



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Caracterización de nanopartículas metálicas por
cromatografía hidrodinámica

Characterization of metallic nanoparticles by
hydrodynamic chromatography

Autor:

Mariam Bakir Laso

Director:

María Sierra Jiménez García-Alcalá

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
Laboratorios GEAS
Zaragoza, junio 2017

ÍNDICE

Resumen

1. Introducción.....	1
1.1 Caracterización de nanopartículas mediante espectroscopia de absorción molecular UV-VIS	2
1.2 Caracterización de nanopartículas mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente	2
1.3 Cromatografía hidrodinámica	2
2. Objetivos y planteamiento del trabajo	4
3. Resultados y discusión	5
3.1 Caracterización de las nanopartículas	5
3.1.1 EAM UV-VIS	5
3.1.2 Caracterización de la concentración de AuNPs por ICP-MS.....	6
3.2 Optimización de la fase móvil para la caracterización de las AuNPs por HDC	9
3.2.1 Fase móvil 1	9
3.2.2 Fase móvil 2	12
3.2.3 Fase móvil 3	13
3.2.4 Fase móvil 4	14
3.2.5 Fase móvil 5	15
4. Parte experimental.....	19
4.1 Instrumentación: Aparatos y materiales	19
4.1.1 Instrumentación	19
4.1.2 Aparatos	19
4.1.3 Materiales.....	19
4.2 Reactivos y disoluciones	19
4.2.1 Patrones:	19
4.2.2 Reactivos:	20
4.3 Procedimientos	20
4.3.1 Caracterización de NPs mediante EAM-UV-Vis.	20
4.3.2 Determinación de la concentración elemental de patrones de AuNPs mediante ICP-MS.....	20
4.3.3 Separación de AuNPs mediante HDC.	21
5. Conclusiones.....	23
6. Bibliografía	24

Anexos

Resumen

Debido a distintas propiedades de las nanopartículas de oro (AuNPs), se ha producido un aumento en el uso de estas en medicina, electrónica, catálisis o células solares. Por ello, se hace necesario su estudio y caracterización. Se han desarrollado numerosas técnicas y métodos analíticos para ello y en este trabajo se ha utilizado la espectroscopía de absorción molecular UV-VIS (EAM UV-VIS) para la caracterización de distintos tamaños de AuNPs (10 nm, 50 nm y 100 nm), estudiando además la estabilidad de estas a lo largo de un tiempo. También se ha determinado la concentración total de oro en patrones de 10 nm, 50 nm y 100 nm de AuNPs mediante espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) y se ha realizado un tratamiento estadístico de los resultados obtenidos. Además se ha realizado la separación de las AuNPs mediante cromatografía hidrodinámica (HDC) con detección UV-VIS, optimizando distintas fases móviles, considerando, para ello, parámetros analíticos, cromatográficos y valores de recuperación.

Summary

Because of the diverse properties of the gold nanoparticles (AuNPs), there has been an increase in the use of them in medicine, electronic, catalysis or solar cells. Because of that, their study and characterization are necessary. A lot of techniques and analytical methods have been development for that and in this work UV-VIS molecular absorption spectrometry (EAM UV-VIS) has been used for the characterization of several sizes of AuNPs (10 nm, 50 nm and 100 nm), studying their stability over a period of time. Also, the total concentration of gold standards of 10 nm, 50 nm and 100 nm of AuNPs have been determinate by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and a statistical treatment of the results has been done. Moreover, the separation of AuNPs has been done by hydrodynamic chromatography (HDC) with UV-VIS detection. Several mobile phases have been optimized, considering for this purpose, analytical, chromatographic parameters and recovery values.

1. Introducción

Los nanomateriales se definen como “un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 10 nm. En casos específicos y cuando se justifique por preocupaciones de medio ambiente, salud, seguridad o competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50% puede sustituirse por un umbral comprendido entre el 1% y el 50%” [1].

Debido al tamaño de partícula, los nanomateriales poseen propiedades mecánicas, catalíticas y ópticas únicas [2]. Por ello, se está produciendo una expansión de la industria nanotecnológica, obteniendo como resultado un gran número de posibilidades en aplicaciones para productos de consumo diario.

Hay un largo listado de productos cuya composición se basa en nanopartículas. Muchos de ellos contienen plata, titanio, nanopartículas basadas en carbono (carbono, nanotubos de carbono, fullereno, grafeno), titanio, sílice, zinc y oro [3].

Una de las nanopartículas más utilizadas son las nanopartículas de oro (AuNPs), que han sido explotadas en numerosos campos, como en la medicina, en donde han sido utilizadas como herramientas biológicas durante los últimos quince años. Su tamaño extremadamente pequeño y una gran superficie permite acceder a una gran variedad de entornos biológicos. Además, debido a su biocompatibilidad universal, las AuNPs son prometedoras para ser utilizadas como vehículos para el transporte de fármacos y genes. También se están estudiando como aplicación para el diagnóstico del cáncer y para aplicaciones terapéuticas [4]. Además se pueden utilizar como transistores, sensores químicos, dispositivos ópticos y electroquímicos [5]. También tiene aplicaciones en los campos de la catálisis y células solares [6].

Debido al aumento en la producción de nanomateriales, se han encontrado en plantas de tratamiento de aguas residuales, donde probablemente se introducirán en lodos. La eliminación de estos lodos de depuradora, que incluyen la aplicación de la tierra y la incineración, probablemente dará lugar a exposiciones ambientales y humanas [7]. Debido a ello, se requiere conocer el impacto y la toxicidad que producen en el medio ambiente y en la salud humana. Por ello es importante su detección y caracterización. Los parámetros clave que requieren la medición incluyen el tamaño de partícula (y su distribución), la concentración de masa, la concentración del número de partículas, el potencial superficial, el área superficial, la morfología de las partículas y la composición química prevista [8].

Se han desarrollado numerosos métodos y técnicas analíticas para su caracterización en distintas muestras complejas. Para la distribución del tamaño se utilizan técnicas microscópicas, como la microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de forma atómica (AFM); técnicas estáticas y dinámicas de dispersión de la luz (DLS y SLS) y espectroscopia de absorción molecular UV-Vis (EAM-UV-Vis) . Como técnicas de separación se emplean fraccionamiento en flujo mediante campos (FFF), cromatografía de exclusión (SEC), cromatografía líquida, cromatografía de alta resolución

(HPLC), electroforesis capilar (CE) y en gel (GE), espectroscopia de iones móviles y cromatografía hidrodinámica (HDC); para obtener la concentración de NPs se utilizan técnicas de espectroscopia atómica como la espectroscopía de absorción atómica electrotermica (ETAAS), espectroscopia de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) [9]. En este trabajo se van a utilizar para su caracterización HDC, ICP-MS y EAM-UV-Vis.

1.1 Caracterización de nanopartículas mediante espectroscopia de absorción molecular UV-Vis

Se puede utilizar la espectroscopia de absorción molecular UV-Vis para la caracterización de nanopartículas de oro.

Dependiendo del tamaño de nanopartícula, absorberá a distintas longitudes de onda, si las partículas tienen un tamaño menor de 100 nm, serán de un color rojo intenso, absorbiendo en el rango de 520-560 nm, y para partículas más grandes el color será amarillento, absorbiendo en el rango de 390-410 nm [10], [11].

La absorbancia en este rango de longitudes de onda se debe a su interacción con la luz. En presencia del campo electromagnético oscilante de la luz, los electrones libres de las nanopartículas metálicas experimentan una oscilación con respecto a la red metálica. Este proceso se denomina resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) [12], [13].

1.2 Caracterización de nanopartículas mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente proporciona información cuantitativa de los elementos presentes en la muestra. Esta técnica es una de las más utilizadas para el análisis cuantitativo debido a su bajo límite de detección, que es del orden de ng L^{-1} . También se utiliza para la caracterización de tamaño, concentración en masa y concentración en número de partículas mediante la denominada técnica de detección individual de partículas (SP-ICP-MS) [9]. En combinación con otras técnicas de separación se usa para la caracterización de otros parámetros de las NPs [9], [14], [15].

1.3 Cromatografía hidrodinámica

La cromatografía hidrodinámica fue descrita por primera vez hace cuarenta y dos años y se ha desarrollado hasta ser utilizada en numerosos instrumentos comerciales [16].

Es una técnica analítica que se basa en la separación de partículas en función del tamaño de éstas o de su masa molar, independientemente del tipo de partícula y su densidad.

En esta cromatografía se utiliza una columna que está empaquetada con partículas esféricas no porosas (microesferas de poliestireno o sílice). Este tipo de columna limita la interacción con la fase móvil y la muestra, lo que permite analizar muestras medioambientales sin perturbaciones. Además la preparación de muestra es mínima [7], [17]–[19].

La separación de partículas se consigue gracias a los gradientes de velocidad, que se desarrollan dentro de los capilares entre las esferas de relleno. Las partículas más grandes eluyen más rápidamente debido a que tienen coeficientes de difusión más pequeños, por lo que difunden más lejos en los capilares, donde el flujo laminar provoca que la elución sea más rápida [7], [15], [20].

Esta técnica se caracteriza por una gran flexibilidad y robustez, lo que es una ventaja respecto a otras técnicas de separación, como son el FFF, en la que podemos tener interacciones con la membrana [15], [20], o la SEC, que posee un limitado poder de separación [15], [20], siendo además rápida [16], permitiendo separar partículas complejas y en matrices pesadas, aunque con una pobre resolución [21], [22].

