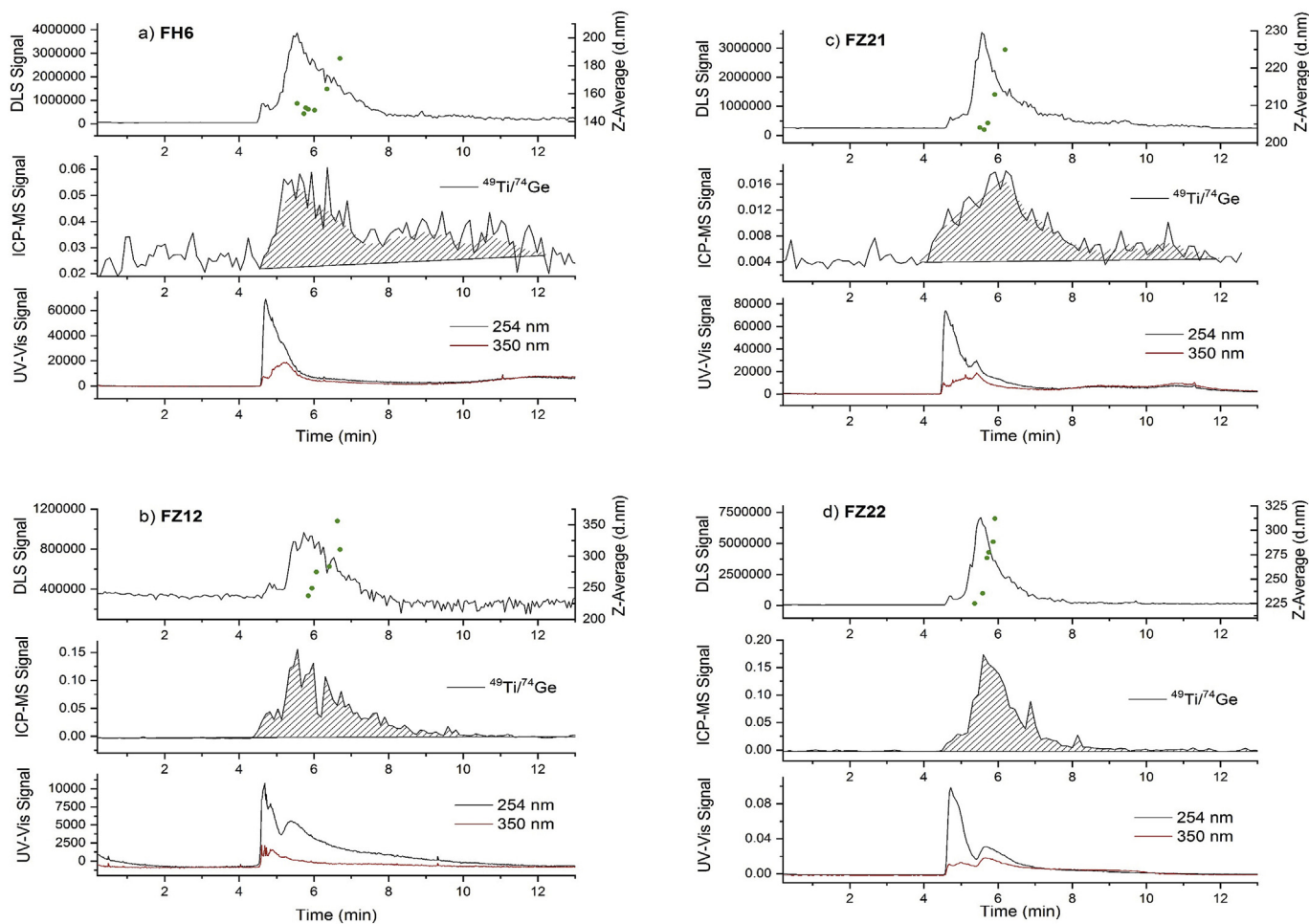


Fig. 2. Fractograms for surimi FH6 (a), FZ12 (b), FZ21 (c) and FZ22 (d). Green circles correspond to Z-average (hydrodynamic diameter) measured by DLS. Striped area represents the integrated area quantified by ICP-MS. Signal smoothed in (a) and (c). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 5

Size characterization of TiO₂ particles from surimi samples by AF4-DLS (hydrodynamic diameter) and Single Particle ICP-MS (spherical equivalent diameter, $n = 3$), with size range between brackets. The results by single particle are presented as the most frequent size, in nm.

Sample	AF4-DLS Mean size (nm)	SP-ICP-MS Most frequent size (nm)
FH6	153 (140–200)	45 ± 1 (36–151)
FZ12	237 (225–350)	73 ± 1 (36–251)
FZ21	204 (200–230)	38 ± 2 (36–90)
FZ22	235 (225–325)	69 ± 1 (36–362)

overestimation of size distributions, since the intensity of light scattered by small particles is much lower (to the sixth power) than larger ones, and can also limit the smallest size attainable by this detector considering the low concentrations in the samples analyzed. Table 5 summarizes the diameters obtained by AF4-DLS for the four surimis analyzed. Diameter ranges are referred to all the DLS measurements, whereas the value for mean diameter is only referred to the peak maximum of scattered intensity signal. In general, all the values obtained are larger than 140 nm, with diameters up to 350 nm. These values are in good agreement with the values reported in bibliography. A study made with seven different TiO₂ pigments used as E171, showed sizes between 350 and 480 nm by AF4-UV, 130–210 nm by SP-ICP-MS, and ranges from 250 to 400 nm by SEM (aggregates, whereas primary particle size were in the range of 60–300 nm) [7]. Based on TEM image analysis, the primarily particle size of food grade TiO₂ has a very broad size distribution (25–410 nm), with 12–15% of the particles smaller than 100 nm [5]. Size ranges between 200 and 400 nm were obtained by AF4-ICP-MS in number percentage, with a 10% < 100 nm [6]. Average diameters in the range of 100–200 nm were obtained by SEM, whereas larger sizes (330–390 nm) were obtained by DLS for the same products [5], since they are referred to hydrodynamic diameters. Even larger sizes have been obtained by DLS as a function of pH and ionic strength (up to 800 nm at pH 5 and ionic strength of 10 mM) [54].

In this case, the presence of a fraction smaller than 100 nm could not be confirmed, due to small scatter intensity signals, which likely hinder the proper size characterization of the smallest fractions. The calibration with SiO₂ NPs was also applied to transform elution times into diameters. However, quite small diameters were predicted by this procedure, which suggests that elution times were shorter than expected. The influence of the matrix on the elution times in AF4 has been previously reported in literature [16]. This effect is caused by repulsion or attraction forces between the particles and the permeation membrane, which modifies the position of the analyte cloud inside the channel during the focusing/relaxation step. The use of size standards of a similar nature than the particles in the sample tries to minimize these effects, although matrix effects are still possible. In order to study this effect, the elution times of a suspension of TiO₂ NPs of 30 nm (nominal size) in ultrapure water, a TMAH solution of 10% (v/v) and a surimi extract FZ12 were compared. Whereas comparable elution times were obtained in ultrapure water and TMAH (around 18 min), shorter times (7 min) were obtained for surimi extracts. This result suggests that elution times are modified by the matrix, being shorter than those predicted by the calibration with SiO₂ or PS. The alteration of the stability of TiO₂ NPs with the presence of some organic ligands has been reported before [55,56] and may affect not only the chemical composition of the particles surface, but also its charge. These changes may modify the interaction between particle-membrane, which plays a major role in separation in AF4, as pointed in section 3.1. Therefore, those strategies based on size calibration of AF4 with suspensions of NPs of known sizes, can be

prone to side effects caused by matrix in complex samples. Dilution of the samples could minimize this effect, but this strategy is limited by the concentration level of the analyte, such in this case.

Given the limitations of DLS detector for the characterization of size fractions under 100 nm and the poor results obtained by the size calibration procedure, the size distribution of TiO₂ particles was also determined by SP-ICP-MS. Same four surimi samples were analyzed, and results obtained are shown in Table 5. Limit of detection (LOD) for TiO₂ NPs size by SP-ICP-MS, were established at 36 nm (3 σ criteria) and 43 nm (5 σ criteria). These calculated LOD in size were similar to those previously reported for TiO₂ NPs assessment by SP-ICP-MS [21,33]. Repeatability, expressed as RSD in TiO₂ NPs size, was 5% (39 ± 2 nm) for the most frequent size. TiO₂ particle size distributions (histograms) are shown in Fig. 3. For samples FH6 and FZ21, sizes ranged from 36 to 150 and 90, respectively; whereas for samples FZ12 and FZ22, the range was wider, from 36 to 250 and 360 nm. These results confirm the presence of TiO₂ nanoparticles in the surimi extracts, although the complete size distribution could not be obtained given the LOD in size. Differences on the size ranges observed respect to the results from AF4-DLS (Table 5) are justified by the different nature of the parameter measured (hydrodynamic diameter vs. mass spherical equivalent diameter) and the higher size detection limits obtained by AF4-DLS.

3.5. Validation of the alkaline extraction and quantification of TiO₂ NPs by AF4-ICP-MS

The efficiency of the extraction by TMAH from surimis was evaluated by the quantification of total Ti contents in the alkaline extracts by ICP-OES, and the subsequent comparison with the results obtained via acid digestion of the same samples, following the procedures described in sections 2.3 and 2.4, respectively. Results are shown in Table 6.

In the case of samples FH6 and FZ21, concentrations were lower than the limit of quantification attained by ICP-OES (2.80 $\mu\text{g Ti g}^{-1}$). In general terms, although higher concentrations were found in the alkaline digested samples, differences were not significant, verified by *t*-test (95% confidence interval), so TMAH extraction procedure proved to extract similar contents to the acid digestion, which corresponds quantitatively to the total titanium content in surimis.

The procedure for the quantification of TiO₂ NPs extracted by AF4-ICP-MS was validated through the analysis of the commercial nanopowder of TiO₂ of 30 nm of nominal size. Firstly, direct analysis of suspensions of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ by ICP-MS resulted in Ti contents in accordance to the concentrations found after acid digestion (section 2.3.) of this product, using Ti ionic standards. Then, the suitability of on-line calibration was verified analysing the same suspension by AF4-ICP-MS, obtaining recoveries higher than 85%. The limit of quantification (as 10 times the standard deviation of baseline/sensitivity) of the AF4-ICP-MS method was established in 2.10 $\mu\text{g Ti g}^{-1}$. Repeatability, studied by the injection of a suspension of the commercial nanopowder of TiO₂ of 30 nm of nominal size, expressed as RSD ($n = 3$) were 2% in elution time (time at peak maximum) and 4% in concentration (area of the peak integrated in the fractogram).

3.6. TiO₂ particles quantification

In order to quantify TiO₂ by AF4-ICP-MS, two different strategies have been described for mass concentration calibration. On one hand, external calibrations with products containing synthetic TiO₂ nanoparticles have been used as standards. In that case, commercial products such as P25 or NM-100 were diluted in ultrapure water [8] or in surfactants like Triton X-100 [31], and then diluted in

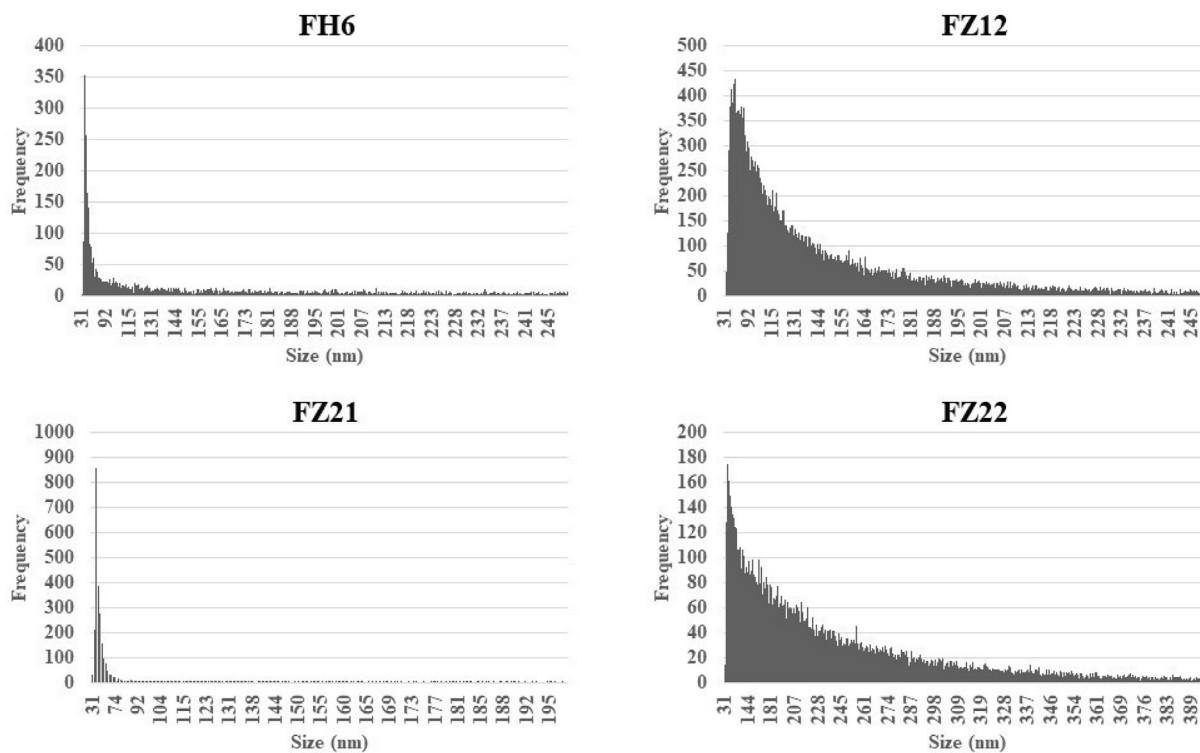


Fig. 3. TiO₂ NPs size distribution in surimi samples by SP-ICP-MS.

Table 6

Total titanium concentrations determined in different samples: photocatalytic coating product (mg Ti g⁻¹) and surimis (μg Ti g⁻¹). Coating product: acid digestion followed by ICP-OES (n = 3) and AF4-ICP-MS (n = 2). Surimis: alkaline digestion followed by ICP-OES (n = 2), acid digestion followed by ICP-MS (n = 3) and AF4-ICP-MS (n = 2). Results expressed as mean ± s.

Sample	Titanium (mg g ⁻¹)			
		Acid digestion ^b	AF4-ICP-MS	
Coating product		19.87 ± 1.25	16.86 ± 2.54	
Surimis:	Titanium (μg g ⁻¹)			
	TMAH extraction ^a			
		Acid digestion ^b	AF4-ICP-MS ^c	
	FH6	2.91 ± 0.25	2.29 ± 0.37	3.14 ± 0.10
	FZ12	16.39 ± 2.28	12.40 ± 1.00	11.75 ± 1.13
FZ21	< LOQ	3.16 ± 0.78	3.83 ± 0.16	
FZ22	13.50 ± 4.51	9.69 ± 1.10	14.55 ± 1.46	

^a ICP-OES quantification, except result from FH6, determined by ICP-MS.

^b Microwave assisted acid digestion followed by ICP-MS quantification.

^c After TMAH extraction.

aqueous solutions at different concentrations. On the other hand, on-line calibrations with Ti ionic standards have been also described [6,26], which was the strategy selected in this study for Ti quantification.

Results of the analysis of the self-cleaning coating product and the surimi extracts by AF4-ICP-MS are summarized in Table 6. In general, there is a good agreement of these results when compared to the total content of Ti in the extracts, which confirms the suitability of the procedure by calibration with ionic Ti standards. It should be also noted the high channel recoveries obtained (above 80%) in all the cases, and the capability of the method to quantify in a range of concentrations close to the limit of quantification, such in surimis FH6 and FZ21. These recoveries are satisfactory, regarding the use of AF4 for TiO₂ in complex samples in literature [6,7,26,30,37,57], and the low concentration levels of Ti found in the

samples, in the range of μg Ti g⁻¹.

Attending to the fractograms shown in Fig. 2, the integrated area corresponds to the particulate fraction of Ti extracted, so all the titanium present and extracted from surimis was in particulate form, with size ranges values established in section 3.4.2. and shown in Table 5. These results were also confirmed by the quantification of the dissolved fraction of Ti by SP-ICP-MS, obtaining concentrations that account for less than 1% the total amount of Ti determined in the samples. It can be concluded that the procedure developed was able to extract the TiO₂ in surimis and quantitatively characterized by size the particles added as E171, remaining unaltered respect to the size distribution of the original pigments described in bibliography [7].

4. Conclusions

The combination of AF4 coupled to DLS and ICP-MS as detectors, has proved to be a successful strategy to quantitatively characterize by size the TiO₂ particles added to different products, based on their photocatalytic properties, such in the case of a self-cleaning coating, or as whitening pigment used as food additive E171 in the case of surimis. The use of TMAH as extractant is compatible with high TiO₂ particle recoveries in AF4, which is one of the most serious drawbacks for quantification in AF4 coupled to ICP-MS. This is the first time that the TiO₂ forms in a food product have been successfully characterized and quantified at μg g⁻¹ concentration levels. This low concentration levels are associated with some limitations when size characterization by AF4 coupled to DLS is carried out. In the case of surimis, SP-ICP-MS coped with these limitations given its low number concentration LOD, although those factors affecting the minimum size detectable affect the information obtained of the size distribution of the particles in the sample. Other strategies based on the use of size standards for AF4 size calibration have been successfully applied to the

characterization of TiO₂ NPs in industrial products, but they can be affected by matrix effects in complex situations, such in food analysis. These results confirm the difficulties of AF4 to characterize the smallest fractions of nanoparticles size distributions when size standards behave in a different way than the nanoparticles in the sample, and the use of detectors that provide independent size information (such as DLS or multiangle light scattering) are limited at these size ranges. The results obtained along this work confirm that the size distribution of TiO₂ particles extracted from surimis resembles the distribution of the pigments used as food additive E171, and that a nano-sized fraction is present, although both applied methods showed size limitations for TiO₂ particles in this range.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRedit authorship contribution statement

David Ojeda: Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **María Vanesa Taboada-López:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Eduardo Bolea:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Supervision. **Josefina Pérez-Arategui:** Conceptualization, Investigation, Supervision. **Pilar Bermejo-Barrera:** Supervision, Funding acquisition. **Antonio Moreda-Piñero:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Supervision. **Francisco Laborda:** Project administration, Funding acquisition, Conceptualization, Writing - review & editing.

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Regional Development Fund, projects RT2018-099222-B-100 and RTI2018-096111-B-I00 (MICINN/FEDER). Taboada-López thanks the Xunta de Galicia and the European Social Fund (FSE) for a pre-doctoral grant.

The authors would like to acknowledge the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza, for ICP-MS and FESEM measurements.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.080>.

References

- [1] L.J. Hazeem, F.A. Waheed, S. Rashdan, M. Bououdina, L. Brunet, C. Slomianny, R. Boukherroub, W.a. Elmeselmani, Cumulative effect of zinc oxide and titanium oxide nanoparticles on growth and chlorophyll content of *Picochlorum* sp, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2015) 2821–2830, <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4370-5>.
- [2] B. Salieri, S. Righi, A. Pasteris, S.I. Olsen, Freshwater ecotoxicity characterisation factor for metal oxide nanoparticles: a case study on titanium dioxide nanoparticle, *Sci. Total Environ.* 505 (2015) 494–502, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.107>.
- [3] J. Hou, L. Wang, C. Wang, S. Zhang, H. Liu, S. Li, X. Wang, Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms, *J. Environ. Sci.* 75 (2018) 40–53, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.010>.
- [4] T. Lammel, A. Mackevica, B.R. Johansson, J. Sturve, Endocytosis, intracellular fate, accumulation, and agglomeration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in the rainbow trout liver cell line RTL-W1, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2019) 15354–15372, <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04856-1>.
- [5] F. Fiordaliso, C. Foray, M. Salio, M. Salmona, L. Diomedea, Realistic evaluation of titanium dioxide nanoparticle exposure in chewing gum, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 6860–6868, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00747>.
- [6] R.J.B. Peters, G. Van Bommel, Z. Herrera-rivera, J.P.F.G. Helsper, J.P. Hans, S. Weigel, P. Tromp, A.G. Oomen, A. Rietveld, H. Bouwmeester, Characterisation of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 6285–6293, <https://doi.org/10.1021/jf5011885>.
- [7] J.P.F.G. Helsper, R.J.B. Peters, M.E.M. van Bommel, Z.E.H. Rivera, S. Wagner, F. von der Kammer, P.C. Tromp, T. Hofmann, S. Weigel, Physicochemical characterization of titanium dioxide pigments using various techniques for size determination and asymmetric flow field flow fractionation hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* (2016) 1, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9783-6>.
- [8] A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski, N. Von Goetz, Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 2242–2250, <https://doi.org/10.1021/es204168d>.
- [9] W. Dufefoi, H. Terrise, M. Richard-Plouet, E. Gautron, F. Popa, B. Humbert, M.H. Ropers, Criteria to define a more relevant reference samples of titanium dioxide in the context of food: a multiscale approach, *Food Addit. Contam.* 34 (2017) 653–665.
- [10] I. López-Heras, Y. Madrid, C. Cámara, Prospects and difficulties in TiO₂ nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 124 (2014) 71–78, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.029>.
- [11] F. Agency, O. Health, EFSA statement on the review of the risks related to the exposure to the food additive titanium dioxide (E 171) performed by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES), *EFSA J* 17 (2019), <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5714>.
- [12] The European Commission, Commission, recommendation (UE) 2011/696 of 18 october 2011 on the definition of nanomaterial, *off. J. Eur. Union* 275 (2011) 38–40.
- [13] IARC/NORA, Identification of research needs to resolve the carcinogenicity of high priority IARC carcinogens, *Int. Agency Res. Cancer.* 42 (2009).
- [14] EFSA, Re-evaluation of titanium dioxide (E171) as a food additive, *EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS)* 14 (2016) 4545.
- [15] C. Contado, Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem, *Front. Chem.* 3 (2015) 1–20, <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00048>.
- [16] M. Mattarozzi, M. Suman, C. Cascio, D. Calestani, S. Weigel, A. Undas, R. Peters, Analytical approaches for the characterization and quantification of nanoparticles in food and beverages, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 63–80, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9946-5>.
- [17] J.H. Lim, D. Bae, A. Fong, Titanium dioxide in food products: quantitative analysis using ICP-MS and Raman spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 13533–13540, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06571>.
- [18] B. Zhao, X. Cao, R. De La Torre-Roche, C. Tan, T. Yang, J.C. White, H. Xiao, B. Xing, L. He, A green, facile, and rapid method for microextraction and Raman detection of titanium dioxide nanoparticles from milk powder, *RSC Adv.* 7 (2017) 21380–21388, <https://doi.org/10.1039/c7ra02520c>.
- [19] V. Moreno, M. Zougagh, Á. Ríos, Analytical nanometrological approach for screening and confirmation of titanium dioxide nano/micro-particles in sugary samples based on Raman spectroscopy – capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 1050 (2019) 169–175, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.067>.
- [20] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, F. Séby, Study of the presence of micro- and nanoparticles in drinks and foods by multiple analytical techniques, *Food Chem.* 266 (2018) 133–145, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.107>.
- [21] M.V. Taboada-López, P. Herbelo-Hermelo, R. Domínguez-González, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñero, Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS, *Talanta* 195 (2019) 23–32, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.023>.
- [22] A.P. Gondikas, F. Von Der Kammer, R.B. Reed, S. Wagner, J.F. Ranville, T. Hofmann, Release of TiO₂ nanoparticles from sunscreens into surface waters: a one-year survey at the old danube recreational lake, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 5415–5422, <https://doi.org/10.1021/es405596y>.
- [23] M.D. Montaña, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single Particle ICP-MS: advances toward routine analysis of nanomaterials, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5053–5074, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9676-8>.
- [24] B. Meermann, V. Nischwitz, ICP-MS for the analysis at the nanoscale—a tutorial review, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 1432–1468, <https://doi.org/10.1039/c8ja00037a>.
- [25] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, B. Maxit, F. Séby, Towards routine analysis of TiO₂ (nano-)particle size in consumer products: evaluation of potential techniques, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 147 (2018) 28–42, <https://doi.org/10.1016/j.sab.2018.05.012>.
- [26] C. Contado, A. Pagnoni, TiO₂ in commercial sunscreen lotion: flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7594–7608, <https://doi.org/10.1021/ac8012626>.
- [27] V. Nischwitz, H. Goenaga-Infante, Improved sample preparation and quality control for the characterisation of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using flow field flow fractionation on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1084, <https://doi.org/10.1039/c2ja10387g>.
- [28] A. Samontha, J. Shiowatana, A. Siripinyanond, Particle size characterization of titanium dioxide in sunscreen products using sedimentation field-flow

- fractionation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 973–978, <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4298-z>.
- [29] R.J.B. Peters, G. Van Bommel, Z. Herrera-rivera, J.P.F.G. Helsper, J.P. Hans, S. Weigel, P. Tromp, A.G. Oomen, A. Rietveld, H. Bouwmeester, Characterisation of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 6285–6293, <https://doi.org/10.1021/jf5011885>.
- [30] C. Contado, A. Pagnoni, TiO₂ nano- and micro-particles in commercial foundation creams: field Flow-Fractionation techniques together with ICP-AES and SQW Voltammetry for their characterization, *Anal. Methods*. 2 (2010) 1112, <https://doi.org/10.1039/c0ay00205d>.
- [31] B. Bocca, S. Caimi, O. Senofonte, A. Alimonti, F. Petrucci, ICP-MS based methods to characterize nanoparticles of TiO₂ and ZnO in sunscreens with focus on regulatory and safety issues, *Sci. Total Environ.* 630 (2018) 922–930, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.166>.
- [32] S. Candás-Zapico, D.J. Kutscher, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Single particle analysis of TiO₂ in candy products using triple quadrupole ICP-MS, *Talanta* 180 (2018) 309–315, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.041>.
- [33] M.V. Taboada-López, S. Iglesias-López, P. Herbelo-Hermelo, P. Bermejo-Barra, A. Moreda-Piñeiro, Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis for isolating titanium dioxide nanoparticles from bivalve mollusk before sp-ICP-MS, *Anal. Chim. Acta* 1018 (2018) 16–25, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.075>.
- [34] K.G. Wahlund, Flow field-flow fractionation: critical overview, *J. Chromatogr., A* 1287 (2013) 97–112, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.028>.
- [35] I. De la Calle, M. Menta, F. Séby, Current trends and challenges in sample preparation for metallic nanoparticles analysis in daily products and environmental samples: a review, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 125 (2016) 66–96, <https://doi.org/10.1016/j.sab.2016.09.007>.
- [36] S. Park, Y. Kim, Feasibility study on the extraction of TiO₂ nanoparticle exposed in the activated sludge using alkaline digestion, *J. Ind. Eng. Chem.* 41 (2016), <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.07.001>.
- [37] D.M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1131–1142, <https://doi.org/10.1039/c2ja30021d>.
- [38] E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo, Metal associations to microparticles, nanocolloids and macromolecules in compost leachates: size characterization by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to ICP-MS, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 206–214, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.021>.
- [39] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V. a Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9361–9369, <https://doi.org/10.1021/ac201952t>.
- [40] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2270–2278, <https://doi.org/10.1021/ac402980q>.
- [41] J. Omar, A. Boix, G. Kerckhove, C. von Holst, Optimisation of asymmetric flow field-flow fractionation for the characterisation of nanoparticles in coated polydisperse TiO₂ with applications in food and feed, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 33 (2016) 1775–1784, <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1239031>.
- [42] N. Bendixen, S. Losert, C. Adlhart, M. Lattuada, A. Ulrich, Membrane-particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles, *J. Chromatogr., A* 1334 (2014) 92–100, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.066>.
- [43] J. Gigault, J.M. Pettibone, C. Schmitt, V.A. Hackley, Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 809 (2014) 9–24, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.021>.
- [44] L. Sánchez-garcía, E. Bolea, F. Laborda, C. Cubel, P. Ferrer, D. Gianolio, I. Silva, J.R. Castillo, Size determination and quantification of engineered cerium oxide nanoparticles by flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry 1438 (2016) 205–215.
- [45] H. Hagendorfer, R. Kaegi, J. Traber, S.F.L. Mertens, R. Scherrers, C. Ludwig, A. Ulrich, Application of an asymmetric flow field flow fractionation multi-detector approach for metallic engineered nanoparticle characterization – prospects and limitations demonstrated on Au nanoparticles, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 367–378, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.014>.
- [46] D. Mahl, J. Diendorf, W. Meyer-Zaika, M. Eppe, Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 377 (2011) 386–392, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.01.031>.
- [47] Y. Dieckmann, H. Cölfen, H. Hofmann, A. Petri-Fink, Particle size distribution measurements of manganese-doped ZnS nanoparticles, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3889–3895, <https://doi.org/10.1021/ac900043y>.
- [48] B. Fadeel, A.E. Garcia-Bennett, Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 362–374, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.008>.
- [49] J. Jiang, G. Oberdörster, P. Biswas, Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *J. Nanoparticle Res.* 11 (2009) 77–89, <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9446-4>.
- [50] A. Teleki, R. Wengeler, L. Wengeler, H. Nirschl, S.E. Pratsinis, Distinguishing between aggregates and agglomerates of flame-made TiO₂ by high-pressure dispersion, *Powder Technol.* 181 (2008) 292–300, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2007.05.016>.
- [51] B. Schmidt, K. Loeschner, N. Hadrup, A. Mortensen, J.J. Sloth, C. Bender Koch, E.H. Larsen, Quantitative characterization of gold nanoparticles by field-flow fractionation coupled online with light scattering detection and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2461–2468, <https://doi.org/10.1021/ac102545e>.
- [52] E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, I. Abad-Álvaro, C. Bladé, L. Arola, J.R.R. Castillo, Detection and characterization of silver nanoparticles and dissolved species of silver in culture medium and cells by AsFFFF-UV-Vis-ICPMS: application to nanotoxicity tests, *Analyst* 139 (2014) 914–922, <https://doi.org/10.1039/c3an01443f>.
- [53] G. Singh, C. Stephan, P. Westerhoff, D. Carlander, T.V. Duncan, Measurement methods to detect, characterize, and quantify engineered nanomaterials in foods, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13 (2014) 693–704, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12078>.
- [54] C. Chen, I.M. Marcus, T. Waller, S.L. Walker, Comparison of filtration mechanisms of food and industrial grade TiO₂ nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 6133–6140, <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1132-5>.
- [55] Z. Ji, X. Jin, S. George, T. Xia, H. Meng, X. Wang, E. Suarez, H. Zhang, E.M.V. Hoek, H. Godwin, A.E. Nel, J.J. Zink, Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 7309–7314, <https://doi.org/10.1021/es100417s>.
- [56] A. Márquez, T. Berger, A. Feinle, N. Hüsing, M. Himly, A. Duschl, O. Diwald, Bovine serum albumin adsorption on TiO₂Colloids: the effect of particle agglomeration and surface composition, *Langmuir* 33 (2017) 2551–2558, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03785>.
- [57] E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, J.R. Castillo, Size characterization and quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2723–2732, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5201-2>.



How the use of a short channel can improve the separation efficiency of nanoparticles in asymmetrical flow field-flow fractionation



David Ojeda, Pablo Sánchez, Eduardo Bolea*, Francisco Laborda, Juan R. Castillo

Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna, 12., 50009, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2020

Revised 19 November 2020

Accepted 23 November 2020

Available online 26 November 2020

Keywords:

AF4

short channel

polystyrene nanoparticles

resolution

efficiency

titanium dioxide nanoparticles

ABSTRACT

The use of a commercially available short length channel (14 cm length) is proposed to improve the efficiency associated to the separation by asymmetrical flow field-flow fractionation of particles in the nanometer range respect to a standard channel (27 cm length). The effect of channel length on elution times, separation efficiency and resolution have been studied. Polystyrene particles between 50 and 500 nm in size have been used to compare the behavior of both channels. Theoretical aspects based on the different contributions on particle diffusion inside the channel during the separation process have been considered to justify the results obtained. Non-equilibrium diffusion contribution to the efficiency has shown to be the most relevant aspect to be controlled during the separation. The increment of the field strength applied through the cross-flow velocity allows the reduction of diffusion while keep elution times constant. The use of the same cross-flow in a channel with a smaller area is the key factor that justifies the better efficiencies observed along the whole size range studied (improvements that reach factors up to 4.7 in experimental efficiency respect to the standard channel were achieved). The separation of polystyrene particles of 100 and 200 nm was achieved with a resolution of 1.20, whereas a 0.66 value was obtained with the standard channel at the same elution times. Channel recoveries have been also compared under optimized conditions to ensure that no side effects are produced, including the separation of mixtures of TiO₂ nanoparticles. Similar or even better values were obtained with the short length channel, with recoveries higher than 85% for all the polystyrene particles tested and 75% recovery for the TiO₂ nanoparticle mixture, which justifies its use for the separation of nanoparticles, providing better resolutions without compromise elution times or recoveries.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of channels of different sizes and geometries in Field Flow Fractionation (FFF) techniques have been described in the literature [1–4] during the last two decades. In the case of commercially available miniaturized AF4 and hollow-fiber Flow-FFF (also known as HF5) systems, they showed promise in the separation and analysis of a wide range of particles [5–7]. The main advantages of these two systems with reduced dimensions over conventional AF4 devices include: smaller sample injection amounts, consumption of less mobile phase, shorter retention times, and ease of coupling with other analytical techniques. For instance, the use of miniaturized channels has been described for the measurement of different macromolecules such as high- and low-density lipoproteins [5,8], polystyrene [6], gold [6,7] and titanium diox-

ide nanoparticles [7,9], as well as quantum dots [10]. In general, these studies correspond to channels of reduced dimensions, both in length (L) and channel breadth (with typical lengths around 7 cm), which lead to shorter analysis times, with the associated reduction in costs, and higher signal-to-noise ratios. These advantages are also associated to the need for injecting less amount of sample to avoid channel overloading, and generally at a cost of lower resolution. The use of a short channel (12 cm of length) has also been described in the separation of lipoproteins for the analysis of cholesterol and triglycerides by enzymatic reaction followed by UV-Vis detection [11]. The use of this short channel allowed the reduction of the outlet flow, minimizing the consumption of expensive enzymatic reactants and decreasing the sample dilution as well, with higher peak heights with respect to the conventional long channel. However, all these advantages relied on empirical observations, and none of these studies developed a theoretical study of the influence of the channel dimensions on the separation in AF4.

