



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Cromatografía hidrodinámica para la caracterización
de nanopartículas de oro y otras nanopartículas
metálicas

Autor: Daniel Isábal Guarné

Director: María Sierra Jiménez García-Alcalá

Departamento de Química Analítica / Laboratorio GEAS

Facultad de ciencias / Universidad de Zaragoza

2017



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación
en Ciencias Ambientales
de Aragón
Universidad Zaragoza

Abreviaturas

- (HDC) Cromatografía hidrodinámica
(DLS) Dispersión dinámica de luz
(SDS) Dodecil sulfato sódico
(CE) Electroforesis capilar
(ICP-MS) Espectrometría de masas acoplada a plasma de inducción
(FFF) Fraccionamiento de campo de flujo
(NM) Nanomateriales
(NP) Nanopartícula
(AuNPs) Nanopartículas de oro
(N) Número de platos
(PA) Penicilamina

Índice

Resumen

1. Introducción	1
1.1 Caracterización de NM _s	2
1.2 HDC y posibles detectores para caracterización de NM _s	3
2. Objetivos y planteamiento del trabajo	6
3. Parte experimental	7
3.1 Instrumentación: Aparatos y materiales	7
3.1.1 Instrumentación	7
3.1.2 Aparatos	7
3.1.3 Materiales	7
3.2 Reactivos y disoluciones	8
3.2.1 Patrones	8
3.2.2 Reactivos	8
3.3 Procedimientos	9
3.3.1 Separación de AuNPs y oro disuelto mediante HDC y detección mediante ICPMS	9
3.3.2 Comparación de sensibilidad entre AuNPs (10 nm) Au ³⁺ por ICP-MS	11
4. Resultados y discusión	12
4.1. Optimización de la fase móvil	12
4.1.1 Fase móvil 1	12
4.1.2. Fase móvil 2	15
4.1.3. Fase móvil 3	17
4.2. Optimización del caudal	23
4.3. Estudio de los parámetros analíticos	26
4.4. Comparación de sensibilidad entre AuNPs (10 nm) Au ³⁺ por ICP-MS	28
5. Conclusión	31
6. Bibliografía	32
Anexos	35

Resumen

El auge de las nanopartículas y sus propiedades específicas ha producido un aumento en su uso, produciéndose además una diversificación en su utilización hacia diferentes sectores (medicina, óptica, electrónica, química industrial, cosmética). Por ello es necesario su estudio y caracterización, habiendo solo desarrolladas en estos últimos años una gran cantidad de métodos analíticos con los que poder conocer mejor sus características. En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de nanoparticulas de oro (AuNPs) y especies de oro disuelto mediante cromatografía hidrodinámica (HDC) como técnica de separación acoplada a un espectrómetro de masas atómica de fuente de plasma acoplado por inducción (ICP-MS) como detector. Para ello se han optimizado diferentes parámetros comatográficos como la fase móvil utilizada y el caudal de la misma. Para poder desarrollar con éxito la separación entre AuNPs y las especies de oro disueltas es necesario utilizar un agente estabilizador, en este caso la penicilamina, la cual se añade a la fase móvil que contiene SDS (0,45 mM). Además, se ha realizado un estudio de la concentración óptima de penicilamina obteniéndose recuperaciones del 100% para las AuNPs estudiadas (con tamaños de 10, 50 y 100 nm) y el oro disuelto. Con respecto al caudal, se han estudiado dos caudales, por un lado $1,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (recomendada por el fabricante de la columna) y $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (caudal óptimo para el ICP-MS) obteniéndose valores de recuperación y resolución adecuados para ambos.

1. Introducción

En diciembre de 1950 el físico norteamericano Richard Feynman realizó una conferencia en la sociedad americana de física titulada “hay mucho espacio en el fondo”, la cual, años después, se determinó como el punto de partida de la nanociencia. Desde ese momento comenzó su desarrollo, pasando por otros científicos como K. Eric Drexler o el japonés Norio Tanaguchi los cuales acuñaron el término actual de Nanotecnología. Como descubrimiento se observó que desde hacía cientos de años se han estado utilizando nanoparticulas en diversos ámbitos de la vida cotidiana (óxidos de titanio en productos de pintura, óxidos de plata para curar heridas....) sin saber de forma concreta su existencia. Hasta hace unos años no se acuño ni siquiera una definición para el termino nanomaterial (material natural, secundario o artificial que de forma individual o formando agregados/aglomerados tiene como mínimo una de sus 3 dimensiones con un tamaño comprendido entre 1-100 nm) [1] o nanotecnología (estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nano y la explotación de sus propiedades a dicha escala) [2] existiendo todavía pequeñas variaciones descriptivas debido a las posibles preocupaciones ambientales y sanitarias (un nanomaterial es aquel que contiene en granulometría numérica el 50%, o de sus partículas, en el umbral de tamaño nombrado, sin embargo esto puede variar) [3].

Las diferentes propiedades que nos dan las nanoparticulas con respecto a los nanomateriales a escala macroscópica vienen determinadas principalmente por su tamaño; lo cual ha provocado un auge por su utilización en diferentes sectores, desde el sector industrial, pasando por el alimentario y el agronómico e incluso en el sanitario. Para conocer el comportamiento de estas nanopartículas debemos tener en cuenta además de su tamaño, su superficie (su relación tamaño/área superficial), su composición (únicamente un material o tenemos un recubrimiento con un núcleo y una superficie exterior) y el medio en el cual se encuentra [4].

El incremento de uso de estos nanomateriales sigue siendo en parte una incógnita debido a la falta de conocimiento que se tiene de ellos; además, la regulación existente para su utilización sigue siendo deficiente. Por todo ello es necesario encontrar una serie de controles para conseguir regular su utilización, siendo necesario conocer no solo las características de la nanopartícula sino la concentración en la que se encuentra tanto en

los productos como de forma residual en el medioambiente y los seres que lo habitan. Son necesarios además estudios de exposición y de toxicidad ya que tampoco se conocen los efectos que puede conllevar su uso. [3], [5], [6]

Como nanoparticulas utilizadas, la mayor parte suelen pertenecer al grupo de las nanoparticulas metálicas entre las que destacar las nanoparticulas de plata (AgNPs) utilizadas tanto en el sector industrial como en el sanitario y las nanoparticulas de oro (AuNPs), explotadas también en una gran cantidad de campos encabezados por el sanitario. Debido a sus características de tamaño y área se están realizando estudios de utilización sanitarios como puede ser su uso como agente antibacteriano o para realizar diagnósticos y tratamientos de enfermedades como el cáncer. Además, tanto el oro como otras nanoparticulas metálicas debido a sus características eléctricas son utilizadas cada vez más en la fabricación de transistores, dispositivos ópticos y otros dispositivos electroquímicos [7]. En sus inicios sus principales funciones eran para la coloración de cerámicas o para la elaboración de vidrios de rubí, el cual en función del color que obtiene transmite la luz (rojo) o la refleja (verde). Utilizado también en la antigüedad como cura para algunas enfermedades como la disentería, epilepsia o tumores. A partir del siglo 19, tras la formación de soluciones coloidales estabilizadas en medios acuosos se comenzaron a investigar las propiedades ópticas que tenían, viendo que las nanopartículas de oro con un diámetro comprendido entre 1 y 10 nm formaban estructuras electrónicas con características especiales. [8]

1.1 Caracterización de NM

A pesar de la existencia y utilización ya habitual de estos nanomateriales existe todavía cierta incertidumbre sobre los métodos tanto de detección como de caracterización y cuantificación. Además de las técnicas habituales utilizadas como puede ser la microscopía electrónica (tanto de transmisión como de barrido), la microscopía atómica, las técnicas de dispersión como dispersión dinámica de luz (DLS) u otras como las técnicas atómicas como espectrometría de masas acoplado a plasma de inducción (ICP-MS) se utilizan acopladas a técnicas previas de separación para conseguir un mejor análisis. De esta forma aparecen en escena técnicas como el fraccionamiento de campo de flujo (FFF), basada en la separación por tamaños aplicando una fuerza perpendicular a la dirección por la que pasa la muestra en el separador, cromatografía hidrodinámica (HDC) cuya separación se basa en la diferencia de movilidad de la partícula (flujo hidrodinámico) o la electroforesis, (utilizada como alternativa en algunos estudios de

caracterización de nanoparticulas y cuya movilidad de nanoparticulas se basa en la relación masa/carga) acoplado a diferentes detectores para finalizar con una unión a ICPMS [9], [10]

1.2 HDC y posibles detectores

La cromatografía hidrodinámica es un método de separación desarrollado alrededor de 1969 cuyo objetivo era intentar satisfacer la necesidad de tener un método de separación de coloides más rápido y de menor coste que los ya existentes para posteriormente estudiar el tamaño y las características de estos. A pesar de ser considerado un sistema cromatográfico tiene diferencias con otras técnicas como el HPLC, partiendo de la base de que nuestro analito no tiene por qué ser soluble en la fase móvil. Además la cromatografía habitual suele tener dos fases, una móvil (gas o líquido) y una estacionaria, sin embargo el HDC utiliza una única fase móvil y una columna de separación la cual contiene unas partículas esféricas que permanecen invariables ante la presencia de la fase móvil. Las partículas se separan en función del tamaño (y de su masa molar, independientemente del tipo y de la densidad); es decir, la separación la conseguimos por diferencia de gradiente de velocidad. Las partículas de mayor tamaño se eluyen más rápidamente debido a que su coeficiente de difusión es más pequeño, moviéndose dentro de los capilares en aquellas zonas donde el flujo laminar provoca una elución más rápida. [11], [12]

La cromatografía hidrodinámica (HDC) se caracteriza por ser un método de análisis robusto y fiable, ya que se ha eliminado uno de los grandes problemas que existen en otros métodos de separación como es la interacción con la membrana en el FFF [13] o la interacción con la fase estacionaria en el HPLC; sin embargo mantiene el problema de algunas de estas técnicas, la cual es su baja resolución. [14], [15]. Tras el proceso de separación llevado a cabo mediante HDC necesitamos combinarlo con un detector para poder obtener información adicional. Los detectores utilizados suelen ser DLS, UV-Vis y ICP-MS. Mediante DLS conseguimos una determinación de tamaños gracias a la dispersión de las nanopartículas en una fase móvil en la cual su difusión viene de un movimiento browniano, sin embargo tiene importantes limitaciones como la necesidad de que la muestra sea monodispersa ya que sino los resultados pueden ser poco precisos. Otras técnicas como el UV-vis y la fluorescencia son útiles para obtener información a nivel de detección en muestras complejas como puede ser aguas residuales con un alto contenido de materia orgánica [12] y nos permite distinguir entre diferentes tipos de NPs

metálicas. El acoplamiento de las dos técnicas utilizadas para realizar este trabajo (HDC-ICP-MS) nos permitiría además de detectar estas nanoparticulas metálicas nos permite distinguir los diferentes tipos de isotopos de cada metal. La técnica de ICPMS es mucho más sensible que las otras técnicas de detección además de poseer un límite de detección mucho menor. [10]