Se ha estudiado el uso de distintos detectores como: ICP-MS, DLS, UV-Vis y fluorescencia acoplados al HDC. La combinación de detectores de ICP-MS, UV-Vis y fluorescencia han sido útiles en el análisis de nanopartículas de Ag, TiO_2 y ZnO en aguas artificiales con altos contenidos de materia orgánica [23]. Otros métodos de detección incluyen la detección por conteo de partículas mediante dispersión láser, dispersión de luz multi-ángulo y viscosimetría [20], [23].

En cuanto a aplicaciones medioambientales, HDC en combinación con distintas técnicas de detección, permite la identificación de diferentes partículas naturales y artificiales, como: TiO_2 , SiO_2 , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , Ag y Au en sobrenadantes de lodos de depuradoras [14], [15]; nanopartículas de plata en aguas de ríos naturales [17], [24] y en aguas superficiales artificiales o la caracterización de nanopartículas de TiO_2 y ZnO que podemos encontrar en cremas solares [23].

En la mayoría de los trabajos publicados en la bibliografía se ha utilizado el mismo tipo de fase móvil, que incluye el uso de surfactantes iónicos, como SDS, y no iónicos, como Tritón X-100 o Brij-35, que estabilizan la muestra, cubriendo la superficie de las partículas, previniendo la aglomeración y mejorando así la recuperación. Se suele añadir un tampón, como el Na_2HPO_4 , para ajustar la fuerza iónica y el pH. Se ha demostrado que una alta fuerza iónica provoca que las interacciones electrostáticas entre partículas y la superficie de la columna no se puedan despreciar y que la eficiencia de separación sea baja [23]. Además es frecuente añadir a la fase móvil formaldehído [7], [8], [14], [15], [19], [20], [23], [25].

El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización de distintos patrones de AuNPs mediante EAM UV-Vis, la determinación del contenido total de Au en los patrones de AuNPs por ICP-MS y finalmente el estudio de la influencia de la composición de la fase móvil en la caracterización y separación de estas AuNPs utilizando HDC.

2. Objetivos y planteamiento del trabajo

El objetivo fundamental de este trabajo es la caracterización de las AuNPs mediante tres técnicas: EAM UV-VIS, HDC y ICP-MS.

Los objetivos específicos para llevar a cabo el objetivo general son:

- Búsqueda, estudio y comparación de antecedentes bibliográficos relacionados con la caracterización de NPs por EAM UV-VIS, ICP-MS y HDC.
- Caracterización de AuNPs por EAM UV-VIS y estudio de su estabilidad a lo largo del tiempo.
- Determinación de la concentración de tres patrones de AuNPs con tamaños de 10, 50 y 100 nm mediante ICP-MS. Valoración y tratamiento estadístico de los resultados obtenidos.
- Caracterización de AuNPs mediante HDC con detección UV-VIS. Valoración y optimización de distintas fases móviles para la separación de AuNPs de 10, 50 y 100 nm en base a:
 - Parámetros cromatográficos
 - Parámetros analíticos.

3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización de las nanopartículas

3.1.1 EAM UV-VIS

Las AuNPs absorben en el rango de 510-570 nm debido a la resonancia del plasmón de superficie localizada. A medida que se aumenta el tamaño de partícula, el máximo se desplaza a longitudes de onda mayores.

Para caracterizar las AuNPs por EAM UV-VIS se realizaron los espectros mediante el procedimiento descrito en el apartado 4.3.1.

Se hizo una primera medida y pasados cinco días se volvió a medir las mismas disoluciones para observar la estabilidad.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.1 y la tabla 3.1 donde se muestra la longitud de onda del máximo, así como los valores de absorbancia.

Figura 3.1. Espectros de absorción. AuNPs (5 mg L^{-1}) (a) AuNPs primer día (b) AuNPs pasados cinco días

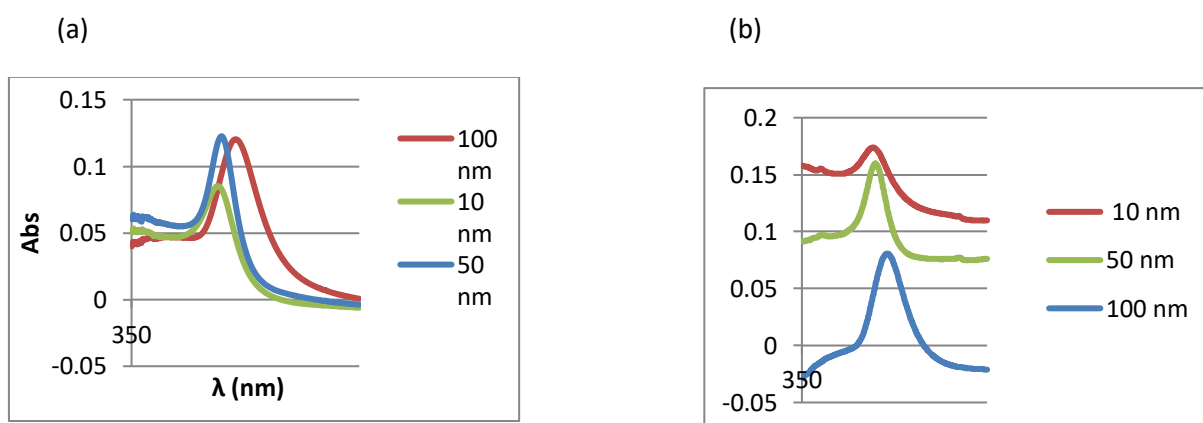


Tabla 3.1. λ del máximo y valores de absorción en los espectros obtenidos por EAM para los distintos tamaños de partícula (a) AuNPs primer día (b) AuNPs pasados cinco días

(a)

Tamaño de partícula (nm)	λ (nm)	Máx. Abs
10	520	0,0852
50	528	0,122
100	555	0,120

(b)

Tamaño de partícula (nm)	λ (nm)	Máx. Abs
10	524	0,174
50	529	0,159
100	556	0,0806

Se observa que para las disoluciones de 10 nm y de 50 nm se produce un aumento tanto de λ como de absorbancia, lo que puede ser debido a una posible aglomeración en las NPs, mientras que en la de 100 nm el máximo de absorbancia disminuye. Por tanto, para todos los tamaños se observa una cierta inestabilidad al realizarse una dilución de los patrones originales.

3.1.2 Caracterización de la concentración de AuNPs por ICP-MS

Se procedió a la determinación de la concentración de AuNPs por ICP-MS aplicando el método descrito en el Apartado 4.3.2.

Se realizaron medidas sin patrón interno y con patrón interno, usando Rh como patrón interno.

En la Tabla 3.2 se muestra la recta de calibrado ponderada sin patrón interno:

Tabla 3.2. Recta de calibrado ponderada para ICP-MS sin patrón interno

Analito	Recta de calibrado	Coefficiente correlación	s pendiente	DSR pendiente	s ordenada en el origen	DSR ordenada
Au	$Y=5859,9x-11133$	0,9991	166,94	2,85	26751	41,62

En la Tabla 3.3 se muestran los parámetros analíticos de límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y rango lineal (RL).

Tabla 3.3. Parámetros analíticos para ICP-MS. Límite de detección, límite de cuantificación y rango lineal.

LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RL ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2,74	9,14	Hasta 250

En la Tabla 3.4 se muestra la recta de calibrado ponderada con patrón interno:

Tabla 3.4. Recta de calibrado ponderada para ICP-MS con patrón interno

Analito	Recta de calibrado	Coefficiente correlación	s pendiente	DSR pendiente	s ordenada en el origen	DSR ordenada
Au	$Y=0,0221x-0,1223$	1	0	0	0	0

En la Tabla 3.5 se muestran los resultados obtenidos para las concentraciones de las muestras al utilizar la calibración con y sin patrón interno. También se muestran las concentraciones teóricas de acuerdo a los valores certificados presentados por el fabricante y las disoluciones realizadas que se explican en el apartado 4.3.2.

Se han medido dos muestras para cada tamaño de AuNPs y para cada muestra se han realizado cinco réplicas. También se presentan los valores de DSR (%) del instrumento.

Tabla 3.5. Concentraciones de AuNPs obtenidas por ICP-MS. (a) Concentraciones sin patrón interno. (b) Concentraciones con patrón interno.

(a)

Muestra	Concentración medida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DSR instr(%)	Concentración teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)
10 nm	122,8	2,8	127,2
	118,9	1,6	128,3
50 nm	122,0	3,9	127,4
	112,0	1,0	128,3
100 nm	120,9	2,5	125,7
	108,1	4,0	124,7

(b)

Muestra	Concentración medida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DSR instr (%)	Concentración teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)
10 nm	87,51	5,7	127,2
	82,59	2,8	128,3
50 nm	84,57	5,3	127,4
	78,57	2,5	128,3
100 nm	80,45	2,4	125,7
	71,64	3,4	124,7

La desviación estándar de la recta (tabla 3.4) es mejor para calibración con patrón interno que para la calibración sin patrón interno. Sin embargo, como se observa en la tabla 3.5 (b), los resultados obtenidos usando patrón interno, difieren bastante de la concentración teórica esperada para los tres tamaños de AuNPs. Ello puede ser debido a que los valores de intensidad del patrón interno en las muestras fue bastante diferente con respecto a los valores de intensidad del patrón interno en los patrones de la recta de calibrado. Por lo tanto en este caso, la calibración con patrón interno no fue adecuada y el patrón interno no cumple su función de corregir los efectos de deriva de la señal y posible imprecisión.