* Corresponding author.

E-mail address: edbolea@unizar.es (E. Bolea).

On the other hand, the effects of the channel geometry on separation in Flow-FFF has been studied from a theoretical point of view in some works [12–15], although the effect of channel length has been included just in a few of them [16,17]. During the development of the theoretical basis of the technique, Giddings investigated the theoretical miniaturization of FFF [16]. Using the number of plates (N) concept for the study of the separation efficiency, he demonstrated that this parameter N depends linearly on the retention time and strongly on the layer thickness of the analyte cloud inside the channel (l). If the retention time and layer thickness are kept constant by appropriate adjustments of the flow rates, equal plate numbers should be obtained independently of channel length [16], which implies an increase of the plate height (H) as long as the channel length (L) increase proportionally. This author concluded that performance is determined primarily by l , which is influenced mainly by the cross-flow. Litzen corroborated this observation in a deep study of the effects of channel dimensions on separation efficiency of an AF4 system [17]. The author determined that a channel length longer than 15 cm did not improve the efficiency of the separation in terms of plate height if retention times remained constant and also that efficiency improvements with channel length could only be achieved at cost of increasing the retention time proportionally (reaching a maximum at 60 cm). Similarly, it was concluded that it is much more efficient to affect the band broadening, and therefore the efficiency, by the cross-flow. However, there are practical limitations for the applied cross-flow, since steric effects [18], membrane interactions [19,20] and particle-particle interactions [21,22] are all enhanced as the cross-flow increases. Therefore, it is difficult to isolate the effect of just one variable, such as the cross-flow or the channel length, given their influence on different aspects of the separation (retention times, efficiencies or recoveries). Some of the studies previously mentioned were corroborated by experimental designs using well defined molecules in terms of diffusion coefficient, mainly proteins [12,13], or polystyrene nanoparticles [14,15]; although parameters such as recovery, to control unexpected interactions with the membrane, were not considered.

The extraordinary interest gained by engineered nanoparticles (ENPs) during the last decade, has strongly promoted the use of AF4 for their detection and characterization in multiple fields [23,24]. The beneficial properties of this technique (e.g., no stationary phase, high separation power, multi-elemental capabilities coupled to different detectors) justifies its popularity, commonly in combination with other techniques or as a complementary tool in complex scenarios [25–28]. On the other hand, the optimization of the operating conditions (such as carrier composition, permeation membrane or cross-flow program) for each type of sample is usually recommended to achieve reasonable separation with minimum perturbation and high recoveries for all species [18,29–31]. The optimization of operating conditions tends to minimize these interactions, but usually without paying much attention on the efficiency of the separation achieved. The present work focus on those variables that can affect the separation efficiency of this type of analytes (particles below 500 nm of size), comparing the performance of two channels, a short length channel (SLC) and a standard channel (SC), using same sample loads and separation conditions, including the recoveries achieved. A section with the theoretical fundamentals of the variables that affect the band broadening in AF4 and their effect on resolution, retention and efficiency of the separation has been included, with the aim of supporting the experimental findings.

2. Theory

The efficiency of the separation in AF4 is determined by different sources of dispersion. The magnitude of each component can

be quantified by plate height (H): a parameter that relates the variance σ^2 of the concentration profile divided by the mean displacement (L). Plate height is the most common mean to describe dispersion phenomena, from which equations can be expressed and will be used as guidelines for a better understanding of the different variables that are relevant in separation. In normal (Brownian) mode, the origin of these sources are: nonequilibrium (H_n), axial diffusion (H_d), relaxation (H_r), polydispersity (H_p) and instrumental effects (H_e) [32]. All these contributions are additives so the dispersion can be expressed as:

$$H = H_n + H_d + H_r + H_p + H_e \quad (1)$$

Under most circumstances, the principal source of dispersion in FFF is nonequilibrium [16,17,32]. Nonequilibrium phenomena are produced by the fact that different components of the analyte are driven through the channel at different velocities in the axial direction, despite having similar sizes. These velocities are originated from the laminar nature of the carrier flow, in which the maximum is reached in the centre of the channel thickness, and the minimums at the walls, following a parabolic profile. Nonequilibrium is expressed as:

$$H_n = \frac{\chi}{D} w^2 \langle v \rangle \quad (2)$$

where w is the channel thickness, D the diffusion coefficient of the analyte and $\langle v \rangle$ the average velocity of the carrier liquid, which is defined by the axial flow (\dot{V}) divided by the channel breadth (b) and the channel thickness:

$$\langle v \rangle = \frac{\dot{V}}{bw} \quad (3)$$

On the other hand, the function χ is related to the third power of the retention parameter λ , and it is commonly used in its simplified form:

$$\chi = 24\lambda^3(1 - 8\lambda + 12\lambda^2) \quad (4)$$

According to the basis of FFF theory, the retention parameter λ is defined as the ratio between the mean zone layer thickness (l) and the channel thickness (w). It is therefore referred to the position of the analyte cloud into the channel, which depends on the equilibrium between the diffusion coefficient of the species (D) and the cross-flow velocity applied ($|u_c|$), in the case of Flow-FFF:

$$\lambda = \frac{l}{w} = \frac{D}{|u_c|w} \quad (5)$$

where the cross-flow velocity is the result of the force applied through the channel, and depends on the cross-flow (\dot{V}_c) and the area (A) of the channel:

$$|u_c| = \frac{\dot{V}_c}{A} \quad (6)$$

so, Eq. (5) can be rearranged as:

$$\lambda = \frac{DA}{\dot{V}_c w} \quad (7)$$

Because the diffusion coefficient of the species is defined by the Stokes-Einstein equation:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d} \quad (8)$$

it can be combined with Eq. (7), resulting in

$$\lambda = \frac{kTA}{3\pi\eta d_h \dot{V}_c w} \quad (9)$$

where k is Boltzmann's constant, T is the absolute temperature, η

is the viscosity and d_h is the hydrodynamic diameter of the analyte. All these parameters that defines the retention parameter λ will determine the position of the species into the channel and, consequently, will have a major role in nonequilibrium dispersion. Although the relationship between the H_n component and channel length (L) is not straightforward, it can be deduced from the parameter λ and function χ . Under the same separation conditions (same cross-flow (\dot{V}_c), same average velocity of the carrier ($\langle v \rangle$), and channel dimensions (w and b), a decrease of the area (A) will lead to a higher cross-flow velocity (Eq. (6)), which means a reduction of the retention parameter λ (Eq. (7)) and function χ (Eq. (4)), therefore, non-equilibrium dispersion will diminish with the length L .

This behavior respect to the channel length is just the opposite for the axial diffusion (H_d) component. Axial diffusion occurs in response to axial concentration gradients of the analyte, which, in higher or lesser degree, cannot be avoided in FFF [32]. It is defined as:

$$H_d = \frac{2D}{R\langle v \rangle} \quad (10)$$

where R is a retention parameter, referred to the experimental ratio of retention times:

$$R = \frac{t_0}{t_r} \quad (11)$$

being t_0 and t_r the retention times associated with the void peak and the peak maxima of retained species, respectively. This means that, for high retention times (t_r), diffusion phenomena are more probable to occur. The experimental parameter R is also related to λ as follows:

$$R = 6\lambda \coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 12\lambda^2 \quad (12)$$

Therefore, axial diffusion will depend on the diffusion coefficient of the species (particle size), and the retention parameter R . Given a specific analyte with a diffusion coefficient D , a reduction of L leads to a decrease of the retention parameter λ (Eq. (7)) and subsequently of R (Eq. (12)), which results in the enhancement of the axial diffusion.

The rest of the sources of dispersion are commonly considered negligible [16,32] and the theoretical development is omitted. In an experimental design, relaxation component can be eliminated by allowing the analyte to relax after the injection step of the sample. In this work, its influence has been studied modifying the variables that affect the relaxation process. Polydispersity is a property of the sample studied. In this case, monodisperse size standards of polystyrene (PS) were used to minimize this contribution. Finally, instrumental effects are defined as nonidealities of the experimental design. Along this work, these effects were determined so corrections to the experimental results could be applied.

3. Experimental

3.1. Materials

In order to study the efficiency of the separation in AF4, a series of monodisperse size standards based on polystyrene nanoparticles (PS NPs) were used (50, 100, 200 and 500 nm). All the PS standards were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland). Two different products containing TiO₂ nanoparticles were also used along the study to prove the effects of the SLC on the improvement of the separation efficiency in terms of retention, peak widths, resolution and recovery. Suspensions of TiO₂ nanoparticles were prepared from powdered rutile (99.9%) with primary particles of 30 nm (US Research Nanomaterials, Houston, TX, USA), and mixed with a suspension of a photo-

Table 1
Injection and elution steps during a measurement in AF4. Detector flow 1 mL min⁻¹.

Step	Time (min)		Cross-flow (mL min ⁻¹)
Injection/focusing	4 + 1	Injection flow 0.2 mL min ⁻¹	0.5
Elution	10-30	Constant	0.1
	3	Linear decay	0.1 to 0
	2	Constant	0

catalytic product NP Fotoactiva 23, with particles around 8 nm of size, according to the manufacturer (Ekoeaso S.L., Gipuzkoa, Spain).

In all cases, suspensions of 30 mg L⁻¹ were prepared by dilution in the AF4 carrier solution, further stabilised by bath sonication (P Selecta, Ultrasons, Barcelona, Spain) during 5 min before analysis. Once the suspension was injected, the program, specified in Table 1, was applied.

3.2. Instrumentation

The AF4 system used was an AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg, Germany). The carrier selected for AF4 separation was a mixed surfactant (Novachem, Postnova Analytics), diluted in ultrapure water at 0.05% (v/v). Ultrapure water (18 MΩ cm of resistivity) was obtained from a Milli-Q purification device (Millipore Co., Bedford, MA, USA). For the carrier filtration, nylon 0.2 μm filters (Merck Milipore, Ireland) were used. A sample loop of 100 μL was used throughout the entire experimental study.

Two different commercial channels (Postnova Analytics, Landsberg, Germany) were studied along this work: a short length channel (branded as Mini Channel) (SLC) and a standard channel (branded as Analytical Channel) (SC). Both of them had a similar design, consisting of two triangular parts at the beginning (b_0 : 2 cm in width) and at the end of the channel (b_L : 0.5 cm in width), and a trapezoidal part, which was actually the only section that varied in length (L) for each channel. The length was 27 cm for the SC, and 14 cm for SLC. A spacer of 350 μm of thickness was used in all cases, and a regenerated cellulose ultrafiltration membrane of 10 kDa of cut-off (Postnova Analytics). Membranes were first conditioned by the injection of a suspension of PS nanoparticles of 100 nm without applying any cross-flow program. Afterwards, the same suspension was injected under the program described in Table 1, until retention times and recoveries were stable. The carrier was finally injected several times until no signal respect to baseline was obtained. This procedure was applied every time a membrane was replaced.

At the end of the channel, the eluent was analysed by an UV-Vis diode-array detector (Shimadzu, Duisburg, Germany), recording signals between 200 and 650 nm. In specific, a wavelength of 254 nm was studied for the detection of PS, and 350 nm for TiO₂, although a complete spectrum of the effluent was registered every 0.6 s.

3.3. Efficiency calculations and signal treatment

Separation efficiencies were estimated using different procedures. In order to study the implications of the sources explained along section 2, theoretical efficiency (H_{theo}) was first modelled, following Eq. (1). In this case, only nonequilibrium and diffusion were considered, since they are the main contributions of dispersion, applying Eq. (2) and 10, respectively. Efficiencies were represented in the model as a function of the retention parameter λ , estimated using Eq. (7). According to the theory, most of the

parameters that defines λ are referred to constants or fixed values (Eq. (9)), except for two experimental factors: the hydrodynamic diameter of the analyte and the cross-flow. Given that the purpose of this work is focused on the separation of particles in the nanoscale, sizes from 50 to 500 nm have been selected for the model. Different cross-flows of 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 mL min⁻¹ were considered, as an approach to real conditions in AF4, since this range is the most commonly used in literature [19,25–27,33]. Separation was considered to be performed with a constant out-flow of 1 mL min⁻¹. The parameter R, necessary for the calculation of H_d , was estimated from λ by using Eq. (12).

For experimental efficiencies, considering the same range of cross-flow and particle diameter of PS size standards of 50, 100, 200 and 500 nm, the following expression was used:

$$H_{exp} = \frac{L \sigma^2}{5.54 t_r^2} \quad (13)$$

where σ is the peak width at half height, and the value 5.54 is referred to the relationship between the peak width at the baseline and at half weight. Both retention times and peak widths were extracted from the fractograms obtained during the corresponding analysis, as signal intensities in function of time. Resolutions between peaks were calculated by relating the difference of their retention times to the average width, as described by Mirano [34]. Recovery calculations were done as specified by Bolea [35], calculated at 254 nm of wavelength. OriginPro data analysis software, version 2019b (OriginLab Corporation, Northampton, USA), was used for the data processing.

In order to compare theoretical and experimental efficiency results in a more realistic scenario, an intermediate approach, with values defined as predicted efficiencies (H_{pred}), was considered. This approach tries to correct experimental deviations in the retention parameter (λ) respect to those values calculated from Eq. (7), applying the values of void times (t_0) and retention times (t_r) obtained from the experimental analysis instead. Parameter R was estimated (Eq. (11)), and Eq. (12) was used for the determination of λ . Additionally to nonequilibrium and diffusion, the channel itself produces an inherent dispersion, referred as H_{inst} , which can be calculated from the peak width as in Eq. (13) for H_{exp} . However, in this case the width is obtained from the separation of PS size standards injected into the channel without cross-flow applied during the analysis (out-flow rate 1 mL min⁻¹). H_{pred} was, therefore, calculated as the sum of H_n , H_d and H_{inst} and modelled in function of λ (solid lines in Figs. 2 and 3).

4. Results and discussion

4.1. Theoretical efficiencies based on dispersion phenomena

Theoretical efficiencies (H_{theo}) were modelled, as described in section 3.3, and represented in Fig. 1 as a function of λ , considering different particle sizes and cross-flows applied. Efficiencies follow an exponential trend, with shorter plate heights as the retention parameter λ is reduced, which means that separation efficiency improves as the analyte cloud is tighten. For values of λ lower than 0.01, a decrease in the retention parameter involves a significant reduction of dispersion phenomena, whereas for higher values, this improvement is less pronounced. Low values of λ (high retention) are obtained in the case of large particles (best results are found for 500 nm) or by applying high cross-flows, which is related to the fundamentals of the technique. When cross-flow is increased the trend is sharpened, reaching the minimum values of dispersion for all the sizes studied at 0.8 mL min⁻¹. However, the trend may be limited in such conditions by the axial diffusion, which becomes significant at this high retention conditions (low λ values).

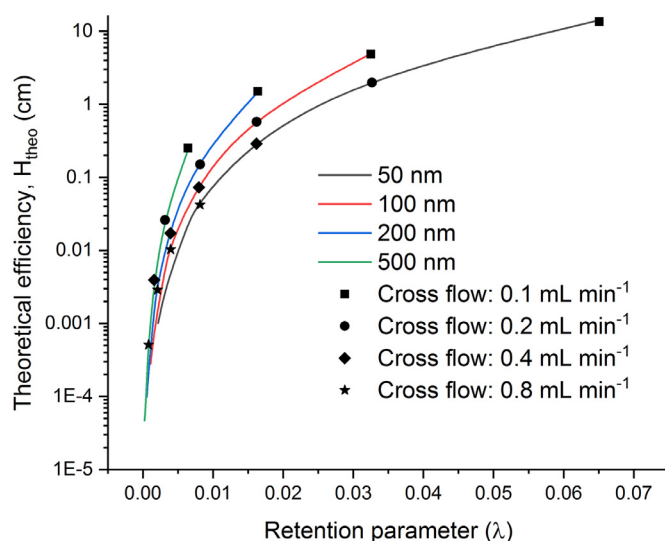


Fig. 1. Model for theoretical efficiencies, referred as the sum of two sources of dispersion: nonequilibrium (H_n) and axial diffusion (H_d), as a function of retention parameter λ . Efficiencies are represented at different cross-flows applied or at different hydrodynamic diameters of the analyte.

The contribution of each source of dispersion is represented in Fig. S1 (supplementary information), where, according to the theory, non-equilibrium and axial diffusion follow opposite behaviors. The reason is that the retention ratio R (and therefore λ) is proportional in the case of H_n , but inversely proportional for H_d (Eq. (10)). Contrary to the trend seen in Fig. 1, axial diffusion enhances as λ decreases. This is explained by the retention time of the species, since diffusion gains relevance as particles remain more time into the channel and diffusive fluxes occurs in the axial direction. For bigger particles, the diffusion coefficient (D) is lower and, consequently, H_d decreases. In terms of cross-flow, when it is increased, particles are focused closer to the membrane, where, following the parabolic flow profile inside the channel, flow velocity is lower and requires more time to elute, so diffusive fluxes may take place. In the range of cross-flows considered for the separation of nanoparticles, nonequilibrium values are ranging from 10 cm to 1×10^{-4} cm of plate height, whereas results between 1×10^{-5} cm and 1×10^{-6} cm are estimated for axial diffusion, which can be considered almost negligible. This was expected, given that, despite being species of high diffusion coefficients, separation is commonly carried out at low cross-flows and high out-flows, when it comes to the analysis of nanoparticles [17]. Therefore, the model follows the trend of nonequilibrium, being the major contribution to dispersion in separation. For this reason, efforts should be focus on diminishing H_n to improve the overall separation efficiency in AF4.

Theoretically, the interest is based on reducing the retention parameter λ as much as possible, where a slight reduction of λ values would mean a significant improvement of the separation efficiency, as shown in Fig. 1. Since hydrodynamic diameter is a property that depends on the nature of the particle, the principal way to improve separation efficiency is the cross-flow. However, there are practical limitations that involves cross-flow, so it is not possible to reduce λ endlessly. When the cross-flow is increased, the species are retained closer to the membrane, which in AF4 means an increase of the potential interactions between membrane and particles [21,36]. These interactions may lead to some problems in terms of recovery, which are recurrent for numerous cases when applied to nanoparticles, such as silver [34,37,38], gold [39,40], titanium dioxide [20,25,41] or polystyrene NPs [6]. In addition, longer times are required to elute the species injected.

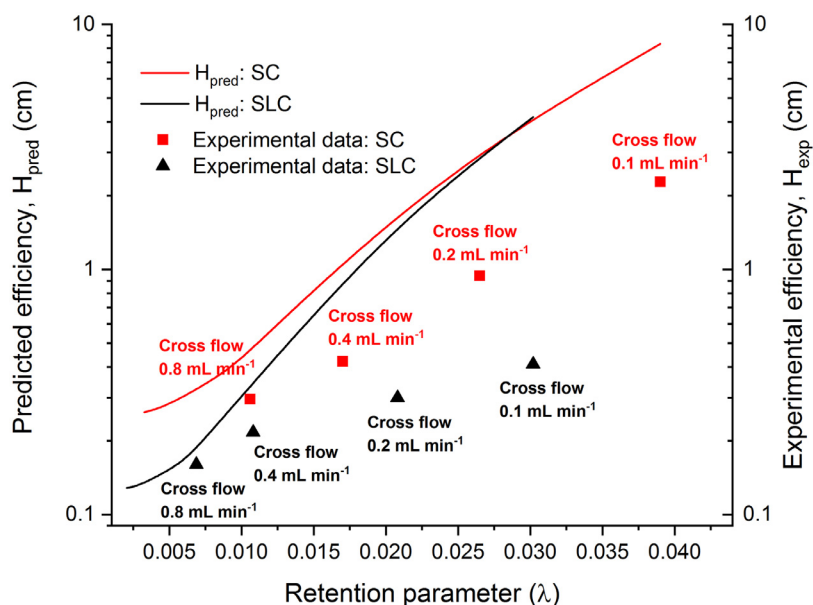


Fig. 2. Predicted and experimental efficiencies for both short length channel (SLC) and standard channel (SC) as a function of retention parameter λ , for a PS size standard suspension (100 nm) at 30 mg L⁻¹. Results are shown for different cross-flows applied: 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 mL min⁻¹.

4.2. Use of a channel of reduced dimensions: Experimental implications

As mentioned in the introduction, a change in the channel dimensions has previously been considered by different authors. In these studies, separation efficiency has always been regarded from a perspective focused on the cross-flow, as the experimental parameter that can be controlled in relation to the field strength. The basis is that the fractionation power of the system can be enhanced by applying a higher cross-flow and, therefore, dispersion phenomena would be reduced. However, in the analysis of nanoparticles, due to its diffusion coefficient and the potential problems of recovery, high cross-flows are not required. Hence, the variation of the channel length and the effect on efficiency needs to be considered from a different viewpoint.

As discussed in section 2, the field strength is determined by the cross-flow velocity ($|u_c|$), a parameter defined as the cross-flow applied per channel area (Eq. (6)). This velocity is indeed affected by the dimensions of the channel: under the same flow conditions, a reduction of the area results in a higher $|u_c|$. When cross-flow velocity is enhanced, field strength increases, leading to a reduction of the retention parameter λ (Eq. (5)), and nonequilibrium, the predominant source of dispersion, would be diminished. The theory predicts that, under the same cross-flow and out-flow rate, a reduction of the channel length would mean an improvement in separation efficiency.

To study the experimental implications of the reduction of the area in separation, the analysis of PS size standards was carried out in the two channels considered, SC and SLC, whose dimensions are specified in section 3.2. The difference in channel length resulted in a reduction of approximately half the area: from 32.5 cm² to 15.5 cm². The program conditions used are specified in Table 1. The efficiency was studied modifying both the cross-flow and the size of the particles, in a similar way as for the model discussed in section 4.1 for the theoretical efficiency (H_{theo}). From the retention times obtained in experimental analysis, specific parameters R (Eq. (11)) and λ (Eq. (12)) were calculated, and experimental efficiencies were determined by applying Eq. (13). These parameters were also used for calculations of the efficiencies predicted by the theory, referred as H_{pred} , as detailed in section 3.3.

Efficiency results as a function of the cross-flow applied are shown for both channels in Fig. 2. As predicted by Giddings [16] and Litzen [17], experimental efficiencies are improved when the cross-flow is increased, no matter the channel used. This behavior follows the trend predicted by the model, although some differences are observed at low retention levels (high λ), especially significant in the case of the SLC, being much lower than expected. These discrepancies can be explained considering that the model used is based on some simplifications, especially significant at $\lambda > 0.02$. At all cross-flows studied, SLC improves separation efficiency in respect of SC. Looking at the experimental data (summarized in Table 2), it can be seen that this improvement is not based on retention times, since they are similar in both channels. This is in agreement with the theory, which states that, under the same flow conditions, retention times should not be altered [42]. According to Eq. (13), the improvement comes from the peak width, depending on the cross-flow applied. For the softest conditions (0.1 and 0.2 mL min⁻¹), SLC provides narrower peaks, which means that differences between channels are maximized in such conditions, reaching the highest improvement for 0.1 mL min⁻¹, where efficiency is 5.5 times improved in terms of H_{exp} (see Table S1). For higher cross-flows, peak widths became wider for both channels, reaching similar values, so the improvement of the SLC mainly comes from the reduction of the channel length respect to SC. This improvement of the efficiency by the reduction of the channel length means that, also in practice, nonequilibrium is the main source of dispersion, and separation can be improved by reducing it. For the whole cross-flow range studied in SLC, lower values of λ were achieved due to the increment of cross-flow velocity and, therefore, better results were obtained in terms of efficiency.

Nevertheless, this improvement seems to reach a limit around 0.15 cm that cannot be surpassed, not even enhancing the cross-flow above the hardest cross-flow conditions studied (0.4 and 0.8 mL min⁻¹). This behavior is in opposition to the trend modeled for nonequilibrium in Fig. 1, in which efficiency decreases until values below 0.001 for such cross-flows. Under these conditions, nonequilibrium is minimized, and other sources of dispersion may gain relevance. As previously discussed, values of axial diffusion are still too low, same as polydispersity for these PS standards, but some other effects, such as relaxation or instrumental effects,

Table 2

Experimental separation results for PS size standard of 100 nm (suspension of 30 mg L⁻¹) in terms of retention times (t_r), peak widths and recoveries at different cross-flows. Results expressed as average \pm s (n=3) for both channels. Recovery reduction is referred to the value from the softest conditions of cross-flow (0.1 mL min⁻¹) for each channel.

Standard channel				
Cross-flow	t_r (min)	Peak width (min)	Recovery (%)	Recovery reduction (%)
0.1 mL min ⁻¹	4.24 \pm 0.03	3.12 \pm 0.03	75.9 \pm 1.9	–
0.2 mL min ⁻¹	6.12 \pm 0.01	2.90 \pm 0.05	71.9 \pm 1.9	-5.2 \pm 2.7
0.4 mL min ⁻¹	9.36 \pm 0.03	2.96 \pm 0.01	72.0 \pm 1.2	-5.1 \pm 2.2
0.8 mL min ⁻¹	14.61 \pm 0.14	3.87 \pm 0.08	53.1 \pm 9.6	-30.1 \pm 9.8
Short length channel				
Cross-flow	t_r (min)	Peak width (min)	Recovery (%)	Recovery reduction (%)
0.1 mL min ⁻¹	3.69 \pm 0.04	1.79 \pm 0.04	88.6 \pm 2.1	–
0.2 mL min ⁻¹	5.35 \pm 0.10	2.20 \pm 0.03	82.8 \pm 0.8	-6.5 \pm 2.3
0.4 mL min ⁻¹	10.05 \pm 0.02	3.49 \pm 0.15	78.1 \pm 0.5	-11.8 \pm 2.2
0.8 mL min ⁻¹	15.47 \pm 0.38	4.65 \pm 0.29	61.8 \pm 1.9	-30.3 \pm 2.9

may become significant. Relaxation effects were studied experimentally modifying both the cross-flow and the focusing time during the focusing step, the only instrumental parameters that can be adjusted in that stage. Both parameters were studied: cross-flow applied (from 0.5, as the value set along the study, to 1.5 mL min⁻¹) and focusing time (from 5 to 9 minutes), but no significant variation on efficiency was observed under the conditions studied. That experimental limit, therefore, cannot be explained by any of these sources, and experimental data may not fit the theoretical predictions at low λ , as it was already observed by Wahlund [21].

As pointed out in section 2, the separation system may also contribute to the dispersion of the analyte as the particles are driven through the channel, the connections, and the detector, in an inherent and unavoidable way. To estimate experimentally this contribution, the procedure described in detail in section 3.3 was followed, referred as H_{inst} . The contribution of H_{inst} to dispersion was calculated as constant values of 0.12 cm and 0.22 cm for the SLC and the SC, respectively. They were added to the predicted efficiencies (H_{pred}), and corrected in Fig. 2. For high values of dispersion, the contribution of the system is negligible; but, when nonequilibrium is minimized at high cross-flows, this contribution prevails. As a result, the trend is flattened at low λ , and the behavior of both predicted and experimental efficiencies are fitted, reaching the limit observed experimentally.

Although efficiency factor improvements between the two channels are reduced as long as the retention parameter decreases, SLC still shows better results. It can be argued that similar efficiency values can be obtained by the SC just increasing the cross-flow. In fact, at high retention conditions (low λ), longer channels would increase the number of plates ($N = L/H$), given that the improvement of H is limited under these conditions, increasing the theoretical resolution. However, the higher cross-flows required can lead to problems in terms of recovery. Experimental recovery values are summarized in Table 2. As expected, recoveries are significantly lower respect to the softest condition (0.1 mL min⁻¹) for both channels (30% reduction at 0.8 mL min⁻¹).

It is worth noting that the use of the SLC allows to decrease H_{exp} in comparison with the SC at any cross-flow studied. The improvement factor between channels reach the maximum value at 0.1 mL min⁻¹, where recoveries are up to 88%. This means that the short length channel maximizes the efficiency improvement without modifying retention times, because separation is performed under the same flow conditions, and without sacrificing recoveries, since it is performed under soft field strength conditions, which is essential in separation of nanoparticles in AF4.

Optimal cross-flow (0.1 mL min⁻¹) was fixed for the study of the experimental efficiency depending on the size of the analyte, shown in Fig. 3. For both channels, the best efficiencies were obtained for the largest particles, as predicted by the model for H_{pred} . According to the theory, nonequilibrium dispersion is reduced because retention parameter λ is also reduced when sizes are larger (Eq. (9)). Experimentally, for high hydrodynamic diameters, the diffusion coefficients are lower (Eq. (8)) and they are focused closer to the membrane. At lower λ , particles are eluted at longer retention times, following the parabolic flow profile, which justifies the lower H_{exp} values observed (see Table S2). Again, despite following the same trend, large discrepancies between H_{pred} and experimental values are observed at high λ values ($\lambda > 0.02$), more significant in the case of the SLC, similarly to those results showed in Fig. 2, given that the same procedure and simplifications have been used for H_{pred} calculations.

Comparing the efficiencies of the particles studied between the two channels, SLC obtained the best results in all the cases. Given that retention times remained constant for both channels, the improvement of H_{exp} is based on peak widths, according to Eq. (13), as observed in the study of the cross-flow, since the variation of H with retention parameter λ is the same in both cases. The narrowing of the peaks in the SLC can be explained by the enhancement of the cross-flow velocity ($|u_c|$), which allows to reduce diffusion of the species into the channel, even for smaller particles, and tightens the analyte cloud. The improvement factor of the SLC is not constant for all sizes (Table S2): H_{exp} is nearly 3 times reduced for particles of 500 nm, and 4 times for 200 nm; whereas for smaller sizes (50, 100 nm), this factor is maximized, around a value of 5 times. Since diffusion phenomena in the axial direction are less probable to occur when particles are bigger, the improvement of the separation efficiency caused by the area reduction in the SLC is less pronounced. However, when particles are smaller, the higher diffusion from particles means that an increase of the cross-flow velocity becomes more relevant to remain the analyte cloud tight, and differences between the use of a standard or a short length channel are significant. Therefore, SLC allows to maximize the separation efficiency improvement, especially in the range of nanoparticles.

The results of recovery values for each PS size standards are summarized in Table 3. Constant values were obtained for the whole range tested in SLC, close to 90%. In the case of the SC, values around 75% were obtained for particles of 100, 200 and 500 nm; and slightly higher for 50 nm, with results similar to those showed by SLC. This difference may be explained since large particles are focused closer to the membrane and interactions with

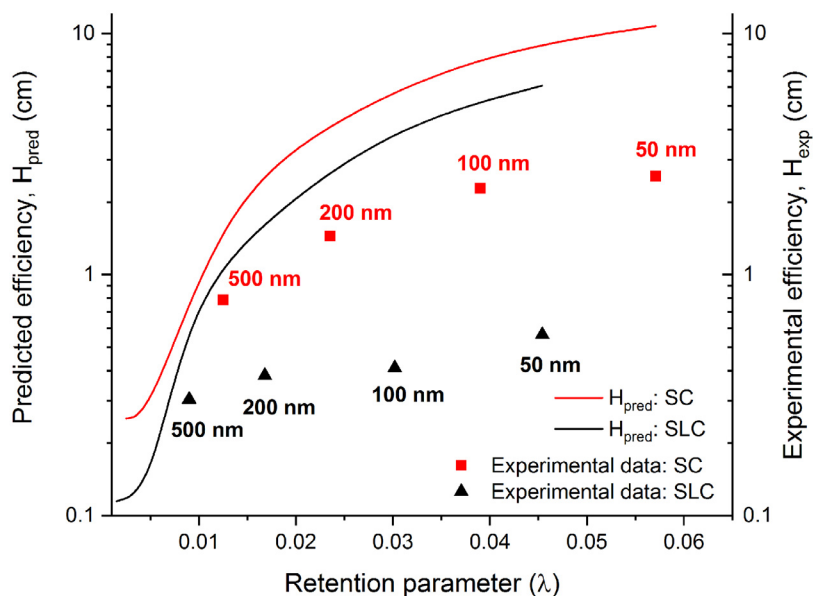


Fig. 3. Predicted and experimental efficiencies for both short length channel (SLC) and standard channel (SC) as a function of retention parameter λ . Results are shown for different PS size standards: 50, 100, 200 and 500 nm of nominal size (suspension of 30 mg L^{-1}) at cross-flow of 0.1 mL min^{-1} .

