

使用 FTIR 成像分析微塑料

定性与定量分析废水、沉积物和动物体内的微塑料



作者

Kristina Borg Olesen、
Nikki van Alst、Marta Simon、
Alvise Vianello、Fan Liu 和
Jes Vollertsen
丹麦奥尔堡大学土木工程系
Mustafa Kansiz
安捷伦科技公司，澳大利亚
摄影：Reina Maricela Blair

前言

近年来，塑料污染越来越多地进入研究人员、政界人士和公众的视线。微塑料 (< 5 mm) 尤其是大家关注的焦点，人们怀疑它们会在环境和水生生物中积聚 [1]。

微塑料来源众多，其在环境中保留数百年后才能被最终分解。然而，人们对环境和水生生物中微塑料的积聚水平和影响了解甚少。部分原因是缺乏标准的分析方法，以及目前的分析技术过于耗时导致实践困难。

之前发表的研究成果依靠目视识别对样品中的塑料进行定量 [2]。本研究开发了从环境样品中提取微塑料的可靠方法。采用傅立叶变换红外 (FTIR) 光谱成像技术对各种微塑料类型进行定性和定量分析 [3,4]。

实验部分

样品

在一段时间内从丹麦维堡的一个湿蓄水池中采集样品，包括沉积物、水、三脊棘鱼和水蛭。研究中未对水生动物展开深入分析，仅用其验证了动物群体中微塑料的检测结果。

池塘接收雨水径流并保留了道路上的污染物，可能导致微塑料的浓度增加。

总共从池塘中收集 50 L 水。每批次采水样 10 L，收集在螺口盖涂覆 Teflon 涂层的 2 × 5 L 培养基储瓶中。采样位置如图 1 所示。

用一个直径 5 cm 的玻璃采样器（采样位置见图 1）在距离池塘边缘 1–2 米处收集沉积物样品。将每份沉积物样品的顶层液体转移至玻璃罐中。

如图 1 所示，使用池塘中铺设的渔网捕获鱼样品。用袋网捕获其他动物群样品，然后放入装有纯乙醇的玻璃瓶中。然后将这些样品放在冰上，以 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度保存在实验室中。

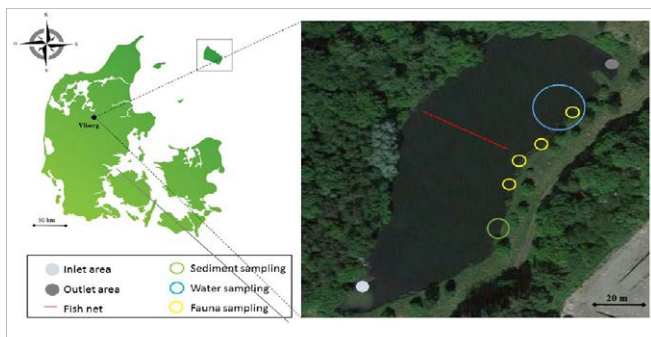


图 1. 丹麦维堡的湿蓄水池采样位置。蓝色、绿色圆圈分别表示水样、沉积物采集区域。黄色圆圈表示动物群采样区域。红线表示渔网位置。浅灰色点和深灰色点分别表示入口和出口区域的位置

样品前处理

所有玻璃器皿在使用前都要冲洗三次，并盖好所有设备、样品等，以防受到空气中微塑料的污染。

分析环境样品中的微塑料时，主要挑战是如何去除有机物/生物体。由于许多塑料都有疏水性，有机物会在塑料表面聚集，因此在对微塑料进行光谱表征之前，必须先去除有机物。用 H_2O_2 氧化作为主要预处理方法，因为这种方法可以在保持塑料不变的同时去除有机物。

通过筛分并用乙醇冲洗以富集水样中的塑料，然后将乙醇蒸发。

对沉积物样品进行筛分与冷冻干燥，然后通过 H_2O_2 氧化去除有机物。再用重量分离法分离无机和有机组分。

动物群样品的前处理方法是在每 1 g 干重的冷冻干燥样品中加入 60 mL 的 5 M KOH。然后将该溶液在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 48 小时。加入超纯水，之后筛分样品。