Para comprobar si hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos sin PI y la concentración teórica se realiza un test T. La hipótesis nula es que no hay diferencias significativas entre los valores de concentración calculada y la medida en el ICP-MS. Se calcula el valor de t, al 95% de confianza con dos grados de libertad, y se compara con el valor de t crítico que aparece en tabulado en tablas. En la tabla 3.6 se muestran los valores para el estadístico t.

Tabla 3.6. Valor del t estadístico calculado y crítico.

Muestra	t calculado	t crítico
10 nm	3,35	4,30
50 nm	2,25	4,30
100 nm	1,66	4,30

El t estadístico calculado es menor en todos los casos que el t estadístico crítico por lo que se cumple la hipótesis nula de que los resultados no presentan diferencias significativas entre la concentración calculada y la obtenida con el ICP-MS. Podemos decir que no hay errores sistemáticos.

Como se han medido dos muestras distintas para cada tamaño y para cada muestra se han realizado cinco réplicas, procedemos a calcular la incertidumbre total y las incertidumbres asociadas a cada uno de los procesos realizados: preparación de la muestra, medida o instrumental y de la interpolación o calibración. Para ello primero se calcula la incertidumbre del instrumento. Se hace un promedio de las incertidumbres obtenidas con el instrumento. Se trabaja siempre con valores de varianza, que se obtienen elevando al cuadrado el valor de la DSR. Además se tiene en cuenta que se han hecho 5 réplicas, por lo que las incertidumbres se han de multiplicar por 4, que son los grados de libertad. En la tabla 3.7 se muestran los resultados de la incertidumbre debida al instrumento.

Tabla 3.7. Resultados obtenidos para la incertidumbre debida al instrumento.

Muestra	Media de la concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DSR _{ins} (%)
10 nm	120,8	2,04
50 nm	117,0	2,54
100 nm	114,5	2,98

Para calcular la incertidumbre debido a la preparación de la muestra, se resta a la incertidumbre estándar obtenida de la medida de las dos réplicas la incertidumbre del instrumento, obtenida anteriormente, según la fórmula: $RSD_{\text{prep}} = \sqrt{RSD_{\text{med}}^2 - RSD_{\text{instr}}^2 / 3}$. Los resultados de la incertidumbre de medida y de la incertidumbre de la preparación de la muestra se muestran en la tabla 3.8.

Tabla 3.8. Resultados obtenidos en la incertidumbre debida a la medida y a la preparación de la muestra.

Muestra	Media de la concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	s	DSR _{med} (%)	DSR _{prep} (%)
10 nm	120,8	2,76	2,28	1,02
50 nm	117,0	7,07	6,04	5,48
100 nm	114,5	9,05	7,90	7,32

Posteriormente calcularemos la incertidumbre debido a la calibración para cada tamaño mediante la ecuación de Miller (plantilla Excel utilizada en el tercer curso). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Resultados obtenidos para la incertidumbre debido a la calibración.

Muestra	Media de la concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DSR _{cali} (%)
10 nm	120,8	2,39
50 nm	117,0	2,43
100 nm	114,5	2,48

Por último calculamos la incertidumbre total como la raíz cuadrada de la suma de todas las incertidumbres al cuadrado. Los resultados obtenidos para todas las incertidumbres se muestran en la tabla 3.10.

Tabla 3.10. Contribución de las incertidumbres.

Muestra	DSR _{ins} (%)	DSR _{prep} (%)	DSR _{cali} (%)	DSR total (%)
10 nm	2,04	1,02	2,39	3,30
50 nm	2,54	5,48	2,43	6,51
100 nm	2,98	7,32	2,48	8,28

3.2 Optimización de la fase móvil para la caracterización de las AuNPs por HDC

Para la caracterización de AuNPs mediante HDC se partió de la fase móvil más utilizada en la bibliografía [7], [15], [20], [23] y recomendada por la casa comercial que suministra la columna. La fase móvil consiste en 0,5 mM de Na₂HPO₄, 0,05% de Triton X-100, 0,013% de SDS y 0,05% de formaldehído y la vamos a denominar Fase Móvil 1. Se han estudiado 3 tamaños diferentes de AuNPs: de 10, 50 y 100 nm.

Además de esta fase móvil, se ha procedido a estudiar otras fases móviles que se han utilizado puntualmente en la bibliografía. Las distintas fases móviles utilizadas y su composición se recogen en la tabla 3.11 y han sido también descritas en el apartado 4.3.3.

Tabla 3.11. Composición de las fases móviles utilizadas.

Fase móvil	Composición	pH
Fase Móvil 1	0,5 mM de Na ₂ HPO ₄ , 0,05% de Triton X-100, 0,013% de SDS y 0,05% de formaldehído.	7,8
Fase Móvil 2	0,45 mM de SDS	7,7
Fase Móvil 3	10 mM de SDS	7,8
Fase Móvil 4	0,45 mM de SDS y 0,2 mM de L-metionina	7,8
Fase Móvil 5	0,5 mM de NH ₄ CO ₃ , 0,013% de SDS y 0,05% de Novachem	7,6

Para las distintas fases móviles, se han estudiado tanto parámetros cromatográficos, como son tiempos de retención, número de platos y resolución como parámetros analíticos (límites de detección, límites de cuantificación, precisión y rango lineal). Además se han realizado estudios de recuperación para evaluar posibles pérdidas de las NPs en la columna.

3.2.1 Fase móvil 1

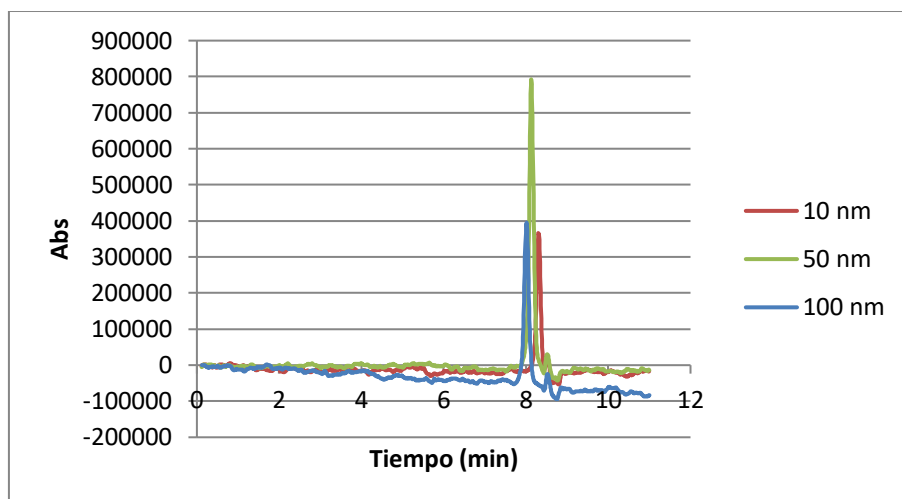
A modo de ejemplo se describe a continuación los resultados obtenidos con la Fase Móvil 1 tanto para el estudio de parámetros cromatográficos, analíticos y recuperaciones.

Se ha partido del caudal de fase móvil recomendado por el fabricante de la columna que es 1,6 mL min⁻¹. La presión máxima para operar con la columna es de 2200 psi, siendo la presión de trabajo habitual entre 1400-1600 psi.

Para el estudio de parámetros cromatográficos se inyectaron disoluciones de AuNPs de 0,5 mg L⁻¹ para los tres tamaños estudiados. Los valores obtenidos de tiempos de retención y anchuras de picos se muestran en la tabla A.1 del anexo A.

En la figura 3.2 se muestra el cromatograma obtenido para los 3 tamaños de AuNPs.

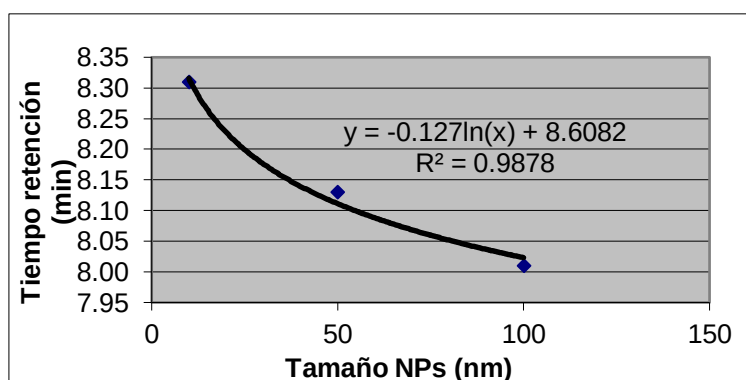
Figura 3.2. Cromatograma para los tres tamaños de partícula obtenido con la Fase móvil 1.



En la tabla 3.12 que aparece en la página 17 se presentan los tiempos de retención, su DSR, resolución entre picos consecutivos y número de platos para cada tamaño estudiado. Se han realizado 5 inyecciones para cada tamaño de NP estudiado.

Además se muestra en la tabla 3.12 la ecuación de calibración de tiempo frente a tamaño. El resultado obtenido es $y = -0,127\ln(x) + 8,61$, $R = 0,993$. Se obtiene una buena correlación, similar a la encontrada en la bibliografía [15], [17], [18]. En la figura 3.3 se muestra el gráfico de calibración.