Table 3

Experimental separation results for PS standards of 50, 100, 200 and 500 nm (suspension of 30 mg L^{-1}) in terms of retention times (t_r), peak widths, recoveries and resolution. Results expressed as average \pm s ($n=3$) for both channels. Flow rate conditions were fixed for all measurements at 0.1 mL min^{-1} of cross-flow and 1 mL min^{-1} of channel out-flow. Resolution is referred to the correspondent PS standard and the previous one in decreasing size order.

Standard channel				
Particle size	t_r (min)	Peak width (min)	Recovery (%)	Resolution
50 nm	3.03 ± 0.04	2.36 ± 0.01	85.6 ± 1.0	–
100 nm	4.24 ± 0.03	3.12 ± 0.03	75.9 ± 1.9	0.44
200 nm	6.53 ± 0.02	3.83 ± 0.05	73.8 ± 6.8	0.66
500 nm	11.63 ± 0.11	5.04 ± 0.02	73.5 ± 4.0	1.15
Short length channel				
Particle size	t_r (min)	Peak width (min)	Recovery (%)	Resolution
50 nm	2.66 ± 0.04	1.50 ± 0.01	87.6 ± 2.5	–
100 nm	3.69 ± 0.04	1.79 ± 0.04	88.6 ± 2.1	0.63
200 nm	6.59 ± 0.07	3.06 ± 0.03	88.2 ± 0.4	1.20
500 nm	11.94 ± 0.19	4.95 ± 0.07	85.8 ± 7.5	1.34

membrane may occur. With the SLC, recoveries were not reduced despite a higher cross-flow velocity was applied during separation.

Fractograms for the different PS size standards in both channels studied are shown in Fig. 4. For all the standards, resolution values were higher (see Table 3) with the SLC. In the specific case of PS standards of 100 and 200 nm, resolution of 0.66 is achieved by means of the SC, where they almost coelute. With the SLC, under the same conditions, this value increases until 1.20, thanks to the narrowing of the peaks obtained. These results (see Table S3) have been also compared between the two channels considering the same field strength applied, the cross-flow velocity ($|u_c|$). This implies applying a cross-flow two times higher in the SC respect to the SLC, since SLC area is approximately half the SC area. Given that the same strength field was applied, same resolution was obtained with both channels in this case, using two different cross-flow velocities. A resolution of 1.20 was obtained for the SLC under 0.1 mL min^{-1} of cross-flow, which can be improved to 1.81 at 0.2 mL min^{-1} . Similar results were obtained with the SC at 0.2 mL min^{-1} (1.29 resolution) and 0.4 mL min^{-1} (1.81 resolution), respectively. However, under the same cross-flow velocity conditions, better performance was still obtained with the SLC (shorter reten-

tion times, narrower peak widths, and higher recoveries). This can be explained by the fact that, despite nanoparticles are retained at the same position inside the two channels (same λ), the nanoparticles are driven through a shorter distance in the SLC, which reduces dispersion, elution times and potential interactions with the membrane (higher recoveries). Summarizing, to obtain similar resolutions in the SC respect to the SLC, higher cross-flows are required, which results in longer elution times and lower recoveries. Under the conditions studied, this difference involves a loss of the 16% of the analyte in the case of PS size standard of 100 nm, and 25% in the case of 200 nm on average, when the SC is used instead of the SLC.

The same methodology was applied to the separation of TiO_2 nanoparticles. This type of nanoparticles presents some recurrent problems in their analysis based on AF4, mainly related to low resolution and low recovery rates [20,21], so the performance of the SLC could be evaluated when applied to a more complex scenario. Two products of different nominal particle size (see section 3.1) containing these nanoparticles were mixed in a suspension and analyzed in AF4 under the conditions specified in Table 1.

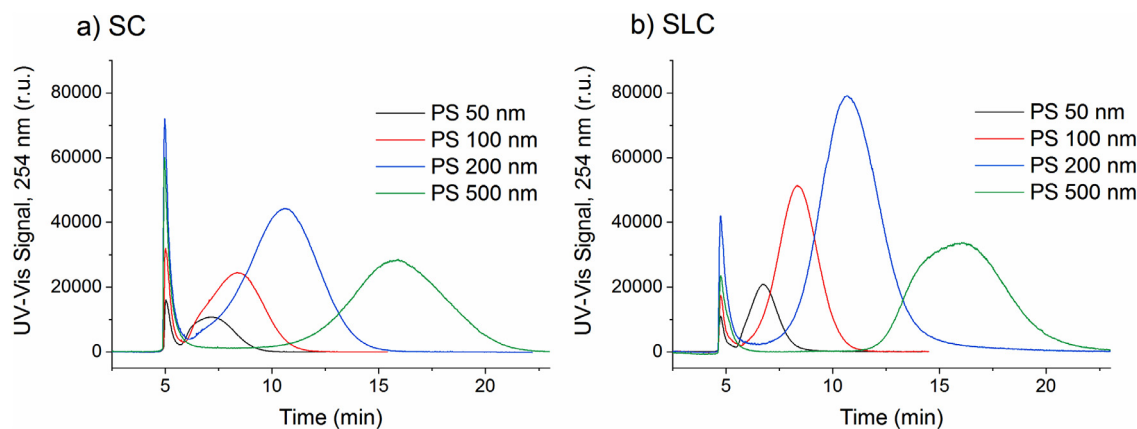


Fig. 4. Fractograms for PS size standards of 50, 100, 200 and 500 nm of nominal size (suspension of 30 mg L⁻¹) obtained from: a) separation using the standard channel (SC) and b) using the short length channel (SLC) at cross-flow 0.1 mL·min⁻¹.

Table 4

Experimental separation results for products (photocatalytic product and rutile nanopowder) which contains TiO₂ NPs, in terms of retention times (t_r), peak widths, recoveries and resolution. Suspensions of a mixture of both products (15 mg L⁻¹ each) were analyzed. Results expressed as average \pm s (n=3) for both channels. For all measurements, 1 mL min⁻¹ of channel out-flow was used. Recoveries are referred to both products in the same suspension.

Standard channel (Cross-flow: 0.1 mL min ⁻¹)				
TiO ₂ NPs product	t_r (min)	Peak width (min)	Recovery (%)	Resolution
Photocatalytic product (8 nm)	2.81 \pm 0.18	2.07 \pm 0.05	69.83 \pm 4.9	0.77
Rutile nanopowder (30 nm)	6.47 \pm 0.09	7.47 \pm 0.55		
Short length channel (Cross-flow: 0.1 mL min ⁻¹)				
TiO ₂ NPs product	t_r (min)	Peak width (min)	Recovery (%)	Resolution
Photocatalytic product (8 nm)	2.31 \pm 0.11	2.03 \pm 0.13	75.2 \pm 4.2	1.07
Rutile nanopowder (30 nm)	6.15 \pm 0.29	5.12 \pm 0.10		
Short length channel (Cross-flow: 0.2 mL min ⁻¹)				
TiO ₂ NPs product	t_r (min)	Peak width (min)	Recovery (%)	Resolution
Photocatalytic product (8 nm)	2.66 \pm 0.23	2.24 \pm 0.04	60.1 \pm 0.8	1.15
Rutile nanopowder (30 nm)	10.47 \pm 0.31	11.38 \pm 0.14		

As can be seen in Table 4, retention times did not show any significant variation in the mixture, no mattering the channel, since the same flow conditions were used, (0.1 mL min⁻¹ of cross-flow, and 1 mL min⁻¹ of out-flow). The first peak corresponds to the photocatalytic product, which contains TiO₂ NPs around 8 nm in size, and the second one to the TiO₂ NPs rutile powder suspension with nominal size of 30 nm (fractograms in Fig. S2). As expected, recoveries were not compromised either, with values around 70–75%. In terms of resolution, it can be seen the improvement of the separation efficiency by using the SLC, since peaks are narrower as long as the channel area is reduced. Therefore, this improvement allowed a better separation (resolution >1) of the two populations. Resolution can be also improved by increasing the cross-flow applied (Table 4) at the expense of longer retention times and non-quantitative recoveries, (60% for 0.2 mL min⁻¹ of cross-flow)

5. Conclusions

The study of the effect of the channel length on the separation of particles in the nanometer range has been carried out in terms of efficiency, resolution, and recovery. Results have been justified from a theoretical point of view. The reduction of the non-equilibrium component of the dispersion in AF4, which is the most

relevant during the separation in AF4 under the most common experimental conditions used, explains the best results obtained with the short length channel. Under the same flow conditions (same out-flow and cross-flow), it is possible to improve the separation reducing the channel length with the same elution times and the same or even better recoveries. This is due to the increment on the cross-flow velocity ($|u_c|$), originated by the reduction of the channel section (A), which leads to tighten the cloud of the analyte inside the channel, reducing its dispersion. The higher retention caused is compensated by the shorter distance, whereas recoveries are not affected. These predictions have been corroborated through the separation of nanoparticles in a wide size range and different nature, such as polystyrene and TiO₂. Although similar retention could be achieved with a longer channel, this is produced at cost of longer elution times, and normally with a reduction of the recoveries obtained. On the other side, the use of even shorter channels, such as the also commercially available 7 cm length channel or hollow fibers, involves the reduction on the out-flow and cross-flows applied, in order to avoid overpressures in the system, which lead to poorer separations, and also a reduction of the amount of sample that can be loaded. The use of the channel proposed allows working under the same flow conditions, using the same sample loads as with the standard channel. This is especially important

in the case of nanoparticles, where interactions with the membrane are relatively common, and mild separation conditions are required. This separation improvement expands the possibilities of the analysis of particles in AF4, as it was the case of TiO₂ nanoparticles, where the short length channel was already applied successfully to the separation and quantification of these nanoparticles in complex samples [43].

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

David Ojeda: Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Pablo Sánchez:** Investigation, Formal analysis. **Eduardo Bolea:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Supervision. **Francisco Laborda:** Project administration, Funding acquisition, Conceptualization, Writing - review & editing. **Juan R. Castillo:** Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Regional Development Fund, project RTI2018-096111-B-I00 (MICINN/FEDER) and the Government of Aragon (E29_17R) and co-financed with FEDER 2014-2020 "Construyendo Europa desde Aragón". David Ojeda thanks project "OUTBIOTICS" Poctefa_EFA 183-16 for its financial support. The project has been 65% cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) through the Interreg V-A Spain-France- Andorra programme (POCTEFA 2014-2020).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.chroma.2020.461759](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461759).

References




- [1] D. Kang, M.H. Moon, Miniaturization of frit inlet asymmetrical flow field-flow fractionation, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3851–3855, doi:[10.1021/ac0496704](https://doi.org/10.1021/ac0496704).
- [2] D. Kang, M.H. Moon, Hollow fiber flow field-flow fractionation of proteins using a microbore channel, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4207–4212, doi:[10.1021/ac050301x](https://doi.org/10.1021/ac050301x).
- [3] P. Reschiglian, A. Zattoni, B. Roda, L. Cinque, D. Parisi, A. Roda, F. Dal Piaz, M.H. Moon, B.R. Min, On-line hollow-fiber flow field-flow fractionation-electrospray ionization/time-of-flight mass spectrometry of intact proteins, *Anal. Chem.* 77 (2005) 47–56, doi:[10.1021/ac048898o](https://doi.org/10.1021/ac048898o).
- [4] K.H. Kim, M.H. Moon, Chip-type asymmetrical flow field-flow fractionation channel coupled with mass spectrometry for top-down protein identification, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8652–8658, doi:[10.1021/ac202098b](https://doi.org/10.1021/ac202098b).
- [5] G. Yohannes, M. Sneek, S.J.O. Varjo, M. Jussila, S.K. Wiedmer, P.T. Kovanen, K. Öörni, M.L. Riekkola, Miniaturization of asymmetrical flow field-flow fractionation and application to studies on lipoprotein aggregation and fusion, *Anal. Biochem.* 354 (2006) 255–265, doi:[10.1016/j.ab.2006.04.018](https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.04.018).
- [6] Z. You, F. Meier, S. Weidner, Comparison of miniaturized and conventional asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) channels for nanoparticle separations, *Separations* 4 (2017), doi:[10.3390/separations4010008](https://doi.org/10.3390/separations4010008).
- [7] D. Müller, S. Cattaneo, F. Meier, R. Welz, A.J. de Mello, Nanoparticle separation with a miniaturized asymmetrical flow field-flow fractionation cartridge, *Front. Chem.* 3 (2015) 1–6, doi:[10.3389/fchem.2015.00045](https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00045).
- [8] I. Yang, K.H. Kim, J.Y. Lee, M.H. Moon, On-line miniaturized asymmetrical flow field-flow fractionation-electrospray ionization-tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring for quantitative analysis of phospholipids in plasma lipoproteins, *J. Chromatogr. A.* 1324 (2014) 224–230, doi:[10.1016/j.chroma.2013.11.035](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.035).
- [9] D. Müller, M. Nogueira, S. Cattaneo, F. Meier, R. Drexel, C. Contado, A. Pagnoni, T. de Vries, D. Cohen, M. Portugal-Cohen, A. de Mello, Integration of Inverse Supercritical Fluid Extraction and Miniaturized Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation for the Rapid Analysis of Nanoparticles in Sunscreens, *Anal. Chem.* 90 (2018) 3189–3195, doi:[10.1021/acs.analchem.7b04535](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04535).
- [10] A. Zattoni, D.C. Rambaldi, P. Reschiglian, M. Melucci, S. Krol, A.M.C. Garcia, A. Sanz-Medel, D. Roessner, C. Johann, Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering detection for the analysis of structured nanoparticles, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 9106–9112, doi:[10.1016/j.chroma.2009.06.037](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.037).
- [11] R.N. Qureshi, W.T. Kok, P.J. Schoenmakers, Fractionation of human serum lipoproteins and simultaneous enzymatic determination of cholesterol and triglycerides, *Anal. Chim. Acta.* 654 (2009) 85–91, doi:[10.1016/j.aca.2009.06.060](https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.060).
- [12] A. Litzen, K. Wahlund, Zone broadening and dilution in rectangular and trapezoidal asymmetrical flow field-flow fractionation channels, *Anal. Chem.* (1991) 1001–1007, doi:[10.1021/ac00010a013](https://doi.org/10.1021/ac00010a013).
- [13] M.H. Moon, P.S. Williams, H. Kwon, Retention and efficiency in frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2657–2666, doi:[10.1021/ac990040p](https://doi.org/10.1021/ac990040p).
- [14] M. Hee Moon, P.S. Williams, D. Kang, I. Hwang, Field and flow programming in frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation, *J. Chromatogr. A.* 955 (2002) 263–272, doi:[10.1016/S0021-9673\(02\)00226-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00226-1).
- [15] J.Y. Ahn, K.H. Kim, J.Y. Lee, P.S. Williams, M.H. Moon, Effect of asymmetrical flow field-flow fractionation channel geometry on separation efficiency, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3876–3880, doi:[10.1016/j.chroma.2010.04.021](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.021).
- [16] J.C. Giddings, *Micro-FFF: Theoretical and Practical Aspects*, *J. Microcolumn Sep.* 5 (1993) 497–503.
- [17] A. Litzen, Separation speed, retention, and dispersion in asymmetrical flow field-flow fractionation as functions of channel dimensions and flow rates, *Anal. Chem.* 65 (1993) 461–470, doi:[10.1021/ac00052a025](https://doi.org/10.1021/ac00052a025).
- [18] F. Von Der Kammer, S. Legros, T. Hofmann, E.H. Larsen, K. Loeschner, Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 425–436, doi:[10.1016/j.trac.2010.11.012](https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.012).
- [19] S. Dubascoux, F. Von Der Kammer, I. Le Hécho, M.P. Gautier, G. Lespes, Optimisation of asymmetrical flow field flow fractionation for environmental nanoparticles separation, *J. Chromatogr. A.* 1206 (2008) 160–165, doi:[10.1016/j.chroma.2008.07.032](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.032).
- [20] N. Bendixen, S. Losert, C. Adlhart, M. Lattuada, A. Ulrich, Membrane-particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles, *J. Chromatogr. A.* 1334 (2014) 92–100, doi:[10.1016/j.chroma.2014.01.066](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.066).
- [21] K.G. Wahlund, Flow field-flow fractionation: Critical overview, *J. Chromatogr. A.* 1287 (2013) 97–112, doi:[10.1016/j.chroma.2013.02.028](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.028).
- [22] J. Gigault, J.M. Pettibone, C. Schmitt, V.A. Hackley, Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: A tutorial, *Anal. Chim. Acta.* 809 (2014) 9–24, doi:[10.1016/j.aca.2013.11.021](https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.021).
- [23] F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M.T. Gómez, M.S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui, J.R. Castillo, Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples, *Anal. Chim. Acta.* 904 (2016), doi:[10.1016/j.aca.2015.11.008](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008).
- [24] B. Meermann, Field-flow fractionation coupled to ICP-MS: separation at the nanoscale, previous and recent application trends, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2665–2674, doi:[10.1007/s00216-014-8416-1](https://doi.org/10.1007/s00216-014-8416-1).
- [25] C. Contado, A. Pagnoni, TiO₂ nano- and micro-particles in commercial foundation creams: Field Flow-Fractionation techniques together with ICP-AES and SQW Voltammetry for their characterization, *Anal. Methods.* 2 (2010) 1112, doi:[10.1039/c0ay00205d](https://doi.org/10.1039/c0ay00205d).
- [26] A.J. Bednar, A.R. Poda, D.M. Mitrano, A.J. Kennedy, E.P. Gray, J.F. Ranville, C.A. Hayes, F.H. Crocker, J.A. Steevens, Comparison of on-line detectors for field flow fractionation analysis of nanomaterials, *Talanta* 104 (2013) 140–148, doi:[10.1016/j.talanta.2012.11.008](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.008).
- [27] S. Wagner, S. Legros, K. Loeschner, J. Liu, J. Navratilova, R. Grombe, T.P.J. Lings, E.H. Larsen, F. Von Der Kammer, T. Hofmann, First steps towards a generic sample preparation scheme for inorganic engineered nanoparticles in a complex matrix for detection, characterization, and quantification by asymmetric flow-field flow fractionation coupled to multi-angle light scattering and, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1286–1296, doi:[10.1039/c4ja00471j](https://doi.org/10.1039/c4ja00471j).
- [28] D. Bartczak, P. Vincent, H. Goenaga-Infante, Determination of Size- and Number-Based Concentration of Silica Nanoparticles in a Complex Biological Matrix by Online Techniques, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5482–5485, doi:[10.1021/acs.analchem.5b01052](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01052).
- [29] M. Baalousha, B. Stolpe, J.R. Lead, Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4078–4103, doi:[10.1016/j.chroma.2011.04.063](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.063).
- [30] O. Geiss, C. Cascio, D. Gilliland, F. Franchini, J. Barrero-Moreno, Size and mass determination of silver nanoparticles in an aqueous matrix using asymmetric flow field flow fractionation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometer and ultraviolet-visible detectors, *J. Chromatogr. A.* 1321 (2013) 100–108, doi:[10.1016/j.chroma.2013.10.060](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.060).
- [31] C.A. Sötebier, F.S. Bierkandt, S. Rades, N. Jakubowski, U. Panne, S.M. Weidner, Sample loss in asymmetric flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry of silver nanoparticles, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 2214–2222, doi:[10.1039/c5ja00297d](https://doi.org/10.1039/c5ja00297d).
- [32] M. Schimpf, K. Caldwell, J.C. Giddings (Eds.), *Field-Flow Fractionation Handbook*, John Wiley & Sons, Inc., 2000.

- [33] I. Römer, T.A. White, M. Baalousha, K. Chipman, M.R. Viant, J.R. Lead, Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4226–4233, doi:[10.1016/j.chroma.2011.03.034](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.034).
- [34] D.M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1131–1142, doi:[10.1039/c2ja30021d](https://doi.org/10.1039/c2ja30021d).
- [35] E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo, Metal associations to microparticles, nanocolloids and macromolecules in compost leachates: Size characterization by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to ICP-MS, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 206–214, doi:[10.1016/j.aca.2009.12.021](https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.021).
- [36] D. Qing, M.E. Schimpf, Correction for particle-wall interactions in the separation of colloids by flow field-flow fractionation, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2478–2485, doi:[10.1021/ac0200318](https://doi.org/10.1021/ac0200318).
- [37] K. Loeschner, J. Navratilova, R. Grombe, T.P.J. Linsinger, C. Købler, K. Mølhav, E.H. Larsen, In-house validation of a method for determination of silver nanoparticles in chicken meat based on asymmetric flow field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometric detection, *Food Chem* 181 (2015) 78–84, doi:[10.1016/j.foodchem.2015.02.033](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.033).
- [38] Y.J. Chang, Y.H. Shih, C.H. Su, H.C. Ho, Comparison of three analytical methods to measure the size of silver nanoparticles in real environmental water and wastewater samples, *J. Hazard. Mater.* 322 (2017) 95–104, doi:[10.1016/j.jhazmat.2016.03.030](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.030).
- [39] E.P. Gray, T.A. Bruton, C.P. Higgins, R.U. Halden, P. Westerhoff, J.F. Ranville, Analysis of gold nanoparticle mixtures: a comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1532, doi:[10.1039/c2ja30069a](https://doi.org/10.1039/c2ja30069a).
- [40] B. Schmidt, K. Loeschner, N. Hadrup, A. Mortensen, J.J. Sloth, C. Bender Koch, E.H. Larsen, Quantitative characterization of gold nanoparticles by field-flow fractionation coupled online with light scattering detection and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2461–2468, doi:[10.1021/ac102545e](https://doi.org/10.1021/ac102545e).
- [41] V. Nischwitz, H. Goenaga-Infante, Improved sample preparation and quality control for the characterisation of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using flow field flow fractionation on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1084, doi:[10.1039/c2ja10387g](https://doi.org/10.1039/c2ja10387g).
- [42] R.N. Qureshi, W.T. Kok, Optimization of Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation (AF4), *LCGC Eur* 23 (2010) 18–25.
- [43] D. Ojeda, M.V. Taboada-López, E. Bolea, J. Pérez-Arantegui, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, F. Laborda, Size characterization and quantification of titanium dioxide nano- and microparticles-based products by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled to Dynamic Light Scattering and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 1122 (2020) 20–30, doi:[10.1016/j.aca.2020.04.080](https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.080).

CRITICAL REVIEW

Cite this: *Anal. Methods*, 2021, 13, 2742

Analytical applications of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a comprehensive and critical review

Eduardo Bolea,  Maria S. Jimenez, Josefina Perez-Arategui, Juan C. Vidal,  Mariam Bakir, Khaoula Ben-Jeddou, Ana C. Gimenez-Ingalaturre, David Ojeda, Celia Trujillo and Francisco Laborda *

Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) refers to the use of ICP-MS as a particle counting technique. When ICP-MS measurements are performed at very high data acquisition frequencies, information about (nano)particles containing specific elements and their dissolved forms can be obtained (element mass per particle, size and number and mass concentrations). As a result of its outstanding performance, SP-ICP-MS has become a relevant technique for the analysis of complex samples containing inorganic nanoparticles. This review discusses the maturity level achieved by the technique through the methods developed for the detection, characterisation and quantification of engineered and natural (nano)particles. The application of these methods in different analytical scenarios is comprehensively reviewed and critically discussed, with special attention to their current technical and metrological limitations. The emergent applications of SP-ICP-MS in the field of nanoparticle-tagged immunoassay and hybridization methods are also reviewed.

Received 4th May 2021
Accepted 7th June 2021

DOI: 10.1039/d1ay00761k
rsc.li/methods

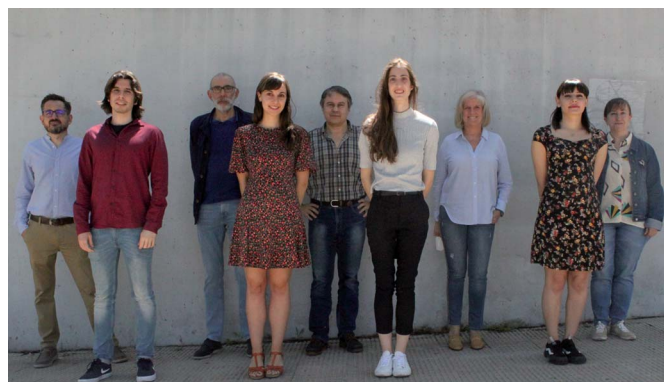
SP-ICP-MS: a fast-developing technique

The use of inductively coupled plasma mass spectrometers in single particle mode has led to the emergence of a particle counting technique known as single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS). Although the origins of the technique can be traced back to the 1970's,¹

a series of key papers by Degueldre *et al.*,²⁻⁶ published between 2003 and 2006, are considered its starting point. However, the application of SP-ICP-MS to the analysis of engineered nanomaterials,^{7,8} followed by its implementation in commercial ICP-MS instruments,⁹⁻¹¹ became the main driving force behind the success of the technique in recent years.

The birth and evolution of SP-ICP-MS resembles that of the ICP-MS technique itself (Fig. 1). After their initial conception, it took some time to get the first ICP-MS research instrument, as well as the first application to nanomaterials in the case of SP-ICP-MS. But from then on, it took only about three years for manufacturers to launch the first commercial ICP-MS instruments, or the first

Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, Zaragoza, 50009, Spain. E-mail: flaborda@unizar.es



The authors belong to the Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS) of the University of Zaragoza. The main research area of the group lies in the development and application of analytical techniques and methods in Nanometrology for the detection, characterization and quantification of natural and engineered nanoparticles. The group has made significant contributions in single particle ICP-MS and flow field flow fractionation hyphenated to ICP-MS. The authors have a long experience in these techniques but also in hydrodynamic chromatography, electron microscopy, as well as X-ray and electroanalytical techniques, which leads to a broad analytical platform for solving complex problems involving nanoparticles and colloids. The group has more than 10 year of experience and 40 publications in this field of Analytical Nanometrology.

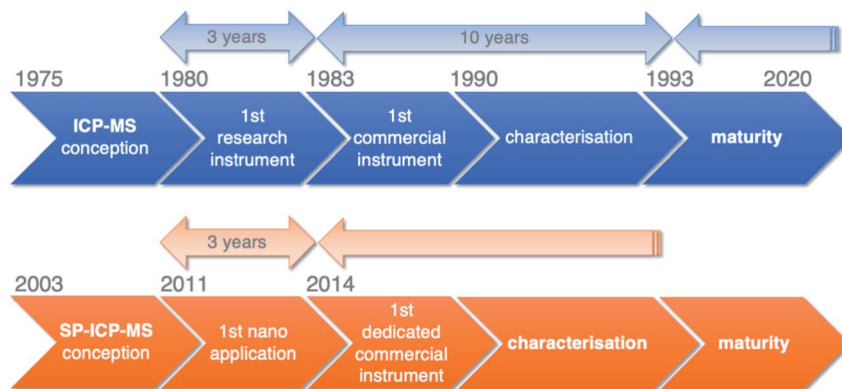


Fig. 1 Comparison of the evolution of SP-ICP-MS with respect to ICP-MS (adapted from Horlick¹²).

dedicated instruments in the case of SP-ICP-MS. Thereafter, conventional ICP-MS evolved in a fast way, becoming a mature technique in about ten years.¹² According to Horlick, a mature technique is characterised by the fact that their methods are applied to a wide range of analytical problems and determinations, and become established as a routine tool with broad commercialisation. Before the maturity stage, a technique goes through a characterisation stage, a period of intense research activity aimed at achieving a complete picture of the technique at instrumental, metrological and methodological levels. On the other hand, during the characterisation stage the new technique seems to have no limits and to be able to solve all the problems, whereas with maturity comes the realization that not all is ideal and there are a number of problems that will not be solved. In the case of SP-ICP-MS, the question is whether the technique can be considered to have reached maturity or is still in the characterisation phase. The final aim of this comprehensive review is to gather the publications involving SP-ICP-MS and critically evaluate the current state of the technique, its limitations and its level of maturity level. Special attention is paid to the problem-solving analytical methods developed and their application under different relevant analytical scenarios.

Basic principles

When an ICP-MS instrument is used at very high reading frequencies, ICP-MS becomes a particle counting technique, being able to deliver information in a particle-by-particle basis. The basics of SP-ICP-MS measurements were established by Degueldre *et al.*² Basically, when a diluted suspension of nanoparticles is nebulized into an ICP-MS, and an isotope of the element present in the nanoparticles is measured at acquisition frequencies over *ca.* 100 Hz, a series of events corresponding to individual nanoparticles are recorded over a continuous baseline. The intensity of these events is related to the mass of the element in the nanoparticle, and hence to its size if additional information about the composition, shape and density of the nanoparticle are available, whereas the frequency of events is proportional to the number concentration of nanoparticles. Subsequently, Laborda *et al.*⁷ revealed that information about dissolved forms of the element measured could also be obtained from the baseline. Whereas the dissolved species are homogeneously distributed in all the aerosol droplets, the

nanoparticles are present randomly in some of them. Thus, a constant signal (baseline) is produced by the dissolved species, whereas the nanoparticles give rise to individual signal events, as it can be seen in a typical time scan (Fig. 2a).

As the SP-ICP-MS measurements are performed in time resolved mode, the data acquisition frequency (or the number of events along a fixed acquisition time), controlled through the dwell time of the instrument, is one of the most relevant parameters. Considering that the ion cloud generated in the plasma from a single nanoparticle can be detected during 300–1000 μs ,^{13,14} nanoparticle events can be recorded in two different forms, depending on the dwell time selected. When using dwell times in the millisecond range (3–10 ms), larger than the duration of the ion cloud in the instrument, events are recorded as one-reading signals (pulses), whereas for dwell times in the microsecond range (10–200 μs), they are recorded as peaks (transient signals), comprising several readings (see the insets in Fig. 2a). For pulses, the intensity event is given by the reading itself, whereas for peaks, the intensity is calculated as the sum of the individual readings along it. With respect to the acquisition frequency, it is worth to mention that the commercial launch of SP-ICP-MS in 2014 was linked to quadrupole spectrometers with higher reading frequencies, allowing dwell times down to 10 μs ,¹⁰ instead of just working at milliseconds. In the meantime, time-of-flight⁹ and double focussing¹¹ spectrometers have become commercially available with minimum dwell times of 33 and 10 μs , respectively.

Raw data from both milli- and microsecond time scans can be processed by plotting the event intensity *vs.* the number of events, obtaining histograms as shown in Fig. 2b, where the first distribution is due to the background and/or the presence of dissolved forms of the element measured and the second to the nanoparticles themselves. The second distribution is further processed to convert the event intensities to mass of element per nanoparticle or size distributions (Fig. 2c). Instrumental and metrological issues related to measurements, data acquisition and data processing have been summarized and described in detail in a number of reviews^{1,15–18} and articles therein. It is worth to mention that the different types of quantitative information on nanoparticles achievable by SP-ICP-MS, and discussed in the next section, require different calibrations with nanoparticle size and number concentration

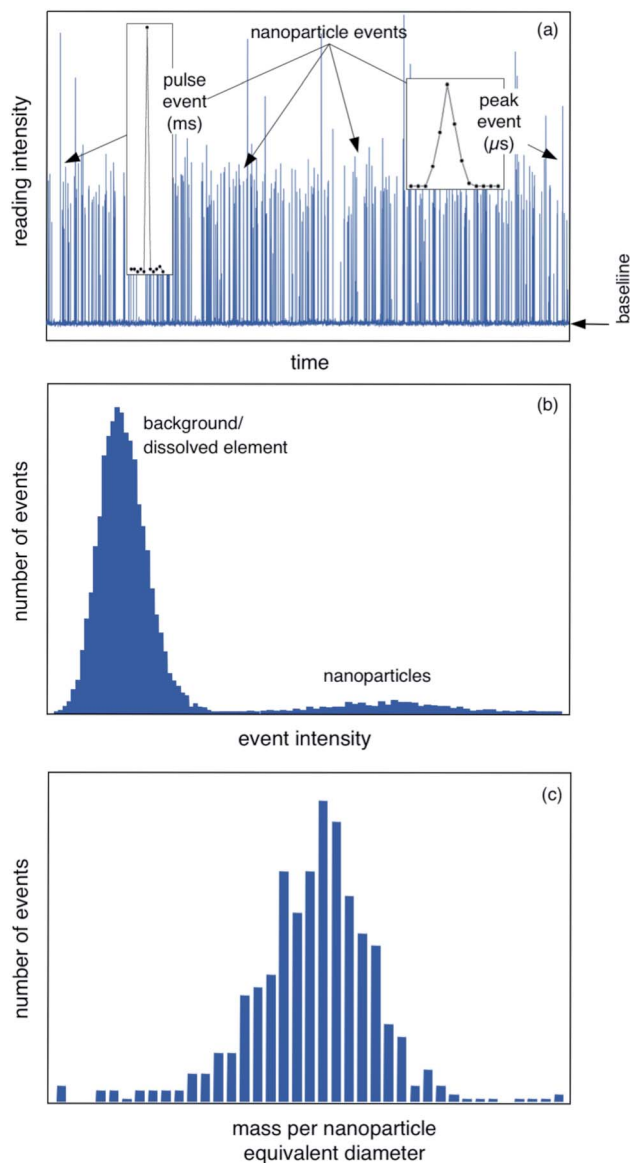


Fig. 2 (a) Time scan of suspension containing nanoparticles and dissolved forms of the same element. (b) Event intensity histogram of data from (a). (c) Mass per nanoparticle/size distribution of spherical nanoparticles calculated from the second intensity distribution in (b).

standards. If size standards of the particles under study are not available, indirect calibrations based on the use of dissolved standards are usually applied. In these cases, sample introduction flow rate and the analyte nebulization efficiency have to be known to determine the mass of element per nanoparticle and hence the nanoparticle size. The analyte nebulization efficiency is commonly determined using the methods developed by Pace *et al.*⁸ An overview of calibration issues in SP-ICP-MS can be found in Laborda *et al.*¹⁹

Analytical information: analytes and measurands

The strength of SP-ICP-MS lies in the different types of analytical information that the technique can provide from very

simple measurements. As we have seen above, two types of analytes are under the scope of SP-ICP-MS, namely (nano) particles and dissolved species. The term “nanoparticle” is going to be used here in a broad sense, although in most cases it will coincide with the ISO definition (nano-object with its three dimensions in the nanoscale, 1–100 nm).²⁰ Other nano-objects, like nanofibers/nanotubes or nanoplates (two and one dimensions in the nanoscale, respectively) may be suitable of being analysed by SP-ICP-MS, depending on the magnitude of the other dimensions that are not in the nanoscale. Thus, particles over 100 nm, even in the micrometre range, have been successfully analysed, although issues related to their nebulization and ionization must be considered.²¹

In any case, the information provided by SP-ICP-MS can be: (i) qualitative, about the presence of (nano)particulate and dissolved forms of specific elements; (ii) quantitative contents, as number and mass concentrations; and (iii) characterisation, about the mass of element/s per nanoparticle and nanoparticle size.