La utilización del ICP-MS junto con el HDC como método de separación está siendo utilizado en diferentes sectores para análisis de nanoparticulas en muestras reales; uno de los más destacados es el estudio de muestras medioambientales, utilizado para caracterizar el comportamiento de NPs metálicas (TiO_2 , Fe_2O_3 , SiO_2 , Al_2O_3) en muestras medioambientales, usando además AuNPs para la calibración del instrumento [14]. Un uso común de estas técnicas es el utilizado para el estudio de nanomateriales en aguas residuales (municipales), para los cuales se utilizan AuNPs y AgNPs en agua miliQ como patrones para la validación y optimización del método experimental [16], [22], [18]. Al igual que para el estudio de aguas se ha desarrollado la técnica HDC-ICP-MS para el estudio de lodos, con el objetivo de conocer el tamaño y la caracterización elemental de algunas nanoparticulas metálicas, utilizando para la optimización del método patrones de AgNPs y demostrando que es un método de análisis rápido, robusto y sin necesidad de una preparación previa de la muestra que pueda alterar alguno de los elementos que contiene. [17]. En el ámbito sanitario, se están desarrollando importantes avances en el uso de los NM con diversos objetivos, como puede ser la disposición selectiva de fármacos, usando estas NPs para hacer capsulas con el fármaco, por lo que es necesario tener un control de sus características y de su impacto. El uso del HDC para el estudio de estas nanocápsulas es primordial ya que nos puede dar información sobre el tamaño (radio hidrodinámico, o la masa molar) y sus interacciones [24]. Se ha desarrollado además como método para la caracterización de nanopartículas de plata en otros elementos líquidos como puede ser la sangre, buscando además del estudio de estas NPs la determinación de plata disuelta [20]. Debido a que el oro es una de las nanoparticulas más utilizadas y a la vez más conocidas, también es utilizado para estudios sobre la concentración de metal que contienen las nanopartículas, de forma que además de HDC-ICP-MS, se puede utilizar el detector para realizar detección de partículas individuales (SP-ICP-MS), pudiendo obtener la distribución de tamaños de las NPs, la concentración en número de las NPs y la concentración de metal que contienen las NPs. [23].

Debido a la posible especiación de las NPs metálicas y la formación de iones, sin embargo, para poder separar y detectar estos iones, necesitamos un agente el cual interaccione con ellos y aparezca un complejo. Utilizando como separador el HDC y detector sp-ICP-MS para la caracterización de AgNPs se utilizó HSA (suero albumina humana), el cual interacciona con iones de plata, formando un complejo que permite detectarlos en muestras sanguíneas. Utilizando un dopante conseguimos detectar y separar los AgNPs y la plata iónica ya que tras la separación mediante HDC, con el sp-ICP-MS podemos detectar las NPs de forma individual. Se aplicó esta estrategia para estudiar el comportamiento de AgNPs y otras con recubrimiento incubadas en plasma humano y observar su capacidad de llegar al torrente sanguíneo tras ser administradas a pacientes con quemaduras [20].

Las condiciones utilizadas en los casos prácticos previos a la investigación, tanto de preparación de la muestra como de preparación de la fase móvil y parámetros del HDC e ICPMS nos servirán como punto de partida, buscando optimizar el objetivo de separar las nanoparticulas, en nuestro caso de oro, del oro iónico y poder detectarlos por separado de forma correcta y posteriormente poder utilizar este método en muestras complejas.

2. Objetivos y planteamiento del trabajo

El objetivo principal de este trabajo es la optimización de un método de separación de AuNPs y de oro iónico mediante HDC-ICP-MS

Este objetivo principal podemos fragmentarlo en:

- Búsqueda, estudio y comparación de antecedentes bibliográficos relacionados
- Optimización de parámetros de HDC
 - o Optimización de la fase móvil para obtener la mejor separación entre las AuNPs de diferentes tamaños y el oro iónico. Para ello se estudian los parámetros cromatográficos como son los tiempos de retención, número de platos y la resolución.
- Optimización del caudal de la FM
 - o Aplicación al método de diferentes caudales ($1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) para seleccionar el más adecuado para el método de separación de AuNPs y el Au^{3+} .
- Estudio de parámetros analíticos para los dos caudales estudiados ($1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) y para los diferentes tamaños de AuNPs estudiadas y el Au^{3+} .
- Estudio de la resolución entre AuNPs de 10 nm y el Au^{3+} en función de la concentración.

3. Parte experimental

3.1 Instrumentación: Aparatos y materiales

3.1.1 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 Tipo 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.)

3.1.2 Aparatos

- Micropipetas 50-200 μL (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 μm Filter Lab (Filtros Anoia, Barcelona, España)

3.1.3 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

3.2 Reactivos y disoluciones

3.2.1 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)

3.2.2 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)
- Triton X-100 (Sigma –Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)
- DL-Penicilamina, 5 mM

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. Su preparación se indica de forma detallada en el apartado 3.3 en procedimientos.

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, posteriormente se lava con agua ultrapura y se dejan secar para su utilización.

3.3 Procedimientos

3.3.1 Separación de AuNPs y oro disuelto mediante HDC y detección mediante ICPMS

Partiendo de lo indicado previamente (apartado 2, objetivos), el objetivo fundamental de este trabajo es el de la separación de las AuNPs y el oro iónico, centrándonos en la posibilidad de poder estudiarlos en un mismo cromatograma en comparación con otras técnicas de separación (FFF).

Uno de los elementos a estudiar y el cual debemos optimizar debido a que influye de manera notoria en la separación en el HDC es la fase móvil. 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 μL) y la salida del detector de UV visible se conecta al nebulizador del ICP-MS de forma que se acondiciona la columna y el detector con cada fase móvil utilizada al menos durante 15 minutos. También se realiza el protocolo de acondicionamiento del ICPMS, en el cual tras estabilizar el sistema debemos realizar una optimización general, la cual consiste en la utilización de diferentes recomendadas por el fabricante para tener la mejor sensibilidad y unos niveles de óxidos e iones divalentes lo más bajos posibles y posteriormente ya que vamos a trabajar con oro realizamos la optimización del voltaje con un patrón de Au^{3+} con una concentración de $10 \text{ }\mu\text{g. L}^{-1}$ en 5% de HCl (el ácido se utiliza como estabilizante de estos iones metálicos). Tanto en el acondicionamiento como al utilizar el método de detección y separación que vamos a llevar a cabo debemos controlar la presión del HDC, trabajando con una presión de entre 1400-1700 psi (el límite de la columna es de 2200 psi).

Teniendo en cuenta trabajos previos del grupo GEAS en los que se optimizo la composición de la fase móvil para la separación de AuNPs mediante HDC con detector de UV-Vis [21] se partió de dos fases móviles (FM 1 y 2, Tabla 3.1) con las que se había obtenido mejores resultados en cuanto a valores de recuperación para las AuNPs estudiadas. Sin embargo, con estas fases móviles no fue posible la caracterización de Au disuelto por lo que de acuerdo a la bibliografía y como se explicara posteriormente en resultados y discusión se añadió un estabilizador para el oro, probándose en diferentes concentraciones (FM 3, Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Composición de las fases móviles utilizadas:

	Composición
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.
Fase Móvil 2	0,45 mM de SDS
Fase Móvil 3	0,45 mM de SDS, DL-Penicilamina

El volumen final preparado de cada fase móvil es de 1L siendo el agua miliQ el componente en mayor cantidad. Partiendo del volumen final y sabiendo en cada caso la concentración inicial de cada componente, preparamos la dilución en peso (Anexo 1, tabla A.1). La elección de utilizar como primera fase móvil la 1 viene determinada por la bibliografía previamente estudiada, al igual que en la segunda [12], [14], [15]. Debido a la falta de resultados para la obtención del oro iónico se decidió la utilización de la penicilamina como acomplejante, para poder detectarlo y separarlo de las NPs. Tras la adición de todos los componentes, se añade agua hasta aproximadamente 900 mL para medir el pH y mediante HCL dejarlo sobre 7,5. 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 (Anexo 1, tablas A.2) de los tres tamaños de AuNPs (10, 50, 100 nm). Estos patrones utilizados se preparan con las disoluciones standard de las AuNPs (con una concentración de 0,053 (mg. L⁻¹) y el patrón de oro iónico (1000 mg. L⁻¹) realizando una dilución en agua miliQ. En algunos casos se realizó una adición de acomplejante para comprobar su efecto junto con el de la fase móvil. Para los patrones de AuNPs fue necesario hacer una disolución. Para la penicilamina, de la disolución inicial de 5 mM se preparó una de 2 mM para poder trabajar de manera más fácil.

El flujo también es un parámetro importante en esta técnica. Dependiendo de cuál sea el utilizado, el tiempo de retención variara. Utilizaremos un flujo en torno a 1,6 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 ya que es el adecuado para dicho instrumento. La utilización de los diferentes flujos conlleva la variación de otros parámetros como el tiempo de análisis ya que al utilizar un caudal menor, el tiempo de separación será mayor, necesitaremos alargar el proceso. Debido a que en un principio empezamos por la optimización de la separación por HDC utilizaremos un caudal en la columna de 1,6 ml/min ya que es el considerado óptimo por el fabricante.

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 NPs y oro iónico (Anexo 1, Tablas A.2). La recuperación se calcula como la señal obtenida con columna dividida entre la señal obtenida sin columna y multiplicado por 100 [11].

Tras la elección de la fase móvil se procedió también al estudio de los parámetros analíticos para ambos caudales ($1,6 \text{ mL.min}^{-1}$ y 1 mL.min^{-1}). Para ello se prepararon patrones con diferentes concentraciones ($25, 50, 100$ y $250 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) de las AuNPs (Anexo 1, tabla A.3) y se realizaron las correspondientes rectas de calibrado.

3.3.2 Comparación de sensibilidad entre AuNPs (10 nm) y Au^{3+} por ICP-MS

Como se discutirá en los resultados, tras estudiar los parámetros analíticos obtenidos en la separación de las AuNPs y el oro disuelto por HDC-ICP-MS se obtuvo una sensibilidad diferente para las NPs y el oro iónico. Por ello, se procedió a la medida directa por ICP-MS de disoluciones con distintas concentraciones de la AuNPs de 10 nm y el Au^{3+} con ácido clorhídrico (HCL) al 5%. Las concentraciones crecientes para realizar las medidas se muestran en el anexo A la tabla A.4.

4. Resultados y discusión

4.1. Optimización de la fase móvil

El objetivo principal de este trabajo se centra en la posible separación de las AuNPs y el Au^{3+} disuelto, ya que a pesar de que ya se ha desarrollado en alguna aplicación no se ha estudiado con profundidad [11]. La fase móvil más ampliamente utilizada en la bibliografía consiste una solución de Na_2HPO_4 (0,5 mM), Tritón X-100 (0,05%), SDS (0,013%) y formaldehído (0,05%) siendo además la recomendada por el fabricante de la columna [11], [16], [22]. Entre los pocos antecedentes que hemos encontrado, únicamente un estudio previo habla sobre nuestro objetivo, en el cual utiliza dicha fase móvil; sin embargo se obtuvo una sensibilidad muy pequeña en comparación con las AuNPs [11]. A. Phillippe consiguió una separación de AgNPs y de iones de plata con la adición de ácido húmico, demostrando la posibilidad de obtener dicha separación y detección mediante HDC-ICPMS con la fase móvil 1 (tabla 3.1) [15].

