

# Caractérisation de nanoparticules inorganiques dans les produits du quotidien

## Les méthodes d'analyse et les applications

*Fabienne Séby est directrice du laboratoire Ultra Traces Analyses Aquitaine<sup>1</sup> et Mathieu Menta y est ingénieur d'applications. François Auger est ingénieur au Service Commun des Laboratoires de Bordeaux<sup>2</sup>.*

Les nanoparticules sont utilisées depuis longtemps dans les produits de notre quotidien, notamment dans les domaines de l'agroalimentaire et des cosmétiques, mais la mesure précise de leurs caractéristiques physico-chimiques est assez récente. C'est cette

dernière préoccupation qui fait l'objet de ce chapitre.

### 1 Utilisation des nanoparticules dans les produits journaliers

#### 1.1. Les nanoparticules dans notre quotidien

Les nanoparticules sont utilisées dans de nombreux secteurs, la **Figure 1** montre la

1. [www.ut2a.fr](http://www.ut2a.fr)

2. [www.douane.gouv.fr/articles/a11078-service-commun-des-laboratoires-dgddi-et-dgccrf](http://www.douane.gouv.fr/articles/a11078-service-commun-des-laboratoires-dgddi-et-dgccrf)



| Particules             | Produits   | Principale utilisation  | Additif     |
|------------------------|--|---|-------------|
| <b>TiO<sub>2</sub></b> | Aliments, peintures, produits d'hygiène, emballages alimentaires, cosmétiques ...                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pigment blanc</li> <li>✓ Filtre UV (en association avec ZnO)</li> <li>✓ Exhausteur de goût (fruits secs, soupe, moutarde ...)</li> </ul> | <b>E171</b> |
| <b>Ag</b>              | Emballages alimentaires, vêtements, aliments, compléments alimentaires, produits d'hygiène, dispositifs médicaux | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Agent antimicrobien</li> <li>✓ Agent décoratif pour pâtisserie ...</li> </ul>  | <b>E174</b> |
| <b>SiO<sub>2</sub></b> | Aliments, soupes en poudre, café, produits d'hygiène, mayonnaise ...   | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Agent antiagglomérant</li> <li>✓ Amélioration de l'onctuosité</li> <li>✓ Amélioration de la texture ...</li> </ul>                       | <b>E551</b> |
| <b>Oxyde de fer</b>    | Produits alimentaires  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Agent colorant</li> <li>✓ Augmentation de la biodisponibilité</li> </ul>   | <b>E172</b> |

**Figure 3**

Les nanoparticules sont omniprésentes dans les produits journaliers. Ce sont des agents antimicrobiens, décoratifs (Ag), colorants (TiO<sub>2</sub> et oxyde de fer) et des exhausteurs de goût (TiO<sub>2</sub>). Ils sont utilisés comme additifs dans l'industrie agroalimentaire et dans d'autres secteurs comme les cosmétiques, le médical et les textiles.

blanche qui permet de donner un aspect plus attrayant au produit auquel on l'ajoute (accentuation des couleurs, aspect brillant, ...) (Figure 3). Ces nanoparticules peuvent être présentes dans certains aliments (notamment les sucreries, les biscuits ou gâteaux industriels, les sauces et plats en sauce de couleur blanche, ...), dans des produits d'hygiène comme le dentifrice, certains emballages colorés ou des cosmétiques.

Le dioxyde de titane possède également des propriétés permettant de réfléchir, disperser et absorber les rayons ultraviolets (UV) et est donc utilisé en tant que filtre solaire dans différents produits (crèmes solaires, certaines crèmes hydratantes, sprays, baumes à lèvres, ...), le plus souvent en association avec l'oxyde de zinc afin de filtrer à la fois les UVA et les UVB. L'ajout de ces deux types de particules sous une forme nanométrique permet à ces produits de pénétrer plus facilement la couche cutanée pour laisser un film transparent sur la peau.

### 1.3. Utilisation des nanoparticules d'argent

L'argent, lui, est principalement utilisé pour ses propriétés antimicrobiennes. De ce fait, il peut être ajouté à des emballages alimentaires pour augmenter la conservation des aliments, à certains dispositifs médicaux pour augmenter leurs propriétés antiseptiques (pansements) ou à des textiles utilisés pour les vêtements de sport afin de lutter contre les mauvaises odeurs dues à la transpiration.

De façon plus anecdotique, les nanoparticules d'argent peuvent également être présentes dans certains aliments pour leur aspect décoratif (perles argentées pour pâtisseries) ou dans certains compléments alimentaires. En effet, pour lutter contre des carences en oligoéléments<sup>4</sup>, il est fréquent d'utiliser ces compléments. L'ajout de ces

4. Oligoéléments : éléments minéraux considérés comme des nutriments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme ; mais une dose trop élevée peut être toxique dans certains cas.

oligoéléments sous forme nanoparticulaire (l'argent mais aussi le zinc ou le sélénium) permet d'améliorer leur absorption.

#### 1.4. D'autres nanoparticules : la silice et l'oxyde de fer

La silice nanoparticulaire est principalement utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour ses propriétés d'anti-agglomération dans la plupart des aliments en poudre (sel, café, soupe, ...). L'ajout de silice sous cette forme permet également d'améliorer l'onctuosité et la texture de certaines sauces comme la mayonnaise. Par ailleurs, en raison de ses propriétés abrasives, la silice peut être ajoutée à certains produits d'hygiène comme le dentifrice pour permettre un brossage plus efficace.

L'oxyde de fer est moins utilisé mais peut être ajouté en tant qu'agent colorant du fait de sa couleur rouge/rouille. Par ailleurs, il augmente la biodisponibilité<sup>5</sup> de certains nutriments présents dans les aliments.

Toutes ces nanoparticules sont des produits connus, utilisés depuis très longtemps et répertoriés sous le terme d'additifs. Ils sont désignés sur l'emballage des produits par la lettre E suivie d'un nombre à trois chiffres. Par exemple, le dioxyde de titane est connu comme l'additif E171 dans la liste des ingrédients présents dans un produit. La focalisation actuelle sur ces additifs vient de l'échelle nanométrique, récemment apparue.