将三种样品类型的最终富集塑料颗粒样品分别悬浮于乙醇中。将粒径 $> 80\text{ }\mu\text{m}$ 的样品沉积到红外反射载玻片 (MirrIR, Kevley Technologies) 上，进行反射模式 FTIR 成像分析。将粒径 $< 80\text{ }\mu\text{m}$ 的样品沉积在氟化钙 (CaF_2) 红外透明窗片上，烘干用于随后的透射模式分析。经过处理后，微塑料颗粒将粘附在载玻片上，用于 FTIR 成像分析。

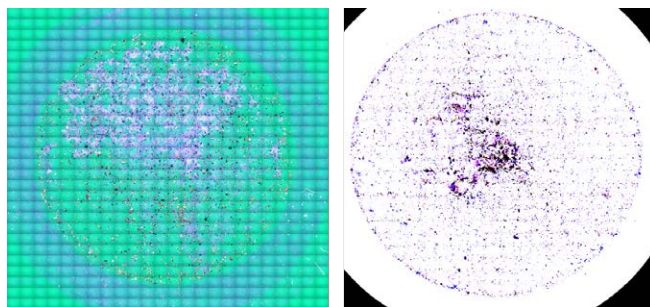


图 2. 反射片（粒径 $80\text{--}500\text{ }\mu\text{m}$ ，左）和 CaF_2 透射窗片（粒径 $10\text{--}80\text{ }\mu\text{m}$ ，右）的可视图像。图像尺寸均为 $10 \times 10\text{ mm}$

为验证方法，在一些重复样品中加入 30–36 个 $100\text{ }\mu\text{m}$ 的红色聚苯乙烯微球。

仪器

使用傅立叶变换红外 (FTIR) 成像系统对样品中的微塑料进行定性和定量分析。系统中包括一台 Agilent Cary 620 FTIR 显微镜，与 Agilent Cary 670 FTIR 光谱仪联用。显微镜上配备了一个 128×128 像素的焦平面阵列 (FPA) 检测器，能够以 15 倍的放大率在每区块 700×700 微米的区域中同时采集 16384 幅光谱图。仪器可以自由切换反射和透射两种模式。仪器设置如表 1 所示。

表 1. 分析所用的 FTIR 成像设置

反射模式和透射模式设置	
焦平面阵列尺寸	128 × 128
物镜	15 倍
红外像素尺寸	5.5 μm
每区块扫描次数	30
马赛克区块数	16 × 16
总测量面积	9.8 × 9.8 mm
光谱分辨率	8 cm ⁻¹
光谱范围	3850–850 cm ⁻¹
总扫描时间	3 小时
总光谱数	4194304

数据处理

FTIR 成像数据分析通过使用丹麦奥尔堡大学开发的 MPhunter 软件与德国阿尔弗雷德韦格纳研究所合作完成。MPhunter 将一系列参比谱图关联到 FTIR 成像系统获得的谱图中。然后其使用原始谱图（未衍生）和第一第二衍生谱图将图像中所有谱图（本例中共 420 万谱图）关联到每一个加载的参比谱图，使用整个谱图范围或选定范围内的波数并在 0 和 1 之间产生一个分数，表明拟合优度。这三种相关性可单独加权。

为检测样品中的微塑料，采用一种自动算法将数据库中的所有参比谱图与图像中的所有谱图进行比较。在这种情况下，采用了塑料聚合物和天然材料的 113 张参比谱图，其显示出与样品塑料谱图具有相似性。将谱图数据库中的各种材料分配到不同的材料组，如 PP、PE、PET 等等。用于微塑料颗粒检测的算法采用 2 个概率评分阈值。首先，该算法找寻所有最高概率评分的像素（本例中每个像素概率分数为 113）并将其归为塑料材料，同时寻找评分高于较高阈值的所有像素。此外，该算法分析所有相邻像素，如果它们拥有与所属材料组同类型的材料且概率评分高于第二阈值，则添加这些像素为塑料颗粒。

