

使用激光红外成像系统进行快速、自动化的微塑料分析

表征和定量海洋环境水样中的微塑料



作者

Lars Hildebrandt, Fadi El Gareb,
Tristan Zimmermann,
Ole Klein, Kay-Christian Emeis,
Daniel Proefrock¹,
Andreas Kerstan²

¹德国 Helmholtz-Zentrum
Geesthacht 海岸研究所

²安捷伦科技公司

前言

据估计，过去 65 年生产的 83 亿吨塑料中，有 75% 以上已转化为废物^[1]。每年有多达 1300 万吨的此类废物最终排入海洋^[2]，而最近的计算估计，全世界的海洋中漂浮着超过 5.25 万亿的塑料颗粒^[3]。

科学家已经证明了塑料颗粒在水生生态系统中的普遍性和持久性，形势令人担忧^[4]。根据模型预测，海洋表层中约有 14% 的塑料碎片可归类为所谓的微塑料（通常指大小在 1 μm–5 mm 之间的颗粒）^[5]。这些可摄入的颗粒由较大碎片经过紫外线诱导降解、机械性降解或生物性降解形成，具有潜在危害性^[6]。为了验证估算值并满足即将实行的监管措施（例如加利福尼亚州参议院 1422 号法案）和指令（MSFD、2008/56/EC），需要准确、高效且稳定的分析工作流程和技术。

合适的技术应能测定微塑料颗粒的大小、形状和聚合物类型，并对每种类型进行快速定量。在撰写本文之际，由于缺乏统一的标准操作规程 (SOPs)，导致许多研究依赖于目视识别、手动傅立叶变换红外 (FTIR) 光谱或拉曼光谱来分析疑似颗粒。这些技术非常耗时，且容易出现操作人员偏差。在本研究中，我们展示了使用激光红外成像分析微塑料的创新工作流程。

实验部分

由于缺乏用于微塑料样品前处理和分析的标准操作规程，导致许多应用方法易受污染、效率低，或者只能处理小体积水样，不具备代表性^[7]。本研究开发并应用了涵盖分析链所有阶段的程序，包括采样、基质消解和使用 LDIR 进行显微光谱分析。实验采用了全面的污染预防和沉积控制措施。使用程序空白样品以量化残留污染。所有实验室工作均在实验室及研究船上的洁净工作台（层流柜）中进行。工作台对于大于 0.1 μm 颗粒的空气过滤效率约为 99.995%（根据 EN1822 1 标准）。此外，所有实验室均运行有 Dustbox 空气净化器¹，用于过滤空气。

采样

样品为 Sonne 270 从中国香港前往路易港期间 (2019)，于印度洋采集 (图 1)。采样区域覆盖了大片海域，范围从印度尼西亚苏门答腊以西至马达加斯加以东区域。

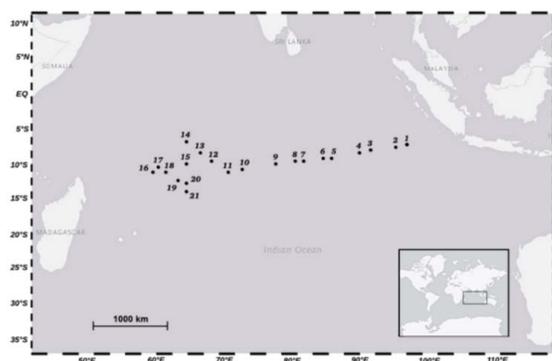


图 1. 采样点横跨印度洋

如图 2 所示，使用 Geesthacht 惰性微塑料分级分离器 (GIMPF) 进行采样，可从海水中过滤出大量的悬浮颗粒物质 (SPM, $10 \mu\text{m} \leq d_{\text{SPM}}$)。双通道 GIMPF 支持在线 SPM 分级分离 (使用两种不同筛网尺寸的不锈钢滤筒过滤器)，可分离出 $> 300 \mu\text{m}$ 和 $10 \mu\text{m} \leq d \leq 300 \mu\text{m}$ 的颗粒。流通系统从研究船位于海面以下 6 m 的月形池中引入海水。整个采样系统由不锈钢部件 (AISI-316L) 制成，并安装在铝板上。所有密封件均采用 PFA 护层，以最大程度减少采样系统产生污染的风险。在经过每个采样点之后，对 GIMPF 背面的 2 μm 过滤器系统进行反向冲洗。总采样量为 61 m^3 。将过滤器滤筒中的样品在 PTFE 和 PC 滤膜 (孔径为 5 μm) 上进行真空过滤，并储存在棕色玻璃瓶中。



