

Количественный анализ микрочастиц пластика в образцах из окружающей среды с помощью пиролиза и ГХ-МСД

Авторы

Джордж Диркес (George Dierkes),
Зузанне Бехер (Susanne Becher),
Хайке Шумахер (Heike Schumacher),
Коринна Фёлди (Corinna Földi)
Германский федеральный институт
гидрологии, Кобленц, Германия

Тим Лаушке (Tim Lauschke)
и Томас Тернес (Thomas Ternes)
Институт интегрированных
естественных наук, Университет
Кобленца-Ландау, Германия

Йорг Ринер (Joerg Riener)
Agilent Technologies, Inc.

Аннотация

Интерес к количественному определению микрочастиц пластика в образцах из окружающей среды постоянно растет. Настоящие рекомендации по применению описывают надежную жидкостную экстракцию под давлением (PLE) с использованием методики пиролиз-газовой хроматографии – масс-спектрометрии (пиро-ГХ-МС) для количественного анализа микрочастиц пластика, в частности полиэтилена (ПЭ), полипропилена (ПП) и полистирола (ПС), содержащихся в матрицах окружающей среды в низкой концентрации, с использованием системы ГХ-МСД Agilent 5977B с высокоэффективным источником HES, ГХ Agilent 7890B и программного обеспечения рабочей станции Agilent MassHunter. Производилась оценка линейности, предела количественного определения (LOQ) и воспроизводимости в реальных образцах из окружающей среды. ГХ-МСД справляется с проблемой недостаточности пределов обнаружения, которая вызывала затруднения при применении предыдущих методик. Для микрочастиц пластика ПЭ, ПП и ПС проводили количественное определение с понижением концентрации до 0,005 мг/г. Отличные показатели линейности ($R^2 > 0,97$) были получены для калибровочных проб с концентрациями от 0,005 до 1 мг/г. Показатели относительного стандартного отклонения (RSD) при анализе образцов с известной концентрацией вещества и образцов из окружающей среды не превышали 10%, что демонстрирует отличную воспроизводимость и надежность системы.

Введение

Микрочастицы пластика обычно определяют как частицы пластика и его фрагменты длиной менее 5 мм. Эти частицы попадают в окружающую среду из многих источников и находятся в ней сотни лет и более, таким образом увеличивая шансы их попадания и накопления в организме. В результате выявления этих процессов появился повышенный интерес в количественном определении концентраций микропластиков в образцах из окружающей среды, таких как почва, вода и органические составляющие.

Из-за высокой молекулярной массы и плохой растворимости в большинстве растворителей количественный анализ микропластиков в образцах из окружающей среды с использованием традиционных методик ГХ-МС и tandemных ЖХ-МС вызывал затруднения. Микропластики пластика можно анализировать с помощью спектроскопических методов, таких как инфракрасная спектроскопия (ИС), которая позволяет определить количество частиц, их химический состав, размер и область распространения. Дополнительно к этим методам, использование тепловой экстракции совместно с ГХ-МС позволяет получить информацию о массовой концентрации, что может быть чрезвычайно важно для целей нормативного регулирования и мониторинга.^{1,2} И несмотря на перспективность пиролиз-газовой хроматографии — масс-спектрометрии (пиро-ГХ-МС), как правило, их недостатком является недостаточный предел обнаружения, связанные с матрицей фоновые помехи и неоднородное распределение микропластиков пластика в пробах.

Диркес и соавт. предположили, что надежное определение микропластиков пластика в образцах из окружающей среды требует показателей предела количественного определения ниже 1 мг/г.³ Для преодоления этих аналитических ограничений Диркес и соавт. разработали надежную методику, которая использует жидкостную экстракцию под давлением (PLE) с пиро-ГХ-МС для количественного анализа микропластиков пластика в низких концентрациях в сложных отложениях, почве и матрицах осадка сточных вод.³ Авторы разработали методику, обеспечивающую анализ с относительно высокой

пропускной способностью таких часто встречающихся микропластиков пластика, как полиэтилен (ПЭ), полипропилен (ПП) и полистирол (ПС). Данная рекомендация по применению описывает возможность использования системы ГХ-МСД Agilent 5977B с высокоэффективным источником HES с Agilent 7890B ГХ и программным обеспечением рабочей станции Agilent MassHunter для реализации этой методики. В частности, ГХ-МСД оценивалась в отношении линейности, пределов количественного определения (LOQ), воспроизводимости, обнаружения и количественного анализа ПЭ, ПП и ПС в реальных образцах из окружающей среды. Кроме перечисленных наиболее распространенных микропластиков пластика, с помощью этой методики можно анализировать другие типы пластика, например полимеры нейлона, полиуретан (ПУ), полиэтилентерефталат (ПЭТ), этиленвинилацетат (ЭВА), поливинилхлорид (ПВХ), акрилонитрил-бутадиен-стирол (АБС) и фторуглеродные полимеры.