En estudios previos del grupo [21] se ha realizado la optimización de la fase móvil para obtener la mejor recuperación en la separación de AuNPs de diferentes tamaños utilizando como detector UV-Visible (10, 50 y 100 nm). Los mejores resultados se obtuvieron con las fases móviles 1 y 2 (tabla 3.1) por lo que el estudio se inicia utilizando estas dos fases móviles y comprobando si también son las óptimas para separar las AuNPs del oro iónico. Comenzamos utilizando además un caudal de $1,6\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, recomendada por el fabricante de la columna.

4.1.1 Fase móvil 1

Con la fase móvil 1 (tabla 3.1), se realizó el análisis inyectando disoluciones de AuNPs así como de iones oro (con una concentración de $250\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para las nanopartículas y $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para los iones oro), (Anexo 1, tabla A.2.1) para estudiar los parámetros cromatográficos.

Podemos observar entonces un chromatograma con los diferentes tamaños de partícula (figura 4.1) obtenidos.

Figura 4.1. Cromatograma AuNPs en HDC-ICP-MS con la FM1

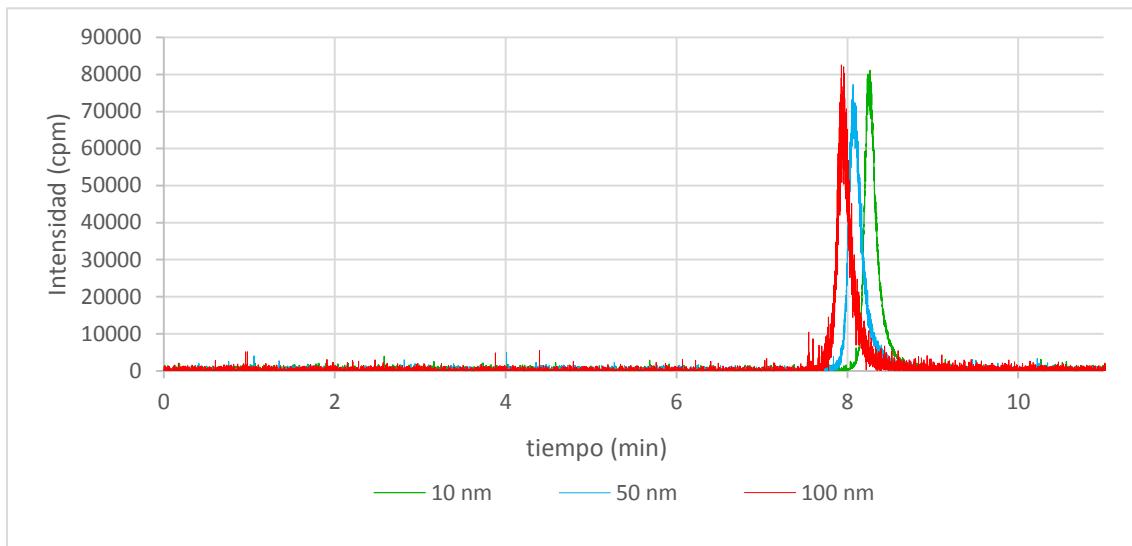


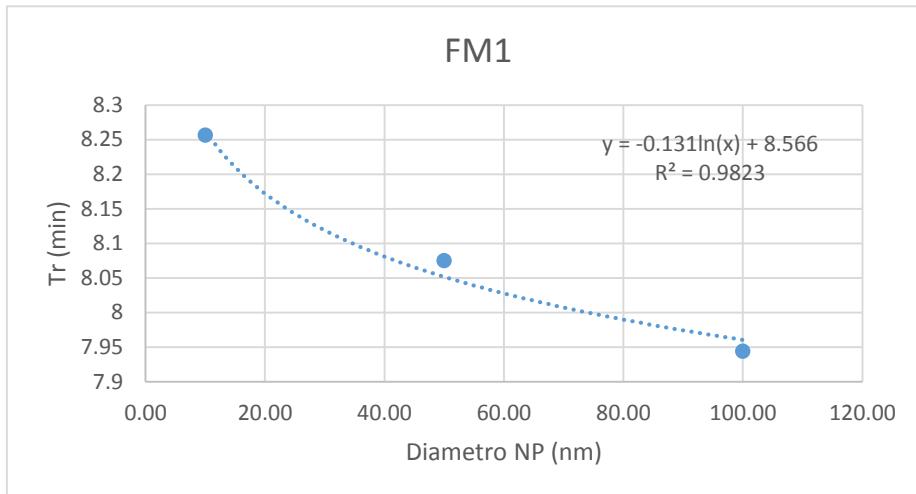
Tabla 4.1. Resultados de la separación de AuNPs mediante HDC con la FM1

Tamaño NPs	Tr (min)	DSR (%)	Resolución	N	Recta calib. tiempo/tamaño	R
10 nm	8.26	0.08	0.23	1704 1851 2457	$y = -0.131\ln(x) + 8.566$	0.991
50 nm	8.08	0.16	0.19			
100 nm	7.94	0.12				

Como podemos observar en la figura 4.1 (y la tabla 4.1) aparecen 3 picos correspondientes a los tiempos de retención de las AuNPs de 3 tamaños diferentes (10, 50 y 100 nm) con una baja resolución como era de esperar, de acuerdo a la bibliografía, sin embargo no aparece el pico correspondiente al oro iónico. Esto puede ser debido a que el oro iónico pueda interaccionar con la columna debido a la doble capa eléctrica que se genera. Tras varias inyecciones con el patrón del oro iónico en ningún caso se obtuvo el pico correspondiente, lo cual está en contraposición con A. Phillippe [12] aunque este utilizo en la fase móvil Brij L23 como tensioactivo.

Como podemos observar en el figura 4.2 y en la tabla 4.1 la recta de calibración obtenida en la representación del tiempo frente al tamaño es bastante similar a las encontradas en la bibliografía [14], [17], [22] con un coeficiente de correlación bueno (0,991).

Figura 4.2. Recta de calibración de tiempos de retención en función del diámetro



En la tabla 4.1 podemos ver además que el número de platos (N) aumenta a la vez que aumenta el tamaño de las AuNPs (en una columna de HPLC el número de platos es muchísimo mayor, estando en torno a 200000, en nuestro caso serán muchos menos debido a que no tenemos interacción dentro de la columna), de forma que aumenta la interacción con la columna con las AuNPs de mayor tamaño.

Como se puede observar en la figura 4.1 los tiempos de retención son inversamente proporcionales al tamaño de las AuNPs obteniéndose una buena reproducibilidad ya que como podemos observar tiene una DSR menor a 0,2%.

Se procedió al estudio de recuperación para las AuNPs, basándonos en las diferencias de señal (altura y área) existentes al pasar muestras similares con y sin columna [11]. De esta forma podemos estudiar si existen perdidas de AuNPs durante el proceso.

Como podemos ver en la tabla 4.2 las recuperaciones mejoran cuanto menor es el tamaño de la nanopartícula, teniendo un 77% con un DSR de 1,8% para las de 10 nm y un 68% con un DSR de 4,7 para las de 100 nm. Como se puede observar se obtienen mejores recuperaciones con mayor precisión en áreas que en alturas, obteniéndose unos valores inferiores al 100% por lo que se observan perdidas en la columna, aumentando estas pérdidas a medida que aumenta el tamaño de la AuNP.

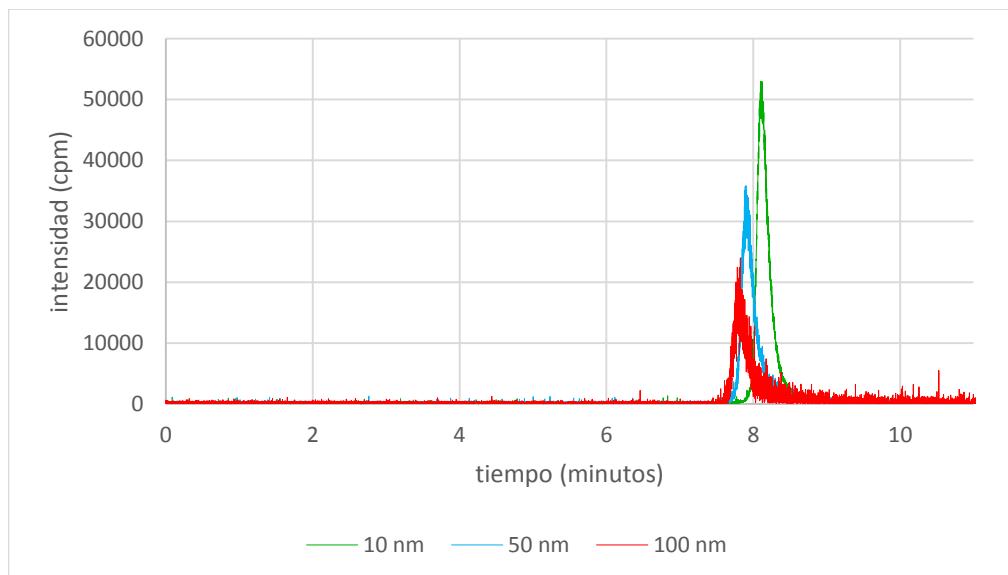
Tabla 4.2. Recuperaciones obtenidas del estudio de los patrones de las AuNPs

Tamaño NPs	Recuperaciones (%)		DSR (%)	
	Área	altura	Área	altura
10 nm	76.89	56.79	1.84	3.28
50 nm	74.33	48.79	1.40	11.2
100 nm	68.71	45.82	4.70	10.3

4.1.2. Fase móvil 2

Debido a los resultados previos obtenidos por el grupo [21] se realizó el mismo estudio con la fase móvil 2, que únicamente contiene SDS 0,45 mM (anexo A tabla A.1). En uno de los estudios previos del año 2012 [24] el cual buscaba la detección de nanoparticulas metálicas mediante HDC-ICP-MS se utilizó una fase móvil la cual contenía solo agua milliQ y SDS con una concentración de 10 mM con un pH de 11 se consiguió separar AuNPs de diferentes tamaños con una resolución baja y con dificultades de señal a medida que aumentaba el tamaño de la AuNP. En nuestro caso se inyectaron también los patrones de los tres tamaños de AuNPs (anexo A, tabla A.2.2) en una concentración de $250 \mu\text{g. L}^{-1}$ y el oro iónico en una concentración de $500 \mu\text{g. L}^{-1}$ con un caudal de $1,6 \text{ ml. min}^{-1}$.

Figura 4.3 Cromatograma AuNPs en HDC-ICP-MS con la FM 2



El cromatograma obtenido se muestra en la figura 4.3 en el que podemos ver que tampoco se obtuvo señal correspondiente al oro iónico. Los parámetros cromatográficos se muestran en la tabla 4.3.