图 2. Geesthacht 惰性微塑料分级分离器 (GIMPF) 的正反面

样品前处理和方法验证

使用前，使用 Milli Q 水和预过滤的乙醇 (30%) 将所有玻璃器皿冲洗 3 次。为了去除干扰性的天然有机和无机基质成分，对粒径为 $10 \mu\text{m} \leq d \leq 300 \mu\text{m}$ 的颗粒进行了酶解和氧化消解。方案可简单总结为，使用蛋白酶 K、 H_2O_2 结合 Fe^{2+} 催化剂和几丁质酶对样品进行处理 (图 3)，然后使用 ZnCl_2 溶液 ($\rho = 1.7 \text{ g mL}^{-1}$) 进行密度分离。

¹www.dustbox.de

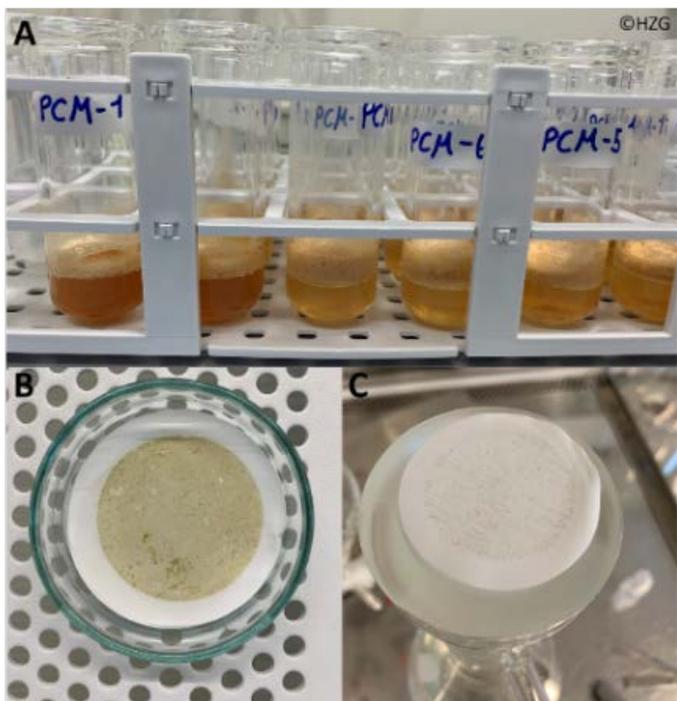


图 3. 酶解和氧化消解。A: Fe^{2+} 催化分解剩余的 H_2O_2 。B: 基质消解前的样品 (在 PTFE 滤膜上)。C: 基质消解后的样品

仪器

使用 Agilent 8700 LDIR 激光红外成像系统对样品中的微塑料进行定性和定量分析。LDIR 这一名称来源于其操作模式，即激光红外成像，利用量子级联激光器 (QCL) 作为光源。QCL 是一种基于半导体的激光器，其中电子穿过一系列量子阱发出光线，从而使其能在一定波数 (λ^{-1}) 范围内快速调节，本实验的波数范围为 $1800\text{--}975\text{ cm}^{-1}$ 。与单点汞镉碲 (MCT) 检测器 (测温冷却) 和快速扫描光学元件结合使用时，可实现两种实用模式。在第一种模式中，LDIR 使用单个波长，在物镜以非常高的速度在样品上方移动时进行扫描。在第二种模式下，物镜停留在一个点上，而 QCL 在指定波数范围内扫描，在不到 1 s 的时间内获得完整光谱。

两种模式均用于微塑料分析工作流程。首先使用扫描模式以单波数快速扫描样品区域。所得的红外图像用于定位样品中的颗粒并描述其大小和形状。定位颗粒后，LDIR 会快速自动移动

到每个颗粒位置，并获得波数范围内的完整光谱。获得颗粒光谱后，立即与微塑料光谱库进行实时比较，从而确定最佳的光谱匹配结果，并按每个颗粒进行报告。光谱库来源可靠，其中包括与海水来源样品中微塑料分析相关的多种光谱。