5. Biodisponibilité : c'est le degré auquel un nutriment est absorbé et utilisé par le corps.

#### 1.5. Les nouveaux produits à base de nanoparticules inorganiques

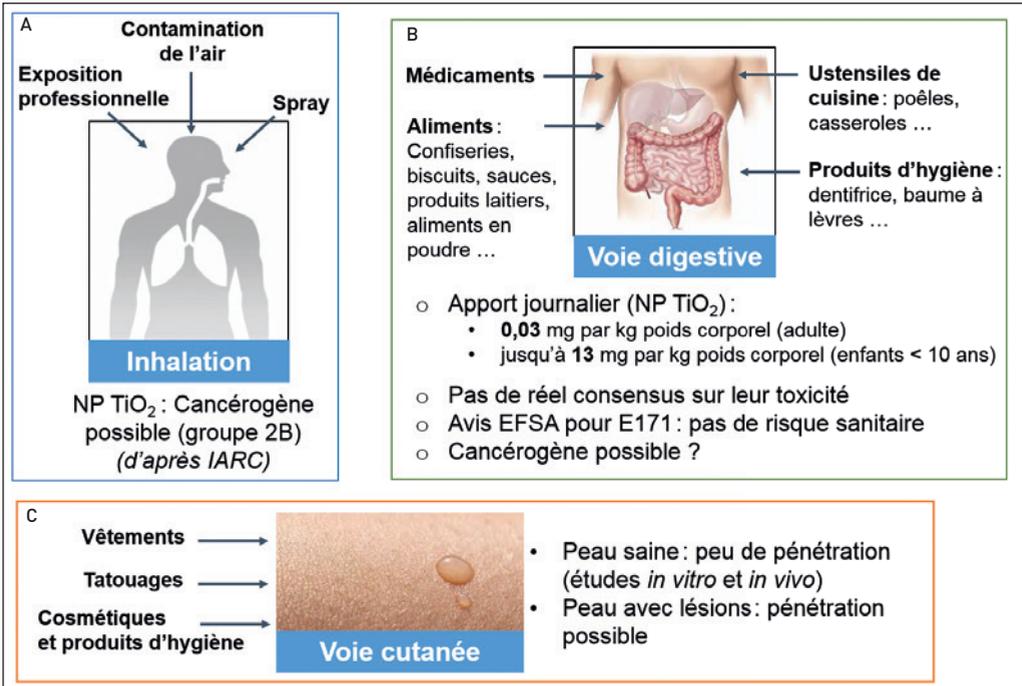
De nouvelles générations de pigments contenant des nanoparticules apparaissent sur le marché pour améliorer l'aspect des produits. Par exemple, l'industrie du cosmétique utilise de très fines paillettes de mica enrobées de nanoparticules de dioxyde de titane ou d'oxyde de fer qui ont de forts indices de réfraction de la lumière. Leur incorporation à certains produits permet d'obtenir des couleurs spécifiques avec un aspect nacré et/ou pailleté qui sont utilisées dans les ombres à paupières notamment. Le pigment le plus courant est constitué de mica recouvert de dioxyde de titane et, selon la taille des nanoparticules, la couleur et son aspect seront différents. Par exemple, une couleur argentée est obtenue avec des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  dont la taille est comprise entre 40 et 60 nm, alors que la couleur verte utilise un domaine de taille entre 140 et 160 nm.

Ces nouveaux matériaux peuvent également être utilisés dans l'agroalimentaire pour obtenir des produits dorés et festifs, souvent utilisés sous forme d'aromates.

## 2 Toxicité et réglementation des nanoparticules

### 2.1. Les principales voies d'exposition aux nanoparticules

La présence de nanoparticules dans les produits que nous consommons quotidiennement



engendre une exposition de plus en plus prégnante. À ce jour, le manque de données épidémiologiques ne permet pas de mener une évaluation complète des risques potentiels liés aux nanomatériaux manufacturés contenus dans les produits de consommation courante. Par contre, un nombre de publications croissant porte sur la détermination de données toxicologiques et écotoxicologiques. Trois principales voies d'exposition ont été identifiées, les voies digestive, cutanée et respiratoire (Figure 4).

Le risque par inhalation (Figure 4A) affecte essentiellement les personnes exposées professionnellement à des nanomatériaux manufacturés. Les premiers organes exposés sont ceux de l'appareil respiratoire. Toutefois, la contamination de l'air en

milieu non professionnel par des particules ultrafines ainsi que l'utilisation fréquente de sprays contenant des nanoparticules peuvent également contribuer à cette voie d'exposition. En ce qui concerne le dioxyde de titane nanoparticulaire, les études laissent penser qu'un risque cancérigène par inhalation est possible et cette substance est classée dans le groupe 2B par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC).

L'exposition orale résulte principalement de l'ingestion de produits alimentaires contenant des additifs à base de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> (Figure 4B). D'autres apports ont été identifiés comme celui lié à l'absorption de médicaments dans lesquels TiO<sub>2</sub> est ajouté en tant qu'excipient pour obtenir une couleur blanche. L'utilisation de

Figure 4

Voies d'exposition aux nanoparticules chez l'homme : A) exposition professionnelle et présence de nanoparticules dans l'air ou dans certains sprays ; B) les médicaments, les produits alimentaires, les ustensiles de cuisine et les produits d'hygiène nous exposent aux nanoparticules par voie digestive. L'apport journalier par voie digestive chez l'enfant serait près de quarante fois plus élevé que celui de l'adulte. Néanmoins, il n'y a pas de réel consensus par rapport à la toxicité des nanoparticules ; C) les vêtements, les tatouages et les produits cosmétiques ou d'hygiène constituent une exposition aux nanoparticules par voie cutanée. Toutefois, il n'y aurait pas de pénétration si la peau est saine.

certains produits d'hygiène dont une quantité peut éventuellement être ingérée (dentifrices, baumes ou rouges à lèvres) peut également contribuer à l'exposition orale, tout comme la libération pendant la cuisson de nanoparticules présentes dans les revêtements d'ustensiles de cuisson.

Des études ont mesuré l'apport journalier de nanoparticules de dioxyde de titane<sup>6,7</sup>, (Figure 4B). Si cet apport est de 0,03 mg par kg de poids corporel chez l'adulte<sup>6</sup>, il peut atteindre 13 mg par kg de poids corporel chez l'enfant de moins de 10 ans<sup>7</sup>, ces derniers consommant des quantités importantes de confiseries.

Peu de travaux sont encore disponibles pour l'évaluation du risque lié à l'ingestion de nanoparticules mais les rares études disponibles laissent penser qu'un effet sur la santé est possible avec pour

cibles les organes digestifs et reproducteurs (Figure 4B). En 2016, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) s'est prononcée en autorisant l'utilisation de l'additif E171 mais a néanmoins recommandé que de nouvelles études soient réalisées pour mieux connaître son effet sur le système reproducteur.

Les apports de nanoparticules par voie cutanée se font essentiellement par l'utilisation de cosmétiques et de produits d'hygiène. Des apports plus anecdotiques concernent les tatouages (encre pouvant contenir des nanoparticules inorganiques selon la couleur désirée) et le port de vêtements intelligents à même la peau (Figure 4C).