For dissolved species, the mass concentration of the element monitored is the measurand of interest, whereas for nanoparticles, the primary measurands of concern are the number concentration and the mass of element per particle. When additional information about the shape, composition and density of the particles is available, information about the size of the particles can be obtained. Nevertheless, a spherical shape is commonly assumed and the equivalent spherical diameter is the measurand usually reported. Any population of particles always exhibits more or less broad size distributions, recorded primarily by SP-ICP-MS as element content distributions, whose measurands are histograms showing the number of particles for each of a number of defined size or element content per particle classes, respectively. Table 1 summarises the quantitative and characterisation information with the corresponding measurands for each of the analytes involved in SP-ICP-MS. Qualitative information about the presence/absence of dissolved species and/or nanoparticles over a certain concentration and size cannot be disregarded because of the practical limitations of the technique when analysing complex samples, as it will be shown below. In addition, other types of information can be obtained from SP-ICP-MS measurements (*e.g.*, porosity,²² density,²³ aggregation,^{24,25} agglomeration²⁶), although they will not be discussed in detail.

Scientific production and evolution stage

Since the publication of the first article by Degueldre and Favarger in 2003, almost 400 studies directly related to SP-ICP-MS have been published in peer-reviewed journals until the end of 2020. These publications include a limited number of reviews, tutorials and divulgation articles; whereas most of them consists of articles on fundamentals and basic aspects of the technique, the development of methods, as well as their application. As it has been stated above, the analysis of engineered nanomaterials is behind the success of SP-ICP-MS, and

Table 1 Analytes, analytical information and measurands involved in SP-ICP-MS

Analytical information		Analyte	Measurand
Qualitative	Presence/absence	Nanoparticle	
		Dissolved element	
Quantitative content	Concentration	Nanoparticle	Number concentration
	Concentration	Dissolved element	Mass concentration of nanoparticulate element Mass concentration of dissolved element
Characterisation	Element content	Nanoparticle	Element mass per particle
	Size	Nanoparticle	Equivalent spherical diameter
	Element content distribution	Nanoparticle	Histogram showing the number of particles for each of a number of defined element content per particle classes
	Size distribution	Nanoparticle	Histogram showing the number of particles for each of a number of defined size classes

most of the works deal with manufactured nanoparticles, although natural and incidental nanoparticles have also been analysed. SP-ICP-MS has proved its usefulness in other areas, like nanoparticle tag-based immunoassay and hybridization methods, as it will be discussed in a specific section.

The scientific production from 2003 to the end of 2020 has been organized in four fields, namely “Reviews”, “Fundamentals”, “Method Development” and “Applications”. With respect to the “Reviews” field, one tutorial,¹⁵ five reviews^{1,16–18,27} and two divulgation articles^{28,29} on the specific topic of SP-ICP-MS have been published to date. However, the technique is being included in most reviews on ICP-MS^{30,31} or about the analysis of natural³² or engineered^{33–35} nanomaterials. The “Fundamentals” field covers publications whose main objective is the study of basic aspects of the technique (*e.g.*, instrumentation, plasma processes, sample introduction, data acquisition and processing). All these studies have been performed with nanoparticle standards, although synthetic matrices have been considered in some cases, but always under controlled laboratory conditions. The “Method Development” field includes publications focused on the development of proofs-of-concept methods, based on the use of in-lab synthesized nanoparticles, nanoparticle standards or samples spiked with standards. When the method has been applied to samples containing original nanoparticles, it has been considered under the “Applications” field. Analysis of samples from laboratory tests (*e.g.*, *in vivo*, *in vitro*, migration) involving nanoparticle standards have also been considered within this field, as it will be justified below.

Fig. 3 summarizes the distribution of publications in the four fields cited above directly related with the analysis of nanomaterials or samples containing nanomaterials, as well as their chronological evolution. The analysis of these data may give light about the maturity and the expected evolution of SP-ICP-MS. As it has been stated above, the rise of SP-ICP-MS publications started from 2011, with a constant increase in the total number of publications related to both “Fundamentals” and “Method Development” until 2016, showing some stabilization in recent years, whereas the number of publications about “Applications” is steadily growing. Following the

evolution stages proposed by Horlick, and despite some overlap between them is unavoidable, the trend in publications suggests that SP-ICP-MS has passed the stage of characterisation and would be at the beginning of the maturity stage. However, other indicators than the extent of application of the technique, namely metrological indicators like method validation and traceability, should also be considered. While traceability of results is out of question in conventional ICP-MS because of the availability of validated methods, standards and reference materials,³⁶ this is not the case in SP-ICP-MS. As will be seen in the following sections, the number of SP-ICP-MS methods developed for the most diverse applications is increasing, although the number of validated ones is still limited. On the other hand, due to the special features of nanoparticles, the availability of standards and reference materials is still scarce, conditioning in the end the traceability of the results obtained.

Analytical methods based on SP-ICP-MS: validation

In spite of the significant evolution of the technique discussed above, method validation in SP-ICP-MS is still at an early stage,

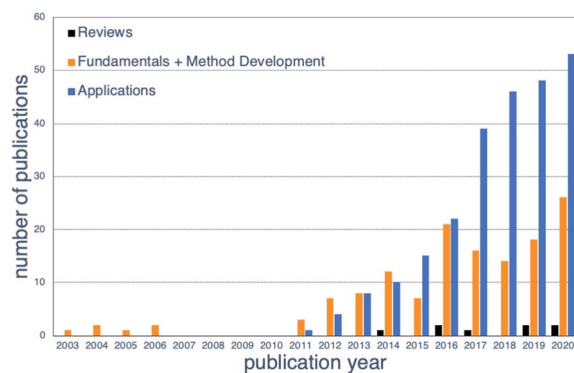


Fig. 3 Evolution of SP-ICP-MS publications related to reviews, fundamentals, method development and applications.

lacking the harmonization of other fields in analytical chemistry, mainly because of the special features of nanoparticles as analytes. Whereas conventional analytes consist of identical entities (mostly atoms in ICP-MS) identified by their chemical composition (*e.g.*, silver, titanium dioxide), identification of particles (*e.g.*, 10 nm spherical silver or titanium dioxide nanoparticles) requires determining their chemical composition but also their morphology (size and shape). This means that validation parameters, like limits of detection and quantification, working range, precision or trueness, must be applied to mass/number concentrations but also to particle size. With respect to size, it must keep in mind that particles always exhibit more or less broad size distributions, entailing that particles cannot be considered as truly identical entities. An additional drawback in relation to validation is the lack of certified reference materials for nanoparticles in any type of matrix, which forces to use recovery tests with matrix-free reference materials or properly characterised commercial nanoparticles for the evaluation of trueness. These recovery tests, based on the spike of nanoparticles, must test not only the recovery of the mass added, but also that the particle size and its distribution remain unchanged. For all these reasons, Linsinger *et al.*³⁷ proposed an adaptation of conventional validation schemes to the detection and quantification of engineered nanoparticles, although the number of validated methods already published is still scarce. In most cases, the scheme has been based on the addition of nanoparticles to different matrices, such as surface waters,³⁸ fruit juices,³⁹ chicken meat,⁴⁰ human liver and spleen tissues⁴¹ or human blood.⁴² In these cases, particle stability in the matrices has a strong influence on trueness and precision of the results, as it was reported for silver nanoparticles in chicken meat, since metallic nanoparticles were transformed into silver sulfide.⁴⁰ Only in a few cases, samples with nanoparticles originally present, such as Ag nanoparticles in confectionery,⁴³ have been described in validated methods. Finally, some methods for screening purposes have also been validated for detection of silver and gold nanoparticles in foods⁴⁴ and TiO₂ nanoparticles in confectionery products.⁴⁵

Validation parameters commonly determined in these studies include trueness, selectivity, precision, detection limits, linearity and robustness.³⁷ The evaluation of trueness has been done mostly by spiking control samples with nanoparticle standards, ensuring that the particle size and size distribution remain unchanged, together with the recovery of the mass added. In general, larger bias, as high as +80% have been reported for number concentration compared to particle size, with bias around -20%.¹⁹ Comparison with nominal median diameter and/or concentration of the standard added is the common rule, although the confirmation of the results by independent methods is highly recommended when possible. Thus, validation of the size characterisation has been performed by comparison with electron microscopy techniques (TEM or SEM), such in the characterisation of a series of TiO₂ materials used as food additives⁴⁶ or with the gold nanoparticle reference material RM8012,⁴⁷ showing differences on size distributions.

Selectivity has been evaluated considering possible (poly) atomic interferences^{38,40,41} and other matrix constituents, which may cause changes in nebulization efficiency or in the ionization, affecting to particle concentration and size, respectively.⁴⁸ In any case, the effect of other nanoparticles or nanoparticles of the same composition but with different properties (size, coating...) should also be evaluated.

Respect to precision, determination of the nanoparticle number concentration is usually less precise than size determination, with reproducibility that reach up to 90% in some cases.⁴⁹ Data processing, is the driving factor in this parameter over sample preparation or sample dilution, especially at high baseline levels that make discrimination of nanoparticle readings more difficult.⁴³ It should be noted that satisfactory results have been obtained when comparing the repeatability and reproducibility obtained with the values predicted by the Horwitz ratio in the analysis of TiO₂ particles at concentration levels in the order of 0.01 mg Ti per kg.⁴¹

Despite there are not expressions widely accepted for the calculation of the limits of detection in the different domains covered by SP-ICP-MS, Laborda *et al.*¹⁷ have proposed a harmonizing approach to calculated LODs for validation purposes. Most widely applied criteria for calculation of size detection limits are based on the use of multiples of the baseline standard deviation (*n*-sigma criterion). Multiples from 3- to 8-sigma criteria can be found in SP-ICP-MS publications,⁴¹ although the use of 5-sigma criteria has been justified by these authors¹⁷ on a routine basis. In general, size LODs depend on different factors, such as the concentration of the dissolved element, the strategy used for subtracting the baseline signal to the particle signal or the type of mass spectrometer.⁴⁵ A comprehensive list of size LODs for metallic and oxide nanoparticles using a commercial quadrupole instrument under typical experimental conditions can be found in Laborda *et al.*¹⁷ Size LODs around 10 nm and larger were obtained for most common nanoparticles at 100 μ s dwell times. Incomplete vaporization of large particles in the plasma can limit the linearity of the size measurement ranges, hence larger particles, in the micrometre range, can produce signals outside the linear range of the detector.⁵⁰ For instance, a linear size range up to 150 nm has been reported for gold nanoparticles, whereas for SiO₂ it can increase up to 1000 (ref. 51) or 2000 nm.⁵⁰ Besides, particles larger than 2–5 μ m are transported into the plasma with lower efficiency.

With respect to the number concentration LOD, it depends on the number of particles events detected in the blank, the sample introduction to the ICP-MS and the acquisition time. The use of conventional procedures for concentration LOD based on the blank standard deviation as in size LOD results in unrealistic values^{9,42} and therefore, they cannot be used interchangeably. LOD values of 100 particles per mL have been reported¹⁷ with acquisition times of 60 s, using a cyclonic spray chamber and a concentric nebulizer. The number concentration measurement range is limited by the occurrence of multiple particle events, which cause a progressively loss of linearity. The occurrence of events due to two or more nanoparticles is predicted by Poisson statistic and is expected to be

significant, depending on the nebulization system and the range of dwell times (milli or microseconds) used.¹³ Linear ranges up to 10^7 L^{-1} can be achieved with conventional nebulization systems at millisecond dwell times, which can be increased one order of magnitude working at microsecond dwell times.

Robustness has been evaluated commonly by changing different parameters that affect the measurement results, such as sample pre-treatment or dilution factor,⁴⁰ although in some cases only the element total concentration has been considered for robustness evaluation.⁴¹

Other studies have included quality control procedures, such as the evaluation of trueness by spiking nanoparticles standards to natural matrix samples, considering that conventional procedures cannot be directly applied in SP-ICP-MS analysis due to the limitations described above. Thus, trueness has been evaluated by measuring recovery of the spiked nanoparticles, mainly based on number concentration, and the use of alternative techniques to confirm size results, such as for the sizing and quantification of Ag nanoparticles in food simulants,⁵² moisturizing creams,⁵³ fish tissue,⁵⁴ or ZnO⁵⁵ and TiO₂ nanoparticles⁵⁶ in natural waters. This strategy has also been applied to the detection of naturally occurring iron oxide nanoparticles in crude oil and residual fuel oil by spiking in-lab synthesized silica-shelled Fe₃O₄ nanoparticles.⁵⁷ Alternatively, the agreement between the total element content determined by acid digestion and ICP-MS can be used for confirmation of the results, as in the determination of Ce, Cd and Pt-bearing nanoparticles in road runoff sediments⁵⁶ or Au nanoparticles in tumour cells after alkaline digestion.⁵⁸

However, if the sample contains nanoparticles smaller than the LOD,^{54–56} size information will be overestimated and number/mass concentration underestimated in consequence. In such situations, SP-ICP-MS should be restricted to confirm the presence of nanoparticles containing the element monitored over a certain equivalent diameter and concentration.

Applications of SP-ICP-MS: analytical scenarios

In relation to the application of SP-ICP-MS to real-world analytical problems, Fig. 4 shows four different analytical scenarios that can be considered. Whereas the first one (type 0) corresponds to the analysis of pristine nanoparticles commonly produced at laboratory or industrial-scale, which just involves their characterisation, the other three correspond mainly to the needs of analytical information arising from the risk assessment of nanomaterials and nanoproducts in relation to environment, health and safety, as well as to legal regulations, which involve the detection, characterisation and/or quantification of nanoparticles in the presence of, more or less, complex matrices. Type 1 scenario includes the analysis of industrial and consumer products containing nanoparticles (*e.g.*, cosmetics, textiles, polymers). Type 2 scenarios consider laboratory tests with pristine nanoparticles or products containing nanoparticles to assess their release, fate, and behaviour (2.1) as well

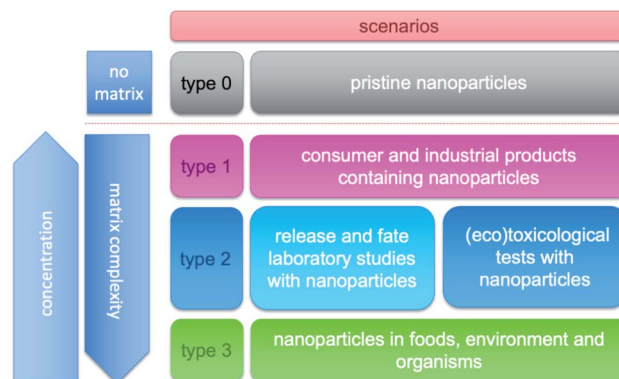


Fig. 4 Analytical scenarios related to nanoparticles (adapted from Laborda *et al.*⁵⁹).

as their (eco)toxicity in a variety of exposure conditions (*e.g.*, environmental micro and mesocosms, migration in food simulants, gastrointestinal digestions, *in vitro* and *in vivo* (eco) toxicity test) (2.2). Finally, type 3 scenarios are related to the monitoring of the occurrence of nanoparticles in foods (3.1) environment (3.2) and organisms (3.3).

Leaving aside the scenario type 0, where the nanoparticles are the sample because of the lack of matrix, each of the three other scenarios involve samples containing nanoparticles and, in general terms, represent a progressive increase in analytical complexity, from the point of view of both the matrix and the decreasing concentrations.

The use and application of SP-ICP-MS methods has been organized according to the scenario classification presented in Fig. 4. Fig. 5 shows the distribution of the number of publications in relation to these different scenarios. The chart shows that two thirds of applications correspond to laboratory tests (scenario 2), whereas one fourth involves samples originally containing nanoparticles (scenario 3). The analysis of pristine nanomaterials (scenario 0) and products containing nanoparticles (scenario 1) account for 16%, most probably because they are usually analysed by other well-established techniques (*e.g.*, electron microscopy, DLS). The following sections provide a detailed reviewing of the SP-ICP-MS application in the different scenarios considered.

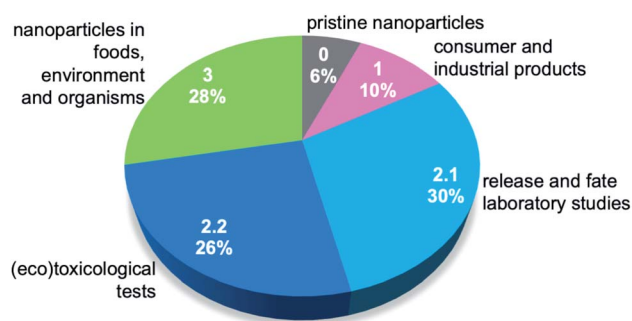


Fig. 5 Distribution of publications (2011–2020) related to applications of SP-ICP-MS in different analytical scenarios.

Scenario 0: analysis of pristine nanoparticles

The analysis of pristine nanoparticles is regarded as the least complex scenario, since there is no matrix in which they are contained. Engineered nanomaterials commonly produced at laboratories for research or industrial purposes,^{61,63–72,75,76} but also commercial suspensions,^{60,62,73,74} have been considered in this section. Table 2 summarizes the applications of SP-ICP-MS to the analysis of such pristine nanoparticles. In any case, the main aim of the analysis is focused on the characterisation of the nanoparticles, although the effect on size of different factors (stability,⁶⁰ kinetics,⁶¹ use of specific reagents^{67,76}) along their synthesis have also been studied by some authors.

Pure nanoparticles of metallic Au,^{63–65} Ag,^{60,61,63} Pd and Ni,⁶⁸ as well as TiO₂,⁷¹ have been analysed by SP-ICP-MS. The nanoparticles were usually obtained by chemical synthesis, although they were also produced by milling.⁶⁰ Most of the nanoparticles were available as suspensions, however, those presented as powders had to be prepared as stable suspensions, requiring convenient dilutions in all cases. Only in the work by Lahtinen *et al.*⁷⁶ nanoparticles had to be extracted with water, because they were obtained by reduction of tetrachloroaurate adsorbed onto 3-D filters.

In relation to the analytical information delivered, size distributions and mean/median sizes were typically reported, although mass^{61,68} and number concentration^{64,68} were also considered when samples were originally presented as suspensions. In this scenario, characterisation was not only limited to sizing. Kálomista *et al.*⁶⁵ were able to provide information about the shape of the nanomaterial, differentiating between spherical nanoparticles and nanorods of Au by comparing the signal-time profiles of the peaks recorded. Merrifield *et al.*⁶² characterised and quantified Au–Ag core–shell nanoparticles, whereas Kéri *et al.*,⁶³ following a similar methodology to Kálomista,⁶⁵ were able to distinguish between Au–Ag alloyed and core–shell nanoparticles, providing average Au : Ag molar ratios.

The analysis by SP-ICP-MS of composite particles consisting of polymer⁶⁶ or silica⁷² particles containing metallic nanoparticles allowed to obtain the mass of Au or Pt per particle, respectively, as well as the corresponding distributions and the number of metallic nanoparticles per composite particle when their size was known. Complex nanomaterials, like up-conversion nanoparticles (NaYF₄ and NaGdF₄ doped with Yb or Er), could also be characterised by decreasing the element mass per particle detection limit; this could be done by reducing the resolution of the quadrupole and hence increasing the transmission of ions.⁷⁰

Although carbon nanotubes are not directly detectable by SP-ICP-MS, their metal impurities have been used as proxies for their detection. In that way, the yttrium contained in nanotubes allowed their detection,^{73,74} although the concentration was underestimated due to the difficulties of detecting nanotubes with low loads of yttrium.

The characterisation of pristine nanoparticle by SP-ICP-MS has been complemented by electron microscopy techniques for size and shape characterisation^{57,61,64,65,68–70,73,74} and

XRD^{68,69,72,75} for confirmation of their nature through their crystalline structure.

Scenario 1: analysis of consumer and industrial products containing nanoparticles

Owing to their specific properties at the nanoscale level, nanoparticles are currently contained in numerous consumer and industrial products. The nano-enhanced products analysed by SP-ICP-MS are summarized in Table 3; they consist of consumer, mainly cosmetics,^{53,77–85} and industrial products, including food additives^{43,46,89} and other materials, like steel,⁹⁰ petroleum products^{57,91} or tattoo inks.^{92,93}

Nanoparticles in cosmetics are mainly focused on sunscreens,^{77–79,84} in which TiO₂ is the most frequent nano-component due to its photocatalytic properties, although ZnO has also been studied in this type of products.^{80,81} TiO₂ was the target analyte in other cosmetics and personal care products, like toothpastes,^{82,83} lip balms,^{82,84} creams⁸⁴ and shampoos.⁸⁴ Aluminium oxide and silver nanoparticles in toothpastes⁸³ and moisturizing creams,⁵³ respectively, have also been measured by SP-ICP-MS, as well as plastic microparticles added as abrasives in exfoliant creams.⁸⁵ Sample preparation of cosmetics always requires their dispersion in ethanol or water, in most cases by adding a surfactant, although a previous defatting step with hexane is typical for sunscreens and lip balms.^{79,82,84} When refractory nanoparticles like TiO₂ or Al₂O₃ are involved, a previous matrix digestion with hydrogen peroxide has been applied.⁸³ Other consumer products considered have been antibacterial sprays containing silver nanoparticles,^{86–88} although the occurrence of other elements like Sn or Zn in these products has also been checked.⁸⁸

TiO₂ and metallic Ag are approved food additives, labelled as E171 and E174, respectively. Raw samples of E171^{46,89} and E174⁴³ have been characterised by SP-ICP-MS in combination with other techniques to obtain information about the nanoparticulate fraction in these materials. In the case of steels,⁹⁰ the aim of the analysis was the characterisation of refractory particles of titanium and niobium carbonitrides, whereas in petroleum products (crude and fuel oil,⁵⁷ and asphaltene solutions⁹¹) was the detection of iron and molybdenum containing particles. In a similar way, tattoo inks^{92,93} were analysed to study the occurrence of nanoparticulate Al, Ti, Cu, Cr, Zn and Pb from the pigments used in their fabrication, or the presence of copper nanoparticles in homeopathic medicines.⁹⁴

Given the nature of the materials considered and their commercial purpose, many of the studies were placed under the European Commission regulation and its definition of nanomaterial.^{43,46,79,81,83,84,93} The principal objective of the use of SP-ICP-MS was therefore focused on the characterisation of the nanoparticle fraction, being the mean size and the particle size distribution the main measurands of concern.

Although concentration is not a serious constrain in this scenario, a common limitation when using SP-ICP-MS is the detection of the smallest fraction of the nanoparticles present with these samples. This can lead to partial histograms since complete size distributions are not always obtained. This was

Table 2 Scenario 0: analysis of pristine nanoparticles

Sample	Nanoparticle composition	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Suspension	Ag	—	5 ms	Q	No	Qualitative (NP)	NP size distribution	TEM DLS	60
	Ag	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	TEM DLS	61
	Au@Ag (Ag shell)	—	50 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	AF4-UV-Vis	62
	Au-Ag alloy	—	6 ms 20 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	molar ratios Au : Ag	—	63
	Au	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	TEM	64
	Au (NP and nanorods)	—	6 ms 20 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	TEM DLS UV-Vis	65
	Au/polymer composite	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	Mean mass per NP NP mass distribution	ICP-MS TEM AF4-ICP-MS CFFF-ICP-MS	66
	CuO FeOOH	—	50 μ s	DF	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	SEM XRD DLS	67
	Ni	—	500 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	SEM TEM XRD	68
	Pd	—	50 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	SEM SAXS XRD	69
	NaYF ₄ (Yb doped) NaYF ₄ (Er doped) NaGdF ₄ (Yb doped) NaGdF ₄ (Er doped)	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	TEM XRD	70

Table 2 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Powder	TiO ₂	Dispersion in 2% PVP	50 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	DLS	71
						Quantitative (DE)	NP size distribution DE mass concentration	TEM	
	SiO ₂ /Pt	Dispersion	10 ms	Q	He	Characterisation (NP)	Mean mass per NP	ICP-MS SEM-EDS TEM XPS	72
	CNT (trace metals)	Dispersion in 1% Triton X-100	10 ms	Q	No	Qualitative (NP) Quantitative (NP)	— CNT number concentration	SEM-EDS NTA	73
	CNT (trace Y)	Dispersion in 1% Na deoxycholate	100 μs	Q	No	Qualitative (NP) Quantitative (NP)	— CNT mass concentration	ICP-MS TEM NTA UV-Vis	74
	TiO ₂ (Mn)	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	Mean mass per NP NP mass distribution	SEM TEM SAM AES XPS XRD Raman	75
Filters	Au	Water extraction	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	HIM SEM-EDS XRD UV-Vis	76

Table 3 Scenario 1: analysis consumer and industrial products containing nanoparticles

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision /reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Cosmetics Sunscreens	TiO ₂	Dispersion in ethanol	50 μs	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	—	77
	TiO ₂	Dispersion in 1% Triton X-100	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS SEM-EDS	78
	TiO ₂	Defatting with hexane + filtration	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS SEM TEM DLS AF4-MALS-ICP-MS	79
Lip balm	TiO ₂ ZnO	Dispersion in 1% Triton X-100	—	—	—	Characterisation (NP)	NP mean size	TEM-EDS XRD	80
	TiO ₂ ZnO	Dispersion in 1% Triton X-100	5 ms	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	AF4-MALS-ICP-MS	81
	TiO ₂	Defatting with hexane + filtration	100 μs	Q	He	Characterisation (NP)	NP size distribution	ICP-MS CE-ICP-MS	82
Toothpaste	TiO ₂	Dispersion in 0.1% SDS	100 μs	Q	He	Characterisation (NP)	NP size distribution	ICP-MS CE-ICP-MS	82
	TiO ₂ Al ₂ O ₃	H ₂ O ₂ digestion + dilution in 0.1% SDS	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS STEM-EDS DLS AF4-MALS-ICP-MS HDC-ICP-MS	83

Table 3 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision /reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Sunscreen	TiO ₂	Defatting with hexane	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	ICP-MS	84
Lip balm		Dispersion in 0.1% SDS				Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-OES DLS	
Toothpaste						Quantitative (DE)	DE mass concentration		
Creams									
Shampoo									
Moisturizing cream	Ag	Dispersion in methanol	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS FESEM TEM	53
Exfoliant	Plastic polymers (C-)	Dispersion in water	200 μs	Q	No	Qualitative (NP)	—	FESEM	85
Other consumer products									
Antibacterial spray	Ag	—	3 ms	Q	No	Qualitative (NP) Qualitative (DE)	—	HPLC-ICP-MS TEM	86
	Ag	—	10 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS	87
Commercial sprays	Ag-Sn-Zn	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	ICP-MS DLS SEM-EDS TEM-EDS SMPS	88
Food additives									
E174	Ag	Ethanol wetting + dispersion in 0.05% BSA	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	TEM	43
						Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration		

Table 3 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision /reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
E171	TiO ₂	Dispersion in water	3 ms	Q	NH ₃	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	TEM-EDS HAADF-STEM-EDS	46
	TiO ₂	Dispersion in 0.05% BSA	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	SEM NTA AF4-MALS AF4-ICP-MS	89
Other materials									
Steel	NbCN TiNbCN	Extraction 0.5 M H ₂ SO ₄ /0.1% Disperbyk-2012 + centrifugation	1.8 ms	TOF	No	Characterisation (NP)	NP size distribution Mass per NP distribution	STEM	90
Petroleum products	Fe ₃ O ₄	Dilution (<i>o</i> -xylene)	100 μs	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-OES TEM	57
Asphaltene solutions	Mo- Fe-	Dilution (<i>o</i> -xylene)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	91
Tattoo inks	Al ₂ O ₃ TiO ₂ Cu-	—	5 ms	Q	He	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	TEM DLS AF4-MALS	92
	Ti- Al-	—	5 ms	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	93
	Cr- Cu- Zn- Pb-	—	—	—	—	—	—	—	—
Homeopathic medicine	Cu	—	—	Q	—	Qualitative (NP)	—	DLS NTA SEM-EDS	94

^a M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M.

the case for titanium in some cosmetics^{77–79,82} and food additives,⁴⁶ as well as for silver.^{43,53,86,87} For microplastics,⁸⁵ the sizes of detectable particles were restricted at both size range limits. At lower size range, it is restricted due to the inherent limitations of carbon detection by ICP-MS, and at the upper size range due to low nebulization efficiency of large particles, being limited to sizes from 1 up to 5 μm .

Scenario 2.1: laboratory tests involving nanoparticles or products containing nanoparticles

The applications developed under scenario 2.1, summarized in Table 4, include laboratory tests under controlled conditions, involving pristine nanoparticle or products containing nanoparticles. Laboratory tests with materials originally containing nanoparticles are devoted to studying their release into aqueous media under selected conditions, whereas the study of the fate and behaviour of nanoparticles in different media, or along different relevant processes, requires the addition of pristine nanoparticles to the samples of concern.

Release studies. The risk assessment of consumer and industrial products containing engineered nanoparticles involves knowing the human and environmental exposure to the nanoparticles released from such products along their whole life cycle. These release studies are usually performed at laboratory scale under controlled simulation conditions.

Direct human exposure to engineered nanoparticles and/or their transformation products might arise from the ingestion of foods stored in containers bearing nanoparticles (*e.g.*, Ag, nanoclays). Migration test from existing regulations for conventional analytes, based on the use of model food simulants (acetic acid, ethanol), have been applied to plastic food containers^{95–99} and packaging films,¹⁰⁰ as well as to cookware.¹⁰¹ The procedures are straightforward; after incubation of the samples at selected temperatures during fixed time periods, simulants are diluted conveniently and analysed by SP-ICP-MS. In addition to plastic containers, polymers doped with Fe_2O_3 ¹⁰⁹ and ZnO ¹¹⁰ have also been studied by using these migration tests. In the case of baby products containing silver nanoparticles, release studies were performed by leaching in artificial saliva to simulate the exposure route for children.⁹⁸ In a similar way, silver release from toothbrushes was studied by leaching in tap water.¹⁰² The dermal exposure from surfaces containing nanoparticles was simulated through wiping tests by using artificial sweat, followed by the extraction with water of the nanoparticles from the wipes.¹⁰³ Water extraction has also been applied to study the release of Ag nanoparticles from antibacterial plasters¹⁰⁴ or TiO_2 from textiles.¹⁰⁵

Environmental exposure to engineered nanoparticles from nano-enhanced products is related to their release and transformations that they undergo during their life cycle. Most commonly, materials like wood,¹¹⁶ leather¹¹⁷ or polymers^{108,109} have been subjected to direct leaching in water, whereas for paints^{111,113} or conductive inks,¹¹⁴ the release from painted surfaces or printed circuits have been considered, respectively. More realistic studies have involved the use of different model waters to study the leaching of metal bearing particles under

end-of-life conditions from photovoltaic cells,¹¹⁵ or the leaching of TiO_2 particles from painted surfaces by snow and rainwater under weathering conditions.¹¹² Mitrano *et al.*¹⁰⁶ studied the life cycle of nano-enhanced textiles subjected to different aging and washing processes to understand the release and transformation of the silver nanoparticles from the textiles. The release of metal containing particles from environmental samples, like road dust¹¹⁹ and mine tailings,¹²⁰ has also been studied by leaching in different media as a source of environmental pollution.