Figura 3.3. Gráfico de calibración de la Fase móvil 1 de tiempo frente a tamaño.



Respecto a los tiempos de retención disminuyen conforme aumenta el tamaño de NPs como era de esperar y son bastante reproducibles observando las DSR, valores entre 0 y 0,066 %. La resolución no es buena, como era de esperar con valores en torno a 0,201-0,354 siendo peor para los tamaños 50-100 nm que para 10-50 nm. El número de platos obtenido está en torno a 2949-7117, siendo mayor para las NPs de 10 nm que para las de 50 nm y 100 nm. Lo normal es

que una columna de HPLC, tenga en torno a 20000 platos, sin embargo en nuestro caso, al no haber interacción en la columna es normal que el número de platos sea menor. Además la resolución es un parámetro que afecta proporcionalmente a este valor, por lo que es lógico que si la resolución no es buena, el número de platos sea menor.

Con respecto a los parámetros analíticos se procedió al cálculo de límites de detección, límites de cuantificación, precisión (calculada con incertidumbre del instrumento) y rango lineal. Para ello se midieron diferentes disoluciones de concentraciones crecientes entre 0,1 mg L⁻¹ y 1,5 mg L⁻¹ para los tres tamaños estudiados. Los límites de detección se han calculado a partir de la desviación estándar de varios valores de la línea base. En la tabla A.2 del anexo A se muestran los valores tanto en altura como área de pico obtenidos para los 3 tamaños.

En la tabla 3.13 de la página 17 se muestran los parámetros analíticos obtenidos para los 3 tamaños de NPs estudiados. Se obtiene una buena calibración lineal tanto en alturas como áreas para los tres tamaños estudiados con coeficientes de correlación R entre 0,990 y 0,987. Los límites de detección están en el rango 0,008-0,010 mg L⁻¹ para los 3 tamaños estudiados, siendo muy similares entre sí, aunque son ligeramente mejores tanto en áreas como en alturas para los 2 tamaños más grandes. La precisión calculada como incertidumbre del instrumento está en el rango de 0,88-3,85 % para alturas y 1,64-3,91 % para áreas. El rango lineal fue desde el límite de cuantificación hasta la mayor concentración estudiada para los 3 tamaños, que es 1,5 mg L⁻¹.

Se realizaron estudios de recuperación para evaluar posibles pérdidas de AuNPs en la columna. Dicha recuperación se calculó como el cociente entre (áreas/alturas) obtenidas en la separación de las AuNPs con columna y (áreas/alturas) sin columna de acuerdo a la bibliografía [7]. Los valores obtenidos tanto en áreas como en alturas se muestran en la tabla 3.14 de la página 18. Se obtuvieron mejores valores de recuperación en áreas que en alturas. En concreto las recuperaciones obtenidas en áreas fueron: 10 nm Rec(%) =102, 50 nm, Rec(%)=109, y 100 nm Rec(%) =97. Como se observa son valores muy próximos al 100% por lo que no hay pérdidas en la columna cromatográfica.

Con esta misma fase móvil se estudió también la influencia del caudal utilizado trabajando también a un caudal de 1 mL min⁻¹.

Del mismo modo que para el caudal de 1,6 mL min⁻¹ se estudiaron también parámetros cromatográficos, analíticos y recuperaciones.

Los resultados obtenidos para los parámetros cromatográficos se muestran en la tabla 3.12 de la página 17. Además se muestra la calibración de tiempo frente a tamaño. El resultado que se obtiene es $y = -0,154 \ln(x) + 13,8$, $R = 0,9863$. Se obtiene una peor correlación que para el caudal de 1,6 mL min⁻¹. Los tiempos de retención son bastante reproducibles como podemos ver con las DSR, cuyos valores están entre 0,034 y 0,159%. Los tiempos de retención son mayores que los obtenidos con el caudal mayor, como se esperaba. Los valores obtenidos de tiempos de retención y anchuras de picos se muestran en la tabla A.3 del anexo A. La resolución es adecuada, con valores en torno a 0,841-0,900, siendo peor para los tamaños 50-100 nm que para 10-50 nm. Si se comparan con los valores obtenidos con el caudal de 1,6 mL min⁻¹, la resolución mejora para el caudal menor. El número de platos que se obtiene está entre 2953-

5519, disminuyendo al aumentar el tamaño de NPs. Se encuentran valores más bajos comparando con el caudal de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$ debido a un ensanchamiento de los picos.

Los resultados obtenidos para los parámetros analíticos se muestran en la tabla 3.13 de la página 17. En la tabla A.4 del anexo A se muestran los valores tanto en altura como área de pico obtenidos para los 3 tamaños de NPs. Como en el caudal de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$, se obtiene una buena calibración lineal tanto en alturas como áreas para los tres tamaños estudiados con coeficientes de correlación R entre 0,98 y 1. Los límites de detección están en el rango $0,003\text{-}0,005 \text{ mg L}^{-1}$ para los tres tamaños estudiados, siendo muy similares entre sí. Los valores obtenidos son mucho mejores que para el caudal mayor. La precisión calculada como incertidumbre del instrumento está en el rango de $1,24\text{-}2,02\%$ para alturas y $3,66\text{-}6,97\%$ para áreas. Estos valores son similares que los obtenidos en el caudal mayor. El rango lineal, como en el caso del caudal de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$, fue desde el límite de cuantificación hasta la mayor concentración estudiada para los 3 tamaños, que es $1,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Los valores de recuperación obtenidos se muestran en la tabla 3.14 de la página 18. Los valores obtenidos, tanto en áreas como en alturas se alejaron del 100%. En concreto las recuperaciones obtenidas en áreas fueron: 10 nm Rec(%)=132, 50 nm, Rec(%) =116, y 100 nm Rec(%) =122. Debido a que los valores se alejan del 100% podemos decir que tenemos pérdidas en la columna. Los resultados que se obtienen son peores en áreas para el caudal de 1 mL min^{-1} que para el caudal de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los 2 caudales, aunque la resolución mejoraba para el caudal de 1 mL min^{-1} , los parámetros analíticos fueron muy similares para ambos caudales, pero los valores de recuperación fueron peores para el caudal de 1 mL min^{-1} . Por ello, teniendo en cuenta el mayor tiempo por cromatograma a 1 mL min^{-1} y que el caudal recomendado por el fabricante era $1,6 \text{ mL min}^{-1}$, para el resto de fases móviles se utilizó dicho caudal.

3.2.2 Fase móvil 2

La Fase móvil 2 consiste en una disolución de SDS con una concentración de $0,45 \text{ mM}$ y $\text{pH } 7,7$. Se trata de una fase móvil que contiene solo SDS como la fase móvil 3 utilizada en la bibliografía pero con una menor concentración, similar a la concentración recomendada en la Fase móvil 1. El SDS actúa como estabilizador de las NPs [26]. Un problema que tienen las NPs es que tienden a desestabilizarse con un aumento de la fuerza iónica por lo que cuanto más sencilla sea la fase móvil, podría ser.

Se estudió con un caudal de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$.

Como en la anterior fase móvil se han estudiado parámetros cromatográficos, analíticos y recuperaciones.

Los resultados obtenidos para los parámetros cromatográficos se muestran en la tabla 3.12, en la página 17. Los tiempos de retención disminuyen al aumentar el tamaño de NP, como se esperaba y son bastante reproducibles, como se observa en los valores de DSR obtenidos ($0,061\text{-}0,063\%$). Los tiempos obtenidos son más bajos que los que se obtienen en la Fase móvil 1. La resolución tampoco es buena, con valores en torno a $0,190\text{-}0,330$, siendo peor para 50-

100 nm que para 10-50 nm. Los valores obtenidos de tiempos de retención y anchuras de picos se muestran en la tabla A.5 del anexo A. Se obtiene una resolución peor que para la Fase móvil 1 con el mismo caudal. El número de platos que se obtiene están en torno a 1737-2255, obteniéndose el valor más bajo para las NPs de 100 nm de tamaño. Estos valores son menores que para la Fase móvil 1.

También se muestra en la tabla la ecuación de la calibración de tiempo frente a tamaño: $y = -0,154 \ln(x) + 8,40$, $R = 0,998$. Se obtiene una buena correlación, similar a la obtenida en la Fase móvil 1.

Los resultados obtenidos para los parámetros analíticos se muestran en la tabla 3.13 de la página 17. En la tabla A.6 del anexo A se muestran los valores tanto en altura como área de pico obtenidos para los 3 tamaños. Los resultados que se obtienen para la calibración lineal son buenos, con coeficientes de correlación entre 0,995 y 0,999, similares a los de la anterior fase móvil. Los límites de detección que se obtienen están entre 0,018 y 0,020 mg L⁻¹ para las alturas y 0,054 y 0,058 mg L⁻¹ para las áreas. Los valores que se obtienen son más altos que para la Fase móvil 1. La precisión, calculada como incertidumbre del instrumento, está en el rango de 0,78-2,67% para alturas y 4,12-9,24% para áreas, en todos los casos, disminuye al aumentar el tamaño de partícula. Se obtienen valores mayores para áreas que en la Fase móvil 1. El rango lineal fue desde el límite de cuantificación hasta la mayor concentración estudiada.

Los valores de recuperación obtenidos se muestran en la tabla 3.14 de la página 18. Los valores que se obtienen son mejores en áreas (10 nm Rec(%)=114, 50 nm Rec(%)=104, 100 nm Rec(%)=93) que para alturas. Los valores son cercanos al 100% excepto para las NPs de 10 nm, lo que muestra que no hay pérdidas en la columna cromatográfica. Con respecto a la Fase móvil 1 los valores obtenidos son muy similares.