仪器采用大视野相机用于获取样品的完整视图，显微镜级物镜用于根据需要捕捉高放大倍数的图像。对 800 个颗粒进行全自动分析并将生成的光谱与数据库进行比较，耗时约 1 h。

样品分析

将纯化后的样品 ($< 300\text{ }\mu\text{m}$) 悬浮于乙醇 (50%) 中，并沉积在红外反射玻片上 ($7.5 \times 2.5\text{ cm}$; MirriR, Kevley Technologies)。使用自动 LDIR (QCL) 成像 (8700 LDIR, 安捷伦科技公司) 对玻片进行透反射分析。所有分析均使用 Agilent Clarity 软件 (1.1.2 版) 中的自动颗粒分析方案来操控 LDIR 完成。灵敏度设置为最大值，光谱分辨率设置为 8 cm^{-1} 。分析了尺寸范围为 $20\text{--}5000\text{ }\mu\text{m}$ 的颗粒，但在自动模式下范围可以扩展至约 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。

Agilent Clarity 软件中的自动化工作流程可采集每个颗粒的红外光谱，并实时进行光谱数据库比较 (超过 420 个参比光谱) 和数据处理。根据分析调整了阳性类别的统计和阈值。运行自动工作流程后，在透反射模式下手动检查结果，部分通过 LDIR 的 $\mu\text{-ATR}$ 功能进行检查。

使用 ATR-FTIR 光谱 (采用钻石晶体或锗晶体) 以及 LDIR 的透反射模式和 $\mu\text{-ATR}$ 装置对直径 $d > 300\text{ }\mu\text{m}$ 的疑似微塑料颗粒和纤维进行了分析。将 ATR-FTIR 光谱与 siMPlE 数据库 (<https://simple-plastics.eu>) 进行比较。但是，本应用简报不会详细讨论直径大于 $300\text{ }\mu\text{m}$ 的颗粒。

方法验证

目前市面上还没有经过认证的微塑料标准物质。因此我们使用内部参比物质 PE、PET、PP 和 PVDC 颗粒 ($20\text{--}500\text{ }\mu\text{m}$) 进行方法验证^[7]。使用上述工作流程可以正确鉴定出 95% 以上的颗粒。另外还分析了一种基质匹配的认证标准物质 (Plankton, BCR-414, JRC) (图 4)。两种分析均用于扩充 LDIR 8700 的光谱库，添加了天然和人为生产的颗粒的 IR 光谱。

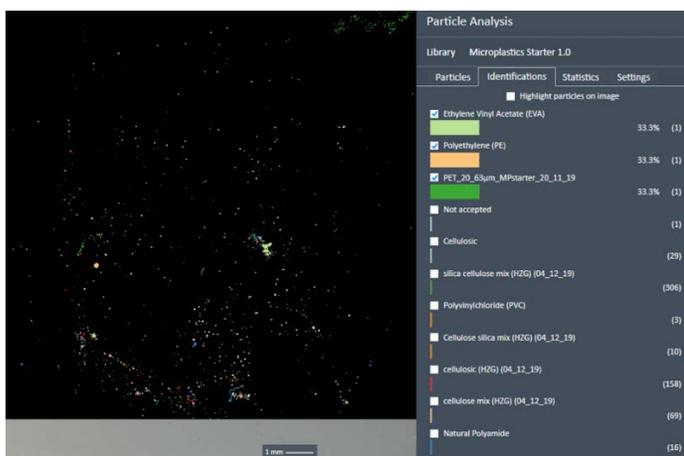


图 4. 从自动 LDIR 分析工作流程中获得的认证标准物质 Plankton (BCR-414) 的伪色 IR 图像和聚合物类型统计信息

结果与讨论

采样点 1-7 的微塑料浓度 ($> 20 \mu\text{m}$) 范围为 10-226 个颗粒/纤维 m^{-3} (表 1)。在 7 个样品中鉴定出 30471 个天然颗粒、635 个合成颗粒和 14 组不同的聚合物。丰度最高的聚合物类别为丙烯酸酯/聚氨酯/清漆 (39.2%)、PET (26.0%)、PE-Cl (7.1%)、PVC (6.0%)、PE (5.2%)、PP (5.2%) 和橡胶 (4.3%)。94.9% 的微塑料颗粒/纤维的直径小于 $100 \mu\text{m}$ (图 5)。