现有相关性中，原始谱图的权重为 0（意味着不在考虑范围内），而第一和第二衍生图权重都为 1，意味着最终分数是第一和第二衍生图分数的平均值。不考虑原始谱图的原因是倾斜的基线（样品形状尺寸造成光散射）往往带来误导性的结果，而在使用衍生图时不会遇到此问题。图形输出可以是颜色相关的图像，每个像素通过最近的谱图匹配进行颜色编码，以及/或者生成第二图像显示用户特定选择的参比材料的热点图。

然后分析已鉴定的塑料颗粒，找出颗粒像素之间的最长距离，从而获得颗粒的主要尺寸。假定颗粒形状为椭圆且知道扫描中颗粒的面积，从而获得次要尺寸。第三尺寸厚度，假定为次要尺寸的 0.67 倍。假定颗粒是椭圆，计算其体积。根据体积和已鉴定塑料材料的密度来计算质量。这些颗粒的参数以列表形式显示，便于导出。请参阅图 3 示例。

结果与讨论

通过分析样品的 FTIR 图像，对样品中的塑料进行定性与定量分析。该分析需要去除目标物以外的大部分物质。为达到此目的，对每种不同类型样品（如水、沉积物、鱼）的前处理方法进行了优化。

透射测定（粒径 10–80 μm）的所有 113 个参比谱图的完整相关性图像，如图 3 所示。

乍看之下，很明显大部分颗粒是天然原料，比如纤维和蛋白质。尤其可以看到纤维颗粒，它们均来源于纤维素材料。

图 4 展示了原始谱图（未衍生）和第一衍生图中，定性为聚丙烯的像素和聚丙烯参比图之间的对比。它清楚地表明，采用衍生图可以有效减少散射造成的光谱偏移和基线倾斜（与样品的颗粒性质相关），从而提供与参比谱图更好的相关性。

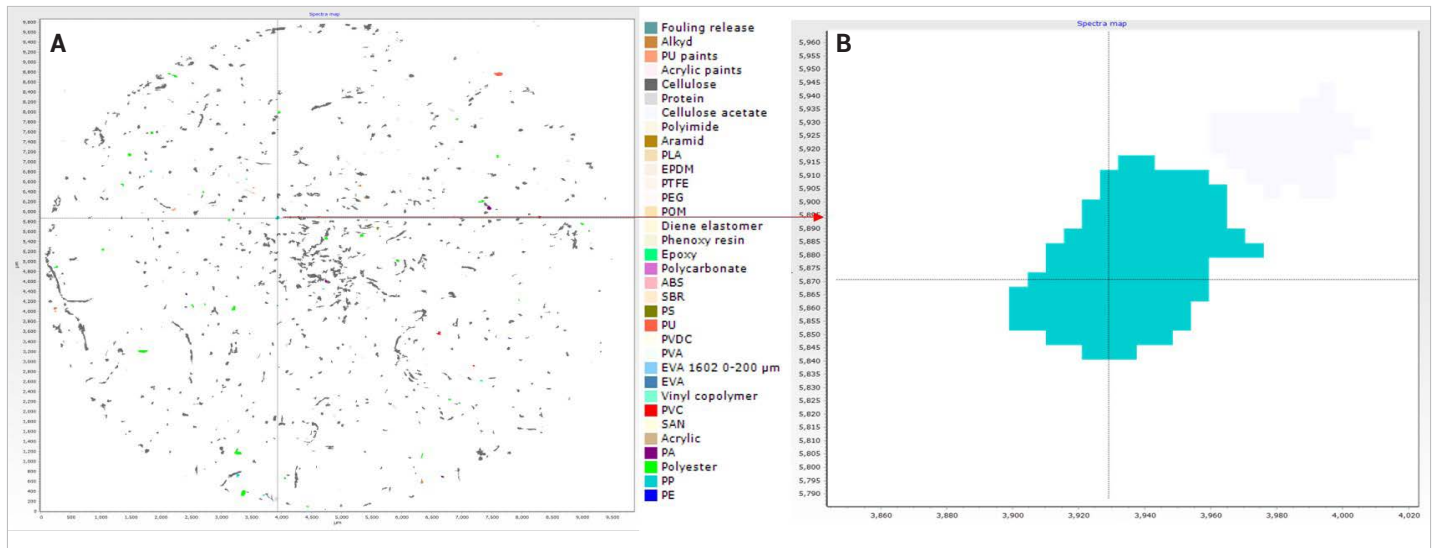


图 3. A. 完整的 10 × 10 mm 自动相关图像。每个颗粒基于已鉴定的塑料（或天然材料）类型进行颜色编码。B. 放大到 200 × 200 微米区域，显示了聚丙烯颗粒的细节水平。注意，每一像素为 5.5 微米