3.2.3 Fase móvil 3

La Fase móvil 3, cuya composición es SDS 10 mM, se utilizó en la caracterización de AuNPs de 30 y 60 nm mediante HDC y SP-ICP-MS.[27].

Se estudió con un caudal de 1,6 mL min⁻¹.

Como en las anteriores fases móviles se han estudiado parámetros cromatográficos, analíticos y recuperaciones.

Los resultados obtenidos para los parámetros cromatográficos se muestran en la tabla 3.12 en la página 17. Los tiempos de retención descienden cuando aumenta el tamaño de NP y son bastante reproducibles, viendo las DSR obtenidas (0,061-0,214 %). Los tiempos obtenidos son más altos que los que se obtienen en la Fase móvil 2, por lo que podemos decir que al aumentar la concentración de SDS, aumenta el tiempo de retención debido a la mayor fuerza iónica lo que coincide con la bibliografía. Los valores obtenidos de tiempos de retención y anchuras de picos se muestran en la tabla A.7 del anexo A. La resolución que se consigue no es buena, con valores en torno a 0,191-0,213, siendo peor para 50-100 nm que para 10-50 nm. Se obtiene una resolución peor que para las otras fases móviles. El número de platos que se obtiene está en torno a 1822-3823, obteniéndose el valor más bajo para las NPs de 50 nm de tamaño.

En la tabla también se muestra la ecuación de la calibración de tiempo frente a tamaño: $y = -0,121 \ln(x) + 8,69$, $R = 0,9862$. La correlación que obtenida es buena, pero menor que para el resto de fases móviles, similar a la que se obtiene en la bibliografía [27].

Los resultados obtenidos para los parámetros analíticos se muestran en la tabla 3.13 de la página 17. En la tabla A.8 del anexo A se muestran los valores obtenidos tanto en altura como área de pico para los 3 tamaños. Los resultados que se obtienen para la calibración lineal son buenos, con coeficientes de correlación entre 0,9712 y 0,999. Estos valores son un poco peores que los que los obtenidos para el resto de fases móviles. Se consiguen límites de detección entre 0,018 y 0,026 mg L⁻¹ para las alturas y 0,089 y 0,116 mg L⁻¹ para las áreas. Estos datos son más altos que los obtenidos para las otras fases móviles estudiadas hasta el momento. La precisión, calculada como incertidumbre del instrumento, está en el rango de 1,25-6,35 % para alturas y 2,40-10,1% para áreas, observando un aumento al aumentar el tamaño de NPs en alturas. Se obtienen valores mayores que para las Fases móviles 1 y 2. El rango lineal fue desde el límite de cuantificación hasta la mayor concentración estudiada.

Los valores de recuperación obtenidos se muestran en la tabla 3.14 de la página 18. Los valores de recuperación obtenidos se alejan del 100% tanto en áreas como en alturas, lo que muestra que sí hay pérdidas en la columna cromatográfica, siendo los resultados obtenidos para áreas: 10 nm Rec(%)=175, 50 nm R=156, 100 nm R=157.

3.2.4 Fase móvil 4

La Fase móvil 4, contiene SDS 0,45 mM y L-metionina 0,2 mM. El estudio de esta fase móvil fue con la idea de poder separar Au en disolución de AuNPs. Este estudio se está desarrollando en el grupo de investigación, utilizando como detector un ICP-MS. la idea es que la L-metionina forme un complejo con el Au disuelto y se pueda determinar simultáneamente con las AuNPs.

Se estudió con un caudal de 1,6 mL min⁻¹.

Como en las anteriores fases móviles se han estudiado parámetros cromatográficos, analíticos y recuperaciones.

Los resultados obtenidos para los parámetros cromatográficos se muestran en la tabla 3.12, en la página 17. Si observamos las DSR obtenidas (0-0,922%) podemos decir que los picos son reproducibles. Los tiempos obtenidos son similares a los de la Fase móvil 2. Los valores obtenidos de tiempos de retención y anchuras de picos se muestran en la tabla A.9 del anexo A. La resolución no es buena, con valores en torno a 0,46 para los dos tamaños. Se obtiene una resolución mejor que para las otras fases móviles, utilizando el mismo caudal. El número de platos que se obtiene aumenta al aumentar el tamaño de partícula, consiguiendo valores en torno a 4945-6644.

La ecuación de la calibración de tiempo frente a tamaño: $y = -0,144 \ln(x) + 8,37$, $R = 0,992$ que se muestra en la tabla, obtiene una buena correlación, similar a la de la Fase móvil 1 con el mismo caudal.

Los resultados obtenidos para los parámetros analíticos se muestran en la tabla 3.13 de la página 17. En la tabla A.10 del anexo A se muestran los resultados obtenidos tanto en altura

como área de pico para los 3 tamaños. En cuanto a la calibración lineal, los resultados que se obtienen son buenos, con coeficientes de correlación entre 0,9893 y 1. Estos valores son mejores que los de la Fase móvil 3 y similares para las Fases móviles 1 y 2. Los límites de detección que se obtienen están entre 0,017 y 0,064 mg L⁻¹ para las alturas y 0,008 y 0,064 mg L⁻¹ para las áreas. Estos valores son más bajos que para la Fase móvil 3, y en general más altos que el resto de fases móviles, aunque del mismo orden. La precisión, que se estudia como incertidumbre del instrumento, está en el rango de 6,30-22,6% para alturas y 14,3-35,3% para áreas, valores no muy buenos. Los valores son mucho más altos que para el resto de fases móviles. El rango lineal fue desde el límite de cuantificación hasta la mayor concentración estudiada.

Los valores de recuperación obtenidos se muestran en la tabla 3.14 de la página 18. Los valores de recuperación que se obtienen son mejores en áreas que para alturas, siendo los resultados obtenidos para áreas: 10 nm Rec(%)=101, 50 nm R=37, 100 nm R=25. El valor obtenido para las NPs de 10 nm nos indica que no hay pérdidas en la columna, pero para las NPs de 50 y 100 nm los valores están muy lejos del 100%, por lo que sí hay pérdidas en la columna, y esto puede ser debido a que la presencia de L-metionina afecta a la estabilidad de las NPs de mayor tamaño.

3.2.5 Fase móvil 5

La Fase móvil 5 contiene NH₄CO₃ 0,5 Mm, SDS 0,013% y Novachem (tensoactivo) 0,05%. Esta fase se ha utilizado en la bibliografía [28] para la caracterización de AuNPs por FFF obteniéndose que era la mejor fase móvil en términos de recuperación, aunque dependía también de la membrana de separación utilizada.

Se estudió con un caudal de 1,6 mL min⁻¹.

Como en las anteriores fases móviles se han estudiado parámetros cromatográficos, analíticos y recuperaciones.

Los resultados obtenidos para los parámetros cromatográficos se muestran en la tabla 3.12, en la página 17. Los tiempos de retención obtenidos disminuyen al aumentar el tamaño de NP y son bastante reproducibles. Viendo las DSR obtenidas, cuyos valores están entre 0 y 0,18%. Los valores obtenidos de tiempos de retención y anchuras de picos se muestran en la tabla A.11 del anexo A. En cuanto a la resolución que se obtiene, los valores están en torno a 0,218-0,454, valores que no son buenos, siendo mejor para tamaños 10-50 nm que para los tamaños 50-100 nm. El número de platos que se obtiene están en torno a 7249-2599, disminuyendo el valor al aumentar el tamaño de partícula. En general, los valores son mayores que en el resto de fases móviles.

También se muestra en la tabla la ecuación de la calibración de tiempo frente a tamaño: $y = -0,183 \ln(x) + 8,70$, $R = 0,999$. Se obtiene una buena correlación, su valor es mayor que para el resto de fases móviles.

Los resultados obtenidos para los parámetros analíticos se muestran en la tabla 3.13 de la página 17. En la tabla A.12 del anexo A se muestran los valores tanto en altura como área de pico obtenidos para los 3 tamaños. Los resultados que se obtienen para la calibración lineal

son buenos, con coeficientes de correlación entre 0,972 y 0,993. Similares a los obtenidos para las fases móviles 1 y 2. Los límites de detección que se obtienen están entre 0,007 y 0,015 mg L⁻¹ para las alturas y 0,002 y 0,005 mg L⁻¹ para las áreas. Los valores que se obtienen son más bajos que las otras cuatro fases móviles utilizadas. La precisión, que calculamos como incertidumbre del instrumento, está en el rango de 3,68-13,5% para alturas y 8,25-14,8% para áreas, valores más bajos que para la fase móvil 4, pero superiores, en general, para el resto de las fases móviles. El rango lineal fue desde el límite de cuantificación hasta la mayor concentración estudiada.

Los valores de recuperación obtenidos se muestran en la tabla 3.14 de la página 18. Los valores que se obtienen son mejores en áreas que para alturas, siendo los resultados obtenidos para áreas: 10 nm Rec(%)=74, 50 nm R=101, 100 nm R=40. El valor obtenido para las NPs con tamaño de 50 nm nos indica que no hay pérdidas en la columna, pero para las NPs de 10 y 100 nm los valores están muy lejos del 100%, por lo que sí hay pérdidas en la columna. Los valores son ligeramente mejores que para la Fase móvil 4, pero peores que en el resto.