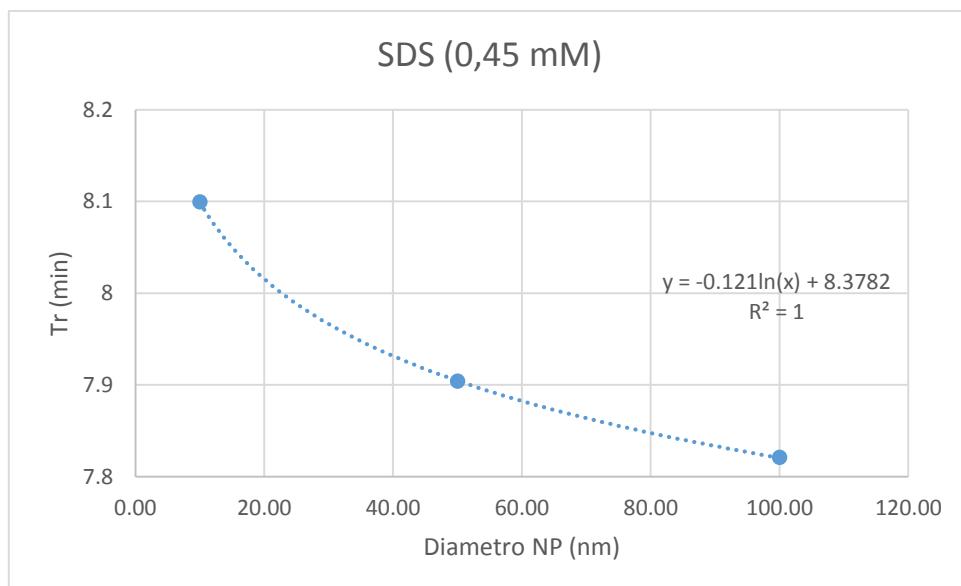
Tabla 4.3. Resultados de la separación de AuNPs mediante HDC con la FM 2

Tamaño NPs	Tr (min)	DSR (%)	Resolución	N	Recta calib. tiempo/tamaño	R
10 nm	8.10	0.04	0.24	1527	$y = -0.121\ln(x) + 8.3782$	1.000
50 nm	7.90	0.13	0.11	1561		
100 nm	7.82	0.53		2927		

Los tiempos de retención obtenidos han disminuido con respecto a los de la fase móvil 1 debido a una menor fuerza iónica, ya que como podemos observar las AuNPs salen antes con esta segunda fase móvil. Se obtienen tiempos de retención bastante reproducibles (con una DSR menor de 0,5), con unos valores de resolución similares a los anteriores (tabla 4.3 y tabla 4.1).

Al realizar la calibración de tiempos de retención frente a tamaño de NPs podemos observar que es mejor que la de la fase móvil 1 ya que a pesar de que son bastante similares, la correlación entre los puntos es muy buena, dando un valor de correlación de 1.

Figura 4.4. Recta de calibración de tiempos de retención en función del diámetro



Con esta fase móvil se calcularon también las recuperaciones para las 3 AuNPs, a partir de las áreas y las alturas con respectivas DSR. Con respecto a las áreas se ha mejorado la recuperación en torno a un 10% con respecto a la primera fase móvil, a excepción de las nanoparticulas más grandes (100 nm); teniendo en cuenta que las DSR son bastante similares (a pesar del aumento notable pero aislado de la nanopartícula de 50 nm). Con respecto a las alturas también se ha producido una pequeña mejora excepto para la

nanopartícula de oro de 100 nm; sin embargo la recuperación en ninguno de los casos llega a ser del 100% por lo que seguimos teniendo perdidas en la columna (tabla 4.4).

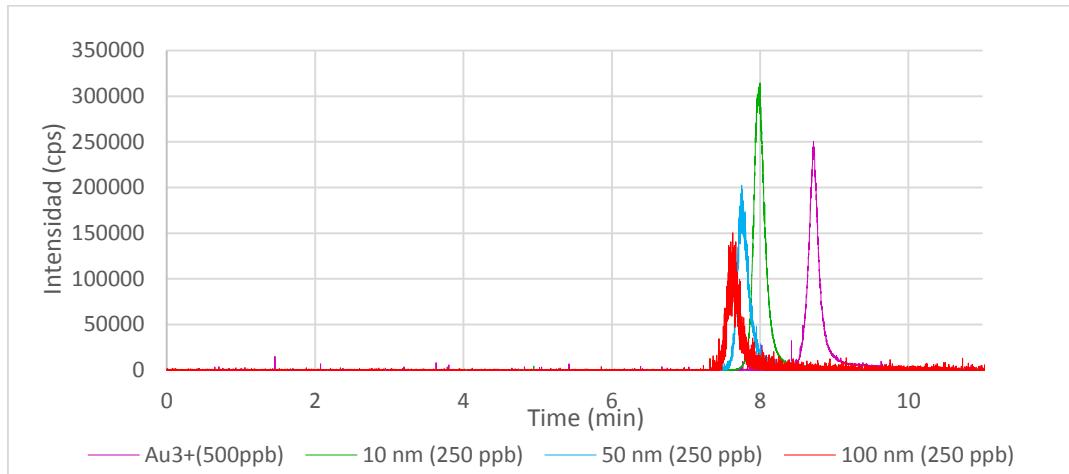
Tabla 4.4. Recuperaciones obtenidas del estudio de los patrones de las AuNPs

Tamaño NPs	Recuperaciones (%)		DSR (%)	
	Área	altura	Área	altura
10 nm	87.88	71.52	1.57	4.40
50 nm	83.27	52.83	5.63	5.57
100 nm	44.06	29.81	4.59	9.57

4.1.3. Fase móvil 3

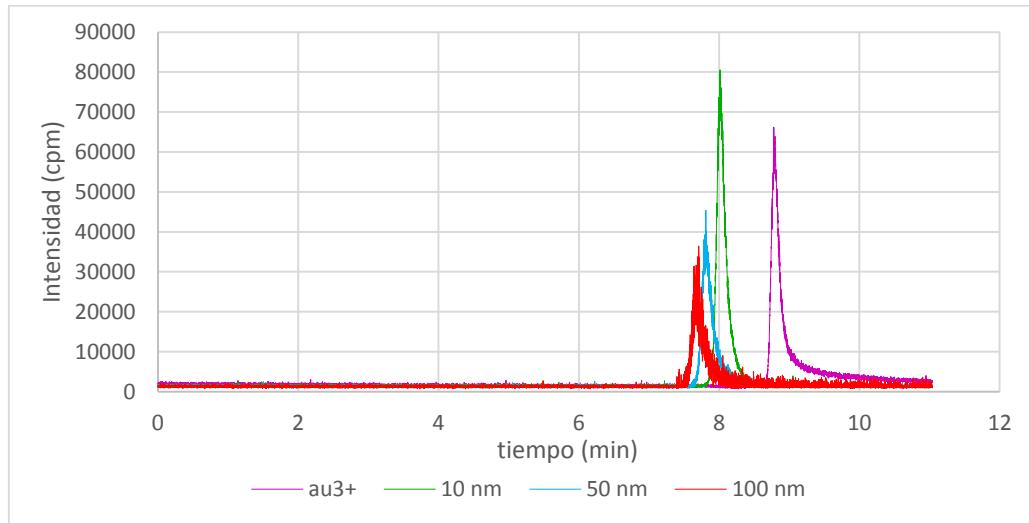
Teniendo en cuenta nuestro principal objetivo, el cual consistía en detectar y separar el oro iónico de las AuNPs se pensó en utilizar un agente acomplejante del oro que permitiera la separación del mismo en presencia de las nanoparticulas. Inicialmente se probó con L-metionina en una concentración 0,2 mM, añadiéndola a la fase móvil 2 la cual como hemos dicho contenía únicamente SDS 0,45 mM. Se inyectaron los patrones de las tres AuNPs con una concentración de $250 \mu\text{g. L}^{-1}$ y oro iónico con una concentración de $500 \mu\text{g. L}^{-1}$ por triplicado. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 4.5 donde podemos observar que en este caso si aparece el pico correspondiente al Au^{3+} con una señal casi similar a la obtenida para la Aun de 10 nm. Sin embargo estos resultados no fueron reproducibles y en días posteriores no se obtuvo señal para el oro ionico. Por ello se descartó su utilización y se pensó en otro estabilizador usado en la bibliografía para la separación de oro iónico en presencia de AuNPs por HPLC-ICP-MS [19] y por electroforesis capilar (EC) acoplado a ICP-MS [24]. El estabilizador utilizado es la penicilamina, la cual realiza la función de agente quelante, adhiriéndose al oro iónico e impidiendo su disolución, así como posibilitando su separación mediante HDC y su detección con ICPMS.

Figura 4.5. Cromatograma de AuNPs y oro iónico con L-metionina



En un principio se utilizó una concentración de penicilamina de 0,2 mM, obteniéndose el chromatograma que se puede ver en la figura 4.6. Se puede observar en este la separación existente entre las 3 AuNPs y el oro iónico; de forma que por primera vez se pudo obtener un resultado reproducible en el tiempo. Además, podemos observar una disminución de los tiempos de retención con respecto a la fase móvil 1.

Figura 4.6. Cromatograma AuNPs en HDC-ICP-MS con la FM3 (0,2 mM PA)

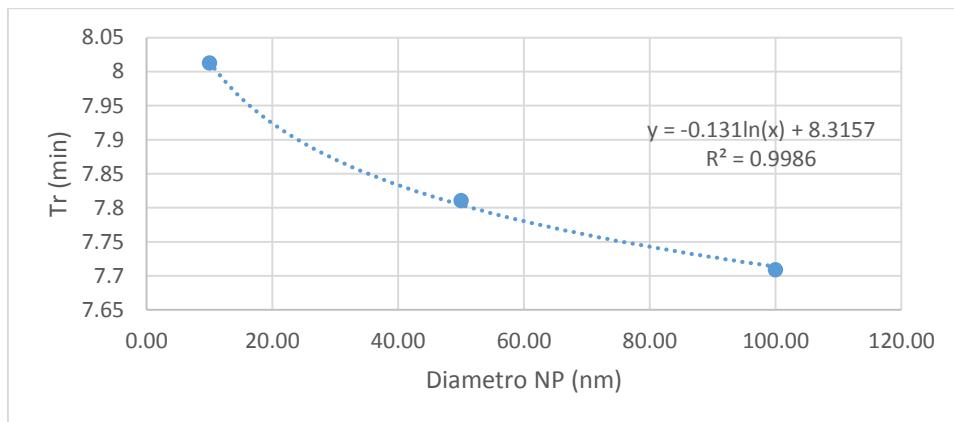


Como se puede observar en la tabla 4.5 (y figura 4.7) la adición de la penicilamina nos deja una resolución entre nanoparticulas bastante similar a las fases móviles anteriores (alrededor de 0.2), con una recta de calibración, que refleja los tiempos de retención en función del tamaño, con una buena correlación ($R= 0,999$).