Экспериментальная часть

Подготовка проб и стандартов

Плохая растворимость ПЭ и ПП в большинстве растворителей делает приготовление калибровочных концентраций из базовых растворов путем разведения практически невозможным. Прямое взвешивание полимеров также неприемлемо из-за ошибок, связанных с взвешиванием очень малых количеств, необходимых для подготовки нижних границ калибровки. Следовательно, калибровочные пробы были приготовлены путем последовательного разведения базовой смеси инертной матрицей (кальцинированный морской песок). ПЭ, ПС (полимер ПСС) и ПП (Sigma-Aldrich) измельчали в криомельнице и 250 мг каждого вещества смешивали с прокаленным морским песком, чтобы получить 10 г базовой смеси. Смесь гомогенизировали в течение 20 минут в планетарной мельнице. Проводили серию разбавлений базовой смеси, смешивая от 1 до 2 г смеси с песком, чтобы получить концентрацию полимера для каждой точки калибровки от 0,005 до 10 мг/г. Смесь гомогенизировали после каждого этапа разведения.

Для проведения PLE 1 г пробы помещали в ячейки для экстракции из нержавеющей стали объемом 10 мл и экстрагировали с использованием оборудования для экстракции растворителем. Предварительную экстракцию метанолом использовали для уменьшения влияния матрицы. Для экстракции микропластиков пластика использовали тетрагидрофуран при температуре 185 °C и давлении 100 бар. Экстракты собирали в вials объемом 60 мл, содержащие 200 мг прокаленного силикагеля. После экстракции в качестве внутреннего стандарта добавляли 10 мкл полистирола-d5 (270 мкг/мл в дихлорметане, Polymer Source). Затем растворитель выпаривали с осаждением полимеров, захваченных силикагелем. Микропластики пластика, оставшиеся в вials, промывали дихлорметаном не менее трех раз. Затем силикагель гомогенизировали в течение 5 минут.

Подробная информация об этапах подготовки стандарта и пробоподготовки представлена в публикации Диркес и соавт. (Dierkes *et al.*).

Для калибровки, валидации методики (за исключением экспериментов с размером частиц), подготовки холостых проб (содержащих только песок) и образцов из окружающей среды экстракцию проводили с использованием одной и той же процедуры.

Анализ с помощью пиролиз-ГХ-МС и оборудование

Анализ всех проб методом пиролиз-ГХ-МС проводили с использованием пиролизатора Multi-Shot Pyrolyzer EGA/PY-3030D и пробоотборника Auto-Shot Sampler AS-1020E (Frontier Laboratories), газового хроматографа 7890B и системы ГХ-МСД Agilent 5977B с высокоэффективным источником HES. Для анализа каждой пробы 20 мг гомогенизированного силикагеля взвешивали в чашке для пиролиза объемом 80 мкл (Eco-Cup LF, Frontier Laboratories) и проводили пиролиз при 600 °C.

Газовый хроматограф 7890B был оснащен колонкой с внутренним диаметром 30 м × 0,25 мм и толщиной фазы 0,25 мкм с (5%-фенил)-метилполисилоксаном (например, HP-5ms UI, 19091S-433UI). Повышение производительности при анализе низких концентраций определяемых веществ обеспечивает инертный тракт интерфейса Agilent ГХ-МС, который предназначен для расширения диапазона количественного анализа и

обнаружения веществ. Система ГХ-МСД Agilent 5977B с высокоэффективным источником HES была сконфигурирована с экстрактором источника ионизации электронным ударом и функционировала в режиме мониторинга выбранного иона (SIM) для обеспечения максимальной чувствительности. Экстрактор источника ионизации электронным ударом позволяет увеличить количество ионов, созданных и перенесенных из тела источника в квадрупольный масс-анализатор. Время анализа ГХ-МС составило 29 минут. В таблицах 1 и 2 приведены сводные данные о конфигурации системы ГХ-МС и параметрах, используемых для реализации методики.