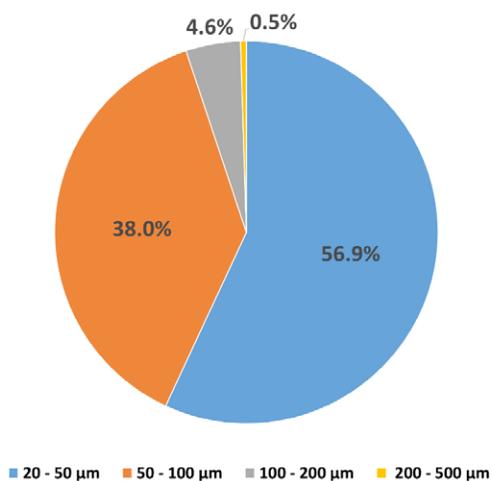


图 5. 识别的微塑料颗粒/纤维中不同尺寸类别的百分比



图 6. 这些大于 $300 \mu\text{m}$ 的纤维经鉴定为纤维素 (上图; 通过拉曼分析证实含有靛蓝染料)、PET (下图) 和 PP (未展示)。这类纤维的 ATR-FTIR 光谱和 LDIR 成像吻合程度达到 100%

即使在几乎完全去除基质后，鉴定出的颗粒中仍有 97.4% 为天然来源 (纤维素、硅酸盐、煤炭、几丁质和天然聚酰胺红外光谱)，而合成聚合物仅占 2.6% (图 7)。Domogalla-Urbansky 等人 (2018) 曾报道微塑料颗粒/天然颗粒的比值在 1:100 和 1:1000 之间 (同样是在样品前处理之后) [8]。

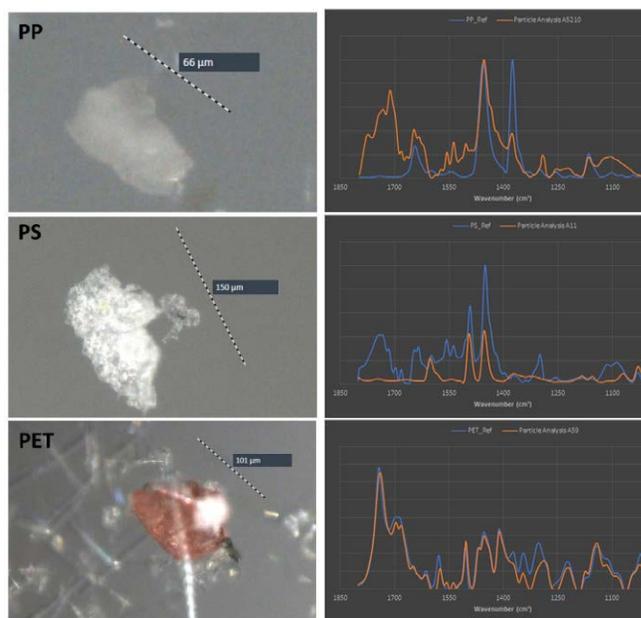


图 7. 在印度洋的水样中检测到的不同类型的微塑料 ($< 300 \mu\text{m}$)。聚丙烯 (上图) 和聚苯乙烯 (中图) 的光谱为手动记录，而聚对苯二甲酸乙二醇酯 (下图) 的光谱来自自动分析

表 1. 每个采样点的过滤体积、采样坐标和检测到的微塑料数量。还列出了每个采样点丰度最高的聚合物类型

采样点	样品体积 (m ³)	坐标	颗粒/纤维数量	微塑料颗粒/纤维数量	丰富最高的微塑料类型 (#)	微塑料浓度 (MPs m ⁻³)
1	2.3	07°17.86'S, 97°45.85'E	3150	47	PET (20)	21
2	5.7	07°33.607'S 95°59.252'E	524	54	PET (32)	10
3	1.1	08°08.165'S 92°05.016'E	2112	67	PP (22)	62
4	1.3	08°20.93'S 90°38.76'E	16687	293	丙烯酸酯/聚氨酯/清漆 (116)	226
5	1.3	08°55.25'S 86°45.32'E	2938	109	PET (40)	86
6	1.4	09°06.639'S 85°27.92'E	5110	239	丙烯酸酯/聚氨酯/清漆 (69)	165
7	1.4	09°32.11'S 82°34.58'E	857	15	PS (5)	11