Tabla 4.5. Resultados de la separación de AuNPs mediante HDC

Tamaño NPs	Tr (min)	DSR (%)	Resolución	N	Recta calib. Tiempo/tamaño	R
10 nm	8.01	0.06	0.20	1789	$y = -0.131\ln(x) + 8.3157$	0.999
50 nm	7.88	0.84	0.12	1236		
100 nm	7.74			1912		
Au^{3+} sin PA	8.81	0.36	0.69	794		

Figura 4.7. Recta de calibración de tiempos de retención en función del diámetro



Se calcularon también las recuperaciones tanto para las AuNPs como el oro iónico, que aparecen en la tabla 4.6. Se probó a inyectar el oro iónico con y sin PA (0,2 mM) en la propia disolución además de introducirlo en la FM.

Tabla 4.6. Recuperaciones obtenidas del estudio de los patrones de las AuNPs

Tamaño NPs	Recuperaciones (%)		DSR (%)	
	Área	altura	Área	altura
10 nm	114.5	86.48	1.99	10.1
50 nm	82.10	31.57	1.92	5.10
100 nm	85.88	48.30		
Au^{3+} con PA	43.41	36.33	7.76	11.7
Au^{3+} sin PA	59.24	36.98	6.89	25.0

Al comparar las recuperaciones calculadas de las áreas para la fase móvil que contiene 0,2 mM de penicilamina frente a la fase móvil 1 podemos ver que existe un aumento de la recuperación mayor del 10% en todos los casos, llegando incluso a conseguir una recuperación total de las nanoparticulas más pequeñas (10 nm) y una buena DSR. Con respecto a las alturas la mejoría en la recuperación se da principalmente en la muestra que contiene nanoparticulas de 10 nm (pasando de un 56,79% con una DSR del 3,3% a un 86,5% aunque con una DSR más elevada 10%). Con respecto al oro iónico podemos

observar una mejoría de la recuperación en área para las muestras que no contienen penicilamina; lo que nos da indicios de la innecesidad de introducir penicilamina si ya la contiene la fase móvil.

A continuación se estudió la concentración óptima de penicilamina para obtener una buena recuperación tanto para las AuNPs como para el Au iónico ya que en la bibliografía [19] se observó que a mayor concentración de PA la señal para las AuNPs disminuía. Se procedió al análisis con las distintas concentraciones de penicilamina pero manteniendo el resto de parámetros cromatográficos (preparación de los patrones en anexo A tabla A.2.3 y A.2.4, caudal a $1,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$). Comenzando por la de concentración de penicilamina mayor ($0,5 \text{ mM}$) y después la menor ($0,05 \text{ mM}$) y con la principal función de optimizar la concentración correcta para obtener los mejores resultados posibles.

Figura 4.8. Cromatograma AuNPs en HDC-ICP-MS con la FM3 ($0,5 \text{ mM PA}$)

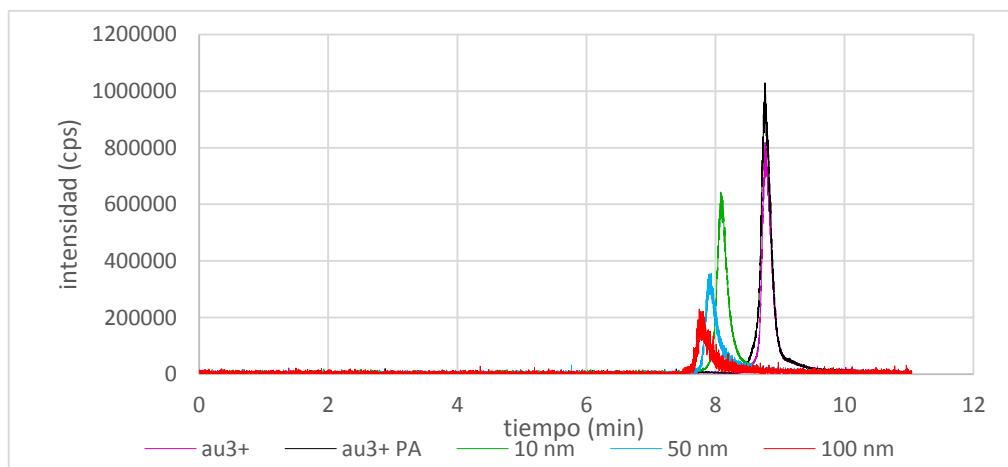
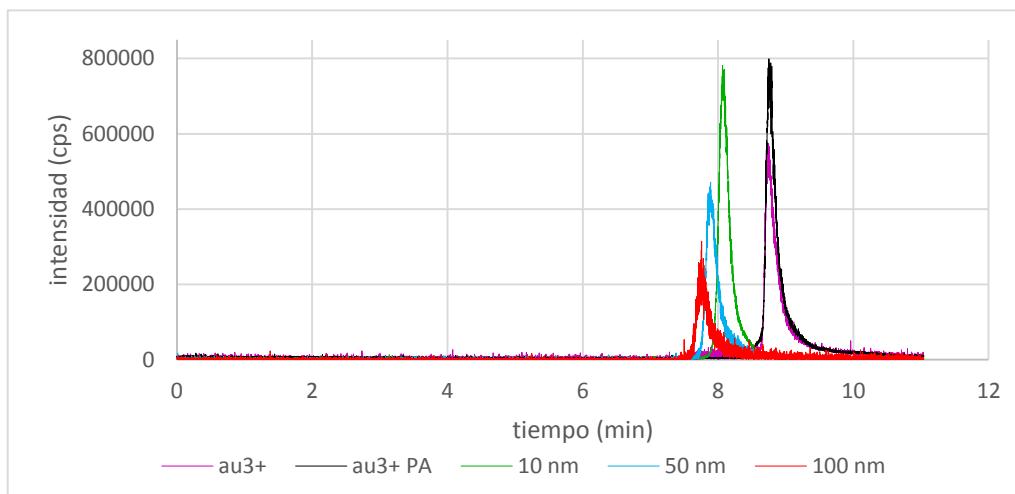


Figura 4.9. Cromatograma AuNPs en HDC-ICP-MS con la FM3 ($0,05 \text{ mM PA}$)



Desde un inicio podemos ver en los cromatogramas de las 3 concentraciones de penicilamina (figura 4.6, 4.8 y 4.9) que el tiempo de retención no se ve prácticamente afectado por esta. Para poder comprobar si la penicilamina influye en la sensibilidad de señal del ICPMS deberíamos realizar las pruebas introduciendo un patrón interno conocido con el que poder compararlas. Se puede observar además una influencia negativa para las AuNPs más grandes (100 nm) ya que la señal que observamos en el cromatograma en todos los casos no es buena, siendo baja y con mucho ruido de fondo. Se probó en varios casos a introducir penicilamina en los patrones de oro iónico además de en la fase móvil, sin embargo las diferencias conseguidas fueron insignificantes y se acabó desecharlo buscando además una menor preparación de los patrones, pensando en un posterior análisis de muestras reales.

Como hemos comentado, los tiempos de retención no se ven afectados por la concentración ya que son similares y con unas DSR que se mantienen de la misma forma (como podemos ver en las tablas 4.7 y 4.8 están en torno a 0,2); pasando lo mismo con la resolución; que a su vez se mantiene con las otras dos fases móviles anteriores. Para las AuNPs conseguimos una resolución en torno 0,15-0,20, similar a las encontradas con las otras FM, sin embargo podemos decir que ha aparecido una mejora ya que la resolución obtenida para el oro iónico está en todos los casos en torno al 0,7%. Esta resolución sigue siendo baja, sin embargo nos permite detectar oro iónico y diferenciarlo claramente de las nanopartículas. Con unas rectas de calibrado con diferencias mínimas, podemos ver que la diferencia de correlación entre todas es menor de 0,01 (los valores de R para las 3 concentraciones de PA están entre 0,980-0,999) por lo que no podemos elegir la mejor opción en función de estas rectas. (Figuras 4.7, 4.10 y 4.11 y tablas 4.5, 4.7 y 4.8).

Figura 4.10. Recta de calibración de tiempos de retención en función del diámetro (FM 0,5 mM PA)

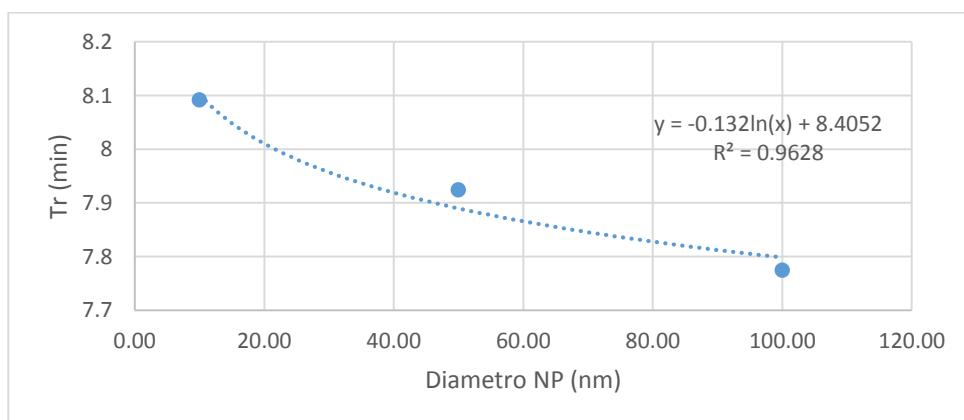


Figura 4.11. Recta de calibración de tiempos de retención en función del diámetro (FM 0,05 mM PA)

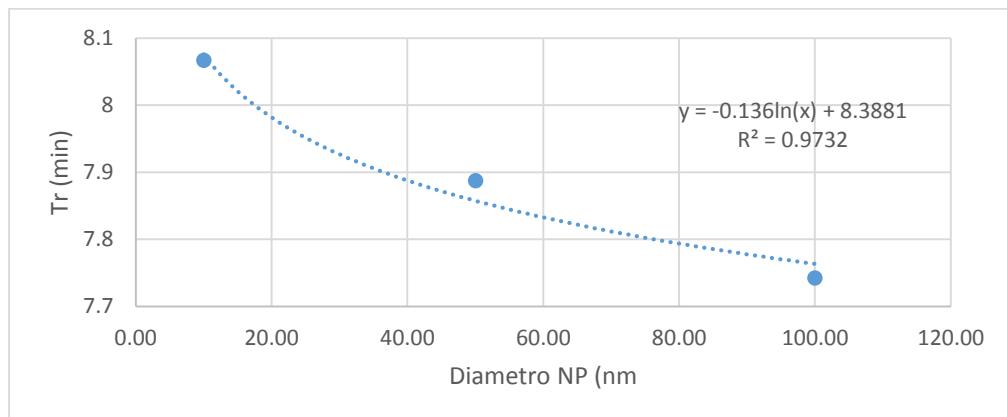


Tabla 4.7 Resultados de la separación de AuNPs mediante HDC (FM 0,5 mM PA)

Tamaño NPs	Tr (min)	DSR (%)	Resolución	N	Recta calib. tiempo/tamaño	R
10 nm	8.09	0.13	0.19	1206	$y = -0.132\ln(x) + 8.4052$	0.981
50 nm	7.92	0.12	0.20	1536		
100 nm	7.77	0.30		2162		
Au ³⁺ con PA	8.77	0.09	0.76	1618		
Au ³⁺ sin PA	8.76	0.20	0.71	1363		

Tabla 4.8 Resultados de la separación de AuNPs mediante HDC (FM 0,05 mM PA)

Tamaño NPs	Tr (min)	DSR (%)	Resolución	N	Recta calib. tiempo/tamaño	R
10 nm	8.07	0.16	0.20	995	$y = -0.136\ln(x) + 8.3881$	0.987
50 nm	7.89	0.05	0.19	1520		
100 nm	7.74	0.17		1706		
Au ³⁺ con PA	8.75	0.11	0.60	759		
Au ³⁺ sin PA	8.76	0.20	0.67	1061		

Para el cálculo de las recuperaciones (tabla 4.9) podemos observar que se ha conseguido una mejora en las AuNPs con respecto a las fases móviles anteriores; ya que hasta para las nanopartículas de mayor tamaño, con las cuales vemos que las pérdidas son mayores, conseguimos igualar esta recuperación. Podemos ver un aumento de la recuperación para las AuNPs de 10 y 50 nm, obteniendo el mejor resultado para la fase móvil con la concentración de penicilamina más baja (0,05 mM), con la que obtenemos una recuperación total (100% AuNPs de 10 nm y 50 nm). Aunque las DSR han aumentado en algún caso, los resultados son reproducibles, sobre todo para las NPs de 10 nm y el oro iónico, en el cual podemos ver tanto para las áreas como para las alturas, que la recuperación del oro iónico aumenta con la menor concentración de penicilamina.