Haciendo un resumen de las distintas fases móviles estudiadas y los resultados obtenidos, tanto para parámetros cromatográficos (tabla 3.12 página 17), como para parámetros analíticos (tabla 3.13 página 17) y recuperaciones (tabla 3.14 página 18) podemos concluir lo siguiente:

Si comparamos los parámetros cromatográficos de todas las fases móviles, con la que mejor resolución se obtiene es con la Fase móvil 1 y el caudal 1 mL min⁻¹, pero como se ha indicado, el tiempo del cromatograma es mayor. Además los valores que se obtienen para la reproducibilidad de tiempos de retención de los picos son buenos, y el número de platos es uno de los más altos. La correlación entre tiempos y tamaños, en general, es buena para todas las fases móviles estudiadas, con buenos coeficientes de correlación.

Si comparamos los parámetros analíticos, la Fase móvil 1 con el caudal de 1 mL min⁻¹ es la que menores límites de detección se obtiene tanto en áreas (0,005 mL min⁻¹) como en alturas (0,003-0,005 mL min⁻¹), aunque no hay grandes diferencias con el resto de fases móviles. Las curvas de calibración son similares para todas las fases móviles con buenos coeficientes de correlación. Las DSR son similares para las Fases móviles 1,2, empeorando bastante para las Fases móviles 3,4 y 5.

Si comparamos los valores de recuperación, sobre todo en áreas, con las que se obtienen mejores resultados, la Fase móvil 1 para el caudal 1,6 mL min⁻¹ y la Fase móvil 2, dan valores de recuperación en torno al 100% por lo que no hay pérdidas en la columna. Sin embargo para el resto de fases móviles los valores están por encima o por debajo del 100%, con lo que serían menos adecuados.

Tabla 3.12. Parámetros cromatográficos y calibración de tiempo de retención frente a tamaño en la separación de AuNPs mediante HDC.

Tamaño de partícula	Fase móvil	Tiempo de retención (min)	RSD(%)	Resolución	N	Recta de tiempo frente tamaño	R
10 nm	Agilent 0,5 mM 1,6 mL/min	8,30	0,066		7117	$y = -0,127 \ln(x) + 8,61$	0,994
	Agilent 0,5 mM 1 mL/min	13,4	0,041		5519	$y = -0,154 \ln(x) + 13,8$	0,986
	SDS 0,45 mM	8,03	0,061		2191	$y = -0,154 \ln(x) + 8,40$	0,998
	SDS 10 mM	8,40	0,107		3823	$y = -0,121 \ln(x) + 8,69$	0,986
	0,45 mM SDS + 0,2 mM L-met	8,04	0,000		4945	$y = -0,144 \ln(x) + 8,37$	0,992
	0,5 mM NH ₄ CO ₃ + 0,013% SDS + 0,05% Novachem	8,28	0,184		7249	$y = -0,183 \ln(x) + 8,70$	1,000
50 nm	Agilent 0,5 mM 1,6 mL/min	8,13	0,000	0,354	2949	$y = -0,127 \ln(x) + 8,61$	0,994
	Agilent 0,5 mM 1 mL/min	13,2	0,034	0,900	4333	$y = -0,154 \ln(x) + 13,8$	0,986
	SDS 0,45 mM	7,81	0,062	0,330	2255	$y = -0,154 \ln(x) + 8,40$	0,998
	SDS 10 mM	8,25	0,061	0,213	1822	$y = -0,121 \ln(x) + 8,69$	0,986
	0,45 mM SDS + 0,2 mM L-met	7,83	0,090	0,462	5870	$y = -0,144 \ln(x) + 8,37$	0,992
	0,5 mM NH ₄ CO ₃ + 0,013% SDS + 0,05% Novachem	7,98	0,000	0,454	4841	$y = -0,183 \ln(x) + 8,70$	1,000
100 nm	Agilent 0,5 mM 1,6 mL/min	8,01	0,056	0,201	3650	$y = -0,127 \ln(x) + 8,61$	0,994
	Agilent 0,5 mM 1 mL/min	13,1	0,159	0,841	2953	$y = -0,154 \ln(x) + 13,8$	0,986
	SDS 0,45 mM	7,68	0,063	0,190	1737	$y = -0,154 \ln(x) + 8,40$	0,998
	SDS 10 mM	8,12	0,214	0,191	3688	$y = -0,121 \ln(x) + 8,69$	0,986
	0,45 mM SDS + 0,2 mM L-met	7,69	0,922	0,461	6644	$y = -0,144 \ln(x) + 8,37$	0,992
	0,5 mM NH ₄ CO ₃ + 0,013% SDS + 0,05% Novachem	7,86	0,000	0,218	2599	$y = -0,183 \ln(x) + 8,70$	1,000

Tabla 3.13. Parámetros analíticos en la separación de AuNPs mediante HDC.

Tamaño de partícula	Fase móvil	LD (mg/L)		LQ (mg/L)		RSD(%)		Recta de calibrado		R	
		Altura	Área	Altura	Área	Altura	Área	Altura	Área	Altura	Área
10 nm	Agilent 0,5 mM 1,6 mL/min	0,010	0,018	0,033	0,039	3,85	3,91	$y = 721783x + 15464$	$y = 89168x + 1545,8$	0,996	0,997
	Agilent 0,5 mM 1 mL/min	0,005	0,005	0,018	0,015	1,36	4,80	$y = 784455x + 45572$	$y = 128968x + 12601$	1,000	0,999
	SDS 0,45 mM	0,018	0,054	0,058	0,180	2,67	9,24	$y = 547952x - 32281$	$y = 102425x - 8132,9$	0,997	0,997
	SDS 10 mM	0,026	0,116	0,087	0,385	1,25	2,40	$y = 495727x - 9293,9$	$y = 88013x - 2158,1$	0,998	0,995
	0,45 mM SDS + 0,2 mM L-met	0,017	0,008	0,055	0,026	6,30	14,3	$y = 271804x - 26321$	$y = 49053x - 6659,1$	0,996	0,995
	0,5 mM NH ₄ CO ₃ + 0,013% SDS + 0,05% Novachem	0,008	0,003	0,027	0,011	3,68	8,25	$y = 546575x - 27191$	$y = 75831x - 2267,4$	0,993	0,993
50 nm	Agilent 0,5 mM 1,6 mL/min	0,008	0,009	0,026	0,029	0,880	1,64	$y = 930017x - 49557$	$y = 121774x - 704,33$	0,984	0,987
	Agilent 0,5 mM 1 mL/min	0,005	0,003	0,015	0,010	1,24	6,97	$y = 912566x + 25589$	$y = 191340x + 23340$	1,00	0,998
	SDS 0,45 mM	0,018	0,055	0,061	0,185	2,66	5,62	$y = 520113x + 8570$	$y = 99797x + 370,84$	0,995	0,990
	SDS 10 mM	0,018	0,089	0,061	0,295	4,46	10,1	$y = 705418x - 4487,5$	$y = 114677x + 4232,4$	0,999	0,999
	0,45 mM SDS + 0,2 mM L-met	0,064	0,064	0,213	0,214	22,6	35,3	$y = 70448x + 4289,9$	$y = 5903,1x + 9507,1$	0,989	0,998
	0,5 mM NH ₄ CO ₃ + 0,013% SDS + 0,05% Novachem	0,007	0,002	0,023	0,007	13,5	13,4	$y = 641789x - 44752$	$y = 111457x - 13898$	0,993	0,994
100 nm	Agilent 0,5 mM 1,6 mL/min	0,008	0,008	0,027	0,028	1,35	3,19	$y = 878381x + 8406$	$y = 125473x + 999,08$	0,997	0,998
	Agilent 0,5 mM 1 mL/min	0,005	0,003	0,016	0,008	2,02	3,66	$y = 905060x - 20776$	$y = 238888x - 4834,6$	0,985	0,996
	SDS 0,45 mM	0,020	0,058	0,0654	0,194	0,780	4,12	$y = 487953x + 2793,8$	$y = 94879x - 68,6499$	1,00	0,999
	SDS 10 mM	0,021	0,091	0,069	0,302	6,35	9,83	$y = 629031x - 13061$	$y = 112217x - 4110,2$	1,00	0,999
	0,45 mM SDS + 0,2 mM L-met	0,041	0,017	0,136	0,058	19,0	14,3	$y = 109824x - 7288,4$	$y = 21787x - 3159,7$	1,00	1,00
	0,5 mM NH ₄ CO ₃ + 0,013% SDS + 0,05% Novachem	0,016	0,005	0,053	0,016	11,1	14,8	$y = 280069x + 44577$	$y = 50057x + 11164$	0,973	0,990

Tabla 3.14. Valores de recuperación obtenidos para las distintas fases móviles en la separación de AuNPs mediante HDC.