本实验不同于其他仅分析部分样品悬浮液或部分过滤后样品的研究^[9, 10]，消解方案和大尺寸显微玻片 LDIR 成像能够实现每个样品的完整分析。这种测量技术减少了由任何外推法引入的不确定性。

如图 8 所示，除了进行目视识别，使用光谱颗粒分析也至关重要，因为天然颗粒和无色的合成颗粒通常具有相似的外观（即使是微球形态）。

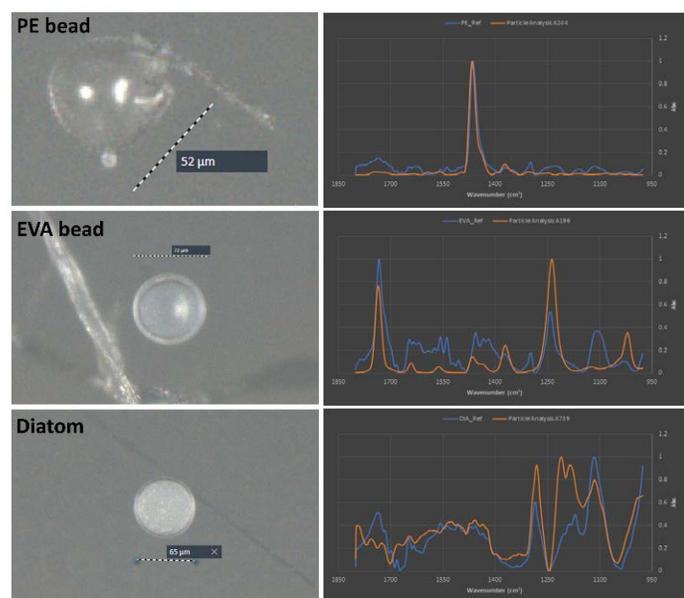


图 8. 两个微塑料球 (PE 和 EVA) 的目视图像 (左图) 和红外光谱 (与最佳匹配的谱库光谱进行对比)。下图显示了通过 LDIR 分析从样品中鉴定出的硅藻

图 9 展示了微塑料颗粒如何附着在天然颗粒 (如硅藻) 上。在这种情况下，可使用 LDIR 的 μ -ATR 功能来验证聚合物类型 (与谱库光谱吻合度极高)。甚至有可能将晶体直接放置到附着于硅藻的颗粒上，对自动分析的结果进行交叉检查。

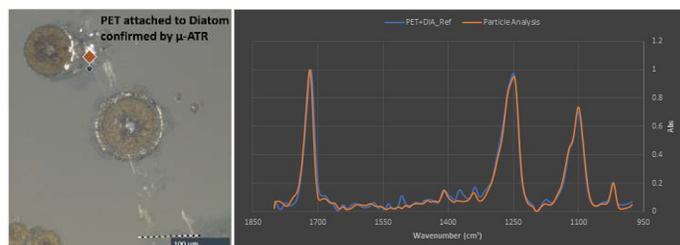


图 9. 附着在硅藻上的 PET 颗粒 (以橙色标记表示) 的目视图像 (左图) 和 μ -ATR-IR 光谱 (与最佳匹配的谱库光谱进行对比)

根据延伸因子 (长宽比) $3^{[11]}$ ，大多数微塑料经鉴定为碎片而非微纤维。纤维识别非常困难 — 尤其是对于基于单点成像的方法，但是 LDIR 成像可以轻松识别环境样品中的纤维 (如图 6 所示)。