Regarding the composition of the nanoparticles, silver^{95–98,100,102–104,106,107,114,115,117} and titanium^{101,105,112,113} are the most frequently studied, although zinc¹¹⁰ and copper^{103,111,116} have also been considered. Multielement monitoring has also been performed, as in the case of photovoltaic cells,¹¹⁵ cookware¹⁰¹ or the emission of particles from paper printing and shredding.¹¹⁸ The release of carbon nanotubes from polymer nanocomposites was followed by monitoring the yttrium present in the nanotubes,¹⁰⁸ as it was described for pristine carbon nanotubes in scenario 0.^{73,74} Detection of plastic microparticles released from food containers has also been possible by using the carbon-13 isotope.⁸⁵

Although SP-ICP-MS allows to obtain detailed quantitative information about nanoparticle size and concentration, the technique has been used in some release studies only to confirm the presence of the nanoparticles in the food simulants^{85,95,99} or the leaching media,^{115,117,118} as well as of dissolved forms of the element monitored.⁹⁷ In these cases, the recorded time scans (Fig. 2a) allow to obtain the qualitative information required, once the adequate metrological criteria have been applied.⁴⁴ In many other studies, detailed information about mean/median sizes, size distributions and number/mass concentration of the nanoparticles released were reported, although the profiles of the size distributions revealed that the nanoparticle distribution had been partially recorded due to the attainable size limits of detection, hence underestimating the actual concentrations and overestimating mean sizes.

Fate studies. Whereas the release studies discussed above involve consumer and industrial products, fate studies are mostly based on the use of pristine and well-characterised nanoparticles, commercially available or synthesized at the laboratory, although aged nanoparticles have also been used.¹⁶⁴ The nanoparticles are spiked in the matrix of interest and the samples analysed directly or after undergoing the simulated process under study (*e.g.*, gastrointestinal digestion, laundry, wastewater treatment, environmental exposure). The main advantage of these controlled experiments is that both size and concentration of the spiked nanoparticles can be selected as desired. Although concentration is not a serious limitation for SP-ICP-MS, allowing even to work at realistic environmental concentrations,^{135,138,141} attainable size LODs can be a critical drawback when using SP-ICP-MS with real samples, as it has been discussed above and it will be shown again in relation to scenario 3.

Fate studies performed with spiked Ag nanoparticles in food simulants complement the migration tests of silver from food containers discussed above, allowing to obtain information

Table 4 Scenario 2.1: laboratory tests involving pristine nanoparticles or products containing nanoparticles

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Release studies <i>Migration</i>									
Food containers	Ag-	Migration: - 3% acetic acid - 50% ethanol	100 μ s	Q	No	Qualitative (NP)	—	ICP-MS SEM-EDS	95
	Ag-	Migration: - 3% acetic acid - 10% ethanol	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	96
	Ag-	Migration: - Water - 3% acetic acid - 10% ethanol - 90% ethanol	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration —	ICP-MS SEM-EDS	97
	Ag-	Migration: - Water - 3% acetic acid - 10% ethanol	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS TEM-EDS	98
	Clays (Al-)	Migration: - 3% acetic acid - 10% ethanol	100 ms	Q	No	Qualitative (NP)	—	ICP-MS SEM-EDS	99
	Plastic polymers (C-)	Water	200 μ s	Q	No	Qualitative (NP)	—	FESEM	85
Food packaging films	Ag-	Migration: - Water - 3% acetic acid - 10% ethanol	5 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS STEM-EDS	100
Cookware	Al- Ti- Si-	Migration in 3% acetic acid	3 ms	Q	H ₂	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	ICP-MS SEM-EDS	101
<i>Consumer products</i> Baby products	Ag-	Leaching in artificial saliva	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS TEM-EDS	98

Table 4 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Toothbrush	Ag-	Leaching in tap water	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	102
Dermal transfer from surfaces (keyboard and painted surface)	Ag-Cu-	Wiping test (artificial sweat) + water extraction	100 μ s	Q	No He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS SEM-EDS TEM-EDS	103
Plaster	Ag-	Water extraction + filtration + CPE	10 ms	Q	No	Quantitative (NP)	Mass concentration NP	ICP-OES TXRF SEM-EDS	104
Textiles	TiO ₂	Leaching in water	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	105
Washing machine effluent	Ag	Leaching under washing conditions	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS SEM TEM-EDS XANES	106
<i>Industrial materials</i> CNT polymer nanocomposite	Ag CNT (trace Y)	— Leaching in water + surfactant stabilization	4 ms 1 ms 100 μ s	DF Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	ISE TEM-EDS NTA	107
Pigmented polyethylene	Fe ₂ O ₃	Leaching in: - 0.05% SDS - Water - Hard EPA water - SRNOM Migration in: - Water - 3% acetic acid - 10% ethanol	5 ms	Q	H ₂	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	XPS ATR-FTIR FESEM	108
									109

Table 4 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
ZnO doped polymers	ZnO	Migration to: - Orange juice - Chicken meat - Tris-HCl extraction	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	FAAS TEM-EDS FTIR DLS	110
Antifouling paint	Cu ₂ O	Leaching in freshwater from painted surface	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	DLS XRD XPS SEM-EDS TEM-EDS	111
Paint	TiO ₂	Leaching in rainwater/snow from painted surface + filtration	50 μ s	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	112
	TiO ₂	Leaching in water from painted surface	100 μ s	Q	No	—	—	SEM-EDS TEM HRTEM XRD UV-Vis XPS XRD	113
Printed circuits	Ag	Leaching in water	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	SEM AFM AF4-ICP-MS	114
Photovoltaic cells	Ag- Al- Cd- Mo- Se- Zn-	Leaching in: - Model freshwater - Model seawater - Model acidic rainwater	30 ms	Q	No	Qualitative (NP)	—	ICP-MS	115
Wood	Cu-	Leaching in water	—	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	AAS ICP-OES SEM-EDS ATR-FTIR	116
Leather	Ag	Leaching in water	50 μ s	Q	No	Qualitative (NP)	—	XPS FESEM	117

Table 4 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Paper	Multielement	Collection of airborne particles in filter + suspension in DMEM	—	Q	No	Qualitative (NP)	—	SEM-EDS TEM-EDS	118
<i>Environmental samples</i>									
Road dust	Pt	Leaching in stormwater runoff	5 ms	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS	119
Mine tailings	Th- U-	Leaching in different media + filtration	50 μ s	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS	120
Fate studies									
<i>Food simulants</i>									
Water	Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	TEM AF4-MALS	121
Acetic acid (3%) Ethanol (10%)	Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	122
Water	Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Quantitative (DE)	DE mass concentration		
Acetic acid (3%) Ethanol (10–50%) Olive oil Milk	Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Quantitative (DE)	DE mass concentration		
<i>In vitro digestion</i>									
Gastric fluid	Au Ag ZnO CeO ₂ (spiked)	Gastric step	50 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration DE mass concentration	SEM	123
Digestion fluids	Ag (spiked)	3-steps <i>in vitro</i> -human gastro-intestinal digestion	—	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	SEM-EDS TEM DLS	124
Chicken meat (spiked)	Ag (spiked)	3-steps <i>in vitro</i> -human gastro-intestinal digestion	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	125

Table 4 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Orange juice Chicken meat	ZnO	3-steps <i>in vitro</i> - human gastro- intestinal digestion	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	FAAS TEM-EDS FTIR DLS	110
<i>Laundry process</i> Washing solutions	Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	STEM-EDS	126
<i>Waters</i> Synthetic moderately hard water + NOM	Pt (spiked)	—	50 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	—	127
Ozonized water	Au@Ag (spiked)	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	—	128
Lake water	Ag (spiked)	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-OES DLS	129
	Ag (spiked)	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS AF4-UV-Vis	130
	Ag (lake spike)	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	131
	Ag (lake spike)	—	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS CPE + ICP-MS AF4-ICP-MS	132
	Ag (lake spike)	—	50 μ s	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS DGT + ICP-MS	133

Table 4 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
River water	Ag Ag ₂ S (spiked)	CPE	500 μs	Q	He	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	HAADF-STEM- EDX	134
	Ag CeO ₂ Fe ₂ O ₃ (spiked)	Digestion (Na ₄ P ₂ O ₇)	50 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-OES AF4-ICP-MS	135
	TiO ₂ ZnO (spiked)	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	—	136
	Au Ag (spiked)	Fractions collected from HDC	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	DLS AUC	137
Fresh waters	Ag	—	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP mass concentration	AF4-ICP-MS	138
Synthetic seawater	Au (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	Size distribution	AF4-UV-Vis DLS	139
Seawater	Ag Ag ₂ S AgCl (spiked)	CPE	500 μs	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS TEM-EDS	140
Seawater	Ag (spiked)	—	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	TEM	141
Seawater	Ag (spiked)	—	10 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	—	142

Table 4 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
<i>Waste water treatments</i>									
Synthetic wastewater	Ag (spiked)	SPE (Chelex-100)	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	NTA	143
	TiO ₂ CeO ₂ (spiked)	—	—	Q	No	Qualitative (NP) Qualitative (DE)	—	ICP-MS	144
	Fe + adsorbed Cd(II)	—	3 ms	Q	H ₂ (MS/MS)	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS XRD	145
Wastewater	Ag (spiked)	—	500 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	EDM-HSI DLS TEM	146
Wastewater	Ag (spiked)	—	1 ms 100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration DE mass concentration	TEM TOF-SIMS XPS UV-Vis	147
Wastewater	TiO ₂ Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	Average size	ICP-MS STEM-EDS	148
Wastewater River water	Au (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	—	149
Wastewater River water	Ag (spiked)	Centrifugation	10 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	TEM-EDS DLS HDC-RI AF4-UV-Vis- MALS-RI HDC-ICP-MS	150
Wastewater River water	Ag (spiked)	HDC online separation	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	—	151
Activated sludge	CNT (trace Y) (spiked)	Centrifugation + ultrafiltration	10 ms	Q	No	Quantitative (NP)	NP mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	152
Activated sludge	Ag	Settling	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	—	152

Table 4 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^c	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Biofilm reactor	Ag (spiked)	Settling	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	153
Biofilm reactor	Ag (spiked)	Settling	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	154
<i>Drinking water treatments</i>									
Fresh water	Ag Au TiO ₂ CeO ₂ ZnO (spiked)	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	TEM-EDS	155
<i>Soils and sediments</i>									
Soil	Ag ZnO TiO ₂ CeO ₂ (spiked)	Water extraction + centrifugation + filtration	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	SEM-EDS	156
	Ag (spiked)	Water extraction + filtration + CPE	10 ms	Q	No	Quantitative (NP)	Mass concentration NP	ICP-OES TXRF SEM-EDS	104
	Ag (spiked)	Water extraction + centrifugation + filtration Extraction (DTPA 5 mM) + centrifugation + filtration	10 ms	Q	No	Qualitative (NP)	—	ICP-OES	157
	Ag (spiked)	Extraction (2.5 mM Na ₄ P ₂ O ₇)	50 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	DLS TEM	158
	Ag (spiked)	Extraction (2.5 mM Na ₄ P ₂ O ₇) + settling	50 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	ICP-MS	159
	Ag (spiked)	Water extraction + centrifugation + filtration	50 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP mass concentration DLS	ICP-MS ISE TEM-EDS DLS	160

Table 4 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Soil colloids	CuO (spiked)	—	5 ms 100 μ s	Q	H ₂	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	DLS	161
Soil sediment	Au (spiked)	Water extraction + centrifugation	10 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS AF4-MALS-UV- ICP-MS DLS	162
Soil sediment	Ag (spiked)	Extraction (2.5 mM Na ₄ P ₂ O ₇) + settling	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	—	163
Sediment column	Aged Ag (spiked)	Extraction (different media) + centrifugation (+filtration)	5 ms	Q	No	Qualitative (NP)	(Presence of aggregates)	ICP-MS ICP-OES ETAAS TEM SEM-EDS HDC-ICP-MS	164
Sand column	Au (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	SEM	165
<i>Biological fluids</i> Artificial sweat	Ag (spiked)	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	DLS UV-Vis XAS SEM-EDS	166
Plasma Cellular blood fractions	Fe ₃ O ₄ (spiked)	—	100 μ s	Q	H ₂	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	TEM AF4-UV-MALS- ICP-MS	167

^a M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M.

about the oxidation of silver nanoparticles to dissolved forms.^{121,122} In relation to the potential human exposure to engineered nanoparticles through ingestion, the behaviours of Ag,^{123,124} but also of Au,¹²³ CeO₂,¹²³ and ZnO^{110,123} nanoparticles along *in vitro* gastrointestinal digestions have been studied by SP-ICP-MS through the direct spiking of the digestion fluids^{123,124} or foods submitted to the *in vitro* digestions.^{110,125} With respect to the dermal exposure to consumer products containing Ag nanoparticles, laboratory experiments with artificial sweat have allowed to detect changes in size of the nanoparticles.¹⁶⁶ The stability of iron oxide nanoparticles in ferumoxytol, an intravenous preparation for treatment of the anaemia, was studied in human plasma and cellular blood fractions.¹⁶⁷ In relation to the life cycle of silver nano-enhanced textiles and their environmental implications, the fate and behaviour of pristine Ag nanoparticles in the washing solutions during the laundry process has also been studied.¹²⁶

Environmental scenarios for studying the fate of nanoparticles by SP-ICP-MS have included different types of real and synthetic surface waters (lake,^{130–133} river,^{134–137} sea^{140–142}) and wastewaters,^{143–150,275} as well as soils^{104,156–161} and sediments.^{162,163} Whereas spiked water samples were usually analysed directly or after dilution, soil analysis required the extraction and the separation of the nanoparticles from the soil matrix. This was done by using water or other extractants, like sodium pyrophosphate,^{158,159,163} followed by centrifugation or/and filtration.

Apart from works devoted to demonstrate the capability of SP-ICP-MS for detecting specific nanoparticles in water^{142,150} and soil^{159,161,163} samples, fate experiments focus mainly on studying the stability^{129,143} and transformations (dissolution/oxidation,^{128,138} aggregation^{127,135}...) of nanoparticles under laboratory controlled conditions, although experiments adding nanoparticles into natural aquifers have also been performed.^{131–133} Special attention has been paid to the fate of nanoparticles in relation to drinking and wastewater treatments. The stability of Ag nanoparticles under ozonisation conditions¹²⁹ and the removal of different engineered nanoparticle through coagulation processes¹⁵⁵ and wastewater treatments^{151–154} have been studied. Soil studies have focused on the interaction of the nanoparticles with soil components, that control their transformations as well as their retention and mobility.^{157,162,164,165}

Most studies with environmental samples have focused on Ag nanoparticles,^{104,121–126,129–135,137–143,146–148,150,152–160,163,164,166,275} as well as their transformation products, Ag₂S and AgCl.^{134,140} Other nanoparticles studied include TiO₂,^{136,144,148,155,156} ZnO,^{136,155,156} CeO₂,^{135,144,155,156} CuO,¹⁶¹ Fe₂O₃,¹³⁵ Pt¹²⁷ and Au.^{137,149,155,165} Less common nanoparticles like core-shell Au@Ag nanoparticles¹²⁸ and carbon nanotubes¹⁵¹ have also been considered. The influence of the coating^{104,129,130,138,141,142,146,157,162,163} and the size^{123,126,149,150,155,159,163,165,166,275} of the spiked nanoparticles on the transformations studied have also been considered.

Fate studies focus on the transformations of the nanoparticles in relation to their potential toxicity.^{130–132,136,138,141,149,155,164} In general, the mean/median size and size distributions are the most frequent measurands. These measurands are related to the stability of the nanoparticles, but

also to their aggregation^{110,122–129,131,133,136,138,139,141,145,148,152,157,158,162–164,166} and dissolution.^{138,143,144,147,151} For this reason, the concentration of the dissolved element has also been considered in different studies.^{122,123,125,126,131,133,136,144,147,153,154,158} To confirm the formation of aggregates, electron microscopy techniques (SEM, TEM),^{110,123–125,141,147,151,158,164} DLS^{110,124,129,139,158,162,166} or NTA¹⁴³ have been used as complementary techniques.

Scenario 2.2: *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* (eco)toxicological tests

Risk assessment of nanomaterials must be based on exposure information but also on their toxicological behaviour in humans, animals and the environment. Hence, *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* (eco)toxicological essays worth studying in order to assess these behaviours and effects on living organisms. However, unravelling the mechanisms of action of nanoparticles for the correct interpretation of (eco)toxicity data requires the availability of detailed analytical information from characterising and quantifying nanoparticles and their transformation products in biological media.³⁴ In this context, SP-ICP-MS has proved to be a valuable technique in recent years, as it is summarized in Table 5. As in the case of the fate studies discussed above, (eco)toxicological test use mostly pristine and well-characterised nanoparticles, commercially available or synthesized at laboratory, allowing to select their size and coating, as well as their concentration levels.

***In vitro* studies.** Bacteria, fungi and algae have been microorganisms used to assess the uptake, biotransformation and ecotoxicity of nanoparticles under laboratory-controlled conditions, in a similar way that it has been done with different types of cells for toxicity assessment.

Because many *in vitro* studies were performed with in-lab synthesised nanoparticles, SP-ICP-MS has been used in combination with other techniques only for characterisation of these pristine nanoparticles.^{168,169} The uptake of Te nanoparticles by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was studied by the direct addition of spherical nanoparticles into the culture medium. Their biotransformation to nanorods when they were incorporated into the bacterial strains was confirmed by TEM and XRD, whereas SP-ICP-MS was applied after bacteria lysis to determine the number of particles per bacteria and to infer dimensional information of the rod-shaped Te nanoparticles.¹⁷⁰ The effect of TiO₂, ZnO and Ag nanoparticles on a river bacterial community was studied by mixing river water with artificial treated wastewater containing added nanoparticles. After three days of exposure, water samples were analysed by SP-ICP-MS to determine the mean size and size distributions, as well as the concentration of nanoparticles and dissolved species.¹⁷¹

Algae are commonly used in ecotoxicity testing. In this context, the dissolution of Ag nanoparticles and the bioavailability of silver to the model green algae *Chlamydomonas reinhardtii* was studied in a wastewater matrix,¹⁷² using SP-ICP-MS for monitoring the aggregation and dissolution of the nanoparticles. Speciation studies with chromium(III) and (VI) in ISO

Table 5 Scenario 2.2: *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* (eco)toxicological tests

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
<i>In vitro</i> studies									
<i>Fungi</i>									
<i>Aspergillus flavus</i>	Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	TEM DLS	168
<i>Aspergillus parasiticus</i>									
<i>Aspergillus carbonarius</i>						Quantitative (NP)	NP number concentration NP mass concentration		
<i>Aspergillus niger</i>									
<i>Aspergillus ochraceus</i>									
<i>Aspergillus steynii</i>									
<i>Aspergillus westerdijkae</i>									
<i>Penicillium verrucosum</i>									
<i>Bacteria</i>									
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ag (spiked)	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	TEM-EDS	169
<i>Staphylococcus aureus</i>						Quantitative (NP)	NP number concentration NP mass concentration	XRD FTIR	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Te (internalized)	Bacteria lysis + centrifugation	5 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	TEM	170
<i>Escherichia coli</i>						Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	XRD	
River bacterial community	TiO ₂ ZnO Ag (spiked)	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	DLS	171
						Quantitative (NP)	NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration		
						Quantitative (DE)			
<i>Algae</i>									
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Ag (spiked)	Ultracentrifugation	0.5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	172
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Cr-(biosynthesis)	Filtration	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	AAS TEM NTA	173
<i>Cells</i>									
Human umbilical vein endothelial cells	Au (spiked)	TMAH digestion	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	FIB-SEM Flow cytometry Confocal microscopy	174

Table 5 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Human macrophages and exosomes	Au (spiked)	Ultracentrifugation + lysis	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	TEM NTA Flow cytometry Confocal microscopy	175
Human breast cancer cells	Au (spiked)	TMAH digestion	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	ICP-MS	58
Human epithelial colorectal adenocarcinoma cells	Ag (spiked)	Lysis	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	ICP-MS	176
Human colon adenocarcinoma mucus secreting cells						Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	DLS TEM-EDS Confocal microscopy	
Mouse embryonic stem cells	Ag Ag ₂ S (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS TEM DLS	177
Mouse neuroblastoma cells	TiO ₂ Ag (spiked)	Lysis	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS LA-ICP-MS TEM DLS	178
Trout liver cells	TiO ₂ (spiked)	Lysis	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM-EDS DLS Confocal microscopy	179
<i>In vivo studies</i> <i>Plants</i> Tomato	Au (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	TEM DLS	180
Tomato Pumpkin	CeO ₂ (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS TEM	181

Table 5 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Soybean Cucumber									
Thale cress	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	50 μ s	Q	No	Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM	182
Garden cress White mustard	Pt (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10) + filtration	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS	183
Thale cress	Ag Cu ZnO (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	3 ms	Q	No	Qualitative (NP)	—	ICP-MS SEM-EDS TEM-EDS DLS	184
Cucumber Wheat	Ag ₂ S (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	DLS SEM-EDS XAS	185
White mustard	Pd (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS TEM	186
Lettuce	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-OES XAS	187
	ZnO (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	ICP-MS	188
Lettuce Kale Collard green	CuO Cu(OH) ₂ (spiked)	Methanol extraction (50%)	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	HPLC-ICP-MS HPLC-QTOF-MS HPLC-FT- orbitrap-MS	189
	CuO (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM FESEM TEM	190

Table 5 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Wheat	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM DLS	191
	Ag Au (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	TEM	192
Rice	TiO ₂ (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-OES DLS STEM-EDS	193
Rice Soybean	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	50 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution DE mass concentration	TEM-EDS	194
Radish	CeO ₂ CuO (spiked)	Gastrointestinal digestion	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	195
	TiO ₂ (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μ s	Q	O ₂ /H ₂ (MS/ MS)	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	196
	CeO ₂ (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10) + filtration	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS LA-ICP-MS	197
<i>Soil organisms</i> <i>Lumbriculus variegatus</i>	Ag Au (spiked)	TMAH digestion	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	198
<i>Lumbriculus variegatus</i>	Ag (spiked)	Water extraction + centrifugation + filtration	—	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-OES TEM DLS AF4-ICP-MS	199

Table 5 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
<i>Lumbriculus rubellus</i>	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (collagenase + hyaluronidase + proteinase K) + centrifugation	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS FESEM-EDS DLS	200
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Au (spiked)	TMAH digestion	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-MS SEM-EDS TEM DLS ICP-MS	201
<i>Aquatic organisms Daphnia magna</i>	Ag Au (spiked)	TMAH digestion	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	198
Mussel	Ag nanowire (spiked)	Collection of hemolymph	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS SEM TEM	202
Mussel	TiO ₂ (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS TEM	203
Zebra fish (liver, intestine, gills)	Au Ag (spiked)	TMAH digestion + filtration	1 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP mass concentration	TEM	204
Zebra fish (intestine, liver, gills, brain)	CeO ₂ TiO ₂ (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K) + H ₂ O ₂ digestion	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM DLS	205
Trout (liver)	Ag (spiked)	TMAH digestion	3 ms	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	—	54

Table 5 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
<i>Rat tissues</i> Spleen	Au (spiked)	TMAH digestion	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	—	206
	TiO ₂ (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	NH ₃	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	SEM-EDS TEM	207
Liver	Au (spiked)	Lysis + centrifugation	10 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	TEM	208
	SiO ₂ (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	CH ₄	Characterisation (NP)	NP mean size	HPLC-ICP-MS ICP-MS TEM	209
Liver Lung	CeO ₂ TiO ₂ (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS DLS TEM	210
Lung Kidney Blood	TiO ₂ nanorods (spiked)	HCl/HNO ₃ digestion + filtration	—	Q	—	Qualitative (NP)		TEM SEM-EDS DLS	211
Foetus, resorption, placenta, lung, liver, spleen, kidney, mammary gland	Ag (spiked)	TMAH digestion	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	TEM-EDS	212
Stomach, intestinal content, liver, spleen, kidney, lungs, blood	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	AAS TEM DLS	213
<i>Chicken tissues</i> Liver Yolk	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	2 ms	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	AAS SEM-EDS	214
Ex vivo studies Human placenta	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	TEM DLS	215

^a M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M.

Table 6 Scenario 3.1: analysis of foods

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analysers	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Confectionery									
Cakes	TiO ₂	H ₂ O ₂ digestion	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	ICP-MS	216
Candy								AF4-ICP-MS	
Chewing gum									
Chewing gum	TiO ₂	Water extraction	10 ms	Q	NH ₃ (MS/MS)	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration		217
Silver pearls	Ag	Water extraction	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS TEM-EDS HAADF-STEM	218
Silver pearls	Ag	Water extraction + centrifugation	5 ms	Q	No	Qualitative (NP)		ICP-MS	44
Decoration dusting powder	Al Au								
Custard cream	TiO ₂		100 μs	Q	No	Qualitative (NP)		TEM-EDS CLS	219
Candies									
Candies	TiO ₂	Water extraction + filtration	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	AF4-MALS-ICP-MS DLS	79
Candies	TiO ₂	Centrifugation	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	SEM	220
Silver coated chocolate and pearls	Ag	Ethanol wetting + dispersion in 0.05% BSA	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	TEM	43

Table 6 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analysers	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Meat									
Game meat	Pb	Enzymatic digestion (proteinase K)	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	221
Miscellaneous									
Noodles	Al-	Enzymatic digestion (α -amylase)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution DE mass concentration	ICP-MS	222
Drinks Chocolate Coffee Chewing gum Silver pearls	Ti- Si- Ag-	Water extraction + filtration	100 μ s	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (DE)	NP mean size DE mass concentration	ICP-MS DLS AF4-MALS-ICP-MS	223
Surimi sticks	TiO ₂	Enzymatic digestion (pancreatin and lipase)	100 μ s	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM	224

^a M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M.

8692 algal medium showed the formation of Cr-bearing nanoparticles, detected by SP-ICP-MS, which could contribute to the ecotoxicity of chromium to *Raphidocelis subcapitata*.¹⁷³

The risk assessment of nanoparticles in living beings involves the proper evaluation of their behaviour at cellular level by *in vitro* assays. Within this framework, SP-ICP-MS has been used in a number of studies with human cell lines (umbilical vein endothelium,¹⁷⁴ macrophages and exosomes,¹⁷⁵ breast cancer,⁵⁸ human epithelial colorectal adenocarcinoma and colon adenocarcinoma mucus secreting cells¹⁷⁶) but also mouse (embryonic stem¹⁷⁷ and neuroblastoma¹⁷⁸) and liver trout¹⁷⁹ cells. The uptake of nanoparticles by cells was demonstrated to be dependent on their concentration in the media,¹⁷⁴ exposure time and cell line.⁵⁸ SP-ICP-MS allowed to study their biotransformations,¹⁷⁶ as well as their dissolution and agglomeration¹⁷⁶ within the cells. Moreover, the release of internalised nanoparticles by macrophages through exosomes could also be confirmed.¹⁷⁵

Au nanoparticles have been more frequently used in these *in vitro* studies with cells,^{58,174,175} although Ag,^{176–178} Ag₂S¹⁷⁷ and TiO₂ (ref. 178 and 179) have also been investigated. After exposure in the culture media containing the nanoparticles, cells were separated by centrifugation and lysed^{175,176,178,179} or digested with TMAH^{58,174} as a previous step to the analysis by SP-ICP-MS.

***In vivo* studies.** Release of engineered nanoparticles to the environment may end up and accumulate in edible plants, which is a potential pathway to human exposure. SP-ICP-MS has been used to study the uptake of nanoparticles by different types of plants in suitable growing media (hydroponic solutions^{185,187,192} and soils^{180–184,186,188,191,193–197}) containing known concentrations of nanoparticles of selected compositions and sizes. Edible plants like tomato, pumpkin, soybean, cucumber, thale cress, garden cress, white mustard, lettuce, kale, collard green, wheat, rice, soybean and radish have been selected for these experiments. Most of uptake studies have involved Ag nanoparticles,^{182,184,187,191,192,194} but also Ag₂S,¹⁸⁵ Cu,¹⁸⁴ CuO/Cu(OH)₂,^{189,190,195} ZnO,^{184,188} CeO₂,^{181,195,197} TiO₂,^{193,196} Au,^{180,192} Pd¹⁸⁶ and Pt.¹⁸³ By analysing different parts of the plants (roots, leaves, fruits), the uptake of nanoparticles through the roots and their translocation to other parts as intact particles or dissolved has been followed.^{183,196} In addition to the uptake of nanoparticles through the roots, the foliar exposure has been also assessed for Ag¹⁹⁴ and CuO^{189,190} nanoparticles. In the case of silver, the transformation of Ag nanoparticles after foliar exposure to ionic silver was reported.

In most cases, plant tissues were enzymatically digested by using macerozyme R-10, an enzyme mixture able to break down vegetal cell walls maintaining nanoparticles intact, as confirmed by several authors.^{182,190} To avoid dissolution of CuO/Cu(OH)₂ nanoparticles, Laughton *et al.*¹⁸⁹ proposed the use of methanol for extraction of the nanoparticles from lettuce leaves as an alternative to the enzymatic digestion.

The assessment of the nanoparticle ecotoxicity in aquatic and terrestrial environments is based on the use of model organisms. In this context, the bioaccumulation of Ag^{198–200} and Au^{198,201} nanoparticles in spiked sediments and soils has been

studied in the earthworms *Lumbriculus variegatus*,^{198,199} *Lumbriculus rubellus*²⁰⁰ and *Caenorhabditis elegans*.²⁰¹ Homogenates of the whole organisms were submitted to enzymatic²⁰⁰ or alkaline^{198,201} digestions, as well as to water extraction¹⁹⁹ prior to SP-ICP-MS analysis.

In relation to ecotoxicity studies in aquatic environments, the uptake of Ag^{198,202} and Au¹⁹⁸ nanoparticles by *Daphnia magna* was studied by analysing the hemolymph of the daphnids,²⁰² as well as whole organisms after alkaline digestion with TMAH.¹⁹⁸ In the case of mussels, Gallochio *et al.*²⁰³ suggested the *in vivo* formation of TiO₂ nanoparticles after their exposure to both ionic and particulate titanium. Zebra fish^{204,205} and trout⁵⁴ have also been used as target species for ecotoxicological studies with Ag, Au, TiO₂ and CeO₂ nanoparticles. The bioaccumulation of these nanoparticles was assessed by analysing different organs of the fishes (liver, intestine, gills, brain) by SP-ICP-MS after their digestion with TMAH or proteinase K.

Rats has been used extensively as model mammals for the toxicity assessment of nanomaterials. Different nanoparticles have been administered in a number of ways (oral gavage,^{207,213} intravenous injection,²⁰⁶ intratracheal instillation,²¹⁰ nose inhalation²¹² or intraperitoneal injection²⁰⁸) and their bioaccumulation and distribution in tissues were investigated by SP-ICP-MS. van der Zande *et al.*²¹³ reported the detection of silver nanoparticles in all the tissues studied after oral gavage, although the target organs were liver and spleen. Usually, samples were subjected to digestion with TMAH or proteinase K prior to SP-ICP-MS. Gallochio *et al.*²¹⁴ evaluated the oral administration of PVP-stabilized 20 nm Ag nanoparticles to chickens, detecting 16 nm nanoparticles in liver, but only ionic silver in egg yolks.

***Ex vivo* studies.** Experiments involving human tissues are scarce, nonetheless Vidmar *et al.*²¹⁵ conducted an *ex vivo* study involving human placentas obtained from pregnancies after caesarean section. The SP-ICP-MS analysis of the perfusion experiment confirmed the translocation and accumulation of Ag nanoparticles, although it could not be confirmed if the Ag-containing particles detected in the foetal circulation were translocated pristine Ag nanoparticles or Ag-bearing particles formed from dissolved silver that crossed the placental barrier.