La plupart des études menées *in vitro* ou *in vivo* tendent à montrer que les nanoparticules ne pénètrent pas le derme<sup>8</sup> et ne peuvent donc pas être diffusées dans les organes par la circulation sanguine. La présence d'une lésion cutanée (érythème, brûlure, coup de soleil,...) favoriserait la pénétration sans atteindre toutefois les couches très profondes du derme (Figure 4C).

## 2.2. Règlementation concernant les nanoparticules

Devant l'utilisation de plus en plus fréquente des nanoparticules dans les produits du quotidien et leur potentielle dangerosité, une réglementation est en train de se mettre en place au niveau européen.

8. Derme : couche de la peau située sous l'épiderme (couche la plus en surface) qui permet de cicatriser et d'éliminer les toxines par la sueur.

6. Rompelberg C., Heringa M.B., van Donkersgoed G., Drijvers J., Roos A., Westenbrink S., Peters R., van Bemmel G., Brand W., Oomen A.G. (2016). Oral intake of added titanium dioxide and its nanofraction from food products, food supplements and toothpaste by the Dutch population, *Nanotoxicology*, 10 : 1404-1414.

7. Huybrechts I., Sioen I., Boon P.E., De Neve M., Amiano P., Arganini C., Bower E., Busk L., Christensen T., Hilbig A., Hirvonen T., Kafatos A., Koulouridaki S., Lafay L., Liukkonen K.-H., Papoutsou S., Ribas-Barba L., Ruprich J., Rehurkova I., Kersting M., Serra-Majem L., Turrini A., Verger E., Westerlund A., Tornaritis M., van Klaveren J.D., De Henauw S. (2010). Long-term dietary exposure to different food colours in young children living in different European countries (EN-53), *EFSA Supporting Publication*, 7 : 1-70.

En 2011 (directive 2011/696/UE), la commission européenne a proposé la définition suivante pour un nanomatériau : « *Matériau naturel formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégats ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique en taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm* ». Cette directive a été modifiée en 2013 (2013/1363/UE) et précise que cette définition se réfère aux « *matériaux manufacturés* » et non aux nanomatériaux en général. En conséquence, les nanomatériaux naturels et formés accidentellement ne doivent pas être inclus dans la définition.

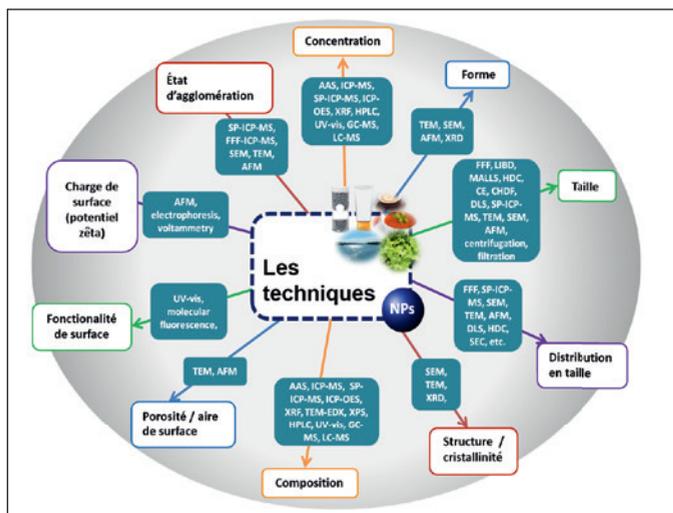
L'utilisation de nanomatériaux dans les produits cosmétiques est réglementée par la directive 1223/2009/EU. Ce règlement a rendu obligatoire depuis juillet 2013 le signalement de leur présence dans la liste des ingrédients des cosmétiques. La règle d'étiquetage prévoit que soit indiqué le terme nano entre crochets après le nom de l'ingrédient concerné. Par exemple, dans le cas de  $\text{TiO}_2$ , Titanium dioxide [nano]. La définition du terme nanomatériau retenu par ce règlement diffère de celui de la directive 2011/696/UE, notamment par le fait qu'elle ne comporte pas de seuil minimal de 50 %.

Il y a, pour les professionnels, obligation de notification de tous les ingrédients nanoparticulaires utilisés. Toutefois, deux types d'autorisations sont prévues, selon que les nanomatériaux sont utilisés ou non

comme colorants, filtres UV et conservateurs. Ainsi, certains nanomatériaux étaient autorisés en 2018, notamment quatre filtres UV dont l'oxyde de zinc et le dioxyde de titane, et un colorant, le noir de carbone.

Si la mention [nano] apparaît dans l'étiquette de certains cosmétiques depuis 2014, des tests menés par des associations de consommateurs et les autorités publiques françaises comme la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF), ont mis en évidence le fait que de nombreuses marques ne sont pas encore en conformité avec l'obligation d'étiquetage.

Dans l'alimentation, le règlement européen concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires (INCO 1169/2011) impose également l'obligation d'étiquetage depuis fin 2014. Il est en effet stipulé que « *tous les ingrédients qui se présentent sous forme de nanomatériaux manufacturés doivent être indiqués clairement dans la liste des ingrédients. Le nom de l'ingrédient est suivi du mot nano entre crochets* ». Toutefois, ce règlement est, de façon générale, peu respecté et plusieurs études scientifiques et des campagnes de contrôle ont confirmé la présence de nanomatériaux dans de nombreux produits présents sur le marché, notamment le dioxyde de titane, sans aucun étiquetage. Devant la réticence de l'industrie agroalimentaire à étiqueter leurs produits, probablement par peur de voir les consommateurs se détourner de leurs



**Figure 5**

*Les techniques disponibles pour l'analyse des nanomatériaux. De nombreux paramètres tels que la taille, la concentration, la forme, etc., doivent être déterminés selon la réglementation. Ces techniques sont donc complémentaires et permettent une caractérisation complète des nanoparticules.*

produits ou tout simplement par ignorance, plusieurs organisations non gouvernementales ont demandé au gouvernement français d'interdire les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  dans les aliments. En mai 2018, un amendement a ainsi été adopté par l'assemblée nationale visant à suspendre la mise sur le marché de l'additif E171 ainsi que les denrées alimentaires qui en contiennent. Cette suspension a été confirmée par le sénat dans le cadre du projet de loi pour l'équilibre des relations commerciales dans le secteur agricole et alimentaire et une alimentation saine, durable et accessible à tous (loi EGALIM). L'arrêté a été signé en avril 2019 et donc, à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2020, l'utilisation de cet additif est interdite. Ce dossier est actuellement présenté par la France à la Commission Européenne.

Même si la réglementation commence à se mettre en place, il y a un réel besoin de mieux évaluer le risque lié à l'utilisation des

nanoparticules. Toutefois, les études de toxicité ont besoin de s'appuyer sur des mesures fiables, précises et spécifiques pour obtenir des conclusions non équivoques sur leur dangerosité. L'analyse des nanoparticules dans les produits du quotidien est assez récente et aucune méthode normalisée n'existe. Il est donc nécessaire de développer des méthodes qui permettront de faire avancer les connaissances liées au danger de l'utilisation des nanoparticules.