科学界对空气中纤维所引起的测量污染问题已经达成了共识^[12]。因此，本实验严格使用洁净的工作台，也许能解释相比其他研究微纤维占比较低的原因。



图 10. LDIR 记录的纤维素纤维和天然颗粒的聚集体的图像

为了分析缠绕的纤维（其中包含的聚合物）以及颗粒聚集体（图 10），使用了 LDIR 的手动单峰（图 11）或高光谱成像功能。

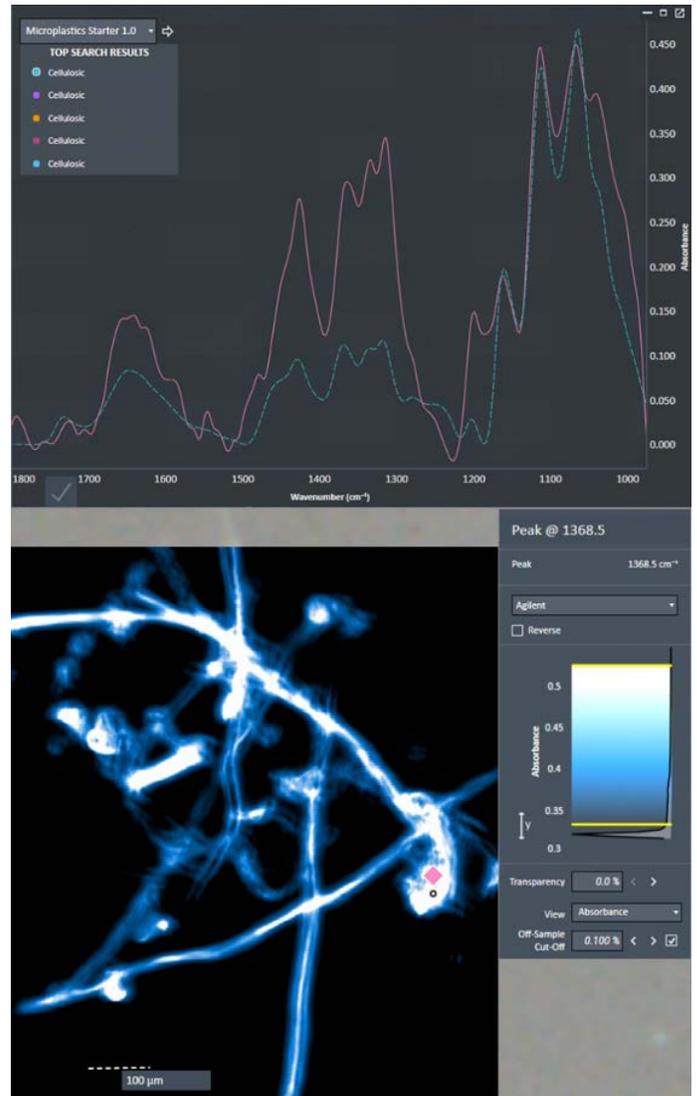


图 11. 图 10 中显示的纤维素纤维和天然颗粒的聚集体在 $\tilde{\nu} = 1368.5 \text{ cm}^{-1}$ 处的红外单峰图像（右下图）和红外光谱（上图）

实验证实，多峰分析配合 μ -ATR 对于分析包含密集生物被膜区域的颗粒非常有价值。例如，图 12 显示了一个较大的聚氨酯 (PU) 颗粒，某些区域显示出清晰的纤维素红外光谱以及良好的 PU 和丙烯酸酯光谱。两者均经过手动透反射和 μ -ATR 分析证实。LDIR 可以对环境聚集体的不同区域实现良好的空间区分，但对于由聚合物混合物和复合材料组成的颗粒也同样实用。多峰分析有助于识别环境微塑料中此类混合物的不同成分。