Obtenemos con una concentración de penicilamina de 0,05 mM una recuperación del 94% en área y del 85% en altura para el oro iónico. La diferencia de la recuperación en área y altura de los patrones con y sin penicilamina tienen una diferencia menor del 10%, por lo que para facilitar un posterior análisis de muestras complejas elegimos las muestras que no contienen penicilamina, incluyendo a esta únicamente en la fase móvil (tabla 4.6, 4.9 y 4.10).

Tabla 4.9. Recuperaciones obtenidas del estudio de los patrones de las AuNPs (FM 0,5 mM PA)

Tamaño NPs	Recuperaciones (%)		DSR (%)	
	Área	altura	Área	altura
10 nm	116.8	77.60	2.07	4.27
50 nm	76.00	48.57	10.65	5.40
100 nm	61.13	38.46	2.72	7.74
Au ³⁺ con PA	91.20	93.19	1.32	2.62
Au ³⁺ sin PA	78.37	73.93	5.26	10.1

Tabla 4.10. Recuperaciones obtenidas del estudio de los patrones de las AuNPs (FM 0,05 mM PA)

Tamaño NPs	Recuperaciones (%)		DSR (%)	
	Área	altura	Área	altura
10 nm	123.4	82.11	12.8	1.93
50 nm	102.67	58.85	1.58	2.69
100 nm	71.48	38.08	13.2	9.28
Au ³⁺ con PA	81.60	81.45	7.50	7.64
Au ³⁺ sin PA	94.20	86.64	2.83	7.67

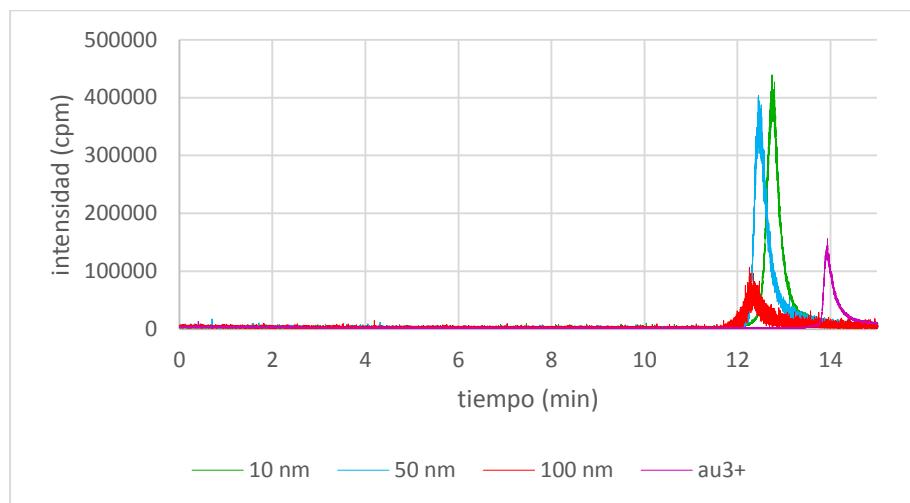
En conclusión, debido a la detección del oro iónico, así como de las nanoparticulas, obteniendo además una buena señal con una resolución alrededor del 0,7 se eligió para proseguir con la optimización del proceso la fase móvil 3, que contiene SDS en una concentración de 0,45 mM y penicilamina, eligiendo una concentración de 0,05 mM. Esta elección se ve justificada además por los resultados de recuperación del 94% para el oro iónico y del 100% para las AuNPs de 10 y 50 nm.

4.2. Optimización del caudal

Durante la optimización de la fase móvil hemos usado un caudal de $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, recomendado por el fabricante de la columna pero el caudal adecuado para trabajar con el ICP-MS esta en torno a $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; de esta forma realizamos el proceso de manera similar al diseñado anteriormente para la fase móvil optima consistente en miliQ con SDS

0,45 mM y penicilamina 0,05 mM con pequeñas diferencias; como la de aumentar el tiempo de análisis ya que a menor velocidad, los tiempos de retención se retrasan, por lo que será necesario aumentar el proceso hasta los 15 minutos aproximadamente. Los patrones utilizados para la optimización tendrán la misma concentración ($250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para los patrones de AuNPs y $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para el patrón. de oro iónico) y se realizaran las medidas por triplicado.

Figura 4.12. Cromatograma AuNPs en HDC-ICP-MS con la FM3 (0,05 mM PA)



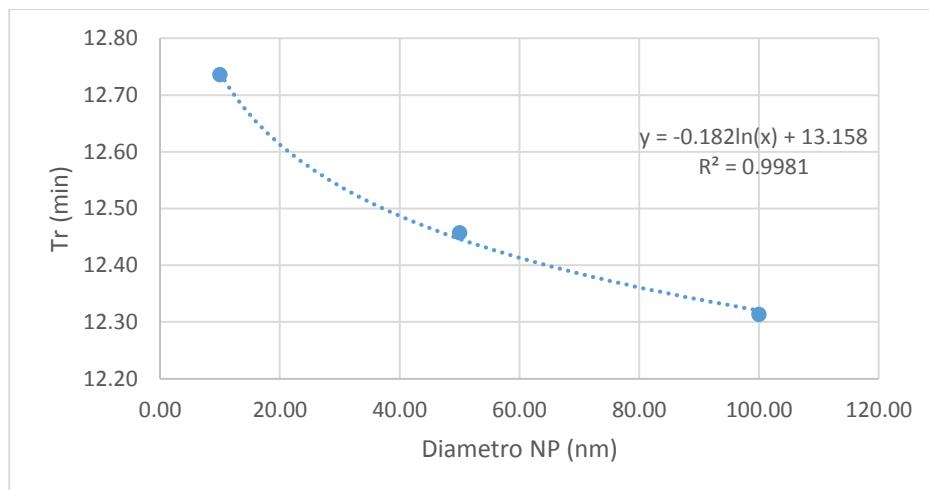
En la figura 4.12 se puede observar una mejora de la resolución para el oro iónico; sin embargo aparecen una serie de inconvenientes a la hora de utilizar este caudal, empezando por la diferencia de sensibilidad entre las AuNPs más pequeñas (10 nm) y el oro iónico y la señal tan pequeña y con un alto ruido de fondo para las AuNPs de 100 nm. La disminución de caudal ha producido además, como era de esperar un aumento en la anchura de los picos, aunque debido al mayor tiempo de retención, como podemos observar en la tabla 4.11 los números de platos parecen bastante similares a los aparecidos con el caudal de $1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a excepción de las nanoparticulas de 100 nm y el oro iónico que han aumentado considerablemente (3565 platos y 2736 platos respectivamente) lo que, uniéndolo a la debilidad de la señal nos proporciona información de una posible interacción en la columna.

Tabla 4.11. Resultados de la separación de AuNPs mediante HDC

Tamaño NPs	Tr (min)	DSR (%)	Resolución	N	Recta calib.	R
10 nm	12.74	0.07	0.21	1298.3	$y = -0.182\ln(x) + 13.158$	0.999
50 nm	12.46	0.08	0.15	1533.1		
100 nm	12.31	0.64		3565.6		
Au ³⁺ sin PA	13.93	0.08	0.96	2736.0		

La resolución es bastante similar entre nanoparticulas y la resolución con respecto al oro iónico ha aumentado desde 0,7 a 0,96. Además como podemos observar en la recta de calibración de tiempo frente a tamaño, a pesar de tener una R muy próxima a la idealidad, la pendiente ha variado notablemente con respecto a la calibración para el caudal de 1,6 ml/min (tabla 4.11 y figura 4.13).

Figura 4.13. Recta de calibración de tiempos de retención en función del diámetro



Se calculó también la recuperación tanto en función de las áreas como de las alturas (tabla 4.12) obteniéndose valores en área superiores próximas al 100% para las nanoparticulas de 10 nm, 50 nm y el oro iónico pero la recuperación para las AuNPs de 100 nm ha descendido hasta un 34,7%.

Tabla 4.12. Recuperaciones obtenidas del estudio de los patrones de las AuNPs

Tamaño NPs	Recuperaciones (%)		DSR (%)	
	Área	altura	Área	altura
10 nm	98.61	62.18	6.66	12.8
50 nm	99.75	64.80	4.37	5.09
100 nm	34.74	22.71	0.37	9.90
Au ³⁺ sin PA	101.4	62.09	4.91	8.42

Aunque los resultados de calcular las resoluciones así como los de recuperaciones a través de las áreas son bastante similares para ambos caudales; se decide utilizar el caudal de 1,6 mL·min⁻¹ debido a que la mayor eficiencia de los picos en el cromatograma y los valores de las recuperaciones para las nanoparticulas de oro de 100 nm son mejores, con un tiempo de análisis menor. En el caso de necesitar una mayor resolución entre el oro iónico y las AuNPs se debería usar el caudal de 1 mL·min⁻¹.

4.3. Estudio de los parámetros analíticos

Tras la optimización de la fase móvil y el caudal de la misma se procedió al estudio de los parámetros analíticos como pueden ser el límite de detección (LD) y cuantificación (LC), la incertidumbre (DSR) y el rango lineal

Se prepararon 4 muestras de concentraciones crecientes aproximadas a 25, 50, 100 y 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (valores exactos en el anexo A, tabla A.3.1) para cada nanopartícula y para el oro iónico, con el fin de realizar la recta de calibración correspondiente para cada una. Se realizó tanto para el caudal de 1 mL.min^{-1} como para el caudal de $1,6 \text{ mL.min}^{-1}$ con la intención de observar si existen diferencias notables entre los dos caudales posibles de trabajo.