Scenario 3.1: analysis of foods

A number of inorganic substances are approved as food additives by different regulations. Whereas metallic aluminium (E173), silver (E174) and gold (E175) are used to colour the external coating of confectionery, TiO₂ (E171) is added to provide a whitening effect, and SiO₂ (E551) as anticaking agent. All these additives have been re-evaluated recently by the European Food Safety Authority in relation to their safety, recommending that information about particle size and percentage (in number) of particles in the nanoscale should be included in their specifications when present in powder forms. Thus, as it has been seen in scenario 1 with E171 and E174 additives, regulatory requirements are the main driving factors for monitoring these elements by SP-ICP-MS, along with studying their occurrence as nanoparticles in foods. Table 6

Table 7 Scenario 3.2: analysis of environmental samples

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Soils, sediments and sludges									
Soil	Fe-	Water extraction + centrifugation	3 ms	Q	NH ₃	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS NTA DLS TEM AF4-UV-ICP-MS	225
Mine tailings	FeAsO ₄ , 2H ₂ O (scorodite)	Water extraction + centrifugation	5 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution NP mass distribution	ICP-MS EXAFS XAS TEM-EDS	226
Lake sediment	Ag-	Water extraction + centrifugation + filtration	50 μs	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE) Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	227
Road runoff sediment	Cu- Zn- Zr- Cd- Ce- Pt- Pb-	Surfactant extraction + centrifugation	5 ms	Q	H ₂ + He	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean mass NP size distribution NP mass distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	229
Sewage sludge	Ti-	Digestion (HNO ₃ + H ₂ O ₂) + filtration	3–10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	230
	Ti- Fe- Zn-	Extraction (acetic acid) and centrifugation	100 μs	Q	n.r.	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS FESEM-EDS TEM-EDS LDA	231
	Ti-	Extraction (sodium pyrophosphate) + centrifugation	—	TOF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mass distribution NP number concentration	ICP-MS TEM	232

Table 7 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Waters	Ti-	Filtration	50 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	56
			50 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration DE mass concentration	SEM-EDS FESEM	233
	Ti-	—	10 ms	Q	No	Quantitative (NP)	NP number concentration	ICP-MS ICP-OES SEM-EDS	234
	Ti-	Centrifugation	4 ms	Q	NH ₃ + He (MS/MS) No	Characterisation (NP)	NP size distribution	TEM	235
Ti-	—	3 ms	TOF	No	Quantitative (NP)	NP number concentration	—	77	
		50 μ s	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	—	77	
Ti-	—	3 ms	Q	No	Quantitative (NP)	NP number concentration	ICP-MS ICP-OES	236	
Ti-	Filtration	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	CPE/TEM-EDS	237	
Ti-	Filtration	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS ICP-AES TEM-EDS HPLC-UV ICP-MS	238	
Ag-Ti-	—	50 μ s	Q	No	Characterisation Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS ICP-AES TEM-EDS HPLC-UV ICP-MS	228	

Table 7 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
	Ag	Filtration	50 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration DE mass concentration	—	239
	Ag	Filtration	1 ms	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS ICP-AES IC	240
	Ag	Cloud point extraction	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS ETAAS	241
	Ag-Ti-Ce	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	—	38
	Ag-Ti-Au	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	FESEM-EDS	242
	Ce-Zr	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	—	243
	Ti-Ce	Filtration	1 ms	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-MS ICP-AES FESEM-EDS IC	244

Table 7 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
River water Rainwater	Ce- La-	—	50 μ s	DF TOF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	—	245
	Zn-	Ion exchange (on line)	50 μ s	DF	No	Quantitative (DE) Characterisation (NP)	NP mean size NP mass concentration NP number concentration DE mass concentration	TEM-EDS	55
Seawater	Ag- Ti- Cu- Zn-	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS	246
Sea water Fresh water	Ag- Ti- Ce-	Filtration	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	—	247
Wastewater	Ag-	Filtration	5 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	ICP-MS ICP-OES	248
	Ag-	Settling	20 ms	Q	No	Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mass concentration DE mass concentration	—	249
	Ag-	Filtration	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	—	250
	Ag- Ti- Ce-	Filtration	100 μ s	DF	No	Quantitative (NP)	NP number concentration	—	251
Wastewater River water	Zn-	Cation exchange separation	0.5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	—	252

Table 7 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Wastewater River water	Zn-	Settling and filtration	100 μ s 3 ms	Q TOF	No H ₂ + He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-OES	253
Wastewater River water Lake water	Ag-	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	CPE + ETAAS	254
Tap water	Ag- Ti- Pb- Sn- Cu- Fe-	—	10 ms	Q	n.r.	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	TEM-EDS	255
Various types of waters	Ag-	Cloud point extraction	100 μ s 0.5 ms	Q Q	No No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ETAAS	256
Throughfall water	Cu-	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	ICP-MS DLS AF4-MALS-ICP-MS	258
Acid mine drainage	Fe- Cu-	—	100 μ s	Q	NH ₃	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-OES STEM-EDS IC	259
Landfill leachates	Ti-	Filtration + surfactant stabilization (0.1% NovaChem 100)	3 ms	Q	NH ₃	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-OES SEM-EDS STEM-EDS DLS	260
Miscellaneous Cigarette smoke	As-	Electrostatic trapping	100 μ s	Q	No	Qualitative (NP)		ICP-MS HPLC-ICP-MS	261

Table 7 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Gas condensate	Hg-	Dilution with THF	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS STEM-EDS AF4-UV-MALS-ICP-MS	262

^a M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M. n.r.: not reported.

summarises the applications of SP-ICP-MS in relation with food analysis.

TiO₂ has been studied in different confectionery products, such as candies,^{79,216,219,220,223} chewing gum,^{216,217,223} pastry products²¹⁹ or cakes,²¹⁶ but also in drinks²²³ and surimi sticks.²²⁴ These samples were typically subjected to water extraction, followed by centrifugation or filtration,^{79,217,219,220} although Peters *et al.*²¹⁶ proposed the digestion with hydrogen peroxide to release the particles from the coating of the products. For the analysis of surimi sticks, samples underwent enzymatic digestion with pancreatin and lipase.²²⁴ The occurrence of particulate and dissolved aluminium in noodles was studied by Loeschner *et al.*,²²² after enzymatic digestion with α-amylase of the food products. Metallic silver, aluminium and gold are available as decorating powders or found as coatings of confectionery products.^{43,44,218} In these cases, samples had to be dispersed or extracted with water, or adding albumin as stabilising agent.⁴³ A different issue was addressed by Kollander *et al.*,²²¹ who studied the presence of Pb nanoparticles from ammunition in meat of hunted wild animals. Samples from the shot areas were digested with proteinase K and analysed by SP-ICP-MS, detecting Pb nanoparticles.

Although some analysis only focused on detecting the presence of nanoparticles in the samples,^{44,219} most of them covered their size characterization and the determination of number and mass concentrations as well. Moreover, most works included the determination of the total content of the elements under study in their analysis schemes, as well as considering the use of electron microscopy techniques^{43,218–220,224} or AF4 separations^{79,216,223} to verify or complement the results obtained by SP-ICP-MS.

Scenario 3.2: analysis of environmental samples

The widespread use of engineered nanomaterials in consumer products has increased their potential risk of environmental contamination, and consequently, the need and demand of analysis of environmental samples (waters, soils, sediments, sludges...) to provide reliable field information about their actual occurrence. On the other hand, SP-ICP-MS is also a suitable technique for monitoring naturally occurring or incidental nanomaterials.³² In fact, an still unresolved challenge in this scenario is the discrimination between engineered and natural occurring nanomaterials, which will be discussed below.

Table 7 summarizes different environmental samples analysed by SP-ICP-MS. Most cases refer only to the detection of nanoparticles containing the monitored element because the chemical composition of the particles was not available. Thus, the size information reported was based on assuming a specific composition (*e.g.*, metallic Ag, TiO₂) and a spherical shape. When the authors did not confirm the composition of the nanoparticles by an alternative technique, nanoparticles in Table 7 are referred as nanoparticles containing a specific element (*e.g.*, Ag-, Ti-, Ce- instead of Ag, TiO₂, CeO₂).

In most studies, total element concentrations were determined by ICP-MS or other atomic spectrometry techniques (ICP-OES, AAS) to obtain complementary information of the

samples. The use of complementary techniques, like TEM/FESEM or EXAF/XAS, for confirming the presence of nanoparticles or aggregates and obtaining information about morphology, size and composition of the particles was limited to samples containing particles at high enough concentrations.^{55,56,225,226,231–234,237,238,242,244,255,259}

Soils, wastes, sediments and sludges. Solid environmental samples analysed by SP-ICP-MS include soils,²²⁵ mine wastes,²²⁶ sediments^{227–229} and sludges from wastewater treatment plants.^{230–232} In the latter case, these analyses were complemented by the analysis of the influent and the treated effluent of the plants,^{230,231} or the analysis of the sediments of lake where discharges were carried out.²²⁹ The nanoparticles of interest were diverse, comprising particles containing elements such as Ag,^{227,228} As,²²⁶ Ti,^{228,230–232} Fe,^{225,231} Zn,^{229,231} Cu,²²⁹ Pb,²²⁹ Pt,²²⁹ Cd,²²⁹ Ce,²²⁹ or Zr.²²⁹ Sample preparation involved the extraction of the particulate matter with ultrapure water,^{225–227} the addition of surfactants²²⁹ or other reagents (sodium pyrophosphate,²³² acetic acid²³¹ or TMAH²²⁸); in the case of particles containing Ti, stronger procedures based on microwave acid digestion have also been applied.²³⁰ These treatments were followed by a separation step consisting of centrifugation, filtration, or both sequentially, prior to the analysis of the corresponding supernatant or filtrate.

In relation to the information reported, only Gomez-Gonzalez *et al.*²²⁶ determined by EXAFS and XAS the nature of the As-containing particles detected by SP-ICP-MS in mine tailings (FeAsO₄ · 2H₂O, scorodite), providing real size information confirmed by TEM. Due to the unknown nature of the particles detected, Baur *et al.*²²⁹ reported mean mass per particle and mass per particle distributions instead of information as equivalent size, which was the characterisation information typically reported, along with particle mass and number concentrations, as well as dissolved element concentrations.

Waters. Different types of waters have been analysed by SP-ICP-MS, including fresh waters from lakes, rivers and dams, as well as rain, sea, tap, pool and waste waters. The reasons for carrying out these analyses are diverse. The monitoring of titanium in river, lake and swimming pool waters is associated to the release of TiO₂ nanoparticles from sunscreens.^{234–238} Silver has been monitored in different types of waters, although the most relevant studies are related to the removal of silver containing particles in wastewater treatment plants,^{248–251,254} which has been also the case for Ti-,²⁵¹ Zn-^{252,253} and Ce-containing particles.²⁵¹ In the case of cerium, CeO₂ nanoparticles can be released into the air by diesel emissions being detected in rain water²⁴⁵ and other natural waters.^{38,243–245,247,251} Tap waters have been analysed in relation to the release of incidental nanoparticles containing different metals from copper pipes.^{255,256} Throughfall water from the wash-off of vine leaves treated with Cu-based fungicides has also been analysed by SP-ICP-MS in combination with other techniques to study the mobilization of Cu-containing particles.²⁵⁸ The occurrence of Zn-,²⁴⁶ Ag-,^{246,247} Ti-,^{246,247} Cu-²⁴⁶ and Ce-²⁴⁷ containing particles⁴⁵ has also been monitored in seawaters. SP-ICP-MS was used to study acid mine drainage by monitoring Fe- and Cu-containing particles and the effects of water chemistry,²⁵⁹ as well as the

release of titanium from construction and demolition landfills by analysing their leachates.²⁶⁰

With respect to the preparation of water samples, the simplest procedures only involved the dilution of the sample, although settling, centrifugation or filtration were also applied when suspended matter was present.

In relation to the information reported, a reduced number of works provided qualitative information,^{236,248,258,274} relying on time scans (Fig. 2a) to prove the presence of particles, whereas most of articles provided quantitative information, including mean/median particle sizes, particle size distributions and particle mass and number concentrations, despite that partial size distributions were obtained in some cases.^{226,235,241,248,259} In this regard, although Rand and Ranville²⁵⁹ have demonstrated the utility of SP-ICP-MS for detecting incidental nanoparticles in natural systems, they also recommended caution in the data treatment and their interpretation.

In an attempt to discriminate between anthropogenic engineered nanoparticles from natural ones, the measurement of element ratios has been proposed. This strategy assumes that engineered nanoparticles are high purity substances, containing a single major element, while natural nanoparticles have heterogeneous multielement compositions. The Ce/La ratio has been reported for identification of CeO₂ nanoparticles,^{244,245,247} whereas for TiO₂ nanoparticles, the Ti/Al and Ti/V ratios have been considered.^{232,234–236,238,244,247} Whereas SP-ICP-MS with quadrupole instruments is limited to the measurement of two isotopes in an individual particle, TOF instruments are able to record the whole mass spectrum from each particle. In this respect, a promising approach for discrimination of anthropogenic and natural particles was proposed by Praetorius *et al.*²⁷⁶ based on the combination of single particle multielement analysis by SP-ICP-TOF-MS and machine learning data treatment.

Miscellaneous. The analysis of gaseous systems by SP-ICP-MS has been limited to condensates from cigarette smoke to study the presence of arsenic containing particles.²⁶¹ Condensates from cigarette smoke were accumulated in an electrostatic trapping device followed by washing with methanol. Whereas different inorganic and organoarsenic dissolved species were determined by HPLC-ICP-MS, no As containing particles were detected by SP-ICP-MS. Gas condensates from petroleum hydrocarbon samples were analysed by a number of techniques, including SP-ICP-MS, confirming the presence of Hg-containing nanoparticles by direct analysis of the samples diluted in THF.²⁶²

Scenario 3.3: analysis of biological samples

The potential exposure of living organisms, including humans, to engineered nanoparticles has led to study their occurrence in such biological systems. Other applications include the detection of wear metal particles from prosthesis in human fluids and tissues, as well as nanoparticles biosynthesised by microorganisms. Table 8 summarizes the applications under this scenario involving biological samples originally containing nanoparticles. As in scenario 3.2, in most works total element concentrations were determined by ICP-MS and also electron

Table 8 Scenario 3.3: analysis of biological samples

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Microorganisms Yeast	Se	Enzymatic digestion (protease)	5 ms 100 μs	Q	H ₂	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS SEC-ICP-MS TEM-EDS	263
Aquatic organisms Molluscs	Ag	Enzymatic digestion (pancreatin/lipase)	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS SEM	264
	Ti	Enzymatic digestion (pancreatin/lipase)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS DLS	265
	Ag Ti Cu Zn	Enzymatic digestion (pancreatin/lipase)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	246
	20 elements	Alkaline digestion (TMAH) + filtration	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS	266
Various (plankton, crustaceans, molluscs, fish)	Ag Ti	Alkaline digestion (TMAH)	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	228
Human fluids and tissues Blood	Ag	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean hydrodynamic diameter NP mean mass per particle NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	HDC-SP-ICP-MS μXRF μXANES	267

Table 8 (Contd.)

Sample	Nanoparticle composition ^a	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Urine	Ag-Ti	—	100 μ s	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS	268
Hip fluid	Co-Cr	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS AF4-UV-MALS AF4-ICP-MS	269
Periprosthetic tissue	Ti-Ta-Co-Cr-Mo-Al-V	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS SEM	270
Liver Spleen Kidney Intestine	TiO ₂ SiO ₂	Enzymatic digestion (proteinase K)	2 ms 100 μ s	DF Q	No H ₂	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS SEM-EDS	271
Liver Spleen	TiO ₂	Enzymatic digestion (proteinase K)	2 ms	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS SEM-EDS	272
Exhaled breath condensate	SiO ₂	—	3 ms	Q	He	Qualitative (NP)	—	TEM-EDS	273
Miscellaneous Gunshot residue wash from shooter's hand	Sb-Ba-Pb	Washing with water Swabbing + water extraction	30 μ s	Q	No	Qualitative (NP)	—	—	274

^a M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M.

microscopy techniques were applied to obtain complementary information.

Microorganisms. Nanoparticles synthesized by microorganisms from dissolved precursors can be analysed by SP-ICP-MS in a similar way than those internalized from culture media once the microorganisms have been selectively digested, as it has been seen in scenario 2.2. This was the case of selenium-rich yeast,²⁶³ where biogenic-selenium nanoparticles were detected by SP-ICP-MS and confirmed by TEM-EDS, revealing the significance of nanoparticles in the speciation of metals and metalloids in biological systems.

Aquatic organisms. The analysis of aquatic organisms has included plankton,²²⁸ crustaceans,²²⁸ molluscs^{228,246,264–266} and fishes.²²⁸ In all cases, prior to SP-ICP-MS analysis, nanoparticles were extracted by digestion of the biological matrices. Enzymatic digestions included the use of pancreatin/lipase,^{246,264,265} whereas alkaline digestions were based on the use of TMAH.^{228,266} The most studied elements have been Ti^{228,246,265} and Ag,^{228,246,264} although nanoparticles containing Cu,²⁴⁶ Zn²⁴⁶ or different rare earth elements²⁶⁶ have been also considered. In relation to the information reported, all the articles provided quantitative information of particle mass and number concentration, particle size distribution and mean size. Reported size detection limits and size distributions allowed to confirm that nanoparticle distribution were incomplete in some cases.^{246,264,266} Moreover, and although SEM and DLS were used in some studies, these techniques did not provide conclusive information, hence the studies only confirmed the occurrence of particles containing the elements detected and not their specific nature.

Human body fluids and tissues. Although the monitoring of Ag-, Ti- and Si-bearing nanoparticles is supported by the potential exposure to Ag, TiO₂ and SiO₂ engineered nanoparticles,^{268,271,272} human fluids and tissues have also been analysed in relation with the release of incidental nanoparticles containing different elements from metal prosthesis^{269,270} and their migration from wound dressings.²⁶⁷ Moreover, exhaled breath condensates were analysed to detect the presence of respirable silica particles in quarry workers.²⁷³ In this latter work, the combination of SP-ICP-MS and TEM-EDS allowed to confirm the presence of silica and silicate particles in the breath condensates. Post-mortem tissues (liver, spleen, kidney, intestine) from deceased persons were analysed after enzymatic digestion with proteinase K, providing detailed information about the SiO₂ and TiO₂ found in the tissues and confirmed by SEM-EDS.^{271,272} On the other hand, periprosthetic tissues and hip fluids from arthroplasty patients were also analysed by SP-ICP-MS, confirming the presence of particles containing Co, Cr, Ti, V, Al, Ta and Mo and the importance of *in vivo* exposure assessments for realistic appraisal of metal toxicity and associated risks in arthroplasty.^{269,270}

Urine²⁶⁸ and blood²⁶⁷ samples were analysed directly after dilution with 1% glycerol or ultrapure water, respectively. Whereas particles containing Ti and Ag were detected in urine, only dissolved Ag was detected in blood from burned patients treated with wound dressings containing Ag nanoparticles.

SP-ICP-MS has also been used with forensic purposes for the direct analysis of gunshot residues.²⁷⁴ Residues were sampled from the hands of shooters by washing with ultrapure water or swabbing (followed by water extraction from the swabs) to obtain the nanoparticle suspensions, which were analysed directly for screening the presence of Sb-, Ba- and Pb-bearing particles.

Instrumentation and data acquisition

As explained above, SP-ICP-MS was originally developed in commercial quadrupole mass spectrometers with data acquisition frequencies in the range of 1–100 Hz, by using dwell times in the millisecond range. The implementation of single particle detection in quadrupole instruments by manufacturers implied that higher acquisition frequencies became feasible by working at dwell times in the microsecond range, removing the settling time of the quadrupole between readings and improving the capability for transmission and storage of data. Although this new generation of instruments was commercially available since 2014, Tables 2–8 show that both ranges of dwell times are being currently used, mostly depending on the availability of instruments, with 45% and 55% of applications using microsecond and millisecond dwell times, respectively. In any case, the duration of the particle events limits the selection of dwell times. Dwell times longer than twice the duration of the events are recommended¹⁷ when working at millisecond dwell times to record the particle events as pulses, whereas for microseconds, they should be shorter than half the duration of the events. Working at dwell times longer than 10 ms increases the number of events corresponding to two or more nanoparticles, whereas dwell times around the duration of a single nanoparticle event (300 μs to 1 ms) makes difficult to confirm whether the recorded events correspond to one or more nanoparticles. In any case, an adequate dilution of the sample must be made, if needed, in accordance with the dwell time used, because it also affects to the number concentration linear range.¹³ In spite of these constraints, dwell times in the range of 0.5–2 ms have been used in several works, compromising the quality of their results.

The feasibility of using microsecond dwell times with double focusing ICP-MS also depends on the instrument, with last generation instruments capable of working down to 10 μs.¹¹ In a similar way, a new design of TOF mass spectrometer with a temporal resolution of 33 μs became commercially available recently.⁹ In either case, their less widespread use is reflected in the low number of applications found in Tables 2–8. The main feature of TOF instruments lies in their simultaneous multi-element capability, recording nearly the whole mass spectrum within each reading. Although applications of SP-TOF-ICP-MS are still scarce, the technique offers unique performance for multi-element and isotope ratio analysis in individual nanoparticles, and for discerning between naturally occurring and engineered nanoparticles.³² Although multielement SP-ICP-MS with quadrupole instruments has also been reported,²⁷⁷ it is limited to monitoring up to two isotopes, and is not commercially available yet.

Apart from resolving spectral interferences, double focusing instruments provide better transmission efficiency and hence improved sensitivity with respect to quadrupole and TOF instruments, resulting in the lowest available size LODs.⁷⁷ The lower resolution of quadrupole ICP-MS is compensated by using single quadrupole instruments with collision/reaction cells (see Tables 2–8), as well as multipole instruments in MS/MS mode,^{145,196,217,235} to reduce polyatomic interferences and improve size limits of detection for nanoparticles containing Ti, Fe, Si or Se. However, the collisions/interactions of the ion cloud generated by each particle with the collision/reaction gases increase the duration of the particle events, affecting the performance of the measurements.²⁷⁸ In fact, the use of short dwell times instead of collision/reaction cell technologies has been proposed as an alternative for improving size LODs for silica particles.²⁷⁹

Sample preparation

When ICP-MS is used in single particle mode, the preservation of most of the properties of the nanoparticles is mandatory, hence sample treatments should be reduced to the minimum required. Apart from the extraction of the nanoparticles from solid samples, sample treatments prior to SP-ICP-MS measurements have been limited to clean-up procedures for removal of large particles or fats, the separation of nanoparticles from dissolved species and the preconcentration of the formers.

As it has been shown in the different scenarios discussed above, extraction of nanoparticles from solid samples can involve just the use of water or aqueous solutions containing surfactants, although 50% methanol has been proposed to avoid the dissolution of copper oxide nanoparticles.¹⁸⁹ However, for more refractory nanoparticles, like TiO₂, SiO₂ or CeO₂, more aggressive treatments based on the use of strong acids and/or hydrogen peroxide have been applied.^{83,205,216,230} Nanoparticles from soils and sediments have been often extracted with tetrasodium pyrophosphate,^{158,159,163} commonly used to disperse soil heteroaggregates. On the other hand, biological samples require the degradation of the organic matrix by using alkaline reagents, like TMAH, or enzymes. In this regard, enzymatic digestions of plant samples have relied exclusively on the use of macerozyme R-10, a mixture of cellulase, hemicellulase and pectinase, whereas for animal samples, proteinase K has been most often selected, although also mixtures of pancreatin/lipase²²⁴ and amylase²²² have been used. In this regard, there is not a general agreement about the best digestion approach. For example, Loeschner *et al.*²⁰⁶ reported that both TMAH and proteinase K provided similar size distributions for gold nanoparticles in animal tissues, although mass recoveries with proteinase K were not quantitative. In contrast, it was shown that enzymatic treatment with proteinase K was more suitable for silver nanoparticles in human placental tissue, as TMAH treatment appeared to change the nanoparticles, most likely by silver ion precipitation and/or nanoparticle aggregation.²⁸⁰

Once nanoparticles have been extracted from a solid sample, it is usual to separate the liquid phase containing the nanoparticles from the solid residue to remove large particles that

may clog the nebulisers. This is also the case in release and fate studies involving solid materials as well as in the analysis of waters. Both filtration and centrifugation have been used for this purpose, although several authors have reported significant losses of nanoparticles in membrane filters.^{126,159,163,245} Thus, filtration should be discouraged unless quantitative recoveries have been proved, therefore settling or centrifugation should be used on a routine basis if removal of large particles is needed. Other clean-up procedures involved the defatting of cosmetics by using hexane.^{79,82,84}

The presence of dissolved species of the measured element has a negative effect on the size LODs, hence methods including their removal by ion exchange^{55,252} or chelating resins¹⁴³ prior to SP-ICP-MS measurements have been reported.

Nanoparticle concentration is not a serious limiting factor for SP-ICP-MS in most scenarios due to its low limits of detection down to 100 particles per millilitre. When lower LODs are required, cloud point extraction has proved to be a valid approach for the isolation and concentration of nanoparticles, while preserving their core size and morphology.^{104,132,140,241,256,281} Cloud point extraction involves the addition of a non-ionic surfactant (*e.g.*, Triton X114) at concentrations over the critical micellar concentration, the incorporation of the nanoparticles in the micellar aggregates and the separation of the surfactant phase from the aqueous one by mild heating (*ca.* 40 °C). Besides the addition of a complexing agent allows the selective extraction of the nanoparticles in the presence of the corresponding cations.²⁸² Finally, a further dilution of the surfactant phase in a mixture of ethanol and water is required before SP-ICP-MS measurements.

As it has been discussed in the previous section, nanoparticle concentration of the measured suspensions should be low enough to be within the linear range, below 10⁷–10⁸ L⁻¹ depending on the instrumental and acquisition conditions,¹³ and hence the adequate dilution of the suspensions must be considered in each case.

Separation techniques coupled to SP-ICP-MS

Separation techniques like asymmetrical flow and centrifugal field flow fractionation, capillary electrophoresis, differential mobility analysis, hydrodynamic chromatography, as well as other chromatography modes (size exclusion, reverse phase, ion exchange) have been coupled to ICP-MS. In this situation, the ICP-MS instrument acts as an element specific detector of inorganic nanoparticles that are separated according to their size, density, surface properties or charge.²⁸³ However, the coupling of an ICP-MS working in single particle mode allows to obtain additional information related to the homo/hetero-aggregation/agglomeration of primary inorganic nanoparticles as well as the element content in complex nanoparticles or nanocomposites, in addition to the information obtained directly through the separation itself.

Although methods based on the online coupling of SP-ICP-MS to HDC,²⁸⁴ AF4,²⁸⁵ capillary electrophoresis²⁸⁶ and DMA²⁸⁷

have been reported since 2012, most of them must be considered as proofs-of-concept because their applications to complex scenarios are still scarce or absent, as in the case of capillary electrophoresis and DMA.

The online coupling of HDC to SP-ICP-MS was first described by Pergantis *et al.*²⁸⁴ for the simultaneous determination of nanoparticle size, number concentration and metal content, by using pristine Au nanoparticles. Subsequently, the capability of HDC-SP-ICP-MS to identify and characterize nanoparticle homoagglomerates in complex media by determining the mass and the hydrodynamic diameter of the separated particles was also demonstrated.²⁸⁸

Roman *et al.*²⁶⁷ developed an algorithm to deconvolute the SP-ICP-MS signals of dissolved element and nanoparticles separated by HDC, providing information about the concentration of dissolved silver and the distribution of Ag nanoparticles in terms of hydrodynamic diameter, mass-derived diameter, number and mass concentration. The approach was suitable to study quantitatively the dynamics and kinetics of silver nanoparticles in complex biological fluids, including processes such as agglomeration, dissolution and formation of protein coronas. The method was applied to investigate the presence of Ag nanoparticles in the blood of burn patients treated with silver dressings, although only dissolved species were detected.

Under less complex conditions, HDC-SP-ICP-MS has been successfully applied to simultaneously determine both the hydrodynamic radius and the content of Au nanoparticles in liposomes used as carriers of Au nanoparticles.²⁸⁹ It was possible to distinguish between subpopulations of liposomes with different hydrodynamic diameters and various nanoparticle loads. The application of HDC-SP-ICP-MS to the analysis of river and wastewaters under optimized conditions did not allow to detect silver nanoparticles in the samples, although Cu-containing nanoparticles could be identified.²⁷⁵

The feasibility of using AF4 online coupled with SP-ICP-MS to detect and quantify inorganic nanoparticles at environmentally relevant concentrations was firstly investigated by Huynh *et al.*²⁸⁵ by using Ag and Ag-SiO₂ core shell nanoparticles. Later on, Hetzer *et al.*¹⁰⁰ used AF4-SP-ICP-MS to evaluate the migration behaviour of Ag nanoparticles from food packaging films with varying nanosilver content into three different food simulants (water, 3% acetic acid and 10% ethanol), verifying that both silver nanoparticles and silver nanoparticles/polymer heteroaggregates were released in water.

An alternative to online couplings is the analysis of the fractions collected from the effluents of HDC or AF4 by SP-ICP-MS. This was the approach followed by Proulx *et al.*,¹³⁷ who demonstrated the feasibility of using HDC offline coupled to SP-ICP-MS for detecting of 20 nm Ag nanoparticles spiked in a river water sample, as well as by Woo-Chun *et al.*²⁹⁰ who analysed tap, river and waste waters spiked with 30, 60 and 100 nm silver nanoparticles. However, the nanoparticle concentrations used in both studies, in the range of mg L⁻¹, were well above those expected in the environment. In a simpler scenario, the content of metal nanoparticles in composite particles consisting of Au nanoparticles embedded in polymeric particles was determined by using both asymmetrical flow and centrifugal field-flow

fractionation.⁶⁶ Nanoplastics were separated according to their hydrodynamic diameter and buoyant mass, respectively, and the collected fractions analysed by SP-ICP-MS, confirming the presence of between 1 and more than 8 Au nanoparticles per plastic particle. Under more complex conditions, the SP-ICP-MS analysis of fractions collected from AF4 separations allowed to obtain complementary information about Ag nanoparticles in chicken meat digestates²⁹¹ and Al₂O₃ and TiO₂ nanoparticles in toothpaste.⁸³

Techniques complementing SP-ICP-MS: analytical platforms

As it has been highlighted through the previous sections, SP-ICP-MS has opened the way for analysing a variety of samples in different scenarios, allowing the detection of nanoparticles, the determination of their concentrations and their characterization to a certain level. However, SP-ICP-MS shows intrinsic limitations, mainly with respect to morphological characterization (size, shape, aggregation/agglomeration) and composition, therefore SP-ICP-MS is usually complemented by using additional techniques (see column “Complementary techniques” in Tables 2–8), leading to advanced analytical platforms which are required for solving complex analytical problems. In the end, the size information provided by SP-ICP-MS has to be estimated from the content of the element directly measured in the particles together with their shape and composition, which must be determined by other complementary techniques; otherwise, these morphological parameters must be assumed and only an equivalent size could be reported. The first purpose of these complementary techniques is to provide additional information on nanoparticle size and shape, to supplement or validate the SP-ICP-MS information. In this way, dynamic light scattering, nanoparticle tracking analysis, and particularly electron microscopy are the most common techniques.

Due to its high spatial resolution, below 1 nm, TEM is one of the most powerful techniques to visualize nanoparticles, and then to obtain information not only about their size, but also shape and aggregation state. This technique is essential in the characterization of pristine nanoparticles (scenario 0), to verify the success of the synthesis of new nanoparticles and to confirm their properties. When more complex analytical scenarios are considered, SEM often substitutes TEM. Current SEM instruments, working with field-emission electron sources (FESEM), offer improved spatial resolutions, reaching competitive ranges for the determination of nanoparticle size and shape in complex samples with easier sample preparation than TEM. Moreover, FESEM provides images of larger sample areas, obtaining more representative size distributions. In any case, electron microscopy plays a significant role to evaluate shapes and possible aggregations of nanoparticles in scenarios 1 and 2, and even in scenario 3 if concentrations of nanoparticles are high enough.

On the other hand, unlike light scattering techniques, electron microscopy enables the determination of the chemical composition of the nanoparticles. Most SEM and TEM instruments include several detectors and are usually coupled to EDS,

obtaining elemental composition of the nanoparticles for their identification, allowing the verification of their nature, but also studying their reactivity, stability and transformations. Although EDS is frequently coupled to TEM or SEM in any analytical scenario, other techniques like electron diffraction and electron energy-loss spectroscopy have also been considered to obtain structural information. The use of transmission electron microscopes working in scanning mode (STEM),^{83,90,100,126,148,193,259,260,262} with high-angle annular dark-field detection,^{46,134,218} allows to obtain Z-contrast images that can also add information about the chemical composition of the nanoparticles.

Even though XAS techniques do not provide information on nanoparticle morphology, they have also been considered in some works^{166,182,185,187,226} because of the interest for improving the information about the composition of the nanoparticles in complex samples. Whereas XANES has been used to obtain information on the geometry and oxidation state of the elements,^{106,267} EXAFS has done it on element coordination.²²⁶ However, these techniques have been applied occasionally because of their limitations in sensitivity, data interpretation and availability of synchrotron radiation facilities. XRD is also a technique to be considered to obtain structural information of nanoparticles, although limited to pristine nanoparticles (scenario 0) or scenarios in which nanoparticle concentration is not a limitation (scenarios 1 and 2). Finally, the determination of the total element content in the samples under study is included in most works, to evaluate mass balances and recoveries, by using atomic spectrometry techniques (ICP-MS, ICP-OES, AAS) after a suitable digestion step.

SP-ICP-MS based immunoassay and hybridization methods

ICP-MS-based immunoassay methods for determination of biomolecules has gained increasing interest in recent years.²⁹² Immunoassays are based on the use of an antibody (or antigen) as a biorecognition agent of the analyte of interest, which acts as antigen (or antibody), respectively. Immunoassays are very widely used in clinical diagnostics, environmental and food safety, covering a range of analytes from small molecules to macromolecules. The high selectivity and affinity of an antibody against its antigen allows their specific binding in the presence of complex matrices (*e.g.*, whole blood, serum, urine, foods). Most immunoassays require the labelling of the antibody (or the antigen) with easily detectable markers (*e.g.*, radioisotopes, enzymes, small molecule light absorbers, fluorophores, nanoparticles). ICP-MS immunoassays are based on the use of elemental tags of metal ions, nanoparticles or metal containing polymers. Although element-tagged immunoassays were firstly proposed in the 1970s,²⁹³ it was not until the advent of ICP-MS that this methodology started to be relevant, largely due to its higher sensitivity in comparison with other atomic spectrometry techniques and its multiplexing capability.^{294,295}

The use of metal nanoparticles as labels provides significant advantages, owing to their stability, biocompatibility, and easy

conjugation to antibodies/antigens without modifying their binding properties. Moreover, when used in combination with an ICP-MS operated in single particle detection mode a further improvement in sensitivity is achieved. Whereas ICP-MS immunoassays are based on the conventional quantification of the tagging element, reaching detection limits in the range of 50–5000 pg mL⁻¹, these detection limits can be decreased to 1–15 pg mL⁻¹ when SP-ICP-MS is used.²⁹² The improvement lies in the fact that the biomolecule concentration is related to the number concentration of nanoparticles determined by SP-ICP-MS and not to the total content of element measured by ICP-MS.