Tamaño de partícula	Fase móvil	Recuperación		DSR	
		Alturas	Área	Alturas	Área
10 nm	Agilent 0,5 mM 1,6 mL/min	73	102	8,53	18,2
	Agilent 0,5 mM 1 mL/min	86	132	1,39	1,65
	SDS 0,45 mM	88	114	1,25	2,40
	SDS 10 mM	57	175	1,18	0,962
	0,45 mM SDS+ 0,2 mM L-met	67	101	4,83	11,5
	0,5 mM NH ₄ CO ₃ + 0,013% SDS + 0,05% Novachem	42	74	3,68	8,25
50 nm	Agilent 0,5 mM 1,6 mL/min	73	109	3,44	7,67
	Agilent 0,5 mM 1 mL/min	76	116	1,45	4,05
	SDS 0,45 mM	78	104	4,46	10,1
	SDS 10 mM	55	156	1,44	5,01
	0,45 mM SDS+ 0,2 mM L-met	23	37	22,6	35,3
	0,5 mM NH ₄ CO ₃ + 0,013% SDS + 0,05% Novachem	38	101	13,5	13,4
100 nm	Agilent 0,5 mM 1,6 mL/min	64	97	5,80	5,91
	Agilent 0,5 mM 1 mL/min	71	122	3,71	4,53
	SDS 0,45 mM	69	93	6,35	9,83
	SDS 10 mM	53	157	1,31	4,17
	0,45 mM SDS+ 0,2 mM L-met	16	25	19,0	14,3
	0,5 mM NH ₄ CO ₃ + 0,013% SDS + 0,05% Novachem	16	40	26,5	35,5

4. Parte experimental

4.1 Instrumentación: Aparatos y materiales

4.1.1 Instrumentación

- Balanza de precisión PL2001-L, precisión de $\pm 0,1$ mg
- Medidor de pH micropH 2001 (Crison, Barcelona, España)
- EAM:
 - Espectrofotómetro de absorción UV-Vis de doble haz Jasco V-730 (Jasco, Oklahoma, EE.UU.)
- HDC:
 - Cromatógrafo: Waters 2796 Bioseparations Module (Waters Corporation, Milford, EE.UU.);
 - Columna PL-PSDA Type 1 (5-300nm);
 - Detector de diodos en array: Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters Corporation, Milford, EE.UU.).
- ICP-MS
 - ICP-MS Elan DRC-e Perkin Elmer (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.)

4.1.2 Aparatos

- Micropipetas 50-200 μ L (Bibby Sterilin, Stone, Reino Unido)
- Baño de Ultrasonidos (JP Selecta S.A., Barcelona, España)
- Sistema de filtración de PTFE con filtro de membrana de nylon 0,45 μ m Filter Lab (Filtros Anolia, Barcelona, España)

4.1.3 Materiales

- Tubos tipo Falcon de 15 y de 50 mL.
- Vasos de precipitados, botes de plástico y recipientes de plástico de distintos volúmenes.
- Cuentagotas de plástico
- Espátulas de laboratorio
- Tubos de medida de 2 mL.

4.2 Reactivos y disoluciones

4.2.1 Patrones:

- Disoluciones estándares de nanopartículas:
 - 10 nm Gold Nanospheres, citrate. Nanoxact 0,053 mg/mL, 25 ml (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)
 - 50 nm Gold Nanospheres, citrate. Nanoxact 0,053 mg/mL 25 mL (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)
 - 100 nm Gold Nanospheres, citrate. Nanoxact 0,053 mg/mL, 25 mL (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)

Los estándares se deben sonicar siempre durante 5 minutos antes de su uso para evitar su aglomeración.

- Disoluciones estándares
 - Patrón de Au de $1001 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ (Fluka Analytical, Suiza)
 - Patrón de Rh para ICP de $1001 \pm 6 \text{ mg L}^{-1}$ (Fluka Analytical, Suiza).

4.2.2 Reactivos:

- Ácido clorhídrico (HCl) 36,5/38% (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.)
- Ácido nítrico (HNO₃) 69/70% (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.)
- Carbonato de amonio (NH₄CO₃) (Fluka Honeywell, Morristown, Estados Unidos)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.)
- Formaldehído 35/40% (Probus, Barcelona, España)
- Hidrógenofosfato de sodio (Na₂HPO₄) (Sigma –Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)
- L-metionina (Sigma –Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)
- Novachem Surfactant 100 (Post Nova Analytics, Landsberg, Alemania)
- Triton X-100 (Sigma –Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)

Todas las disoluciones se preparan a partir de los reactivos y patrones citados utilizando agua ultrapura (Milli-Q) obtenida a partir de agua tratada con un purificador Milipore.

Todo el material que se ha utilizado se sumerge en una disolución de HNO₃ en agua ultrapura al 10% (v/v) durante 24 horas al menos, a continuación se lava con agua ultrapura, y se deja secar antes de su uso.

4.3 Procedimientos

4.3.1 Caracterización de NPs mediante EAM-UV-Vis.

Como se ha explicado en la introducción, las AuNPs presentan absorción en la zona del UV-Vis debido a la resonancia superficial plasmónica.

Se prepara una disolución de 5 mg L^{-1} de cada uno de los diferentes tamaños de los patrones de oro (10 nm, 50 nm y 100 nm).

Se realizan los espectros previa corrección de la línea base realizando un barrido entre 200 y 800 nm.

Para realizar los espectros se utilizan cubetas de 1 mL de cuarzo. Los espectros que se obtienen representan la absorbancia frente a la longitud de onda para cada una de los patrones. Se toman datos de máximo de absorbancia y longitud de onda para cada una de las AuNPs estudiadas.

4.3.2 Determinación de la concentración elemental de patrones de AuNPs mediante ICP-MS.

Se ha llevado a cabo la determinación cuantitativa de la concentración de patrones de AuNPs de distintos tamaños (10 nm, 50 nm y 100 nm). Se ha realizado por ICP-MS.

De acuerdo con los valores certificados por el fabricante la concentración de las distintas AuNPs es 0,053 mg mL⁻¹.

Primero se preparan las disoluciones con las que se va a construir la recta de calibrado. Todas ellas a partir de una disolución patrón de Au³⁺ de 1000 mg L⁻¹.

Las concentraciones exactas de las cuatro disoluciones que se preparan son: 46,36 µg L⁻¹, 102,01 µg L⁻¹, 155,10 µg L⁻¹ y 251,82 µg L⁻¹.

También se utiliza un patrón interno para corregir posibles efectos de imprecisión, en este caso se emplea una disolución patrón de Rh. Para preparar esta disolución el patrón empleado tiene una concentración de 1000 mg L⁻¹. Se hace una disolución intermedia de 10 mg L⁻¹. La concentración final de la disolución que utilizaremos es de 50 µg L⁻¹.

Se preparan las disoluciones de muestra con una concentración final en torno a 125 µg L⁻¹ de acuerdo a la bibliografía [23]. Para ello se disuelven las AuNPs con se añaden 150 µL de HNO₃ (65%) y 310 µL de HCl (37%) a 100 µL de disolución de muestra. Se deja atacar el ácido a la muestra durante una hora a temperatura ambiente. Tras este tiempo se diluye hasta 40 mL con agua mili-Q.

El ICP-MS debe optimizarse según las recomendaciones del fabricante para tener la mejor sensibilidad y menores niveles de óxidos e iones divalentes. Para ello se utilizan disoluciones de In, U, Mg, Ba y Ce de concentración 10 µg L⁻¹.

4.3.3 Separación de AuNPs mediante HDC.

Se utiliza la cromatografía hidrodinámica para conseguir separar las nanopartículas de Au en función de su tamaño.

Como se ha indicado en los objetivos, uno de ellos va a ser estudiar la influencia de la composición de las fases móviles empleadas en dicha separación. Se prepara 1 L de disolución cuya composición se varió, estudiando así el efecto de la fase móvil en las medidas y poder optimizarlas.

La primera fase móvil utilizada ha sido la recomendada por el fabricante y la más utilizada en la bibliografía. La composición de ésta y de las otras fases móviles utilizadas se presenta en la tabla 4.1. En el apartado de resultados y discusión se explica por qué se han utilizado las distintas fases móviles.

Tabla 4.1. Composición de las fases móviles utilizadas.

Fase móvil	Composición	pH
Fase Móvil 1	0,5 mM de Na ₂ HPO ₄ , 0,05% de Triton X-100, 0,013% de SDS y 0,05% de formaldehído.	7,8
Fase Móvil 2	0,45 mM de SDS	7,7
Fase Móvil 3	10 mM de SDS	7,8
Fase Móvil 4	0,45 mM de SDS y 0,2 mM de L-metionina	7,8
Fase Móvil 5	0,5 mM de NH ₄ CO ₃ , 0,013% de SDS y 0,05% de Novachem	7,6

Tras preparar la disolución de fase móvil que se va a utilizar, todas han de ser filtradas para evitar que se introduzca algún resto sólido en el cromatógrafo. También han de ser sonicadas en un baño ultrasonidos durante 10 minutos.

Con objeto de estudiar diferentes parámetros cromatográficos que fueron: calibración de tamaños frente a tiempo, tiempos de retención, resolución y número de platos para las distintas fases móviles estudiadas, se utilizan disoluciones de $0,53 \text{ mg L}^{-1}$ de los tres tamaños de AuNPs. A modo de ejemplo, en el Anexo B.1. se muestra la preparación de dichas disoluciones para cada fase móvil.

Para el estudio de parámetros analíticos (LD, LQ, rango lineal, precisión) se utilizan cinco disoluciones de cada tamaño de partículas de concentración: $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 1 mg L^{-1} Y $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. En la Tabla 4.2 aparece la preparación las disoluciones de 10 nm utilizadas en uno de los experimentos, el resto de las disoluciones de los tamaños de 50 y 100 nm aparecen en el Anexo B, en la tabla B.2.

Tabla 4.2. Preparación de las disoluciones de AuNPs de 10 nm utilizadas para el estudio de los parámetros analíticos.