Таблица 1. Параметры газового хроматографа Agilent 7890B.

Параметр	Значение
Испаритель	С делением и без деления потока (SSL)
Режим	С делением потока
Коэффициент деления	20:1
Суммарный поток	28,2 мл/мин
Газ-носитель	Гелий
Лайнер испарителя	4 мм id, с делением потока, стекловата
Каталожный номер лайнера испарителя	5183-4711
Температура испарителя	320 °C
Термостат	
Начальная температура термостата	40 °C
Начальное время выдержки в термостате	2 мин
Скорость изменения 1	20 °C/мин
Конечная температура 1	320 °C
Конечная выдержка 1	13 мин
Общее время работы	29 мин
Колонка	
Тип	Фаза 5%-фенил-метилполисилоксан
Длина	30 м
Диаметр	0,25 мм
Толщина фазы	0,25 мкм
Режим управления	Постоянный поток
Поток	1,2 мл/мин
Соединение испарителя	Испаритель с делением и без деления потока (SSL)
Выходное соединение	МСД

Таблица 2. Параметры системы ГХ-МСД Agilent 5977B с высокоэффективным источником HES.

Параметр	Значение
Модель	5977B
Источник	XTR EI 350
Файл настройки	EI-Atune.u
Режим	SIM
Задержка для устранения эффектов растворителя	2 мин
Режим настройки электромагнитного напряжения	1
Обнаружение следовых количеств ионов	Откл.
Температура квадрупольного масс-фильтра	150 °C
Температура источника	230 °C
Температура транспортной линии	280 °C
Время задержки	100 мс

Методика сбора данных и количественного анализа

Программное обеспечение рабочей станции MassHunter версии B.07.00 использовалось для сбора и анализа данных. Продукты пиролиза, специфичные для каждого полимера, наблюдали в режиме SIM (мониторинга выбранного иона) для количественного анализа с помощью программного обеспечения MassHunter Workstation. В таблице 3 показаны ионы и время удерживания, наблюдаемые для продуктов пиролиза полимеров.

Для количественного анализа калибровочные кривые были подобраны с использованием 1/х взвешивания с помощью инструмента для количественного анализа программного обеспечения MassHunter.

Оценка и валидация методики

Селективность методики оценивали путем экстракции и анализа матриц, не загрязненных микрочастицами пластика, смешанных с морским песком (3% от веса). Матрицы включали древесину вишни, листья

энотеры, хвою тиса, гуминовые кислоты, филе карпа, раков, моторное масло и фильтровальную бумагу, представляющие типичные ингредиенты матриц из окружающей среды, такие как белки, жиры и полисахариды.

Степень извлечения методики определяли путем анализа 1 г песка, содержащего 3% от веса гуминовых кислот с добавлением ПЭ, ПП и ПС в концентрациях 0,05 и 0,75 мг/г. Воспроизводимость методики определяли с помощью повторного анализа пяти образцов из окружающей среды, каждый из которых экстрагировали несколько раз.

Влияние размеров микрочастиц пластика на воспроизводимость и определение минимальной массы пробы, необходимой для получения репрезентативных аликвот, определяли путем анализа смесей песка и ПЭ двух разных размеров (от 10 до 50 мкм и от 200 до 400 мкм) при двух концентрациях (1 мг/г и 10 мг/г).

Для оценки эффективности методики тестирования экспериментальных образцов из окружающей среды было собрано не менее 500 г каждой из матриц, включая осадочные отложения, речную воду, содержащую взвешенные вещества, придорожную почву, почву для горшечных культур и осадки сточных вод, которые подвергались воздушной сушке, затем подготовке, экстракции и анализу. Тщательно избегали загрязнения проб пластиковыми инструментами и сосудами.

Таблица 3. Ионы и время удерживания, наблюдаемые для каждого полимера и продукта пиролиза.