The first immunoassay based on SP-ICP-MS was reported in 2009. α -Fetoprotein was determined by a competitive immunoassay, using 45 nm Au nanoparticles as labels. A detection limit of 16 pg mL⁻¹ was achieved, lower than using other immunoassay strategies.²⁹⁶ Rabbit-anti-human immunoglobulin G was determined by a sandwich type immunoassay using 45 nm Au nanoparticles with detection limits of 100 pg mL⁻¹.²⁹⁷ A self-validated homogeneous immunoassay was also proposed for the carcinoembryonic antigen quantification by monitoring both frequency and intensity of the gold nanoparticles used as labels. The method provided accurate results in human serum samples with detection limits in the pM level.²⁹⁸ ZnSe quantum dots were used for tagging antibodies in a sandwich-type magnetic immunoassay for determination of carcinoembryonic antigen in human serum with a detection limit of 6 pg mL⁻¹ by monitoring ⁶⁴Zn.²⁹⁹ The determination of cytokeratin fragment antigen 21-1, carbohydrate antigen, and carcinoembryonic antigen was carried out by a simultaneous sandwich-type immunoassay using antibody-immobilized magnetic beads and Au, Ag and ZnSe nanoparticle labels, respectively.³⁰⁰ The method was successfully applied to detect the three biomarkers in human lung cancer serum samples.

Besides immunoassay, SP-ICP-MS has also been applied in DNA hybridization and RNA methods.^{301–304} A homogeneous DNA assay based on a target-induced hybridization chain reaction to achieve controlled spherical nucleic acid assembly has been reported. The strategy relies on the mediation of the hybridization chain reaction in the assembly of a nanogold core with oligonucleotide shell to generate controllable large Au nanoparticle aggregates and significant ¹⁹⁷Au counts as compared with the background of a simple dispersed Au nanoparticle. This homogeneous assay could determine DNA within the range of 5 fM to 10 pM.³⁰²

A rRNA detection platform was achieved by combining a sandwich type hybridization reaction with a single-molecule magnetic capture and SP-ICP-MS for the absolute and relative quantification of *E. coli* rRNA. This method was applied to the direct quantification of rRNA from dangerous human pathogens in milk samples with a detection limit of 10 fM.³⁰⁴

Table 9 summarises the SP-ICP-MS based immunoassay and hybridization methods developed up to date. Au nanoparticles have been more frequently used, although methods based on Ag and Pt nanoparticles have also been reported, as well as ZnS quantum dots. Quadrupole instruments have been used in all

Table 9 SP-ICP-MS-based immunoassay and hybridization methods for the quantification of biomolecules

Analyte	Sample	Assay type	Nanoparticle label	Dwell time	LOD	Ref.
α -Fetoprotein	Human serum	Competitive immunoassay	Au (45 nm)	10 ms	16 pg mL ⁻¹	296
Rabbit-anti-human IgG	Human serum	Sandwich immunoassay	Au (45 nm)	10 ms	100 pg mL ⁻¹	297
Carcinoembryonic antigen	Human serum	Homogeneous immunoassay	Au (30 nm)	50 μ s	210 pg mL ⁻¹ (1.2 pM)	298
Cytokeratin fragment antigen	Human serum	Sandwich magnetic immunoassay	ZnSe (2.6 nm)	100 μ s	6 pg mL ⁻¹	299
	Human serum	Sandwich magnetic immunoassay	Au (29 nm)	100 μ s	20 pg mL ⁻¹	300
Carcinoembryonic antigen			ZnSe (2.6 nm)		6 pg mL ⁻¹	
Carbohydrate antigen			Ag (14 nm)		0.25 mU mL ⁻¹	
DNA	—	Homogeneous DNA hybridization	Au (28 nm)	0.5 ms	1 pM	301
	Human serum	Homogeneous DNA hybridization chain reaction	Au (30 nm)	5 ms	3 fM	302
Human immunodeficiency virus	Human serum	Multiplexed heterogeneous sandwich DNA hybridization	Au (25 nm)	0.5 ms	<1 pM	303
Hepatitis B virus			Ag (25 nm)			
Hepatitis C virus			Pt (20 nm)			
<i>E. coli</i> RNA	Milk	Sandwich hybridization with magnetic particles	Au (30 nm)	—	10 fM	304

works, with dwell times in the range of milliseconds, but also at microseconds. In some cases, immunoassay and hybridization schemes use antibody-immobilised magnetic particles, that greatly improve the efficiency of the washing and separating steps of the captured antigens under a magnetic field.^{298,302}

Conclusions

The features of SP-ICP-MS for the detection, quantification and characterization of nanoparticles have led to the development of this technique and its increasing application in many different fields under analytical scenarios of varying complexity, which have been comprehensively covered in this review. However, its implementation in commercial instruments by most ICP-MS manufacturers can be considered the key to its success. Despite the rapid evolution of SP-ICP-MS in the last ten years, in 2020 the number of publications related to fundamental aspects of the technique and the development of methods was still 1 out of 3 with respect to the number of publications dedicated to specific analytical applications. For this reason, by following Horlick's approach,¹² although SP-ICP-MS is on the way of becoming a mature technique, its characterization stage cannot be considered finished yet. Moreover, its progress towards maturity is currently hampered by other issues like the availability of validated methods and the traceability of their results. Both issues are conditioned by the availability of reference materials, which are currently restricted to pristine nanoparticles of specific compositions, whereas matrix reference materials are still not available due long-term stability problems.¹⁹ This situation entails using nanoparticle suspensions supplied from a reduced number of manufacturers as standards for calibrations and quality control. Furthermore, since standards for only a small number of nanoparticle compositions are available, indirect calibrations based on the determination of the nebulisation efficiency and the use of

dissolved standards are applied routinely to obtain quantitative information. This approach requires that not only the element in dissolved and particulate forms behave in the ICP in the same way, but also the nebulisation for the standards and the samples. These two factors cannot be disregarded to obtain unbiased results, which is particularly challenging when dealing with complex matrices.

The analytical scenarios in which SP-ICP-MS is more frequently applied are those related to studies about fate and (eco)toxicity under controlled laboratory conditions involving the use of pristine nanoparticles (type 2 scenarios). The main reason is that both size and concentration of the nanoparticles added can be selected according to the experiment design and the detection capability, although there is an increasing trend to perform these studies at realistic concentrations. In any case, the most complex challenge for SP-ICP-MS is the analysis of samples originally containing nanoparticles, namely foods and environmental and biological samples (scenarios type 3), because of the complexity of the matrices and the low concentrations expected, but also nano-enhanced products (scenario 1). The main drawback with these samples is that the nature of the particles is unknown in many cases. Consequently, only masses of element per particle or equivalent sizes (assuming an expected composition and shape) can be reported, unless complementary techniques are used to obtain such information. An additional difficulty with this samples arises when part of the particle size distribution is missed due to the attainable size LODs. In such cases, nanoparticle concentrations will be underestimated and mean sizes overestimated. Hence, results should include these limitations, only reporting the occurrence of particles in the sample over a certain (equivalent) size and number concentration, considering SP-ICP-MS as a screening technique instead of a fully quantitative one. On the other hand, particles are not the only targets of SP-ICP-MS, its capability for the simultaneous quantification of dissolved elements has also

been exploited in many of the applications involving nanoparticles prone to oxidation or dissolution, like those made of Ag, CuO or ZnO.

Although SP-ICP-MS is mostly involved in methods for the analysis of samples containing nanoparticles, the technique is also suitable for being used in methods where nanoparticles are not analytes but analytical tools. This is the case of immunoassay and hybridization methods for the analysis of biomolecules, where nanoparticles are used as elemental labels conjugated to antibodies and oligonucleotides. By selecting the adequate nanoparticles, SP-ICP-MS can provide better limits of detection for these bioassays due to its high sensitivity in terms of number concentration. The applications of SP-ICP-MS in immuno- and hybridization assays are still scarce but show very promising results.

List of acronyms

AAS	Atomic absorption spectrometry
AES	Auger electron spectroscopy
AFM	Atomic force microscopy
AF4	Asymmetric flow field flow fractionation
ATR-FTIR	Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy
AUC	Analytical ultracentrifugation
BSA	Bovine serum albumin
CE	Capillary electrophoresis
CFFF	Centrifugal field flow fractionation
CLS	Centrifugal liquid sedimentation
CNT	Carbon nanotube
CPE	Cloud point extraction
DE	Dissolved element
DF	Double focussing
DGT	Diffusive gradient in thin film
DLS	Dynamic light scattering
DMA	Differential mobility analysis
EDM-HSI	Enhanced darkfield microscopy-hyperspectral imaging
EDS	Energy dispersive X-ray spectroscopy
ETAAS	Electrothermal atomic absorption spectrometry
EXAFS	Extended X-ray absorption fine structure
FAAS	Flame atomic absorption spectrometry
FESEM	Field-emission scanning electron microscopy
FIBSEM	Focused ion beam scanning electron microscopy
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
HAADF	High-angle annular dark-field
HDC	Hydrodynamic chromatography
HIM	Helium ion microscopy
HPLC	High performance liquid chromatography
HRTEM	High resolution transmission electron microscopy
IC	Ion chromatography
ICP-MS	Inductively coupled plasma-mass spectrometry
ICP-OES	Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry
ISE	Ion selective electrode potentiometry
LA	Laser ablation
LDA	Laser diffraction analysis

LOD	Limit of detection
MALS	Multangle light scattering
NOM	Natural organic matter
NP	Nanoparticle
NTA	Nanoparticle tracking analysis
Q	Quadrupole
RI	Refractive index
SAM	Scanning Auger mapping
SDS	Sodium dodecylsulphate
SEC	Size exclusion chromatography
SEM	Scanning electron microscopy
SIMS	Secondary-ion mass spectrometry
SMPS	Scanning mobility particle sizer
SP-ICP-MS	Single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry
STEM	Scanning transmission electron microscopy
TEM	Transmission electron microscopy
TMAH	Tetramethyl ammonium hydroxide
TOF	Time of flight
TXRF	Total reflection X-ray fluorescence
UV-Vis	Ultraviolet visible absorption
XANES	X-ray absorption near edge structure
XAS	X-ray absorption spectroscopy
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy
XRD	X-ray diffraction

Author contributions

Eduardo Bolea: writing – review & editing; Maria S. Jimenez: writing – original draft; Josefina Perez-Arantegui: writing – original draft; Juan C. Vidal: investigation, writing – original draft; Mariam Bakir: investigation, writing – original draft; Khaoula Ben-Jeddou: investigation, writing – original draft; Ana C. Gimenez-Ingalaturre: investigation, writing – original draft; David Ojeda: investigation, writing – original draft; Celia Trujillo: investigation, writing – original draft; Francisco Laborda: conceptualization, supervision, visualization, writing – review & editing.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Regional Development Fund, project RTI2018-096111-B-I00 (MICINN/FEDER). K. B.-J. thanks funding from the EU Horizon 2020 programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement no. 801586. A. C. G. thanks the Government of Aragón (DGA) for a predoctoral contract. C. T. thanks the University of Zaragoza for a predoctoral contract.

References

- 1 M. D. Montaña, J. W. Olesik, A. G. Barber, K. Challis and J. F. Ranville, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5053–5074.

- 2 C. Degueldre and P.-Y. Favarger, *Colloids Surf., A*, 2003, **217**, 137–142.
- 3 C. Degueldre and P.-Y. Favarger, *Talanta*, 2004, **62**, 1051–1054.
- 4 C. Degueldre, P.-Y. Favarger and C. Bitea, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **518**, 137–142.
- 5 C. Degueldre, P.-Y. Favarger, R. Rossé and S. Wold, *Talanta*, 2006, **68**, 623–628.
- 6 C. Degueldre, P. Favarger and S. Wold, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **555**, 263–268.
- 7 F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea and J. R. Castillo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1362–1371.
- 8 H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 9361–9369.
- 9 O. Borovinskaya, B. Hattendorf, M. Tanner, S. Gschwind and D. Günther, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 226–233.
- 10 A. Hineman and C. Stephan, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 1252–1257.
- 11 P. Shaw and A. Donard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 1234–1242.
- 12 G. Horlick, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1994, **9**, 593–597.
- 13 I. Abad-Álvaro, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J. R. Castillo and F. Laborda, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5089–5097.
- 14 V. Geertsen, E. Barruet, F. Gobeaux, J.-L. Lacour and O. Taché, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 9742–9750.
- 15 F. Laborda, E. Bolea and J. Jiménez-Lamana, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 2270–2278.
- 16 F. Laborda, E. Bolea and J. Jiménez-Lamana, *Trends Environ. Anal. Chem.*, 2016, **9**, 15–23.
- 17 F. Laborda, A. C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea and J. R. Castillo, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2020, **169**, 105883.
- 18 D. Mozhayeva and C. Engelhard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 1740–1783.
- 19 F. Laborda, A. C. Gimenez-Ingalaturre and E. Bolea, in *Analysis and Characterisation of Metal-Based Nanomaterials*, ed. R. Milacic, J. Scancar, J. Vidmar and H. Goenaga-Infante, Elsevier, 1st edn, 2021.
- 20 ISO/TC 229, *ISO/TS 80004-2:2015 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects*, 2015.
- 21 F. Laborda, C. Trujillo and R. Lobinski, *Talanta*, 2021, **221**, 121486.
- 22 A. Kéri, A. Sári, D. Ungor, D. Sebők, E. Csapó, Z. Kónya and G. Galbács, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 1139–1147.
- 23 N. Joo and H. B. Lim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2019, **40**, 1087–1092.
- 24 H.-A. Kim, B.-T. Lee, S.-Y. Na, K.-W. Kim, J. F. Ranville, S.-O. Kim, E. Jo and I.-C. Eom, *Chemosphere*, 2017, **171**, 468–475.
- 25 N. D. Donahue, E. R. Francek, E. Kiyotake, E. E. Thomas, W. Yang, L. Wang, M. S. Detamore and S. Wilhelm, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, **412**, 5205–5216.
- 26 S. V. Jenkins, H. Qu, T. Mudalige, T. M. Ingle, R. Wang, F. Wang, P. C. Howard, J. Chen and Y. Zhang, *Biomaterials*, 2015, **51**, 226–237.
- 27 K. Flores, R. S. Turley, C. Valdes, Y. Ye, J. Cantu, J. A. Hernandez-Viezcas, J. G. Parsons and J. L. Gardea-Torresdey, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2019, 1–26.
- 28 L. C. Jones, E. Soffey and M. Kelinske, *Spectroscopy*, 2019, **34**, 10–20.
- 29 C. Stephan and R. Thomas, *Spectroscopy*, 2017, **32**, 12–25.
- 30 B. Meermann and V. Nischwitz, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 1432–1468.
- 31 R. M. Galazzi, K. Chacón-Madrid, D. C. Freitas, L. F. Costa and M. A. Z. Arruda, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2020, **34**, e8726.
- 32 M. D. Montaña, F. von der Kammer, C. W. Cuss and J. F. Ranville, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 1768–1772.
- 33 Z. Gajdosechova and Z. Mester, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, 4277–4292.
- 34 F. Abdolapur Monikh, L. Chupani, M. G. Vijver, M. Vancová and W. J. G. M. Peijnenburg, *Sci. Total Environ.*, 2019, **660**, 1283–1293.
- 35 G. E. Schaumann, A. Philippe, M. Bundschuh, G. Metreveli, S. Klitzke, D. Rakcheev, A. Grün, S. K. Kumahor, M. Kühn, T. Baumann, F. Lang, W. Manz, R. Schulz and H. Vogel, *Sci. Total Environ.*, 2015, **535**, 3–19.
- 36 M. Sargent, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 2479–2486.
- 37 T. P. J. Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe, F. von der Kammer, E. H. Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede and S. Weigel, *Food Chem.*, 2013, **138**, 1959–1966.
- 38 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, *Sci. Total Environ.*, 2018, **621**, 210–218.
- 39 M. Witzler, F. Küllmer, A. Hirtz and K. Günther, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, **64**, 4165–4170.
- 40 R. J. B. Peters, Z. H. Rivera, G. van Bommel, H. J. P. Marvin, S. Weigel and H. Bouwmeester, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3875–3885.
- 41 P. Ruud JB, U. Anna K, M. Joost, B. Greet van, M. Sandra, B. Hans, N. Peter, S. Wobbe and L. Martijn K van der, *Curr. Trends Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **2**, 74–84.
- 42 M. Witzler, F. Küllmer and K. Günther, *Anal. Lett.*, 2018, **51**, 587–599.
- 43 N. Waegeneers, S. De Vos, E. Verleysen, A. Ruttens and J. Mast, *Materials*, 2019, **12**, 2677.
- 44 F. Laborda, A. C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea and J. R. Castillo, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2019, **159**, 105654.
- 45 O. Geiss, I. Bianchi, C. Senaldi, G. Bucher, E. Verleysen, N. Waegeneers, F. Brassinne, J. Mast, K. Loeschner, J. Vidmar, F. Aureli, F. Cubadda, A. Raggi, F. Iacoponi, R. Peters, A. Undas, A. Müller, A. K. Meinhardt, E. Walz, V. Gräf and J. Barrero-Moreno, *Food Control*, 2021, **120**, 107550.
- 46 E. Verleysen, N. Waegeneers, F. Brassinne, S. De Vos, I. O. Jimenez, S. Mathioudaki and J. Mast, *Nanomaterials*, 2020, **10**, 592.
- 47 A. R. Montoro Bustos, K. P. Purushotham, A. Possolo, N. Farkas, A. E. Vladár, K. E. Murphy and M. R. Winchester, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 14376–14386.

- 48 R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. van der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester and S. Weigel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 1274–1285.
- 49 S. Weigel, R. Peters, K. Loeschner, R. Grombe and T. P. J. Linsinger, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 4839–4848.
- 50 R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. Van Der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester and S. Weigel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 1274–1285.
- 51 J. W. Olesik and P. J. Gray, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1143–1155.
- 52 T. P. J. Linsinger, R. Peters and S. Weigel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3835–3843.
- 53 I. Rujido-Santos, L. Naveiro-Seijo, P. Herbelo-Hermelo, M. d. C. Barciela-Alonso, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Talanta*, 2019, **197**, 530–538.
- 54 N. J. Clark, R. Clough, D. Boyle and R. D. Handy, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 3388–3400.
- 55 L. Fréchette-Viens, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Talanta*, 2019, **200**, 156–162.
- 56 S. Wu, S. Zhang, Y. Gong, L. Shi and B. Zhou, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **382**, 121045.
- 57 J. Nelson, A. Saunders, L. Poirier, E. Rogel, C. Ovalles, T. Rea and F. Lopez-Linares, *J. Nanopart. Res.*, 2020, **22**, 304.
- 58 J. Noireaux, R. Grall, M. Hullo, S. Chevillard, C. Oster, E. Brun, C. Sicard-Roselli, K. Loeschner and P. Fiscaro, *Separations*, 2019, **6**, 3.
- 59 F. Laborda and E. Bolea, in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier, 2018, pp. 1–9.
- 60 J. D. Martin, L. Telgmann and C. D. Metcalfe, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2017, **98**, 589–594.
- 61 H. Zhang, Y. Huang, J. Gu, A. Keller, Y. Qin, Y. Bian, K. Tang, X. Qu, R. Ji and L. Zhao, *New J. Chem.*, 2019, **43**, 3946–3955.
- 62 R. C. Merrifield, C. Stephan and J. R. Lead, *Talanta*, 2017, **162**, 130–134.
- 63 A. Kéri, I. Kálomista, D. Ungor, Á. Béltéki, E. Csapó, I. Dékány, T. Prohaska and G. Galbács, *Talanta*, 2018, **179**, 193–199.
- 64 J.-B. Chao, J.-R. Wang and J.-Q. Zhang, *Chin. J. Anal. Chem.*, 2020, **48**, 946–954.
- 65 I. Kálomista, A. Kéri, D. Ungor, E. Csapó, I. Dékány, T. Prohaska and G. Galbács, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 2455–2462.
- 66 A. Barber, S. Kly, M. G. Moffitt, L. Rand and J. F. Ranville, *Environ. Sci.: Nano*, 2020, **7**, 514–524.
- 67 S. G. F. Eggermont, A. Rua-Ibarz, K. Tirez, X. Dominguez-Benetton and J. Fransaeer, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 29902–29908.
- 68 R. P. Lamsal, M. S. E. Houache, A. Williams, E. Baranova, G. Jerkiewicz and D. Beauchemin, *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1120**, 67–74.
- 69 K. Walbrück, F. Kuellmer, S. Witzleben and K. Guenther, *J. Nanomater.*, 2019, **2019**, 1–7.
- 70 S. Meyer, R. Gonzalez de Vega, X. Xu, Z. Du, P. A. Doble and D. Clases, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 15007–15016.
- 71 S. Salou, C. Cirtiu, D. Larivière and N. Fleury, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, **412**, 1469–1481.
- 72 A. Sági, A. Kéri, I. Kálomista, D. G. Dobó, A. Szamosvölgyi, K. L. Juhász, A. Kukovecz, Z. Kónya and G. Galbács, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 996–1003.
- 73 R. B. Reed, D. G. Goodwin, K. L. Marsh, S. S. Capracotta, C. P. Higgins, D. H. Fairbrother and J. F. Ranville, *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 2013, **15**, 204–213.
- 74 J. Wang, R. S. Lankone, R. B. Reed, D. H. Fairbrother and J. F. Ranville, *NanoImpact*, 2016, **1**, 65–72.
- 75 P. M. P. Danty, A. Mazel, B. Cormary, M. L. De Marco, J. Allouche, D. Flahaut, J. Jimenez-Lamana, S. Lacomme, M. H. Delville and G. L. Drisko, *Inorg. Chem.*, 2020, **59**, 6232–6241.
- 76 E. Lahtinen, E. Kukkonen, V. Kinnunen, M. Lahtinen, K. Kinnunen, S. Suvanto, A. Väisänen and M. Haukka, *ACS Omega*, 2019, **4**, 16891–16898.
- 77 M. Hadioui, G. Knapp, A. Azimzada, I. Jreije, L. Frechette-Viens and K. J. Wilkinson, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 13275–13284.
- 78 Y. Dan, H. Shi, C. Stephan and X. Liang, *Microchem. J.*, 2015, **122**, 119–126.
- 79 I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, B. Maxit and F. Séby, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2018, **147**, 28–42.
- 80 P. J. Lu, S. W. Fang, W. L. Cheng, S. C. Huang, M. C. Huang and H. F. Cheng, *J. Food Drug Anal.*, 2018, **26**, 1192–1200.
- 81 B. Bocca, S. Caimi, O. Senofonte, A. Alimonti and F. Petrucci, *Sci. Total Environ.*, 2018, **630**, 922–930.
- 82 C. Adelantado, Á. Ríos and M. Zougagh, *Talanta*, 2020, **219**, 121385.
- 83 M. Correia, T. Uusimäki, A. Philippe and K. Loeschner, *Separations*, 2018, **5**, 1–25.
- 84 I. de la Calle, M. Menta, M. Klein and F. Séby, *Talanta*, 2017, **171**, 291–306.
- 85 F. Laborda, C. Trujillo and R. Lobinski, *Talanta*, 2021, **221**, 121486.
- 86 Y. Yang, L. Luo, H. P. Li, Q. Wang, Z. G. Yang, Z. P. Qu and R. Ding, *Talanta*, 2018, **182**, 156–163.
- 87 J. Therkorn, L. Calderón, B. Cartledge, N. Thomas, B. Majestic and G. Mainelis, *Environ. Sci.: Nano*, 2018, **5**, 544–555.
- 88 S. Losert, A. Hess, G. Ilari, N. von Goetz and K. Hungerbuehler, *J. Nanopart. Res.*, 2015, **17**, 293.
- 89 J. P. F. G. Helsper, R. J. B. Peters, M. E. M. van Bommel, Z. E. H. Rivera, S. Wagner, F. von der Kammer, P. C. Tromp, T. Hofmann and S. Weigel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 6679–6691.
- 90 A. Hegetschweiler, O. Borovinskaya, T. Staudt and T. Kraus, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 943–950.
- 91 J. Nelson, M. Yamanaka, F. Lopez-Linares, L. Poirier and E. Rogel, *Energy Fuels*, 2017, **31**, 11971–11976.
- 92 B. Bocca, E. Sabbioni, I. Micetic, A. Alimonti and F. Petrucci, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 616–628.
- 93 B. Battistini, F. Petrucci, I. De Angelis, C. M. Failla and B. Bocca, *Chemosphere*, 2020, **245**, 125667.
- 94 M. Van Wassenhoven, M. Goyens, E. Capieaux, P. Devos and P. Dorfman, *Homeopathy*, 2019, **108**, 073–074.

- 95 Y. Echegoyen and C. Nerin, *Food Chem. Toxicol.*, 2013, **62**, 16–22.
- 96 A. Mackevica, M. E. Olsson and S. F. Hansen, *J. Nanopart. Res.*, 2016, **18**, 5.
- 97 K. Ramos, M. M. Gómez-Gómez, C. Cámara and L. Ramos, *Talanta*, 2016, **151**, 83–90.
- 98 R. Ding, P. Yang, Y. Yang, Z. Yang, L. Luo, H. Li and Q. Wang, *Food Addit. Contam., Part A*, 2018, **35**, 2052–2061.
- 99 Y. Echegoyen, S. Rodríguez and C. Nerin, *Food Addit. Contam., Part A*, 2016, **33**, 530–539.
- 100 B. Hetzer, A. Burcza, V. Gräf, E. Walz and R. Greiner, *Food Control*, 2017, **80**, 113–124.
- 101 S. Addo Ntim, S. Norris, K. Scott, T. A. Thomas and G. O. Noonan, *Food Control*, 2018, **87**, 31–39.
- 102 A. Mackevica, M. E. Olsson and S. F. Hansen, *J. Hazard. Mater.*, 2017, **322**, 270–275.
- 103 A. Mackevica, M. E. Olsson, P. D. Mines, L. R. Heggelund and S. F. Hansen, *NanoImpact*, 2018, **11**, 109–118.
- 104 L. Torrent, M. Iglesias, M. Hidalgo and E. Marguá, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 383–394.
- 105 A. Mackevica, M. E. Olsson and S. F. Hansen, *J. Nanopart. Res.*, 2018, **20**, 6.
- 106 D. M. Mitrano, E. Lombi, Y. A. R. Dasilva and B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 5790–5799.
- 107 J. Farkas, H. Peter, P. Christian, J. A. Gallego Urrea, M. Hassellöv, J. Tuoriniemi, S. Gustafsson, E. Olsson, K. Hylland and K. V. Thomas, *Environ. Int.*, 2011, **37**, 1057–1062.
- 108 R. S. Lankone, J. Wang, J. F. Ranville and D. H. Fairbrother, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 967–982.
- 109 N. Neubauer, L. Scifo, J. Navratilova, A. Gondikas, A. Mackevica, D. Borschneck, P. Chaurand, V. Vidal, J. Rose, F. von der Kammer and W. Wohlleben, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 11669–11680.
- 110 B. Gomez-Gomez, M. T. Perez-Corona and Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1100**, 12–21.
- 111 A. S. Adeleye, E. A. Oranu, M. Tao and A. A. Keller, *Water Res.*, 2016, **102**, 374–382.
- 112 A. Azimzada, J. M. Farner, M. Hadioui, C. Liu-Kang, I. Jreije, N. Tufenkji and K. J. Wilkinson, *Environ. Sci.: Nano*, 2020, **7**, 139–148.
- 113 M. T. Islam, A. Dominguez, R. S. Turley, H. Kim, K. A. Sultana, M. A. I. Shuvo, B. Alvarado-Tenorio, M. O. Montes, Y. Lin, J. Gardea-Torresdey and J. C. Noveron, *Sci. Total Environ.*, 2020, **704**, 135406.
- 114 D. P. Martin, N. L. Melby, S. M. Jordan, A. J. Bednar, A. J. Kennedy, M. E. Negrete, M. A. Chappell and A. R. Poda, *Chemosphere*, 2016, **162**, 222–227.
- 115 Y.-S. Zimmermann, A. Schäffer, P. F.-X. Corvini and M. Lenz, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 13151–13159.
- 116 R. S. Lankone, K. Challis, L. Pourzahedi, D. P. Durkin, Y. Bi, Y. Wang, M. A. Garland, F. Brown, K. Hristovski, R. L. Tanguay, P. Westerhoff, G. Lowry, L. M. Gilbertson, J. Ranville and D. H. Fairbrother, *Sci. Total Environ.*, 2019, **668**, 234–244.
- 117 M. C. Sportelli, R. A. Picca, F. Paladini, A. Mangone, L. C. Giannossa, C. Di Franco, A. L. Gallo, A. Valentini, A. Sannino, M. Pollini and N. Cioffi, *Nanomaterials*, 2017, **7**, 203.
- 118 N. Shin, K. Velmurugan, C. Su, A. K. Bauer and C. S. J. Tsai, *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 2019, **21**, 1342–1352.
- 119 K. Folens, T. Van Acker, E. Bolea-Fernandez, G. Cornelis, F. Vanhaecke, G. Du Laing and S. Rauch, *Sci. Total Environ.*, 2018, **615**, 849–856.
- 120 Z. Li, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Environ. Pollut.*, 2019, **247**, 206–215.
- 121 S. Addo Ntim, T. A. Thomas and G. O. Noonan, *Food Addit. Contam., Part A: Chem., Anal., Control, Exposure Risk Assess.*, 2016, **33**, 905–912.
- 122 M. Jokar, M. Correia and K. Loeschner, *Food Control*, 2018, **89**, 77–85.
- 123 X. He, H. Zhang, H. Shi, W. Liu and E. Sahle-Demessie, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2020, **31**, 2180–2190.
- 124 A. P. Walczak, R. Fokkink, R. Peters, P. Tromp, Z. E. Herrera Rivera, I. M. C. M. Rietjens, P. J. M. Hendriksen and H. Bouwmeester, *Nanotoxicology*, 2012, **7**, 1198–1210.
- 125 K. Ramos, L. Ramos and M. M. Gómez-Gómez, *Food Chem.*, 2017, **221**, 822–828.
- 126 D. M. Mitrano, Y. Arroyo Rojas Dasilva and B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 9665–9673.
- 127 M. Sikder, J. Wang, B. A. Poulin, M. M. Tfaily and M. Baalousha, *Environ. Sci.: Nano*, 2020, **7**, 3318–3332.
- 128 R. C. Merrifield, C. Stephan and J. Lead, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 3206–3213.
- 129 L. Telgmann, M. T. K. Nguyen, L. Shen, V. Yargeau, H. Hintelmann and C. D. Metcalfe, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5169–5177.
- 130 J. Jiménez-Lamana and V. I. Slaveykova, *Sci. Total Environ.*, 2016, **573**, 946–953.
- 131 D. C. Rearick, L. Telgmann, H. Hintelmann, P. C. Frost and M. A. Xenopoulos, *PLoS One*, 2018, **13**, 1–18.
- 132 L. M. Furtado, M. E. Hoque, D. M. Mitrano, J. F. Ranville, B. Cheever, P. C. Frost, M. A. Xenopoulos, H. Hintelmann and C. D. Metcalfe, *Environ. Chem.*, 2014, **11**, 419.
- 133 J. D. Martin, P. C. Frost, H. Hintelmann, K. Newman, M. J. Paterson, L. Hayhurst, M. D. Rennie, M. A. Xenopoulos, V. Yargeau and C. D. Metcalfe, *Environ. Sci. Technol.*, 2018, **52**, 11114–11122.
- 134 A. Urstoeger, A. Wimmer, R. Kaegi, S. Reiter and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2020, **54**, 12063–12071.
- 135 F. Loosli, J. Wang, M. Sikder, K. Afshinnia and M. Baalousha, *Sci. Total Environ.*, 2020, **715**, 136927.
- 136 N. Londono, A. R. Donovan, H. Shi, M. Geisler and Y. Liang, *Nanotoxicology*, 2017, **11**, 1140–1156.
- 137 K. Proulx and K. J. Wilkinson, *Environ. Chem.*, 2014, **11**, 392–401.
- 138 D. M. Mitrano, J. F. Ranville, A. Bednar, K. Kazor, A. S. Hering and C. P. Higgins, *Environ. Sci.: Nano*, 2014, **1**, 248–259.
- 139 D. C. António, C. Cascio, Ž. Jakšić, D. Jurašin, D. M. Lyons, A. J. A. Nogueira, F. Rossi and L. Calzolari, *Mar. Environ. Res.*, 2015, **111**, 162–169.