图 4. MPhunter 的屏幕截图，蓝色为聚丙烯参比谱图，其与一个被鉴定为聚丙烯的像素谱图进行叠加。上面窗格显示的是原始谱图（未衍生）。下面窗格显示的是相同谱图经过第一次衍生后的谱图

由于此方法采用了所有的谱图（本例中为 420 万），其成为了一种定量和化学鉴定样品中颗粒的非常有效且准确的方法。按质量和按颗粒数的百分比列于表 2。

使用 MPhunter 颗粒信息输出还可进行更详细的分析，可以列出每个已鉴定的颗粒、其坐标、所属聚合物组（化学 ID）、面积、主要尺寸和次要尺寸、体积以及质量。请参见表 3。

表 2. 按质量和颗粒数百分比列出的颗粒 ID

颗粒 ID	按质量 %	按颗粒数 %
PE	0.01%	0.11%
PP	0.30%	1.03%
聚酯	3.11%	3.22%
聚酰胺 (PA)	0.37%	0.69%
PVC	0.15%	0.23%
聚氨酯	1.21%	1.49%
聚苯乙烯	0.05%	0.11%
环氧树脂	0.02%	0.23%
聚甲醛	0.01%	0.11%
醋酸纤维素	0.15%	0.23%
蛋白质	1.90%	10.57%
纤维素	92.98%	82.18%
聚氨酯涂料	0.10%	0.23%
醇酸树脂	0.16%	0.46%

表 3. 从 MPhunter 获得的详细颗粒信息。此分析鉴定了 871 个颗粒。为清晰显示，此处仅显示前 4 个

MP ID	坐标 (像素)	坐标 (μm)	聚合物组	图像上的面积 (μm ²)	主要尺寸 (μm)	次要尺寸 (μm)	体积 (μm ³)	质量 [ng]
MP_1	1416; 630	7788; 3465	pe	968	74.3	16.6	6423	6.102
MP_2	111; 914	611; 5027	pp	182	17.8	13	943	0.896
MP_3	333; 1238	1832; 6809	pp	938	44.8	26.7	10002	9.502
MP_4	464; 1500	2552; 8250	pp	61	13.3	5.8	140	0.133

塑料组分的定量分析

水生环境中存在的微粒数量可能会关系到微塑料对水生动物的影响大小 [7]。本研究通过确定所分析样品体积中存在的塑料颗粒数量对塑料进行定量分析。在对塑料颗粒进行定量分析时，应考虑样品前处理方法造成的影响，通过超声、机械搅拌和研磨等方式使较大颗粒碎裂成较小颗粒，可能会增加颗粒数量。

根据 FTIR 分析，沉积物中塑料浓度为 5.2×10^5 颗粒/kg 干沉积物，相当于 26 mg/kg 干沉积物。水样中的塑料浓度为 1.1×10^2 颗粒/L，相当于 4.5 $\mu\text{g/L}$ 。水蛭样品中没有发现塑料颗粒，但并不表示该样品中不存在塑料，只能表示这种方法无法检出塑料，出现这个结果的原因可能是样品中的颗粒粒径小于 20 微米（本研究中较小的粒度限），也可能是由于不同动物类型需要不同的样品前处理技术。

方法验证

在样品中加入已知数量的聚苯乙烯颗粒，来验证此研究方案。在进行样品前处理并应用 FTIR 定量方法后，对颗粒进行定量分析。如图 5 所示，大多数样品可观察到高回收率，水样和沉积物样品中的回收率分别为 97% 和 64%。