Полимер	Продукт пиролиза	Наблюдаемые ионы (m/z)	Время удерживания (мин)
Полипропилен	2,4-диметил-гепт-1-ен	126, 70	4,89
Полиэтилен	1,14-пентадека-диен	81	10,29
Полиэтилен	1-пентадецен	97	10,32
Полистирол	Стирол	104, 91	5,54
Полистирол-d5	Стирол-d5	109	5,50

Синий: ионы-квалификаторы

Результаты
и обсуждение

Линейность и пределы
количественного определения

На рисунке 1 представлены хроматограммы экстрагированных ионов стандартной смеси при концентрации 0,25 мг/г.

Для построения калибровочных кривых рассчитывали относительные площади пиков с использованием в качестве внутреннего стандарта полистирола-d5. Для всех полимеров при снижении концентрации до 0,005 мг/г были

получены линейные калибровочные кривые ($R^2>0,97$). Линейные значения были получены до 1 мг/г для ПП и ПС. Для ПЭ были получены линейные значения до концентрации 10 мг/г.

Ложноположительные результаты обнаружения микрочастиц пластика вызывают беспокойство из-за повсеместного использования пластика в большинстве лабораторий. Следовательно, авторы определили предел количественного определения как концентрацию, при которой 95% холостой пробы показывают более низкий сигнал. Используя среднюю чувствительность детектора для 11 холостых проб, концентрации

холостых полимеров с односторонним доверительным интервалом ($t_{(p=0,95; n-1=10)} = 1,812$) были рассчитаны как пределы количественного определения (LOQ) (таблица 4).

Таблица 4. Пределы количественного определения.