## 3 La caractérisation des nanoparticules

### 3.1. Les techniques d'analyse

De nombreux paramètres permettent de caractériser les nanoparticules comme la concentration, la forme, la taille, la distribution en taille, la structure, la cristallinité<sup>9</sup>, la composition, l'aire de surface, la fonctionnalité de surface<sup>10</sup>, la charge de surface et l'état d'agglomération (Figure 5). Selon la réglementation européenne, l'ensemble de ces paramètres devrait être déterminé. Une caractérisation aussi complète peut difficilement être réalisée par un seul laboratoire. De plus, le coût de ces analyses est souvent très élevé en raison de l'utilisation de techniques très sophistiquées. Pour ces

9. Cristallinité : caractérise la proportion de matériau qui est à l'état cristallin, c'est-à-dire dont les ions, atomes ou molécules sont disposés de façon régulière.

10. Fonctionnalité de surface : capacité à modifier l'interaction entre deux milieux au niveau d'une interface.

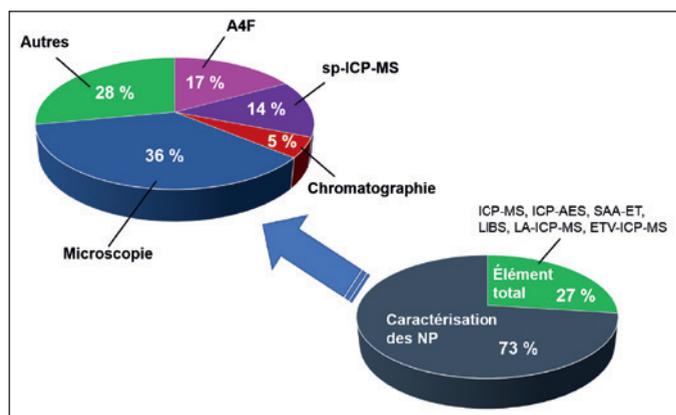


Figure 6

La microscopie est la technique d'analyse la plus répandue, elle est suivie par l'A4F et l'ICP-MS en mode « single particle », qui va permettre de caractériser la nanoparticule et non l'élément total.

raisons, seules la nature, la taille, la distribution en taille et la concentration des nanoparticules sont le plus souvent mesurées. Plusieurs techniques permettent d'obtenir cette information, il n'y a pas de technique universelle mais plutôt des techniques complémentaires (Figure 5).

Si on recense les travaux effectués sur l'analyse des nanoparticules (Figure 6), plus d'un tiers d'entre eux décrivent des techniques permettant la caractérisation spécifique des nanoparticules. Les autres études utilisent généralement la teneur totale en élément. Par exemple, si c'est le dioxyde de titane que l'on veut caractériser, on se contente de mesurer la concentration totale en titane. Ces analyses élémentaires sont le plus souvent des méthodes spectrométriques<sup>11</sup>, et en particulier l'ICP-MS (« *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* »), qui est une technique très performante

en termes de sensibilité pour l'analyse élémentaire. C'est toutefois une technique destructive car l'échantillon est soumis à un plasma<sup>12</sup> d'argon à très haute température, et l'information concernant la taille n'est pas accessible dans les conditions normales d'utilisation de l'ICP-MS.

Parmi les techniques permettant de caractériser les nanoparticules et pas seulement l'élément qui la constitue, la microscopie occupe la première place, elle représente 36 % des applications (Figure 6). Des techniques séparatives comme l'A4F ou la chromatographie<sup>13</sup> sont citées, ainsi que la technique ICP-MS en mode particule unique ou « *single particle* », qui commence à gagner un certain nombre d'adeptes.

12. Plasma : état de la matière dans lequel elle est partiellement ou totalement ionisée.

13. Chromatographie : technique de séparation et d'analyse de substances basée sur la différence d'affinité des composés pour une phase mobile (liquide ou gazeuse) et une phase stationnaire (solide ou liquide).

11. Techniques spectrométriques : techniques d'analyse de la matière basées sur l'étude des spectres fournis par l'interaction entre la matière et un rayonnement (lumière, UV, rayon X).

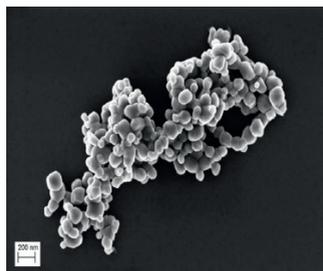


Figure 7

La microscopie électronique permet d'obtenir l'image des nanoparticules.

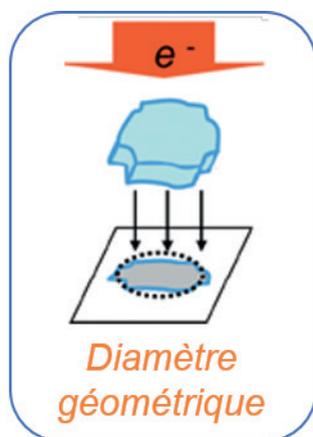


Figure 8

La microscopie électronique permet d'obtenir la projection de la nanoparticule étudiée.



Figure 9

La microscopie électronique reste la technique de référence.

### 3.2. Les techniques de microscopie électronique

Les techniques de microscopie électronique sont utilisées depuis longtemps pour mesurer la taille des nanoparticules. Deux catégories de microscopie électronique se distinguent, la Microscopie Électronique à Balayage (MEB) et la Microscopie Électronique en Transmission (MET). Ce qui différencie principalement ces deux techniques est que le MEB ne permet d'imager que la surface de l'échantillon alors que le MET peut visualiser la structure interne. Ces méthodes sont intéressantes car ce sont les seules qui permettent d'obtenir une image des nanoparticules (Figure 7) correspondant en fait au diamètre projeté de la particule (Figure 8). Ces méthodes nécessitent une étape de préparation d'échantillon qui peut être assez longue, notamment par MET. Il est également indispensable de sécher complètement l'échantillon, ce qui peut entraîner une agglomération des nanoparticules. Le diamètre (moyen, médian ou modal) est obtenu à partir de l'image et un traitement statistique à l'aide d'un logiciel de traitement d'image permet d'accéder à la distribution en taille des particules. Quand ces techniques sont associées à l'EDX (spectroscopie X à dispersion d'énergie), la composition chimique peut être connue. Les techniques de microscopie électronique sont essentielles car elles permettent une information précise sur la forme des nanoparticules et restent les techniques de référence (Figure 9) ; les inconvénients sont qu'elles sont coûteuses et que la durée d'analyse est longue.