- 140 A. Wimmer, A. Urstoeger, N. C. Funck, F. P. Adler, L. Lenz, M. Doeblinger and M. Schuster, *Water Res.*, 2020, **171**, 115399.
- 141 C. Toncelli, K. Mylona, I. Kalantzi, A. Tsiola, P. Pitta, M. Tsapakis and S. A. Pergantis, *Sci. Total Environ.*, 2017, **601–602**, 15–21.
- 142 C. Toncelli, K. Mylona, M. Tsapakis and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 1430–1439.
- 143 P. Cervantes-Avilés, Y. Huang and A. A. Keller, *Water Res.*, 2019, **166**, 115072.
- 144 T. Lange, P. Schneider, S. Schymura and K. Franke, *Water*, 2020, **12**, 2509.
- 145 J. Vidmar, P. Oprčkal, R. Milačić, A. Mladenović and J. Ščančar, *Sci. Total Environ.*, 2018, **634**, 1259–1268.
- 146 T. Théoret and K. J. Wilkinson, *Anal. Methods*, 2017, **9**, 3920–3928.
- 147 M. Azodi, Y. Sultan and S. Ghoshal, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 13318–13327.
- 148 A. Georgantzopoulou, P. Almeida Carvalho, C. Vogelsang, M. Tilahun, K. Ndungu, A. M. Booth, K. V. Thomas and A. Macken, *Environ. Sci. Technol.*, 2018, **52**, 9431–9441.
- 149 C. Long, Z. Yang, Y. Yang, H. Li and Q. Wang, *J. Cent. South Univ.*, 2016, **23**, 1611–1617.
- 150 Y. Jie Chang, Y. Hsin Shih, C. H. Su and H. C. Ho, *J. Hazard. Mater.*, 2017, **322**, 95–104.
- 151 J. Kidd, Y. Bi, D. Hanigan, P. Herckes and P. Westerho, *Nanomaterials*, 2019, **9**, 1–14.
- 152 J. Tuoriniemi, M. D. Jürgens, M. Hassellöv and G. Cornelis, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 1189–1197.
- 153 S. Alizadeh, S. Ghoshal and Y. Comeau, *Sci. Total Environ.*, 2019, **647**, 1199–1210.
- 154 S. Alizadeh, A. Abdul Rahim, B. Guo, J. Hawari, S. Ghoshal and Y. Comeau, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 9148–9159.
- 155 A. R. Donovan, C. D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz and H. Shi, *Chemosphere*, 2018, **195**, 531–541.
- 156 Y. Yang, X. Bi, P. Westerhoff, K. Hristovski and J. E. McLain, *Environ. Eng. Sci.*, 2014, **31**, 381–392.
- 157 L. Torrent, E. Marguá, I. Queralt, M. Hidalgo and M. Iglesias, *J. Environ. Sci.*, 2019, **83**, 205–216.
- 158 A. H. Jesmer, J. R. Velicogna, D. M. Schwertfeger, R. P. Scroggins and J. I. Princz, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2017, **36**, 2756–2765.
- 159 D. M. Schwertfeger, J. R. Velicogna, A. H. Jesmer, S. Saatcioglu, H. McShane, R. P. Scroggins and J. I. Princz, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 2505–2513.
- 160 D. Schwertfeger, J. Velicogna, A. Jesmer, H. McShane, R. Scroggins and J. Princz, *Environ. Chem.*, 2017, **14**, 123–133.
- 161 J. Navratilova, A. Praetorius, A. Gondikas, W. Fabienke, F. von der Kammer and T. Hofmann, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2015, **12**, 15756–15768.
- 162 H. El Hadri, S. M. Louie and V. A. Hackley, *Environ. Sci.: Nano*, 2018, **5**, 203–214.
- 163 L. Li, Q. Wang, Y. Yang, L. Luo, R. Ding, Z. G. Yang and H. P. Li, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 9442–9450.
- 164 L. Degenkolb, G. Metreveli, A. Philippe, A. Brandt, K. Leopold, L. Zehlike, H. J. Vogel, G. E. Schaumann, T. Baumann, M. Kaupenjohann, F. Lang, S. Kumahor and S. Klitzke, *Sci. Total Environ.*, 2018, **645**, 192–204.
- 165 S. Motellier, D. Locatelli and R. Bera, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 10714–10722.
- 166 D. M. Peloquin, E. J. Baumann and T. P. Luxton, *Chemosphere*, 2020, **249**, 126173.
- 167 K. C. Nwoko, A. Raab, L. Cheyne, D. Dawson, E. Krupp and J. Feldmann, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2019, **1124**, 356–365.
- 168 J. V. Gómez, A. Tarazona, F. Mateo, M. Jiménez and E. M. Mateo, *Food Control*, 2019, **101**, 58–68.
- 169 S. S. D. Kumar, N. N. Houreld, E. M. Kroukamp and H. Abrahamse, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2018, **178**, 259–269.
- 170 B. Gomez-Gomez, M. Corte-Rodríguez, M. T. Perez-Corona, J. Bettmer, M. Montes-Bayón and Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1128**, 116–128.
- 171 N. Londono, A. R. Donovan, H. Shi, M. Geisler and Y. Liang, *Chemosphere*, 2019, **230**, 567–577.
- 172 A. Azimzada, N. Tufenkji and K. J. Wilkinson, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 1339–1349.
- 173 I. Aharchaou, J. S. Py, S. Cambier, J. L. Loizeau, G. Cornelis, P. Rousselle, E. Battaglia and D. A. L. Vignati, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2018, **37**, 983–992.
- 174 H. Klingberg, L. B. Oddershede, K. Loeschner, E. H. Larsen, S. Loft and P. Møller, *Toxicol. Res.*, 2015, **4**, 655–666.
- 175 M. Logozzi, D. Mizzoni, B. Bocca, R. Di Raimo, F. Petrucci, S. Caimi, A. Alimonti, M. Falchi, F. Cappello, C. Campanella, C. C. Bavisotto, S. David, F. Bucchieri, D. F. Angelini, L. Battistini and S. Fais, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2019, **137**, 23–36.
- 176 A. Abdelkhalik, M. van der Zande, A. K. Undas, R. J. B. Peters and H. Bouwmeester, *Nanotoxicology*, 2020, **14**, 111–126.
- 177 A. Abdelkhalik, M. van der Zande, R. J. B. Peters and H. Bouwmeester, *Part. Fibre Toxicol.*, 2020, **17**, 11.
- 178 I.-L. Hsiao, F. S. Bierkandt, P. Reichardt, A. Luch, Y.-J. Huang, N. Jakubowski, J. Tentschert and A. Haase, *J. Nanobiotechnol.*, 2016, **14**, 50.
- 179 T. Lammel, A. Mackevica, B. R. Johansson and J. Sturve, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2019, **26**, 15354–15372.
- 180 Y. Dan, W. Zhang, R. Xue, X. Ma, C. Stephan and H. Shi, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 3007–3014.
- 181 Y. Dan, X. Ma, W. Zhang, K. Liu, C. Stephan and H. Shi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, 5157–5167.
- 182 D. Bao, Z. G. Oh and Z. Chen, *Front. Plant Sci.*, 2016, **7**, 1–8.
- 183 J. Jiménez-Lamana, J. Wojcieszek, M. Jakubiak, M. Asztemborska and J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 2321–2329.
- 184 J. Nath, I. Dror, P. Landa, T. Vanek, I. Kaplan-Ashiri and B. Berkowitz, *Environ. Pollut.*, 2018, **242**, 1827–1837.
- 185 P. Wang, E. Lombi, S. Sun, K. G. Scheckel, A. Malysheva, B. A. McKenna, N. W. Menzies, F.-J. Zhao and P. M. Kopittke, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 448–460.
- 186 K. Kińska, J. Jiménez-Lamana, J. Kowalska, B. Krasnodębska-Ostęga and J. Szpunar, *Sci. Total Environ.*, 2018, **615**, 1078–1085.

- 187 L. Torrent, M. Iglesias, E. Marguá, M. Hidalgo, D. Verdaguer, L. Llorens, A. Kodre, A. Kavčič and K. Vogel-Mikuš, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **384**, 121201.
- 188 J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, K. Bierla, M. Asztemborska, L. Ruzik, M. Jarosz and J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 683–693.
- 189 S. Laughton, A. Laycock, F. von der Kammer, T. Hofmann, E. A. Casman, S. M. Rodrigues and G. V. Lowry, *J. Nanopart. Res.*, 2019, **21**, 174.
- 190 A. A. Keller, Y. Huang and J. Nelson, *J. Nanopart. Res.*, 2018, **20**, 101.
- 191 F. Dang, Q. Wang, W. Cai, D. Zhou and B. Xing, *Nanotoxicology*, 2020, **14**, 654–666.
- 192 W. Y. Zhang, Q. Wang, M. Li, F. Dang and D. M. Zhou, *Nanotoxicology*, 2019, **13**, 1073–1086.
- 193 Y. Deng, E. J. Petersen, K. E. Challis, S. A. Rabb, R. D. Holbrook, J. F. Ranville, B. C. Nelson and B. Xing, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 10615–10623.
- 194 C. C. Li, F. Dang, M. Li, M. Zhu, H. Zhong, H. Hintelmann and D. M. Zhou, *Nanotoxicology*, 2017, **11**, 699–709.
- 195 M. Hayder, J. Wojcieszek, M. Asztemborska, Y. Zhou and L. Ruzik, *J. Sci. Food Agric.*, 2020, **100**, 4950–4958.
- 196 J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, L. Ruzik, M. Asztemborska, M. Jarosz and J. Szpunar, *Front. Environ. Sci.*, 2020, **8**, 1–12.
- 197 J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, K. Bierla, L. Ruzik, M. Asztemborska, M. Jarosz and J. Szpunar, *Sci. Total Environ.*, 2019, **683**, 284–292.
- 198 E. P. Gray, J. G. Coleman, A. J. Bednar, A. J. Kennedy, J. F. Ranville and C. P. Higgins, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 14315–14323.
- 199 J. G. Coleman, A. J. Kennedy, A. J. Bednar, J. F. Ranville, J. G. Laird, A. R. Harmon, C. A. Hayes, E. P. Gray, C. P. Higgins, G. Lotufo and J. A. Steevens, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2013, **32**, 2069–2077.
- 200 S. Makama, R. Peters, A. Undas and N. W. van den Brink, *Environ. Chem.*, 2015, **12**, 643.
- 201 M. E. Johnson, S. K. Hanna, A. R. Montoro Bustos, C. M. Sims, L. C. C. Elliott, A. Lingayat, A. C. Johnston, B. Nikoobakht, J. T. Elliott, R. D. Holbrook, K. C. K. Scott, K. E. Murphy, E. J. Petersen, L. L. Yu and B. C. Nelson, *ACS Nano*, 2017, **11**, 526–540.
- 202 L. D. Scanlan, R. B. Reed, A. V. Loguinov, P. Antczak, A. Tagmount, S. Aloni, D. T. Nowinski, P. Luong, C. Tran, N. Karunaratne, D. Pham, X. X. Lin, F. Falciani, C. P. Higgins, J. F. Ranville, C. D. Vulpe and B. Gilbert, *ACS Nano*, 2013, **7**, 10681–10694.
- 203 F. Gallochio, G. Biancotto, A. Moressa, F. Pascoli, T. Pretto, A. Toffan, G. Arcangeli, F. Montesi, R. Peters and A. Ricci, *Food Chem.*, 2020, **323**, 126841.
- 204 H. K. Sung, E. Jo, E. Kim, S. Yoo, J. Lee, P. Kim, Y. Kim and I.-C. Eom, *Chemosphere*, 2018, **209**, 815–822.
- 205 F. Abdolhahpur Monikh, L. Chupani, E. Zusková, R. Peters, M. Vancová, M. G. Vijver, P. Porcal and W. J. G. M. Peijnenburg, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 946–953.
- 206 K. Loeschner, M. S. J. Brabrand, J. J. Sloth and E. H. Larsen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3845–3851.
- 207 R. Tassinari, F. Cubadda, G. Moracci, F. Aureli, M. D'Amato, M. Valeri, B. De Berardis, A. Raggi, A. Mantovani, D. Passeri, M. Rossi and F. Maranghi, *Nanotoxicology*, 2014, **8**, 654–662.
- 208 R. Álvarez-Fernández García, N. Fernández-Iglesias, C. López-Chaves, C. Sánchez-González, J. Llopis, M. Montes-Bayón and J. Bettmer, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2019, **55**, 1–5.
- 209 F. Aureli, M. Ciprotti, M. D'Amato, E. do Nascimento da Silva, S. Nisi, D. Passeri, A. Sorbo, A. Raggi, M. Rossi and F. Cubadda, *Nanomaterials*, 2020, **10**, 888.
- 210 J. Modrzynska, T. Berthing, G. Ravn-Haren, K. Kling, A. Mortensen, R. R. Rasmussen, E. H. Larsen, A. T. Saber, U. Vogel and K. Loeschner, *PLoS One*, 2018, **13**, 1–22.
- 211 T. Horváth, A. Papp, N. Igaz, D. Kovács, G. Kozma, V. Trenka, L. Tizslavicz, Z. Rázga, Z. Kónya, M. Kiricsi and T. Vezér, *Int. J. Nanomed.*, 2018, **13**, 7061–7077.
- 212 L. Campagnolo, M. Massimiani, L. Vecchione, D. Piccirilli, N. Toschi, A. Magrini, E. Bonanno, M. Scimeca, L. Castagnozzi, G. Buonanno, L. Stabile, F. Cubadda, F. Aureli, P. H. B. Fokkens, W. G. Kreyling, F. R. Cassee and A. Pietroiusti, *Nanotoxicology*, 2017, **11**, 687–698.
- 213 M. van der Zande, R. J. Vandebriel, E. Van Doren, E. Kramer, Z. Herrera Rivera, C. S. Serrano-Rojero, E. R. Gremmer, J. Mast, R. J. B. Peters, P. C. H. Hollman, P. J. M. Hendriksen, H. J. P. Marvin, A. a C. M. Peijnenburg and H. Bouwmeester, *ACS Nano*, 2012, **6**, 7427–7442.
- 214 F. Gallochio, G. Biancotto, V. Cibir, C. Losasso, S. Belluco, R. Peters, G. van Bommel, C. Cascio, S. Weigel, P. Tromp, F. Gobbo, S. Catania and A. Ricci, *J. Agric. Food Chem.*, 2017, **65**, 3767–3774.
- 215 J. Vidmar, K. Loeschner, M. Correia, E. H. Larsen, P. Manser, A. Wichser, K. Boodhia, Z. S. Al-Ahmady, J. Ruiz, D. Astruc and T. Buerki-Thurnherr, *Nanoscale*, 2018, **10**, 11980–11991.
- 216 R. J. B. Peters, G. van Bommel, Z. Herrera-Rivera, H. P. F. G. Helsper, H. J. P. Marvin, S. Weigel, P. C. Tromp, A. G. Oomen, A. G. Rietveld and H. Bouwmeester, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 6285–6293.
- 217 S. Candás-Zapico, D. J. Kutscher, M. Montes-Bayón and J. Bettmer, *Talanta*, 2018, **180**, 309–315.
- 218 E. Verleysen, E. Van Doren, N. Waegeneers, P. J. De Temmerman, M. Abi Daoud Francisco and J. Mast, *J. Agric. Food Chem.*, 2015, **63**, 3570–3578.
- 219 O. Geiss, J. Ponti, C. Senaldi, I. Bianchi, D. Mehn, J. Barrero, D. Gilliland, R. Matissek and E. Anklam, *Food Addit. Contam., Part A: Chem., Anal., Control, Exposure Risk Assess.*, 2020, **37**, 239–253.
- 220 G. Bucher and F. Auger, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 1380–1386.
- 221 B. Kollander, F. Widemo, E. Ågren, E. H. Larsen and K. Loeschner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 1877–1885.

- 222 K. Loeschner, M. Correia, C. López Chaves, I. Rokkjær and J. J. Sloth, *Food Addit. Contam., Part A: Chem., Anal., Control, Exposure Risk Assess.*, 2018, **35**, 86–93.
- 223 I. de la Calle, M. Menta, M. Klein and F. Séby, *Food Chem.*, 2018, **266**, 133–145.
- 224 M. V. Taboada-López, P. Herbello-Hermelo, R. Domínguez-González, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Talanta*, 2019, **195**, 23–32.
- 225 C. Moens, N. Waegeneers, A. Fritzsche, P. Nobels and E. Smolders, *J. Chromatogr. A*, 2019, **1599**, 203–214.
- 226 M. A. Gomez-Gonzalez, E. Bolea, P. A. O'Day, J. Garcia-Guinea, F. Garrido and F. Laborda, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5125–5135.
- 227 C. D. Metcalfe, T. Sultana, J. Martin, K. Newman, P. Helm, S. Kleywegt, L. Shen and V. Yargeau, *Environ. Monit. Assess.*, 2018, **190**, 555.
- 228 B. Xiao, Y. Zhang, X. Wang, M. Chen, B. Sun, T. Zhang and L. Zhu, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 3431–3441.
- 229 S. Baur, T. Reemtsma, H.-J. Stärk and S. Wagner, *Chemosphere*, 2020, **246**, 125765.
- 230 S. P. Bitragunta, S. G. Palani, A. Gopala, S. K. Sarkar and V. R. Kandukuri, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2017, **98**, 595–600.
- 231 F. Tou, Y. Yang, J. Feng, Z. Niu, H. Pan, Y. Qin, X. Guo, X. Meng, M. Liu and M. F. Hochella, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 4831–4840.
- 232 F. Loosli, J. Wang, S. Rothenberg, M. Bizimis, C. Winkler, O. Borovinskaya, L. Flamigni and M. Baalousha, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 763–777.
- 233 D. T. Maiga, B. B. Mamba and T. A. M. Msagati, *Water Supply*, 2020, **20**, 516–528.
- 234 A. P. Gondikas, F. Von Der Kammer, R. B. Reed, S. Wagner, J. F. Ranville and T. Hofmann, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 5415–5422.
- 235 A. Gondikas, F. von der Kammer, R. Kaegi, O. Borovinskaya, E. Neubauer, J. Navratilova, A. Praetorius, G. Cornelis and T. Hofmann, *Environ. Sci.: Nano*, 2018, **5**, 313–326.
- 236 R. B. Reed, D. P. Martin, A. J. Bednar, M. D. Montaña, P. Westerhoff and J. F. Ranville, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 69–77.
- 237 A. K. Venkatesan, R. B. Reed, S. Lee, X. Bi, D. Hanigan, Y. Yang, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2018, **100**, 120–126.
- 238 L. N. Rand, Y. Bi, A. Poustie, A. J. Bednar, D. J. Hanigan, P. Westerhoff and J. F. Ranville, *Sci. Total Environ.*, 2020, **743**, 140845.
- 239 D. T. Maiga, H. Nyoni, B. B. Mamba and T. A. M. Msagati, *SN Appl. Sci.*, 2020, **2**, 326.
- 240 J.-L. Wang, E. Alasonati, M. Tharaud, A. Gelabert, P. Fiscaro and M. F. Benedetti, *Water Res.*, 2020, **176**, 115722.
- 241 A. Wimmer, A. Kalinnik and M. Schuster, *Water Res.*, 2018, **141**, 227–234.
- 242 A. R. Donovan, C. D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz and H. Shi, *Chemosphere*, 2016, **144**, 148–153.
- 243 A. R. Donovan, C. D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz and H. Shi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5137–5145.
- 244 K. Phalyvong, Y. Sivry, H. Pauwels, A. Gélabert, M. Tharaud, G. Wille, X. Bourrat and M. F. Benedetti, *Front. Environ. Sci.*, 2020, **8**, 1–14.
- 245 I. Jreije, A. Azimzada, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Molecules*, 2020, **25**, 5516.
- 246 L. Xu, Z. Wang, J. Zhao, M. Lin and B. Xing, *Environ. Pollut.*, 2020, **260**, 114043.
- 247 J. Sanchís, J. Jiménez-Lamana, E. Abad, J. Szpunar and M. Farré, *Environ. Sci. Technol.*, 2020, **54**, 3969–3978.
- 248 R. Vogt, D. Mozhayeva, B. Steinhoff, A. Schardt, B. T. F. Spelz, A. Philippe, S. Kurtz, G. E. Schaumann, C. Engelhard, H. Schönherr, D. K. Lamatsch and J. Wanzenböck, *Sci. Total Environ.*, 2019, **696**, 134034.
- 249 D. M. Mitrano, E. K. Leshner, A. Bednar, J. Monserud, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2012, **31**, 115–121.
- 250 P. Cervantes-Avilés, Y. Huang and A. A. Keller, *Water Res.*, 2019, **156**, 188–198.
- 251 J. Tuoriniemi, G. Cornelis and M. Hassellöv, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 3965–3972.
- 252 M. Hadioui, V. Merdzan and K. J. Wilkinson, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 6141–6148.
- 253 S. Bevers, M. D. Montaña, L. Rybicki, T. Hofmann, F. von der Kammer and J. F. Ranville, *Front. Environ. Sci.*, 2020, **8**, 84.
- 254 L. Li, M. Stoiber, A. Wimmer, Z. Xu, C. Lindenblatt, B. Helmreich and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 6327–6333.
- 255 A. K. Venkatesan, B. T. Rodríguez, A. R. Marcotte, X. Bi, J. Schoepf, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Environ. Sci.: Water Res. Technol.*, 2018, **4**, 1923–1932.
- 256 A. Wimmer, J. Beyerl and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 13293–13301.
- 257 M. Gajec, E. Kukulska-Zajac and A. Król, *Appl. Ecol. Environ. Res.*, 2020, **18**, 5775–5788.
- 258 I. De la Calle, P. Pérez-Rodríguez, D. Soto-Gómez and J. E. López-Periago, *Microchem. J.*, 2017, **133**, 293–301.
- 259 L. N. Rand and J. F. Ranville, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 11214–11222.
- 260 R. Kaegi, A. Englert, A. Gondikas, B. Sinnet, F. von der Kammer and M. Burkhardt, *NanoImpact*, 2017, **8**, 73–79.
- 261 J. R. Huang, P. Li, J. H. Wen, X. Hu, Y. J. Chen, D. H. Yin and H. Z. Lian, *Spectrosc. Lett.*, 2018, **51**, 252–256.
- 262 D. Ruhland, K. Nwoko, M. Perez, J. Feldmann and E. M. Krupp, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 1164–1170.
- 263 J. Jiménez-Lamana, I. Abad-Álvaro, K. Bierla, F. Laborda, J. Szpunar and R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 452–460.
- 264 M. V. Taboada-López, N. Alonso-Seijo, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Microchem. J.*, 2019, **148**, 652–660.
- 265 M. V. Taboada-López, S. Iglesias-López, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1018**, 16–25.
- 266 Q. Zhou, L. Liu, N. Liu, B. He, L. Hu and L. Wang, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2020, **198**, 110670.

- 267 M. Roman, C. Rigo, H. Castillo-Michel, I. Munivrana, V. Vindigni, I. Mičetić, F. Benetti, L. Manodori and W. R. L. Cairns, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5109–5124.
- 268 K. Badalova, P. Herbelo-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2019, **54**, 55–61.
- 269 K. Loeschner, C. F. Harrington, J.-L. Kearney, D. J. Langton and E. H. Larsen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, 4541–4554.
- 270 J. Schoon, S. Geißler, J. Traeger, A. Luch, J. Tentschert, G. Perino, F. Schulze, G. N. Duda, C. Perka and A. Rakow, *Nanomedicine*, 2017, **13**, 2415–2423.
- 271 R. J. B. Peters, A. G. Oomen, G. van Bommel, L. van Vliet, A. K. Undas, S. Munniks, R. L. A. W. Bleys, P. C. Tromp, W. Brand and M. van der Lee, *Nanotoxicology*, 2020, **14**, 420–432.
- 272 M. B. Heringa, R. J. B. Peters, R. L. A. W. Bleys, M. K. van der Lee, P. C. Tromp, P. C. E. van Kesteren, J. C. H. van Eijkeren, A. K. Undas, A. G. Oomen and H. Bouwmeester, *Part. Fibre Toxicol.*, 2018, **15**, 15.
- 273 E. Leese, J. F. Staff, V. A. Carolan and J. Morton, *Ann. Work Exposures Health*, 2017, **61**, 902–906.
- 274 R. d. Heringer and J. F. Ranville, *Forensic Sci. Int.*, 2018, **288**, e20–e25.
- 275 K. Proulx, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5147–5155.
- 276 A. Praetorius, A. Gundlach-Graham, E. Goldberg, W. Fabienke, J. Navratilova, A. Gondikas, R. Kaegi, D. Günther, T. Hofmann and F. von der Kammer, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 307–314.
- 277 M. D. Montaña, H. R. Badiei, S. Bazargan and J. F. Ranville, *Environ. Sci.: Nano*, 2014, **1**, 338–346.
- 278 E. Bolea-Fernandez, D. Leite, A. Rua-Ibarz, T. Liu, G. Woods, M. Aramendia, M. Resano and F. Vanhaecke, *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1077**, 95–106.
- 279 M. D. Montaña, B. J. Majestic, Å. K. Jämting, P. Westerhoff and J. F. Ranville, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4733–4741.
- 280 J. Vidmar, T. Buerki-Thurnherr and K. Loeschner, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 752–761.
- 281 A. Urstoeger, A. Wimmer, R. Kaegi, S. Reiter and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2020, **54**, 12063–12071.
- 282 J. Chao, J. Liu, S. Yu, Y. Feng, Z. Tan, R. Liu and Y. Yin, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 6875–6882.
- 283 F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M. T. Gómez, M. S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui and J. R. Castillo, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **904**, 10–32.
- 284 S. A. Pergantis, T. L. Jones-Lepp and E. M. Heithmar, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 6454–6462.
- 285 K. A. Huynh, E. Siska, E. Heithmar, S. Tadjiki and S. A. Pergantis, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4909–4916.
- 286 D. Mozhayeva, I. Strenge and C. Engelhard, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 7152–7159.
- 287 J. Tan, J. Liu, M. Li, H. El Hadri, V. A. Hackley and M. R. Zachariah, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 8548–8555.
- 288 D. Rakcheev, A. Philippe and G. E. Schaumann, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 10643–10647.
- 289 Y. U. Hachenberger, D. Rosenkranz, F. L. Kriegel, B. Krause, R. Matschaß, P. Reichardt, J. Tentschert, P. Laux, N. Jakubowski, U. Panne and A. Luch, *Materials*, 2020, **13**, 1–14.
- 290 W.-C. Lee, B.-T. Lee, S. Lee, Y. S. Hwang, E. Jo, I.-C. Eom, S.-W. Lee and S.-O. Kim, *Microchem. J.*, 2016, **129**, 219–230.
- 291 K. Loeschner, J. Navratilova, C. Købler, K. Mølhav, S. Wagner, F. von der Kammer and E. H. Larsen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 8185–8195.
- 292 R. Liu, P. Wu, L. Yang, X. Hou and Y. Lv, *Mass Spectrom. Rev.*, 2014, **33**, 373–393.
- 293 M. Cais, S. Dani, Y. Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E. E. Isaacs, Y. Josephy, Y. Saar, E. Slovin and L. Snarsky, *Nature*, 1977, **270**, 534–535.
- 294 C. Zhang, F. Wu, Y. Zhang, X. Wang and X. Zhang, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 1393–1396.
- 295 O. I. Ornatsky, R. Kinach, D. R. Bandura, X. Lou, S. D. Tanner, V. I. Baranov, M. Nitz and M. A. Winnik, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, **23**, 463–469.
- 296 S. Hu, R. Liu, S. Zhang, Z. Huang, Z. Xing and X. Zhang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 1096–1103.
- 297 R. Liu, Z. Xing, Y. Lv, S. Zhang and X. Zhang, *Talanta*, 2010, **83**, 48–54.
- 298 Z. Huang, C. Wang, R. Liu, Y. Su and Y. Lv, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 2876–2881.
- 299 Y. Cao, G. Mo, J. Feng, X. He, L. Tang, C. Yu and B. Deng, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1028**, 22–31.
- 300 Y. Cao, J. Feng, L. Tang, G. Mo, W. Mo and B. Deng, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2020, **166**, 105797.
- 301 G. Han, Z. Xing, Y. Dong, S. Zhang and X. Zhang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 3462–3465.
- 302 B. Li, H. Tang, R. Yu and J. Jiang, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 2379–2382.
- 303 S. Zhang, G. Han, Z. Xing, S. Zhang and X. Zhang, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 3541–3547.
- 304 X. Xu, J. Chen, B. Li, L. Tang and J. Jiang, *Analyst*, 2019, **144**, 1725–1730.

VII. ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

^{27}Al	Isótopo 27 de aluminio
^{28}Si	Isótopo 28 de silicio
^{29}Si	Isótopo 29 de silicio
^{49}Ti	Isótopo 49 de titanio
^{74}Ge	Isótopo 74 de germanio
A	Área del canal
A_A	Abundancia atómica
AF4	Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico
AFM	Microscopía de fuerza atómica
b	Anchura del canal
BSA	Albúmina de suero bovino
CeO_2	Óxido de cerio (IV)
d	Diámetro de partícula
D	Coefficiente de difusión
d_h	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMA	Análisis mecánico dinámico
EAF4	Fraccionamiento en flujo mediante campo eléctrico de flujo asimétrico
EDS	Espectrometría de rayos X de dispersión de energía
EELS	Espectroscopía de pérdida de energía de electrón
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EFTEM	Microscopía electrónica de transmisión de imagen filtrada en energía
EIFFF	Fraccionamiento en flujo mediante campo eléctrico
ET-AAS	Espectrometría de absorción atómica electrotérmica
F	Fuerza del campo externo sobre el analito
FESEM	Microscopía electrónica de barrido con fuente de emisión de campo
FFF	Fraccionamiento en flujo mediante campo
FH	Surimi fresco
FIFFF	Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo

F _p	Fracción en masa del elemento por partícula
FTIR	Espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier
FZ	Surimi congelado
H	Altura de plato teórico
HAADF	Detector anular de alto ángulo
H _d	Difusión axial
HDC	Cromatografía hidrodinámica
H _e	Dispersión debida a efectos instrumentales
H _{exp}	Eficiencia experimental
HF5	Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo de fibra hueca
H _{inst}	Dispersión instrumental
H _n	Dispersión de no-equilibrio
H _p	Dispersión de polidispersidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
H _{pre}	Eficiencia prevista
H _r	Dispersión de relajación
H _{teo}	Eficiencia teórica
ICP-MS	Espectrometría de masas con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo
ICP-MS/MS	ICP-MS de triple cuadrupolo
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo
ITENE	Instituto Tecnológico de Embalaje, Transporte y Logística
JRC	<i>Joint Research Center</i>
k	Constante de Boltzmann
KED	Discriminación de energía cinética
K _{ICP-MS}	Factor de eficiencia de detección del sistema
K _{intro}	Factor de introducción de muestra en SP-ICP-MS
K _M	Factor del isótopo de análisis en SP-ICP-MS
K _m	Sensibilidad obtenida mediante una calibración en masa por partícula

K_N	Sensibilidad obtenida mediante una calibración en concentración en número
K_R	Sensibilidad obtenida mediante una calibración de intensidades en función de la concentración en masa
L	Longitud del canal en FFF
l	Altura o posición del analito en el canal
LDPE	Polietileno de baja densidad
LOD	Límite de detección
LOD _{núm}	Límite de detección en número
LOD _{tamaño}	Límite de detección en tamaño
LOQ	Límite de cuantificación
MALS	Dispersión de luz multiangular
MgFFF	Fraccionamiento en flujo mediante campo magnético
M_M	Masa atómica
m_P	Masa de un elemento por partícula
N	Número de platos
NaPP	Pirofosfato de sodio
N_{Av}	Número de Avogadro
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
NPs	Nanopartículas
NTA	Análisis de rastreo de nanopartículas
PES	Polietersulfona
PET	Tereftalato de polietileno
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
Q _{muestra}	Caudal de introducción de muestra
R	Parámetro de retención experimental
RC	Celulosa regenerada
SC	Canal convencional
SdFFF	Fraccionamiento en flujo mediante campo de sedimentación
SDS	Dodecilsulfato de sodio

SEM	Microscopía electrónica de barrido
SiO ₂	Óxido de silicio (IV)
SLC	Canal corto
S _P	Intesidad neta de una partícula detectada
SP-ICP-MS	Detección individual de partículas mediante ICP-MS
T	Temperatura absoluta
t ₀	Tiempo de retención de volumen muerto
t _{dwell}	Tiempo de lectura
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGA	Análisis termogravimétrico
ThFFF	Fraccionamiento en flujo mediante campo térmico
t _i	Tiempo de adquisición de datos
TiO ₂	Óxido de titanio (IV)
TMAH	Hidróxido de tetrametilamonio
TOF	Tiempo de vuelo
t _r	Tiempo de retención
$ u_c $	Velocidad de flujo cruzado
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Flujo axial
V _c	Flujo cruzado
v _{máx}	Velocidad máxima del portador
$\langle v \rangle$	Velocidad promedio del portador
w	Espesor del canal
w _p	Anchura de un evento de partícula en términos de tiempo
X _c ^{tam}	Diámetro de partícula equivalente al valor crítico
X ^D	Concentración en masa de un elemento disuelto
X ^M	Masa correspondiente a un elemento M
X ^N	Concentración en número de partículas
XRD	Difracción de rayos X
XRF	Fluorescencia de rayos X

Y	Intensidad bruta de un pico
Y_B	Intensidad promedio de la línea base
Y_C	Valor crítico
Y_N	Número de partículas detectadas
$Y_{N,B}$	Número de eventos detectados en el blanco
Y_R	Señal bruta en un barrido de intensidades
ZnO	Óxido de zinc (II)
η	Eficiencia de transporte
η_m	Viscosidad del medio
λ	Parámetro de retención teórico
ρ	Densidad
σ	Desviación estándar
σ^2	Varianza
σ_B	Desviación estándar de la intensidad de la línea base