Полимер	LOQ (мг/г)
ПП	0,007
ПЭ (m/z 97)	0,007
ПЭ (m/z 81)	0,16
ПС	0,008

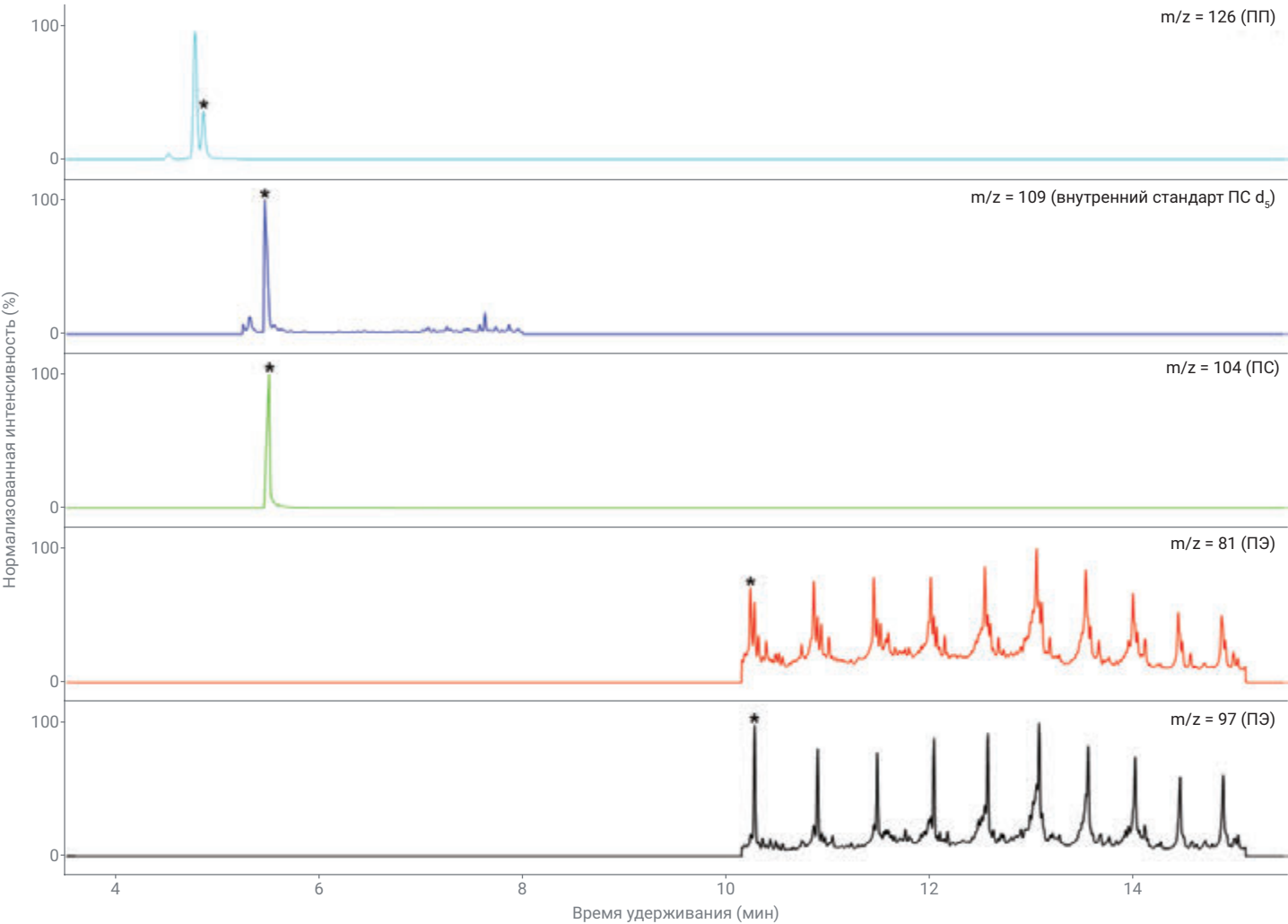


Рисунок 1. Хроматограммы экстрагированных ионов стандартного раствора смеси с концентрацией 0,25 мг/г.

Селективность методики

Поскольку методика количественного анализа пиро-ГХ-МС основана на косвенном количественном анализе продуктов пиролиза полимеров (таблица 3), оценивались помехи от ингредиентов матрицы в незагрязненных образцах из окружающей среды. В протестированных матрицах не было обнаружено помех при анализе ПП. Древесная матрица была источником повышенного фона при анализе ПС, 0,042 мг/г. Несмотря на то, что аминокислота фенилаланин является предшественником стирола при пиролизе, богатые белком рыбные матрицы не вызывали помех. Белки удаляли при предварительной экстракции метанолом. Таким образом, маловероятно, что присутствие встречающихся в природе веществ, если в них не содержится высокая доля древесины, существенно повлияет на количественный анализ ПП и ПС в образцах из окружающей среды, проводимый с использованием пиро-ГХ-МС. Однако были обнаружены помехи при количественном анализе ПЭ. Например, 30 мг моторного масла давали интенсивность пиков ионов, аналогичную стандарту 1,1 мг ПЭ. Полученный результат может представлять проблему при анализе образцов из окружающей среды, загрязненных маслом или бензином. В целом предварительная экстракция метанолом, экстракция растворителем с тетрагидрофураном и использование ионов-индикаторов для количественного анализа, обеспечивали высокую специфичность методики и ее пригодность для количественного анализа микропластика в матрицах, содержащих большое количество органических соединений.

Степень извлечения и воспроизводимость методики

В таблице 5 показаны результаты извлечения ПП, ПС и ПЭ в гуминовых кислотах и морском песке. Учитывая статистическую погрешность $\pm 20\%$, влияние матриц не искажало результаты анализа. Извлечение из других органических источников — филе рыб, раков, листьев и хвои — приводило к аналогичным результатам. Показатели относительного стандартного отклонения (RSD) не превышали 10% или были ниже, что демонстрирует отличную воспроизводимость и надежность методики.

Таблица 5. Извлечение для различных полимеров и уровень добавок.

Полимер	Уровень добавок (мг/г)	Среднее извлечение (%)*
ПП	0,05	95 $\pm$ 9
	0,75	85 $\pm$ 15
ПС	0,05	77 $\pm$ 19
	0,75	118 $\pm$ 17
ПЭ (m/z = 81)	0,05	<LOQ
	0,75	123 $\pm$ 1
ПЭ (m/z = 97)	0,05	114 $\pm$ 35
	0,75	131 $\pm$ 15

* Доверительный интервал $t_{(0,95; n-1=2)} = 4,303$

Поскольку прямой (без экстракции) пиро-ГХ/МС анализ 20 мг максимально допустимой пробы для пиролизной чашки объемом 80 мкл показал RSD, достигающее до 50%, пробы увеличили до 1 000 мг для ПЛЕ с тетрагидрофураном. Использование 200 мг по весу для фракций размером от 10 до 50 мкм приводило к результату RSD < 10%, в то время как для фракций от 200 до 400 мкм даже 1 000 мг по весу приводило к RSD 21%. Результаты показывают, что пробы, содержащие микропластики размером более 200 мкм должны быть измельчены в криомельнице перед проведением ПЛЕ для получения однородного распределения частиц.