### 3.3. Analyse par Fractionnement Flux-Force par Flux Asymétrique (A4F)

Afin d'analyser des nanoparticules de façon plus rapide et moins coûteuse qu'avec la microscopie électronique, d'autres techniques sont disponibles. L'une d'entre elles est l'A4F (« *Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation* »), qui permet de séparer les nanoparticules en fonction de leur taille. Cette méthode, contrairement à la chromatographie en phase liquide, ne dépend pas de l'interaction entre les analytes et les phases mobile et stationnaire. Avec l'A4F, la phase mobile n'a qu'un rôle de véhiculeur, la séparation des nanoparticules repose en théorie sur des interactions physiques entre l'échantillon et les forces appliquées. Son couplage à différents détecteurs permet de mesurer les paramètres permettant de caractériser les nanoparticules (Figure 10).

Après injection et application des flux, les nanoparticules les plus petites sont éluées les premières. Les détecteurs couplés en ligne peuvent être de différentes sortes (Figure 10) : le détecteur UV pour caractériser des nanoparticules organiques, le détecteur MALS est un granulomètre<sup>14</sup> qui donne une information sur la taille, et le détecteur ICP-MS qui permet d'accéder à la composition chimique de la nanoparticule ainsi qu'à leur concentration.

14 Granulomètre : appareil permettant de mesurer la taille de grains ou de particules et d'en étudier la forme.

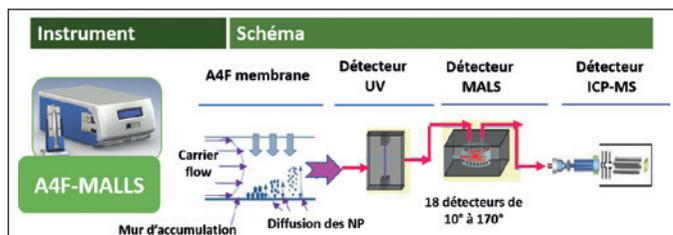


Figure 10

L'A4F-MALLS est constitué d'une membrane et d'une série de détecteurs (UV, MALS, ICP-MS) qui vont permettre d'obtenir des informations, notamment sur la taille, la composition et la concentration des nanoparticules.

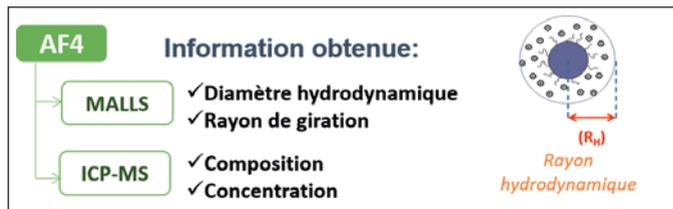


Figure 11

L'A4F-MALS permet de mesurer le rayon hydrodynamique de la nanoparticule, c'est-à-dire qu'on prend en compte à la fois la particule et son environnement.

L'information relative à taille obtenue est le diamètre hydrodynamique<sup>15</sup> (Figure 11), c'est-à-dire le diamètre de la particule avec son environnement chimique : si elle est solvatée, la taille de particule mesurée est plus importante puisqu'elle correspond au diamètre de la particule et de sa couche immédiate.

La technique A4F repose sur une bonne efficacité de la séparation des particules dans le flux. Elle permet d'analyser une large gamme de taille de particules, qu'elles soient organiques ou inorganiques. Elle présente quand même des inconvénients car des interactions particule-particule subsistent pendant la séparation ainsi que des interactions particule-membrane,

notamment pour les nanoparticules inorganiques. Par ailleurs, c'est une technique qui nécessite une bonne maîtrise pour en conclure les principaux résultats. Les données obtenues par les différents détecteurs donnent lieu à l'obtention de fractogrammes<sup>16</sup>, qui ne sont pas toujours faciles à interpréter pour un non-expert.

### 3.4. Principe de l'analyse par sp-ICP-MS

Pour les nanoparticules contenant un élément détectable par ICP-MS, la technique de choix est l'ICP-MS en mode particule unique ou « *single particle* » (Encart : « **Fonctionnement de l'ICP-MS en mode « single particle »** »). Elle repose sur la détection des particules une à une qui se distinguent du bruit

<sup>15</sup> Diamètre hydrodynamique : diamètre de la particule qui prend en compte son environnement chimique et mesure en plus du diamètre de la particule sa couche immédiate ou couche d'hydratation, couche formée par les molécules de solvant autour de la particule solvatée qui dépend du milieu.

<sup>16</sup> Fractogramme : les particules sont capables de diffracter la lumière incidente. Le fractogramme représente les raies de diffraction avec leur intensité et est spécifique à chaque type de particule.

## FONCTIONNEMENT DE L'ICP-MS EN MODE « SINGLE PARTICLE »

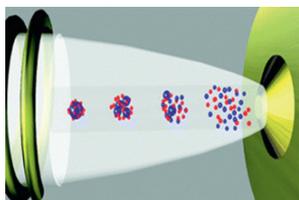


Figure 12

Même si elle est basée sur de nombreuses hypothèses, l'ICP-MS en mode « single particle » est une technique de plus en plus répandue. La première étape de l'ICP-MS est le passage dans un plasma qui dissocie l'amas de nanoparticules à analyser afin de pouvoir les analyser une par une.

Un des composants clés d'un ICP-MS est la torche à plasma (Figure 12). C'est un milieu entretenu d'argon chauffé à très haute température. Quand l'échantillon est introduit dans ce plasma sous forme d'aérosol, les éléments sont atomisés et ionisés. Ils sont ensuite détectés par spectrométrie de masse en fonction de leur rapport masse sur charge.

En mode « *single particle* », les particules vont produire un nuage d'ions de l'élément qui la compose dans le plasma (Figure 12) et lorsque ce nuage d'ions arrive dans le spectromètre de masse, le signal obtenu est plus intense qu'un signal provenant d'un analyte ionique. À chaque fois qu'une nanoparticule arrive au détecteur, son signal se distingue de celui du bruit de fond correspondant à la détection de l'élément ionique par une pulsation (Figure 13A). Par exemple, lorsque des particules de  $\text{TiO}_2$  sont analysées, du titane à l'état dissous est présent et est responsable du bruit de fond. Il est nécessaire de minimiser ce bruit de fond pour mieux distinguer les nanoparticules.

Les signaux qui se distinguent du bruit de fond (Figure 13A) sont ensuite traités par un logiciel spécifique qui est maintenant disponible chez tous les constructeurs d'ICP-MS. Ce traitement permet d'obtenir la fréquence des particules en fonction de leur taille (Figure 13B). Si une seule population de nanoparticules est présente, une distribution gaussienne est obtenue et les informations qui peuvent être acquises sont le diamètre équivalent sphérique (diamètres moyen, médian, modal), la distribution en taille et la concentration des nanoparticules. Il est également possible d'accéder à la teneur en élément dissous.