Como podemos ver en la figura 4.14, la cual contiene las rectas de calibración obtenidas para el caudal de 1 mL.min^{-1} , no fue posible la calibración para las nanoparticulas de 100 nm ya que, como pudimos observar en el estudio de las fases móviles, a medida que aumentaba el tamaño de las NPs la señal del cromatograma era cada vez peor, con mayor anchura y más ruido de fondo, lo que se vio amplificado con las concentraciones más pequeñas, llegando incluso a no aparecer señal (con la concentración de $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ la señal no superaba el límite de detección). Con respecto a las otras nanopartículas podemos ver que hay una buena correlación entre la concentración y la señal observada. Tanto para las AuNPs de 10 y 50 nm como para el oro iónico los coeficientes de correlación son próximos a 1(tabla 4.13)

Figura 4.14. Recta de calibración con FM3 (0,05 mM PA) y un caudal de 1 mL.min^{-1}

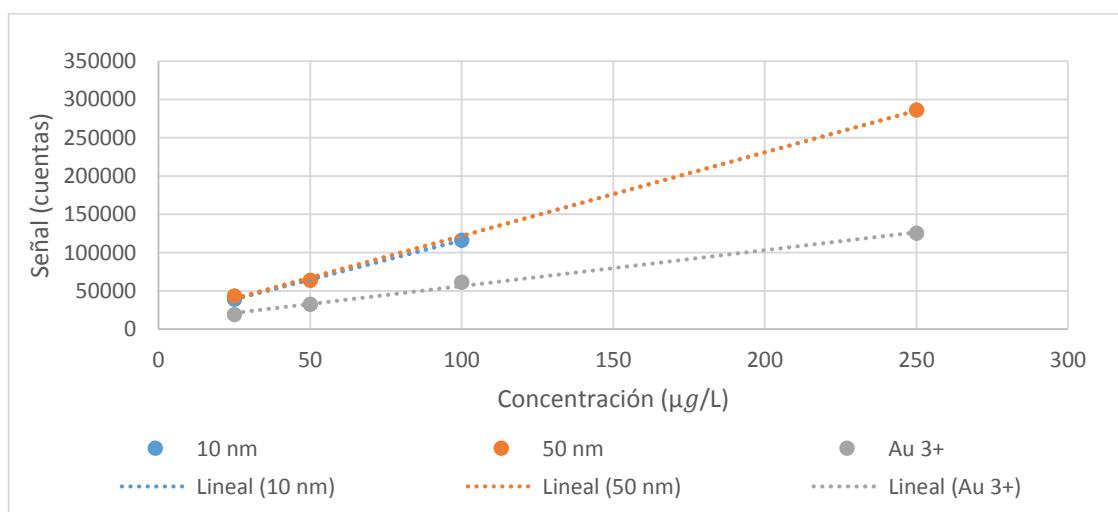


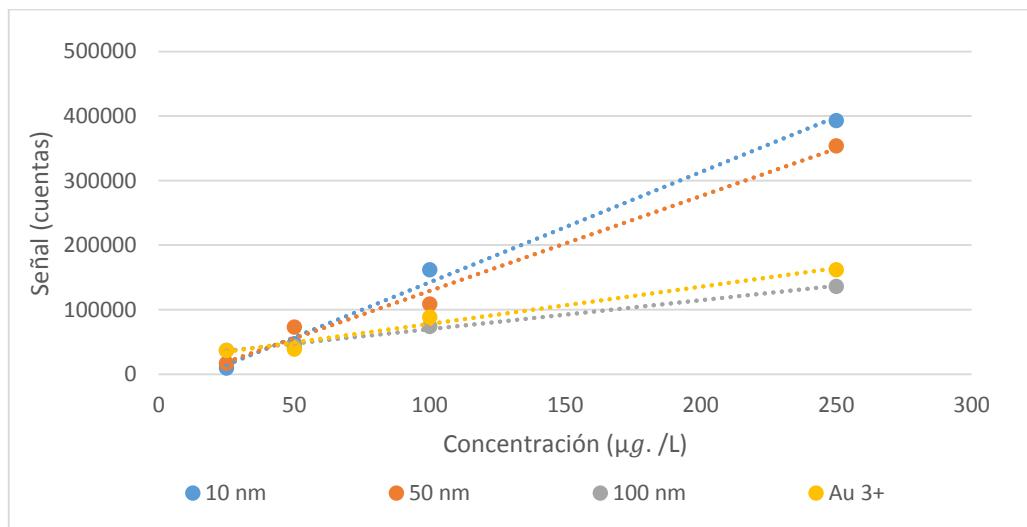
Tabla 4.13. Parámetros calibración y límites con el caudal de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

	Recta calibrado	R	LD ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	DSR (%)
10 nm	$y = 1025.7x + 13347$	1	0.61	2.04	6.66
50 nm	$y = 1092.1x + 12532$	0.999	2.34	7.79	4.37
Au ³⁺	$y = 467.91x + 9508.9$	0.998	2.52	8.40	4.91

Los límites de detección mejores son para las AuNPs más pequeñas, de 10 nm; empeorando para las de 50 nm y el oro iónico. Podemos ver en la tabla 4.13 que los valores de DSR más bajos se pueden observar para la NPs de 10 nm tienen el valor de incertidumbre más alto (6,66) y disminuye en función que aumenta el tamaño. El valor de oro iónico se encuentra próximo al valor de la AuNP de 50 nm (4,37).

Por otro lado podemos ver en la figura 4.15 las rectas de calibración obtenidas con los mismos patrones y la misma fase móvil a un caudal de $1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, idóneo para trabajar en el HDC. Los resultados nos vuelven a confirmar la utilización de este caudal como el más óptimo ya que como podemos observar los valores de R resultantes de las rectas de calibración son mucho más cercanos a 1 para todas las especies estudiadas pudiendo obtener además una recta de calibración correcta para la nanopartícula de 100 nm, lo cual fue imposible para el caudal de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Figura 4.15. Recta de calibración con FM3 (0,05 mM) y un caudal de $1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$



Encontramos pequeñas variaciones en los límites de detección y cuantificación, siendo en todo caso algo mejores los resultados para este caudal, ya que se han estabilizado los valores de las nanoparticulas pequeñas con un límite menor de $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ y hemos reducido

la del oro iónico hasta aproximadamente $2,1 \text{ }\mu\text{g. L}^{-1}$. Los valores de incertidumbre y rango lineal son similares al caudal de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Tabla 4.14).

Tabla 4.14. Parámetros calibración y límites con el caudal de $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

	señal	R	LD ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	DSR (%)
10 nm	$y = 1707.1x - 28335$	1.00	0.91	3.04	12.8
50 nm	$y = 1466.2x - 17521$	0.99	0.65	2.18	1.58
100 nm	$y = 447.84x + 25113$	1.00	4.91	16.4	13.2
Au ³⁺	$y = 575.34x + 20476$	0.99	2.09	7.00	2.83

Podemos observar que los valores de incertidumbre (DSR) son en general del mismo orden que para el caudal de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

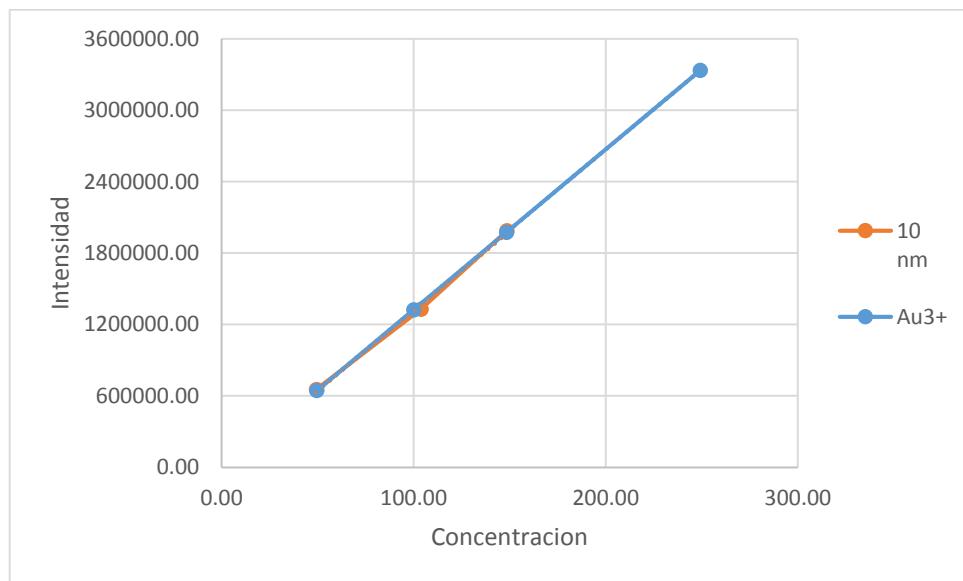
4.4. Comparación de sensibilidad entre AuNPs (10 nm) Au³⁺ por ICP-MS

Es de destacar la diferencia de sensibilidad entre las diferentes especies de AuNPs de diferentes tamaños estudiadas y el oro iónico. En el único estudio que hemos encontrado en la bibliografía en el que se estudian parámetros analíticos [12] no encontraron diferencias en la sensibilidad en la separación por HDC y detección por ICP-MS, pudiendo haber alguna diferencia de sensibilidad para las nanoparticulas mayores de 100 nm. En el estudio el cual utiliza CE-ICP-MS se observaron diferencias de sensibilidad para los diferentes tamaños de las AuNPs al realizar la calibración [24].

El problema en nuestro caso puede estar ocasionado por una inestabilidad del oro iónico o que la concentración de los patrones de AuNPs no sea la indicada por el fabricante. La concentración de los patrones de AuNPs ha sido determinada en el grupo del GEAS [21] obteniéndose como resultado la inexistencia de diferencias significativas entre la concentración encontrada tras el ataque con ácido clorhídrico y nítrico en proporción 1:3 y la indicada por el fabricante a un nivel de confianza del 95% [15].

Por ello se procedió a la realización de dos rectas de calibrado directamente por ICP-MS para las AuNPs de 10 nm y el Au³⁺ estabilizado con HCL 5%. Las concentraciones de los patrones las podemos ver en el anexo A en la tabla A.4. Las rectas de calibración obtenidas fueron las que aparecen en la figura 4.15, siendo la recta para la AuNP de 10 nm $Y=13479x-24473$ y la del oro iónico $Y=13397x-24553$.

Figura 4.16. Rectas de calibrado de la Au de 10 nm y oro iónico



Como se observó (figura 4.16) las pendientes son muy similares teniendo en ambos casos valores de R muy elevados (0,998 para la recta de calibración del oro iónico y 0,999 para la recta de calibración del AuNP de 10 nm) por lo que el problema de diferencia de sensibilidad por HDC-ICP-MS puede ser problema de la estabilidad del oro iónico en agua miliQ (en ausencia de HCl). Es de suponer que para una muestra compleja en la que con la que se quisiera aplicar el método propuesto para HDC-ICP-MS el oro iónico en disolución estaría estabilizado mediante algún acomplejamte.