Concentración (mg L^{-1})	NPs (g)	Agua (g)	Concentración final (mg L^{-1})
0,1	0,0486	25,3	0,100
0,25	0,0540	10,1	0,284
0,5	0,0613	6,08	0,534
1	0,0608	3,07	1,05
1,5	0,0916	3,11	1,56

El flujo también es un parámetro importante en esta técnica. Dependiendo de cuál sea el utilizado, el tiempo de retención variara. Utilizaremos un flujo de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$, que es el recomendado por el fabricante de la columna, y 1 mL min^{-1} , conveniente para futuros estudios usando ICP-MS como detector.

Para estudiar la recuperación y comprobar si hay pérdidas de las AuNPs en la columna se utilizan disoluciones de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de todos los tamaños de disolución. La recuperación se calcula como la señal obtenida con columna dividida entre la señal obtenida sin columna y multiplicado por 100.

Antes de comenzar a medir, se sigue el protocolo de acondicionamiento del cromatógrafo. Se realizan las purgas correspondientes para la eliminación de burbujas, se lava y homogeniza la jeringuilla de inyección (volumen de $20 \mu\text{L}$) y se acondiciona la columna con cada fase móvil utilizada al menos durante 15 minutos.

5. Conclusiones

Las conclusiones que se obtienen del estudio de la caracterización de AuNPs son:

- Se ha buscado en la bibliografía antecedentes relacionados con la caracterización de AuNPs por EAM UV-VIS, ICP-MS y HDC. Se han encontrado numerosos ejemplos en los que se utilizaban estas técnicas, con resultados similares a los obtenidos en este trabajo.
- En la caracterización de AuNPs por EAM UV-VIS se ha estudiado la longitud de onda y la absorción del máximo de los tres tamaños de AuNPs y su estabilidad a lo largo del tiempo. Para las NPs de 10 nm y 50 nm se observa un aumento de la longitud de onda y de la absorbancia, al cabo de unos días; y para las de NPs de 100 nm se observa una disminución, por lo que podemos decir que son inestables al cabo de un tiempo.
- En la determinación de la concentración de los patrones de AuNPs mediante ICP-MS, se ha comparado los resultados obtenidos al utilizar patrón interno y sin patrón interno, obteniendo resultados bastante alejados de la concentración teórica al utilizar patrón interno. También se han estudiado distintos parámetros estadísticos, comparando los resultados obtenidos sin patrón interno con la concentración teórica mediante el test estadístico T, obteniéndose como resultado la confirmación de la hipótesis de que no hay diferencias significativas entre ellas. Además se calculó la incertidumbre total y la contribución de cada una de las distintas incertidumbres a esta. Se observa un aumento de la incertidumbre total al aumentar el tamaño de partícula.
- En la separación de tres tamaños de AuNPs mediante HDC utilizando un detector UV-VIS, se ha estudiado la optimización de la fase móvil, valorándola mediante los parámetros analíticos, cromatográficos y la recuperación. Si comparamos los parámetros cromatográficos, se observa que en todas las fases móviles los tiempos de retención son bastante reproducibles. La calibración de tiempo frente a tamaño es buena para todas las fases móviles. La resolución, que es mejor para la Fase móvil 1 con un caudal de 1 mL min^{-1} , pero en general es mala (0,190-0,460), empeorando para las NPs de mayor tamaño. En cuanto a los parámetros analíticos, los límites de detección y las curvas de calibrado son similares en todas las fases móviles, sin embargo la DSR tiene mejores valores en las Fases móviles 1 y 2. En cuanto a los valores de recuperación se obtienen mejores resultados para la Fase móvil 1 con un caudal de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$ y para la Fase móvil 2, que al ser valores cercanos al 100% nos indican que no hay pérdidas en la columna.

6. Bibliografía

- [1] L. Verde, A. L. P. Europeo, A. L. Comité, E. Y. Social, and E. Y. Al, "Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales. Comunicación de la comisión al parlamento europeo, al consejo y al comité económico y social europeo.," pp. 1–14, 2012.
- [2] S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, and J. R. Lead, "Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects.," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 27, pp. 1825–1851, 2008.
- [3] M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, and D. R. Hull, "Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory.," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 6, pp. 1769–1780, 2015.
- [4] S. Wang, W. Lu, O. Tovmachenko, U. S. Rai, H. Yu, and P. C. Ray, "Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 463, pp. 145–149, 2008.
- [5] Y. Shang, C. Min, J. Hu, T. Wang, H. Liu, and Y. Hu, "Synthesis of gold nanoparticles by reduction of HAuCl₄ under UV irradiation," *Solid State Sci.*, vol. 15, pp. 17–23, 2013.
- [6] M. M. Schmidt, S. Wu, Z. Cui, N. T. Nguyen, M. Faulkner, and B. R. Saunders, "How gold nanoparticles can be used to probe the structural changes of a pH-responsive hydrogel," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, pp. 5102–5112, 2017.
- [7] E. P. Gray, T. A. Bruton, C. P. Higgins, R. U. Halden, P. Westerhoff, and 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," *JAAS*, vol. 27, pp. 1532–1539, 2012.
- [8] D. J. Lewis, "Hydrodynamic chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry, with post-column injection capability for simultaneous determination of nanoparticle size, mass concentration and particle number concentration (HDC-PCI-ICP-MS)," *Analyst*, vol. 140, pp. 1624–1628, 2015.
- [9] F. Laborda, E. Bolea, G. Ceprián, M. T. Gómez, M. S. Jiménez, J. Pérez-Arantequi, and 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*, vol. 904, pp. 10–32, 2016.
- [10] L. Tong, Q. Wei, A. Wei, and J.-X. Cheng, "Gold Nanorods as Contrast Agents for Biological Imaging: Optical Properties, Surface Conjugation and Photothermal Effects," *Photochem. Photobiol.*, vol. 85, pp. 21–32, 2009.
- [11] C. J. Murphy, A. M. Gole, J. W. Stone, P. N. Sisco, A. M. Alkilany, E. C. Goldsmith, and S. C. Baxter, "Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity\to Cellular Imaging," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, pp. 1721–1730, 2008.
- [12] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, pp. 1578–1586, 2008.
- [13] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Calculated absorption and

scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, pp. 7238–7248, 2006.

- [14] K. Tiede, A. B. A. Boxall, X. Wang, D. Gore, D. Tiede, M. Baxter, H. David, S. P. Tear, and J. Lewis, "Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 25, pp. 1149–1154, 2010.
- [15] K. Tiede, A. B. A. Boxall, D. Tiede, S. P. Tear, H. David, and J. Lewis, "A robust size-characterisation methodology for studying nanoparticle behaviour in 'real' environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS," *Anal. At. Spectrom.*, vol. 24, pp. 964–972, 2009.
- [16] H. Small and M. A. Langhorst, "Hydrodynamic Chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 54, pp. 892–898, 1982.
- [17] K. Proulx and K. J. Wilkinson, "Separation, detection and characterisation of engineered nanoparticles in natural waters using hydrodynamic chromatography and multi-method detection (light scattering, analytical ultracentrifugation and single particle ICP-MS)," *Environ. Chem.*, vol. 11, pp. 392–401, 2014.
- [18] K. Proulx, M. Hadioui, and K. J. Wilkinson, "Separation, detection and characterization of nanomaterials in municipal wastewaters using hydrodynamic chromatography coupled to ICPMS and single particle ICPMS," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, pp. 5147–5155, 2016.
- [19] A. K. Brewer and A. M. Striegel, "Particle size characterization by quadruple-detector hydrodynamic chromatography," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, pp. 295–302, 2009.
- [20] A. Philippe, M. Gangloff, D. Rakcheev, and G. E. Schaumann, "Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry detector for analysis of colloids in environmental media – effects of colloid composition, coating and shape," *Anal. Methods*, vol. 6, pp. 8722–8728, 2014.
- [21] M. Roman, C. Rigo, H. Castillo-Michel, I. Munivrana, V. Vindigni, I. Micetic, F. Benetti, L. Manodori, and W. R. L. Cairns, "Hydrodynamic chromatography coupled to single-particle ICP-MS for the simultaneous characterization of and determination of dissolved Ag in plasma and blood of burn patients," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, pp. 5109–5124, 2016.
- [22] P. M-M and A. Siripinyanond, "Field-flow fractionation with inductively coupled plasma mass spectrometry: past{,} present{,} and future," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 29, pp. 1739–1752, 2014.
- [23] A. Philippe and 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*, vol. 9, pp. 1–9, 2014.
- [24] Y. Chang, Y. Shih, C.-H. Su, and 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.*, vol. 322, pp. 95–104, 2017.
- [25] A. K. Brewer and A. M. Striegel, "Characterizing a spheroidal nanocage drug delivery

- vesicle using multi-detector hydrodynamic chromatography," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 399, pp. 1507–1514, 2011.
- [26] F. K. Liu, F. H. Ko, P. W. Huang, C. H. Wu, and T. C. Chu, "Studying the size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, vol. 1062, pp. 139–145, 2005.
- [27] S. A. Pergantis, T. L. Jones-Lepp, and E. M. Heithmar, "Hydrodynamic chromatography online with single particle-inductively coupled plasma mass spectrometry for ultratrace detection of metal-containing nanoparticles," *Anal. Chem.*, vol. 84, pp. 6454–6452, 2012.
- [28] B. Meisterjahn, S. Wagner, F. von der Kammer, D. Hennecke, and 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*, vol. 1440, pp. 150–159, 2016.