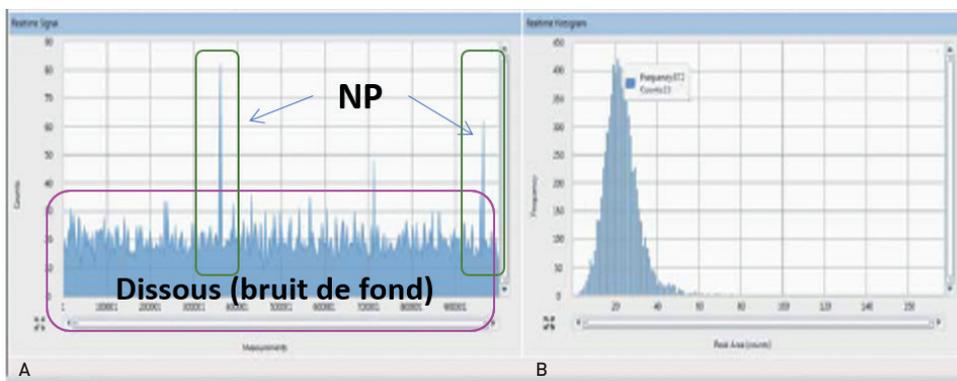


Figure 13

A) La détection d'une nanoparticule se visualise par l'apparition d'un signal qui se distingue du bruit de fond (élément sous forme ionique). Ces signaux sont d'autant plus visibles que le bruit de fond est atténué ;  
B) cette méthode permet d'obtenir la distribution en taille des nanoparticules et d'en déduire les diamètres équivalents sphériques (moyen, médian et modal).

de fond (**Figures 12 et 13**). Le mode « *single particle* » ne peut être utilisé qu'avec les ICP-MS de nouvelle génération qui permettent d'appliquer un temps de mesure (« *dwell time* ») rapide afin de pouvoir détecter la nanoparticule quand elle arrive au détecteur. Il est nécessaire de diluer l'échantillon afin d'éviter l'analyse simultanée de plusieurs particules. Le traitement des données est basé sur l'hypothèse que toutes les particules sont sphériques.

Les principaux avantages de la technique sp-ICP-MS sont sa simplicité d'utilisation, sa rapidité, sa sensibilité et sa spécificité. Elle ne peut toutefois être appliquée qu'à des nanoparticules qui contiennent un élément détectable par ICP-MS. Elle est donc limitée aux nanoparticules inorganiques.

Les limites de détection en termes de taille sont différentes selon les nanoparticules ; la sensibilité en taille est meilleure pour les nanoparticules de dioxyde de titane, d'or ou d'argent que pour celles de silice. En effet, le silicium est un élément interféré en ICP-MS, ce qui engendre des limites de détection élevées avec un ICP-MS quadripolaire. Ces interférences peuvent être éliminées en utilisant un ICP-MS haute résolution.

## 4 Analyse des nanoparticules dans les produits du quotidien

### 4.1. Préparation de l'échantillon

Quelle que soit la technique utilisée, il est nécessaire de préparer l'échantillon au

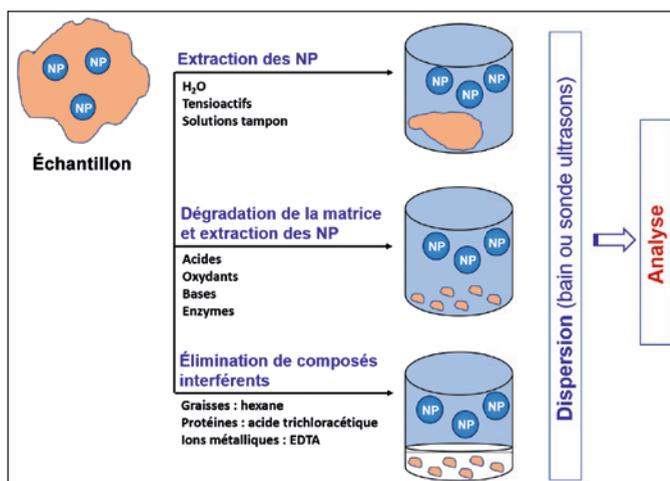


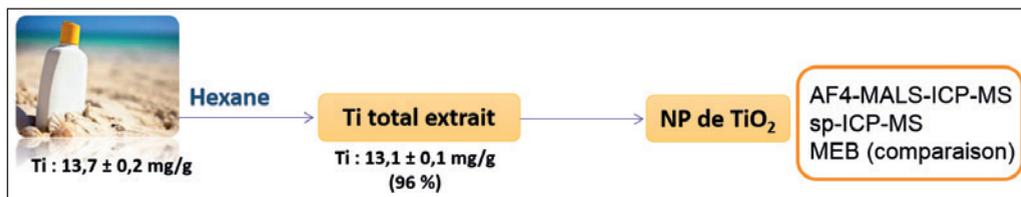
Figure 14

La préparation de l'échantillon dépend de la matrice dans laquelle sont présentes les nanoparticules. On peut solubiliser les nanoparticules ou bien les extraire en dégradant la matrice pour libérer les nanoparticules. Les extraits peuvent nécessiter une étape de purification permettant d'éliminer les composés interférents avec la technique d'analyse.

préalable. S'il s'agit d'un échantillon solide, il faut extraire les nanoparticules de la matrice le plus efficacement possible sans les dénaturer. Il est également indispensable ensuite de disperser les nanoparticules extraites. Ces étapes sont primordiales et des protocoles normalisés ne sont pas encore disponibles.

Les nanoparticules dans les produits sucrés (bonbon ou chewing-gum) sont généralement faciles à extraire. Dans ces échantillons, les nanoparticules sont souvent présentes dans le revêtement pour leur donner un aspect brillant, qui est soluble dans l'eau. Le résidu solide est éliminé et l'extrait aqueux est récupéré. Il constitue une matrice simple à analyser après dispersion (**Figure 14**).

La préparation d'échantillon est plus complexe lorsqu'on a une matrice composite, par exemple une crème solaire qui contient des produits gras. Il faut donc les détruire et libérer les nanoparticules. Des réactifs d'extraction autres que l'eau sont utilisés afin de



**Figure 15**

L'échantillon de crème solaire est extrait avec de l'hexane et les teneurs de titane avant et après extraction sont mesurées. Plusieurs techniques (A4F-MALS-ICP-MS, sp-ICP-MS et MEB) vont ensuite permettre de vérifier la présence de nanoparticules (NP).

dégrader ces matrices comme des solvants organiques, des acides plus ou moins dilués, des oxydants, des bases, ou parfois, pour des échantillons biologiques, des enzymes capables de dénaturer les protéines qui engagent les nanoparticules (**Figure 14**).