Dada la importancia de poder diferenciar en muestras complejas entre las NPs y las posibles especies disueltas como se ha señalado a lo largo de este trabajo, se ha estudiado la resolución en función de la concentración para los 2 caudales planteados, de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y $1,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tabla 4.15. Resultados estudio diferentes concentraciones con caudal 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Concentración $\mu\text{g.L}^{-1}$	Au^{3+}			10 nm			Resolución Au^{3+} vs NP 10 nm		
	tr	ancho	N	Tr	ancho	N	25	50	100
25	13.65	0.78	4842	12.86	0.99	2700	0.88	1.01	1.03
50	13.70	0.87	3926	12.59	1.32	1459		1.01	1.04
100	13.80	1.01	2984	12.74	0.96	2813			1.07
250	13.92	0.94	3485						

Tabla 4.16. Resultados estudio diferentes concentraciones con caudal $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Concentración $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Au ³⁺			10 nm			Resolución Au ³⁺ vs NP 10 nm			
	Tr	ancho	N	Tr	ancho	N	25	50	100	250
25	8.52	0.82	1710	7.94	1.10	833	0.61	0.74	0.66	0.77
50	8.57	0.79	1874	7.99	0.61	2702		0.82	0.73	0.86
100	8.62	0.86	1601	8.01	0.73	1909			0.76	0.76
250	8.66	0.74	2170	7.97	0.60	2800				1.03

Se puede observar nuevamente que la resolución entre las AuNPs de 10 nm y el oro iónico mejora para el caudal de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y no hay grandes diferencias para las distintas concentraciones estudiadas, siendo para todas ellas el valor de R próximo a 1; con la excepción de la concentración de $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en las 2 especies. Para el caudal de $1,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ se observa una mejora de resolución conforme aumenta la concentración de ambas especies alcanzándose también valores de R=1 cuando la concentración de ambas especies es $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En el caso de una muestra real dependerá de las concentraciones en que se encuentren las AuNPs y el oro ionnico para elegir el caudal más conveniente

5. Conclusión

De este estudio podemos obtener las siguientes conclusiones:

- A pesar de haber buscado antecedentes relacionados con la separación y detección de AuNPs mediante HDC-ICP-MS podemos ver que a pesar de haber encontrado suficiente información para tener como punto de partida es un campo en el que todavía queda mucho que estudiar.
- Se ha conseguido una optimización del HDC para la separación de AuNPs y de oro iónico, gracias a la elección de una fase móvil la cual contenía SDS 0,45 mM y penicilamina 0,05 mM. La penicilamina se introduce en la FM como estabilizante para el oro iónico, lo que nos permite separarlo de las AuNPs y detectarlo mediante ICP-MS. Además de la fase móvil se realizó una optimización del caudal, eligiendo el caudal de $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ que acompañado con la elección de la fase móvil nos ha permitido mejorar nuestro método.
- En el HDC-ICP-MS se estudiaron diferentes parámetros con los que poder elegir las mejores condiciones de trabajo, desde la resolución, la cual estaba alrededor de 0,2 para las AuNPs y entre 0,7 y 0,9 entre las AuNPs y el oro iónico, las recuperaciones (superiores al 95% para las AuNPs de 10 y 50 nm y el oro iónico y del 70% para las AuNPs de 100 nm) y los tiempos de retención, los cuales eran similares para cada FM.
- Se calcularon rectas de calibración de tiempos de retención frente a tamaño para todas las FM, siendo en todos los casos reproducibles, con valores de correlación próximos a 1. Además se estudiaron los límites de detección (comprendidos entre $0,61 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $4,91 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y cuantificación (entre $2,04 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $16,4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) siendo algo mejores para el caudal de $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y unas DSR cuyos valores eran generalmente del mismo orden para ambos caudales (entre 1,58% y 13,2%).
- Se estudió el impacto de la concentración en la resolución, mediante la realización de diferentes rectas de calibración de señal frente a concentración para las AuNPs de 10 nm y el oro iónico. Se observó que para el caudal de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ no influía la concentración en la resolución pero para el caudal de $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ la resolución aumentaba a medida que aumentaba la concentración, con una resolución de 1 para la concentración de $250 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

6. Bibliografía

- [1] B. Nowack, T. D. Bucheli, “Occurrence, behaviour and effects of nanoparticles in the environment” *Environmental Pollutions* vol. 150, pp.5-22, 2007.
- [2] G. Scrinis, K. Lyons, “The emerging Nano-Corporate paradigm: Nanotechnology and the transformation of nature, food and agri-food systems” *International journal of sociology of food and agricultura*, Vol. 15, pp. 1-44, 2007.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] P. Christian, F. Von der Kammer, M. Baalousha, Th Hofmann, “Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media” *Ecotoxicology* vol. 17, pp. 326-343, 2008.
- [7] 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.
- [8] M. C. Daniel, D. Astruc, “Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Bilogy, Catalysis and Nanotechnology” *Chem. Rev.*, vol. 104, pp.293-346, 2004.
- [9] F.Oukacine, A. Morel, I. Desvignes, H. Cottet, “Size-based Characterization of nanoparticle mixtures by the inline coupling of capillary electrophoresis to Taylor dispersion analysis” *Journal of Chromatography A*, 1426, pp.220-225, 2015.

- [10] F. Laborda, E. Bolea, G. Ceprián, M. T. Gómez, M. S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui, 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.

[18] Y. Chang, Y. Shih, C. Su, H. Ho, “Comparasion of three analytical methods to measure the size of silver nanoparticles in real environmental wáter and wastewater samples” *journal of Hazardous Materials*, vol. 322, pp. 95-104, 2017

[19] C. Sotebier, S. Weidner, N. Jakubowski, U. Panne, “Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively cupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis”, *Journal of Chromatography*, vol. 1468, p.p. 102-108, 2016

[20] 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.

[21] M. Bakir, “Caracterizacion de nanoparticulas metálicas por cromatografía hidrodinámica” Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza, 2017

[22] 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.

[23] 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.

[24] B. Franze and C. Engelhard, “Fast separation, Characterization and Speciation of gold and silver nanoparticles and their ionic counterparts with micellar electrokinetic chromatography coupled to ICP-MS” *Anal. Chem.*, vol. 86, pp.5713-5720, 2014.

Anexo A:

Tabla A.1. Pesos y concentraciones de los diferentes componentes de las fases móviles

FM	Na_2HPO_4		Triton X-100		SDS		Formaldehido		Penicilamina		pH
	Peso (g)	Conc. (mM)	Peso (g)	Conc. (mM)	Peso (g)	Conc. (mM)	Peso (g)	Conc. (mM)	Peso (g)	Conc. (mM)	
1	0.074	0.524	0.514	0.794	0.132	0.458	0.527	17.549	x	x	7.6
2	x	x	x	x	0.131	0.454	x	x	x	x	7.6
3	x	x	x	x	0.131	0.453	x	x	0.032	0.216	7.5
	x	x	x	x	0.137	0.476	x	x	0.075	0.503	7.5
	x	x	x	x	0.137	0.475	x	x	0.008	0.054	7.6

Tablas A.2. Pesos y concentraciones de elaboración de los patrones para conocer los parámetros analíticos del HDC con cada fase móvil, así como la calibración de tamaños en función del tiempo de retención.

Tabla A.2.1. Fase móvil 1

	Soluc. Inicial (g)	Agua miliq (g)	PA (g)	Concentración ($mg.L^{-1}$)
10 nm	0.030	6.013	x	0.245
50 nm	0.030	6.000	x	0.250
100 nm	0.031	6.105	x	0.251
Au^{3+}	0.499	8.500	0.992	0.500

Tabla A.2.2. Fase móvil 2

	Soluc. Inicial (g)	Agua miliQ (g)	PA (g)	Concentración ($mg.L^{-1}$)
10 nm	0.032	5.961	x	0.268
50 nm	0.030	5.989	x	0.249
100 nm	0.030	6.017	x	0.251

Tabla A.2.3. Fase móvil 3 (0,2 mM penicilamina)

	Soluc. Inicial (g)	Agua miliQ (g)	PA (g)	Concentración ($mg.L^{-1}$)
10 nm	0.029	5.980	x	0.241
50 nm	0.029	6.148	x	0.235
100 nm	0.029	5.997	x	0.243
Au^{3+}	0.507	9.534	x	0.505
	0.511	8.702	0.918	0.505

Tabla A.2.4. Fase móvil 3 (0,5 mM penicilamina)

	Soluc. Inicial (g)	Agua miliQ (g)	PA (g)	Concentración (mg.L ⁻¹)
10 nm	0.032	6.163	x	0.254
50 nm	0.031	5.974	x	0.261
100 nm	0.032	5.981	x	0.263
	0.501	9.649	x	0.494
<i>Au</i> ³⁺	0.504	7.086	2.413	0.504

Tabla A.2.1. Fase móvil (0,05 mM penicilamina)

	Soluc. Inicial (g)	Agua miliQ (g)	PA (g)	Concentración (mg.L ⁻¹)
10 nm	0.0294	6.0494	x	0.24182404
50 nm	0.0297	6.346	x	0.2329156
100 nm	0.0287	6.0109	x	0.23759852
	0.4933	10.0367	x	0.49149621
<i>Au</i> ³⁺	0.505	9.407	0.248	0.49704724

Tabla A.3. Patrones de diferentes concentraciones crecientes para cada AuNP (10, 50 y 100 nm) y el oro iónico para el estudio de las rectas de calibrado (señal vs concentración) con la fase móvil que contiene penicilamina (0,05 mM) para ambos caudales.

	caudal 1,6 ml/min			caudal 1 ml/min		
	Sol. Inic. NP (g)	Agua miliQ (g)	Conc. (mg.L ⁻¹)	Sol. Inic. NP (g)	Agua miliQ (g)	Conc. (mg.L ⁻¹)
10 nm	0.003	6.039	0.027	0.003	6.101	0.027
	0.007	6.092	0.055	0.007	5.993	0.059
	0.012	5.988	0.096	0.013	6.063	0.108
	0.031	6.054	0.257	0.029	5.985	0.241
50 nm	0.004	6.024	0.031	0.003	6.040	0.022
	0.007	6.045	0.055	0.006	5.984	0.050
	0.012	5.984	0.098	0.012	6.006	0.099
	0.031	5.969	0.256	0.030	6.051	0.247
100 nm	0.003	6.023	0.025	0.003	5.997	0.023
	0.007	5.995	0.060	0.007	6.019	0.058
	0.012	5.977	0.099	0.012	5.994	0.097
	0.031	5.969	0.254	0.030	5.994	0.252
<i>Au</i> ³⁺	0.026	9.981	0.026	0.026	9.995	0.026
	0.049	9.955	0.049	0.051	9.994	0.051
	0.103	9.934	0.103	0.101	9.998	0.100
	0.250	9.793	0.249	0.250	9.955	0.245

Tabla A.4. Preparación de patrones para estudiar la sensibilidad por ICP

	Sol. Inic. NP (g)	Aqua miliQ (g)	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$).
Au ³⁺	0.50	10.07	49.60
	0.10	10.01	99.97
	0.15	10.04	148.30
	0.25	10.01	249.20
10 nm	0.01	10.05	49.30
	0.02	10.02	103.83
	0.03	10.00	148.50
	0.05	10.04	258.90