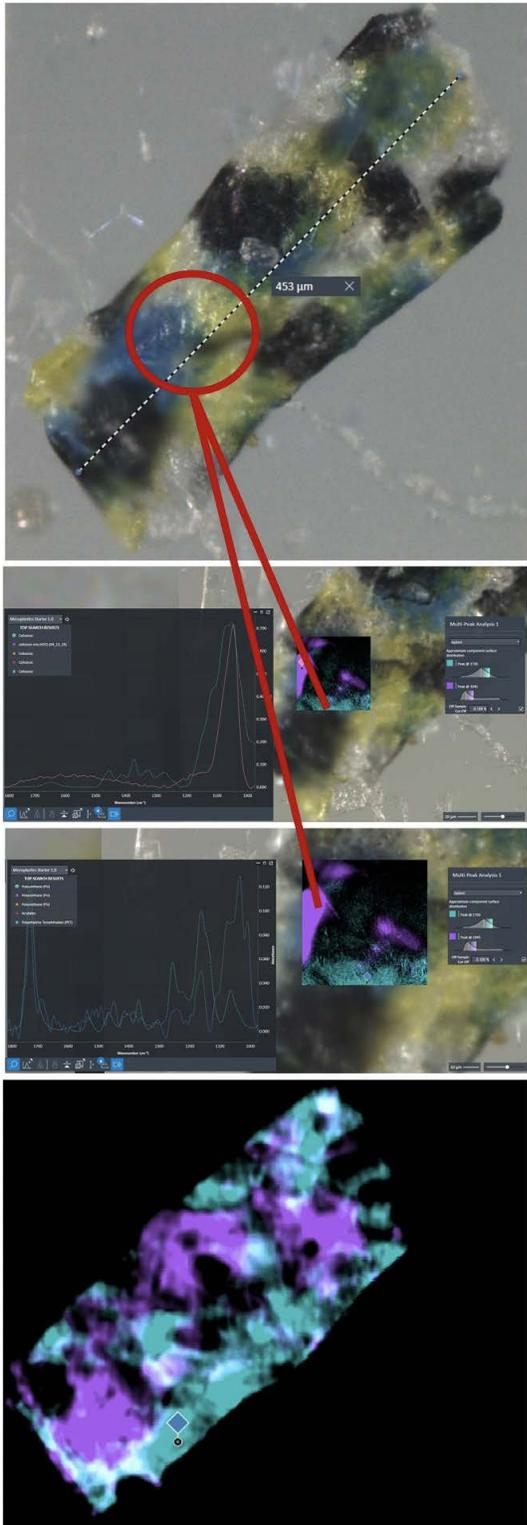


图 12. 使用多峰成像（下图）分析可能密布有生物被膜的 PU 颗粒（上图），在 $\nu = 1045 \text{ cm}^{-1}$ 和 $\nu = 1730 \text{ cm}^{-1}$ （中图）处显示出强吸收。紫色区域与纤维素参比光谱表现出良好的一致性（第二张图），而蓝绿色区域与 PU 和丙烯酸酯光谱相对应（第三张图）

与其他微塑料研究的比较

尽管因采用不同的方法（采样和检测）而难以进行研究间比较，但本研究报告的浓度 ($10\text{--}226 \text{ MPs m}^{-3}$) 与基于 FTIR 或拉曼显微光谱的其他研究非常吻合。Lorenz 等 (2019) 在使用仿蝠鲼网 (manta net) 于北海南部采集的样品（表层水）中测得的微塑料颗粒浓度为 $0.1\text{--}245.4$ 个微塑料颗粒/立方米 (Mps m^{-3})^[9]。Enders 等 (2015) 在使用分级过滤装置于大西洋（水位线以下 3 m）采集的样品中测得的浓度为 $13\text{--}501 \text{ MPs m}^{-3}$ ^[13]。根据建模和监测数据，表层水中的微塑料浓度可能是水体均值的 30 倍^[14-16]。因此，采样区域可能存在较高的塑料颗粒污染（海面处的浓度很高）。

本研究中检测到的聚合物类型为这一假设提供了支持。在本研究中，丰度排名第 2 (PET)、第 3 (PE-Cl) 和第 4 (PVC) 的聚合物的典型密度均超过了海水密度（丰度最高的丙烯酸酯/聚氨酯/清漆的密度变化范围较大）。值得注意的是，低密度聚合物 PE 和 PP（约占生产量的 50%）在所发现的微塑料中均只占 5.2%。这类聚合物停留在水面上，直到生物淤积使其下沉并转移至海底。但是，这一假设需要在将来通过采集不同深度的水样（深度分析）来证明。

结论

LDIR 成像成功用于检测并表征大体积海水样品中的微塑料颗粒和纤维。结果表明存在较高的微塑料污染。

通过目视检查、至少 5 次手动透反射红外测量以及部分 $\mu\text{-ATR}$ 红外分析对自动化工作流程的结果进行了全面的重新检查。对于 $> 300 \mu\text{m}$ 的颗粒，在 LDIR 成像（使用成熟的微塑料光谱数据库）与传统 ATR-FTIR 分析之间获得了良好的一致性。在数据库中扩充典型基质的光谱，有助于进一步提高工作流程的准确性。