Une fois l'extraction réalisée, il peut être nécessaire de purifier l'extrait afin d'éliminer des composants qui peuvent perturber l'analyse (**Figure 14**). Par exemple, si l'extrait contient encore des produits gras, une étape de dégraissage avec de l'hexane peut être réalisée avant la dispersion. Si des protéines subsistent, on peut les dégrader avec l'acide trichloracétique. Si des ions métalliques doivent être éliminés, il est possible de les complexer avec de l'EDTA. Quel que soit le protocole de préparation de l'échantillon, il est nécessaire de réaliser une étape de dispersion<sup>17</sup> pour éviter que ces nanoparticules ne s'agglomèrent ou ne s'agrègent dans l'extrait avant l'analyse. La dispersion se fait avec un bain à ultrasons ou une sonde à ultrasons.

L'analyse par les techniques présentées auparavant peut ensuite être réalisée.

17. Dispersion : étape dans la préparation de l'échantillon consistant à séparer les nanoparticules qui se sont agglomérées.

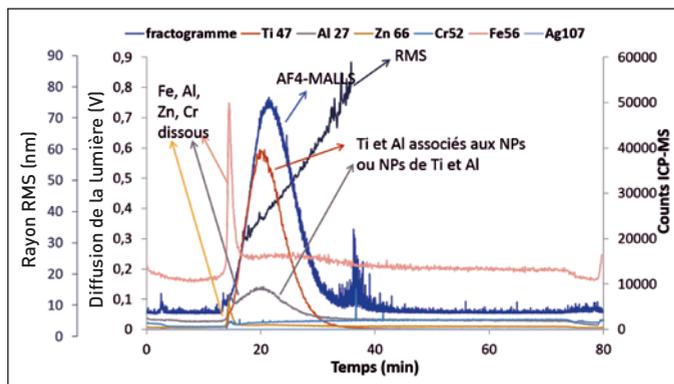
#### 4.2. Un exemple concret : l'analyse d'une crème solaire

Un protocole d'analyse d'un échantillon de crème solaire dont la présence de nanoparticules de dioxyde de titane est indiquée dans la liste des ingrédients avec la mention [nano] est proposé.

La teneur en titane total a tout d'abord été mesurée, elle est voisine de 14 mg par gramme. Afin d'accéder à la caractérisation des nanoparticules, une extraction a été réalisée en utilisant de l'hexane pour dégrader la matière grasse. La concentration en titane total a été mesurée dans la solution afin de s'assurer que la totalité du titane a été extraite. La comparaison de cette concentration avec celle du titane contenu dans la crème solaire montre qu'elles sont très proches, le taux de recouvrement étant de 96 %.

Afin de caractériser les nanoparticules extraites, trois techniques ont été comparées : le couplage A4F-MALS-ICP-MS, l'ICP-MS en mode « *single particle* » et la microscopie électronique (**Figure 15**).

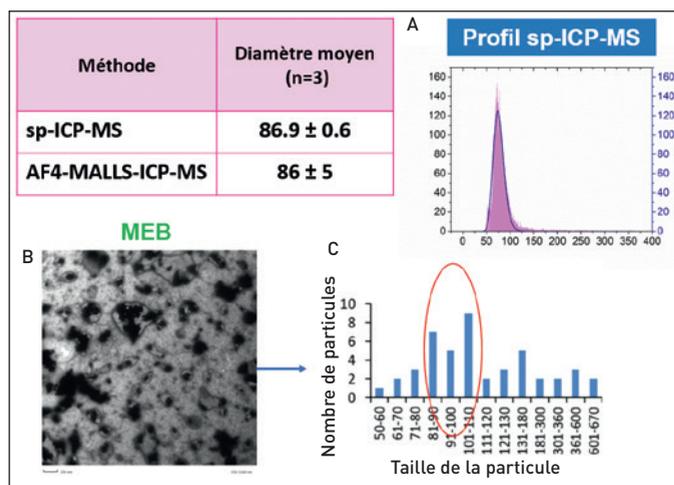
La **Figure 16** montre le fractogramme obtenu par A4F-MALS-ICP-MS. La courbe bleue correspond au détecteur MALS et le pic obtenu montre la présence d'une seule population de nanoparticules. Le signal correspondant


**Figure 16**

Les nanoparticules de l'échantillon contiennent du  $TiO_2$  et de l'aluminium car le signal du granulomètre (bleu) se superpose aux signaux du titane (orange foncé) et de l'aluminium (gris).

au détecteur ICP-MS pour le titane (courbe orange foncé) se superpose complètement à celui du détecteur MALS montrant que ce pic correspond très probablement à des nanoparticules de  $TiO_2$ . D'autres éléments peuvent être analysés par ICP-MS pendant la séparation comme ici l'aluminium, le zinc, le chrome, le fer ou l'argent. Le signal de l'aluminium (courbe grise) se superpose également à ce même pic, démontrant que du titane et de l'aluminium sont soit associés aux nanoparticules, soit ces deux éléments entrent dans la composition des nanoparticules.

Le diamètre moyen des nanoparticules dans l'échantillon de crème solaire par la technique A4F-MALS-ICP-MS est proche de 86 nm. Cet échantillon a également été analysé par ICP-MS « *single particle* » et le diamètre moyen mesuré est voisin de 87 nm (Figure 17A). Ces deux résultats sont très proches et la microscopie a permis d'obtenir des diamètres équivalents (Figure 17B). La cohérence des résultats permet de valider la technique la plus récente comme l'ICP-MS en mode « *single particle* » (Figure 17C).


**Figure 17**

Les différentes techniques de mesure : A) A4F-MALLS-ICP-MS ; B) microscopie électronique ; C) ICP-MS en mode « *single particle* », donnent des résultats équivalents pour le diamètre moyen. Cela permet de valider les techniques les plus récentes comme l'ICP-MS en mode « *single particle* ».

Figure 18

Différents produits alimentaires du quotidien (chewing-gums, dragées, aromates, sauces et boissons) ont été testés afin de vérifier si l'obligation d'étiquetage est suivie.

| Echantillons analysés     |                    |
|---------------------------|--------------------|
| Confiserie                | Chewing-gum 1      |
|                           | Chewing-gum 2      |
|                           | Dragées            |
| Complément alimentaire    | CA 1 (comprimés)   |
|                           | CA 2 (comprimés)   |
| Aromates                  | Poivre doré        |
| Sauces, boissons          | Sauce "fast-food"  |
|                           | Sirop aromatisé    |
| Additifs TiO <sub>2</sub> | Additif 1 (poudre) |
|                           | Additif 2 (poudre) |
|                           | Additif 3 (poudre) |
|                           | Additif 4 (pâte)   |



**Objectifs:**

**Le produit est-il bien étiqueté ?**

- Présence de particules ?
- Composition des particules ?
- Particules « nano » ?