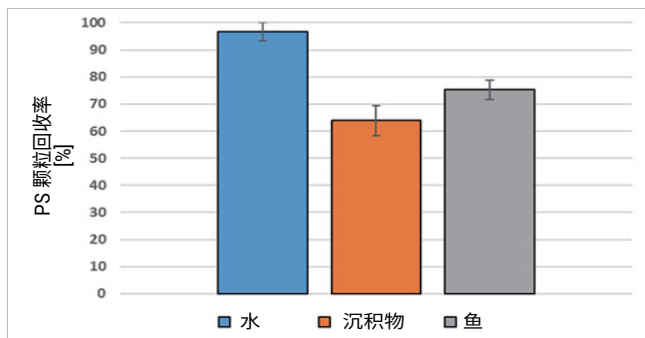


图 5. 加标样品中聚苯乙烯 (PS) 微球的回收率。回收率为：水样 97%、沉积物样品 64%、两个鱼样品的平均值 75%。蓝色柱和橙色柱上的误差线表示计数错误（由含回收颗粒过滤器贡献的量造成）的可能性。鱼样品的误差线表示标准偏差

沉积物样品的低回收率表明，土壤和沉积物的研究方法存在低估塑料浓度的风险。本研究中沉积物样品中的塑料浓度最高，其前处理样品中含有肉眼可见的彩色塑料颗粒。样品中形状和颜色与红色聚苯乙烯颗粒相似的颗粒可能使回收聚苯乙烯的计数变得复杂。

结论

该研究方法能够成功地回收、鉴定并定量分析富含有机物的样品（如沉积物、水和鱼类中的微塑料）。

根据研究结果，我们可以得出结论，采样的蓄水池中存在微塑料。

事实证明，FTIR 成像结合 MPhunter 软件是自动定性和定量微塑料和其他材料的一种快速而准确的方法。结合 H_2O_2 氧化，FTIR 成像非常有希望成为微塑料分析的标准方法，利用它可进一步研究和了解环境中的微塑料。

参考文献

1. Wagner, M., Scherer C., Alvarez-Muñoz D., Brennholt N., Bourrain X., Buchinger S., Fries E., Grosbois C., Klasmeier J., Marti T., Rodriguez-Mozaz S., Urbatzka R., Vethaak A. D., Winther-Nielsen M., and Reifferscheid G. (2014). Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe* 26(1), 12
2. Hidalgo-Ruz, V., Gutow L., Thompson R. C., and Thiel M. (2012). Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental science & technology* 46(6), 3060–3075
3. Löder, M. G. J. and Gerdts G. (2015). Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics—A Critical Appraisal. Springer International Publishing
4. Tagg, A. S., Sapp M., Harrison J. P., and Ojeda J. J. (2015). Identification and Quantification of Microplastics in Wastewater Using Focal Plane Array-Based Reflectance Micro-FTIR Imaging. *Analytical chemistry* 87(12), 6032–6040
5. Lassen, C., Hansen S. F., Magnusson K., Hartmann N. B., Rehne Jensen P., Nielsen T.G., and Brinch A. (2015). Microplastics: occurrence, effects and sources of releases to the environment in Denmark. Technical report, Danish Environmental Protection Agency
6. PlasticsEurope (2015). Plastics - the facts 2015: An analysis of European plastics production, demand and waste data
7. Vollertsen, J. and Hansen A. A., (2016, November). Microplastic in Danish wastewater: Sources, occurrences and fate. In press, Danish Environmental Protection Agency

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018年4月19日，中国出版
5991-8271ZHCN

更多信息

本应用简报摘自丹麦奥尔堡大学土木工程系 Kristina B Olesen、Diana A Stephansen、Nikki van Alst、Marta Simon、Alvise Vianello、Fan Liu 和 Jes Vollertsen 于 2017 年 5 月在环境毒理学和化学学会 (SETAC) 会议上发表的《Microplastic in Water, Sediment, Invertebrates, and Fish of a Stormwater Retention Pond》（蓄水池中水、沉积物、无脊椎动物和鱼中的微塑料）文章。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