LDIR 成像技术具有高效率 and 高度自动化的优势，极有潜力成为首选的显微光谱方法，尤其适合需要快速提供数据的应用，例如大规模微塑料研究或监测活动。

参考文献

1. Geyer, R., J.R. Jambeck, and K.L. Law, *Production, use, and fate of all plastics ever made*. Science Advances, **2017**, 3(7): p. e1700782
2. Jambeck, J.R., R. Geyer, C. Wilcox, T.R. Siegler, M. Perryman, A. Andrady, R. Narayan, and K.L. Law, *Plastic waste inputs from land into the ocean*. Science, **2015**, 347(6223): p. 768
3. Eriksen, M., L. Lebreton, H. Carson, M. Thiel, C. Moore, J. Borerro, F. Galgani, P. Ryan, and J. Reisser, *Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea*. PLoS ONE, **2014**, 9
4. Ivleva, N.P., A.C. Wiesheu, and R. Niessner, *Microplastic in Aquatic Ecosystems*. Angewandte Chemie International Edition, **2017**, 56(7): p. 1720-1739
5. Koelmans, A., M. Kooi, K. Law, and E. Seville, *All is not lost: Deriving a top-down mass budget of plastic at sea*. Environmental Research Letters, **2017**, 12
6. Song, Y.K., S.H. Hong, M. Jang, G.M. Han, S.W. Jung, and W.J. Shim, *Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion on Microplastic Fragmentation by Polymer Type*. Environmental Science & Technology, **2017**, 51(8): p. 4368-4376
7. Hildebrandt, L., N. Voigt, T. Zimmermann, A. Reese, and D. Proefrock, *Evaluation of continuous flow centrifugation as an alternative technique to sample microplastic from water bodies*. Marine Environmental Research, **2019**, 151: p. 104768
8. Domogalla-Urbansky, J., P.M. Anger, H. Ferling, F. Rager, A.C. Wiesheu, R. Niessner, N.P. Ivleva, and J. Schwaiger, *Raman microspectroscopic identification of microplastic particles in freshwater bivalves (*Unio pictorum*) exposed to sewage treatment plant effluents under different exposure scenarios*. Environ Sci Pollut Res Int, **2019**, 26(2): p. 2007-2012
9. Lorenz, C., L. Roscher, M.S. Meyer, L. Hildebrandt, J. Prume, M.G.J. Löder, S. Primpke, and G. Gerdt, *Spatial distribution of microplastics in sediments and surface waters of the southern North Sea*. Environmental Pollution, **2019**, 252: p. 1719-1729
10. Domogalla-Urbansky, J., P.M. Anger, H. Ferling, F. Rager, A.C. Wiesheu, R. Niessner, N.P. Ivleva, and J. Schwaiger, *Raman microspectroscopic identification of microplastic particles in freshwater bivalves (*Unio pictorum*) exposed to sewage treatment plant effluents under different exposure scenarios*. Environmental Science and Pollution Research, **2019**, 26(2): p. 2007-2012
11. Cole, M., *A novel method for preparing microplastic fibers*. Scientific Reports, **2016**, 6(1): p. 34519
12. Prata, J.C., J.L. Castro, J.P. da Costa, A.C. Duarte, T. Rocha-Santos, and M. Cerqueira, *The importance of contamination control in airborne fibers and microplastic sampling: Experiences from indoor and outdoor air sampling in Aveiro, Portugal*. Marine Pollution Bulletin, **2020**, 159: p. 111522
13. Enders, K., R. Lenz, C.A. Stedmon, and T.G. Nielsen, *Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10\mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution*. Marine Pollution Bulletin, **2015**, 100(1): p. 70-81
14. Kooi, M., J. Reisser, B. Slat, F.F. Ferrari, M.S. Schmid, S. Cunsolo, R. Brambini, K. Noble, L.-A. Sirks, T.E.W. Linders, R.I. Schoeneich-Argent, and A.A. Koelmans, *The effect of particle properties on the depth profile of buoyant plastics in the ocean*. Scientific Reports, **2016**, 6(1): p. 33882
15. Brunner, K., T. Kukulka, G. Proskurowski, and K.L. Law, *Passive buoyant tracers in the ocean surface boundary layer: 2. Observations and simulations of microplastic marine debris*. Journal of Geophysical Research: Oceans, **2015**, 120(11): p. 7559-7573
16. Lenaker, P.L., A.K. Baldwin, S.R. Corsi, S.A. Mason, P.C. Reneau, and J.W. Scott, *Vertical Distribution of Microplastics in the Water Column and Surficial Sediment from the Milwaukee River Basin to Lake Michigan*. Environmental Science & Technology, **2019**, 53(21): p. 12227-12237

更多信息

本应用简报包含部分正在进行中的工作，包括方法开发和大型数据集，并且计划在同行评审科学期刊上发表。

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

www.agilent.com

DE.6083912037

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，2020
2020年10月12日，中国出版
5994-2421ZHCN



Trusted Answers