Quelle distribution ?



#### 4.3. Analyse de produits alimentaires

Dans le cadre d'une collaboration avec le Service Commun des Laboratoires (SCL-Pessac) de la Direction générale des douanes et droits indirects (DGCCRF) et de la Direction générale des douanes et droits indirects (DGDDI), une étude a été menée sur l'analyse de nanoparticules de dioxyde de titane d'un grand nombre d'échantillons alimentaires disponibles sur le marché. Il s'agit de produits sucrés (dragées et chewing-gum), des compléments alimentaires, un aromate (le poivre doré), des sauces et des boissons,

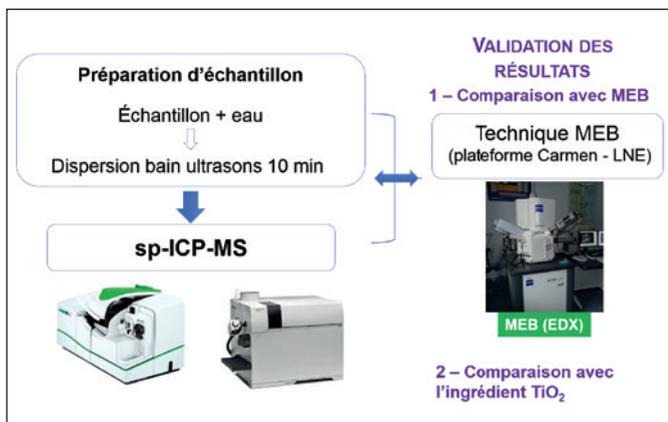
ainsi que certains additifs utilisés dans la fabrication de ces produits (Figure 18).

Les objectifs de cette étude étaient multiples : est-ce que le produit est bien étiqueté ? Contient-il des particules ? Quelle est leur composition ? Est-ce qu'elles sont nano ou pas ? Quelle est leur distribution ?

Dans la mesure où un grand nombre d'échantillons devait être analysé, la préparation de l'échantillon a consisté en une extraction avec de l'eau, suivie d'une étape de dispersion. La méthode d'analyse retenue est l'ICP-MS en mode « *single particle* » car c'est la

Figure 19

Les échantillons sont analysés par ICP-MS en mode « *single particle* » après mise en suspension des particules dans l'eau. Les résultats sont validés par microscopie électronique et sont comparés avec ceux de l'additif E171 utilisé comme ingrédient dans la fabrication du produit.



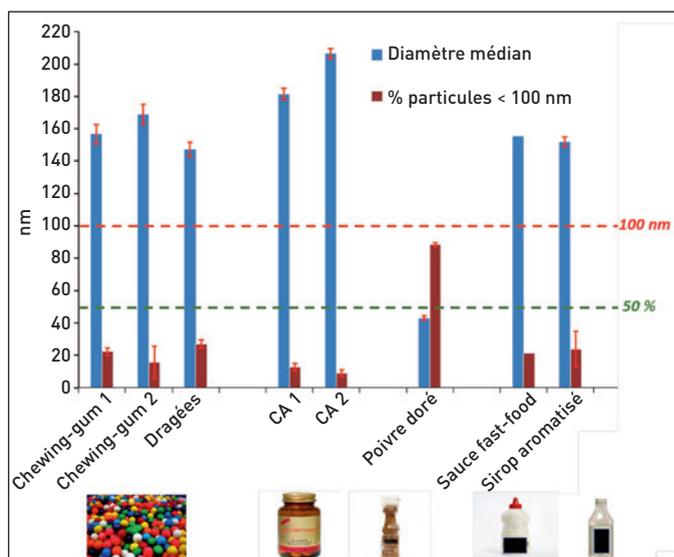


Figure 20

Les analyses des confiseries, sauces, boissons et aromates montrent que tous contiennent des particules de dioxyde de titane dont la taille est comprise entre 40 et 200 nm.

méthode la plus simple et la moins coûteuse de mise en œuvre. Certains résultats ont été validés par comparaison avec les informations obtenues par microscopie électronique (Figure 19) en partenariat avec la plateforme Carmen du Laboratoire National d'Essai (LNE). Quand cela était possible, les diamètres des particules de  $\text{TiO}_2$  trouvées dans les produits alimentaires ont été comparés avec ceux de l'ingrédient E171 utilisé dans la fabrication du produit.

Les résultats obtenus pour certains échantillons sont présentés sur la Figure 20. Des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  ont été détectées dans tous les produits étudiés avec des diamètres médians compris entre 40 et 200 nm. C'est le poivre doré qui présente les particules les plus fines, tous les autres produits ayant un diamètre médian supérieur à

100 nm. Le taux de particules ayant un diamètre inférieur à 100 nm est autour de 20 % pour tous les échantillons sauf le poivre doré qui présente un taux plus élevé (proche de 80 %). Si le seuil de 10 % est considéré, comme c'est souvent le cas pour les nanoparticules dans l'agroalimentaire, il y a obligation d'étiquetage pour l'ensemble des échantillons étudiés.

De façon générale, un très bon accord a été obtenu entre la technique ICP-MS en mode « *single particle* » et la microscopie pour l'ensemble des échantillons, aussi bien pour le diamètre (moyen, médian modal) que pour le taux de particules ayant une taille inférieure à 100 nm. Il en est de même pour les diamètres des particules de  $\text{TiO}_2$  dans les produits et dans l'ingrédient E171 de base.

## Vers la maîtrise de la connaissance des nanoparticules dans les produits du quotidien

Cette présentation a permis de montrer que les nanoparticules sont présentes dans un grand nombre de produits du quotidien. Si l'on s'intéresse aux nanoparticules de dioxyde de titane, il s'agit d'une utilisation industrielle ancienne bien avant qu'elle ne soit recherchée. Elle est en effet depuis longtemps signalée sur les étiquettes par la mention EXXX mais doit maintenant être complétée par la mention [nano].

Il est nécessaire d'augmenter la connaissance sur la toxicité des différentes nanoparticules afin de proposer une réglementation qui soit sans ambiguïté à la fois pour les industriels et les consommateurs. Les outils analytiques permettant de détecter et caractériser les nanoparticules sont maintenant performants en termes de sensibilité et de spécificité, rapides et de moins en moins coûteux. Leur utilisation dans les études de toxicité devrait permettre d'augmenter les connaissances sur l'évaluation du risque. Par ailleurs, il est actuellement possible de mener des études à grande échelle grâce à certaines techniques comme l'ICP-MS en mode « *single particle* » qui peuvent être utilisées en routine. Pour augmenter la traçabilité des données, il va être nécessaire de proposer des méthodes normalisées, produire des matériaux de référence pour valider les analyses et organiser des essais inter-laboratoires.