Производительность методики для анализа образцов из окружающей среды

Осадочные отложения, взвешенные частицы, почва и осадки сточных вод были проанализированы на наличие загрязнения ПП, ПЭ и ПС. Результаты проведенных анализов представлены в таблице 6. Выводы, которые следует отметить:

- В речных осадочных отложениях ПП и ПЭ были обнаружены в концентрациях 0,032 $\pm$ 0,001 и 0,028 $\pm$ 0,006 мг/г соответственно, в то время как концентрация ПС была ниже предела количественного определения (0,008 мг/г). ПЭ и ПП были обнаружены во взвеси в максимальных концентрациях 0,98 $\pm$ 0,02 и 0,055 $\pm$ 0,010 мг/г соответственно.
- В осадках сточных вод все три полимера были обнаружены в диапазоне концентраций от 0,08 $\pm$ 0,02 мг/г (ПП) до 3,3 $\pm$ 0,3 мг/г (ПЭ).
- Горшечная почва содержала ПЭ в концентрациях, сходных с таковыми из осадков сточных вод, но ПП был обнаружен только в следовых количествах. ПС не был обнаружен.
- В придорожной почве все три полимера были выявлены в предельных концентрациях 0,85 $\pm$ 0,07 мг/г (ПЭ).

Эти результаты подтверждают, что система ГХ-МСД Agilent 5977B с высокоэффективным источником HES применима для пиро-ГХ-МС обнаружения и количественного анализа микропластика ПЭ, ПП и ПС в различных типах матриц.

Таблица 6. Результаты анализа образцов из окружающей среды.

Проба	N	ПЭ		ПП		ПС	
		Среднее (мг/г)	RSD (%)	Среднее (мг/г)	RSD (%)	Среднее (мг/г)	RSD (%)
Почва 1	7	0,79	6,0	0,039	7,4	0,054	9,6
Почва 2	6	0,85	7,3	0,040	9,2	0,057	7,9
Осадок 1	7	3,03	6,8	0,100	12,3	0,61	4,1
Осадок 2	7	3,27	4,2	0,081	10,0	0,50	4,0
Горшечная почва	7	2,81	7,1	<0,007	неприменимо	<0,008	неприменимо

Заключение

Система ГХ-МСД Agilent 5977B с высокоэффективным источником HES с ГХ Agilent 7890B и программным обеспечением рабочей станции Agilent MassHunter признана эффективной для рутинного, надежного и достоверного количественного анализа микропласти́к пластика в окружающей среде с использованием методики пиро-ГХ-МС, описанной в работе Диркес с соавторами (Dierkes et al.). В частности, с ГХ-МСД удалось справиться с проблемой недостаточности пределов обнаружения, которая вызывала затруднения при применении предыдущих методик. Количественный анализ микропласти́к пластика, таких как ПЭ, ПП и ПС, был успешно проведен при низких концентрациях (до 0,005 мг/г) в испытываемых матрицах и экспериментальных образцах из окружающей среды. Отличная линейность ($R^2 > 0,97$) калибровочных проб от 0,005 до 1 мг/г была получена для ПЭ, ПП и ПС. Для ПЭ были получены линейные значения до концентрации 10 мг/г. Показатели относительного стандартного отклонения (RSD) при анализе образцов с известной концентрацией вещества и образцов из окружающей среды не превышали 10%, что демонстрирует отличную воспроизводимость и надежность системы.

Литература

1. Robey, D. Microplastics Analysis Doesn't Need to Be So Hard. *Agilent Technologies*, номер публикации 5994-1584EN, **2019**.
2. Scircle, A. et al. Occurrence of Microplastic Pollution at Oyster Reefs and Other Coastal Sites in the Mississippi Sound, USA: Impacts of Freshwater Inflows from Flooding. *Toxics* **2020**, 8(2), 35. <https://doi.org/10.3390/toxics8020035>.
3. Dierkes, G. et al. Quantification of microplastics in environmental samples via pressurized liquid extraction and pyrolysis-gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2019**, 411, 6959–6968. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02066-9>.