

DOI: 10.12264/JFSC2024-0005

基于荧光染色法的菲律宾帘蛤中微塑料的高效分离研究

姚梦竹¹, 刘吉强², 陈翊³, 沈浩⁴, 张宜明¹

1. 浙江农林大学食品与健康学院, 浙江 杭州 311300;
2. 自然资源部第二海洋研究所, 自然资源部海底科学重点实验室, 浙江 杭州 310012;
3. 杭州市余杭区疾病预防控制中心, 浙江 杭州 311100;
4. 必维申瓯质量技术服务温州有限公司, 浙江 温州 325027

摘要: 为建立基于荧光染色技术的贝类中微塑料的高效分离前处理方案, 以菲律宾帘蛤(*Ruditapes philippinarum*)作为研究对象, 在 10%氢氧化钾(KOH)和蛋白酶 K 两种消解体系下, 考察消解效率、堵膜率和微塑料回收率及红外光谱变化情况, 确定最佳消解条件并做优化。优化方案结合尼罗红荧光染色, 并用共聚焦显微拉曼光谱仪对疑似荧光颗粒进行验证, 确定方案的适用性。实验表明: 优化后的 KOH 消解方案, 消解效率提高到(99.80±0.06)%, 堵膜率降至(95.78±6.51)%, 3~5 mm 粒径塑料标准品的回收率为(97.92±3.61)%, 400~600 μm 粒径塑料标准品的回收率为(89.58±4.14)%。经优化的蛋白酶 K 消解方案, 消解效率提升至(99.97±0.02)%, 堵膜率降为(94.37±9.85)%, 两种粒径的塑料标准品回收率分别为(97.92±3.61)%和(87.08±2.69)%。使用尼罗红溶液染色有效地提高了目视显微观察筛选效率。实验发现蛋白酶 K 优化组出现众多假阳性荧光亮点, 影响显微拉曼测定, 而 KOH 优化组未出现类似的情况。样品共检出 0.99 个/g(湿重)微塑料, 包括聚对苯二甲酸乙二醇酯[polyethylene terephthalate, PET, 纤维状, 长度为(971.23±22.01) μm]和丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物[acrylonitrile butadiene styrene, ABS, 颗粒, 粒径为(26.88±1.69) μm]。最终采用以 10% KOH 为消解溶液, 超声 10 min 后, 在 50 °C, 150 r/min 的水浴中消解 4 h, 经 5% 稀盐酸溶液调节 pH 为优化前处理方案, 结合尼罗红荧光染色观察和共聚焦显微拉曼定性, 本方案简单、经济且高效, 可适用于双壳贝类中微塑料的检测分析。

关键词: 微塑料; 菲律宾帘蛤; 消解; 荧光染色; KOH; 蛋白酶 K

中图分类号: X55

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)06-0718-13

微塑料是一类粒径小于 5 mm 的塑料碎片或颗粒^[1], 由于其具有高比表面积和多种官能团, 可有效吸附重金属(如铅、镉)^[2-3]、有机污染物(如多环芳烃)^[4-5]和抗生素^[6]。微塑料在大气、土壤、水体等环境介质中长期稳定存在, 并能通过食物链传递富集^[7-8]。目前, 塑料污染已然是一个全球性问题: 2022 年, 微塑料被列为新污染物, 人类的血液^[9]、肺部^[10]中均检测到微纳塑料的含量。经呼吸、摄入等途径进入体内的微塑料, 会引起呼吸和消化问题, 增加糖尿病及癌症的发病

风险^[11-12]。上述发现为“微塑料对人类健康的潜在风险”这一猜测提供有力的证据, 推动微塑料研究的蓬勃发展。

生物样品成分复杂, 有机物种类繁多, 采用不同消解方案, 对塑料的物理化学性质影响不一^[13], 且易受环境干扰, 其处理效果的优劣直接影响仪器分析数据, 使得准确评估其中微塑料含量存在更大挑战。酸法消解、碱法消解、氧化消解和酶法消解已广泛应用于鱼类、贝类等水生生物样品微塑料提取的前处理。酸法消解(如 HNO₃)适用于

收稿日期: 2024-01-27; 修订日期: 2024-04-21.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072298); 杭州市农业与社会发展科研引导项目(20220919Y201).

作者简介: 姚梦竹(1990-), 女, 助理工程师, 研究方向为食品安全控制技术. E-mail: 493337955@qq.com

通信作者: 张宜明, 教授, 研究方向为食品安全快速检测. E-mail: zym7307@zju.edu.cn

绝大多数生物组织,但不能完全去除油脂等生物基质,且会造成某些塑料(如聚酰胺、聚对苯二甲酸乙二醇酯)发生变色、溶解^[14],从而影响检测结果的准确性。Digka 等^[15]用稀释的 H_2O_2 溶液(1:20, W/V , 30%原液)消解聚丙烯(polypropylene, PP)、PET 和聚氯乙烯(polyvinylchloride, PVC),获得较高回收率。但其对生物组织的平均消解效率低,反应过程中释放大气泡,残留的生物组织会堵塞滤膜^[16],延长样品前处理时间。碱法消解彻底、可缩短样品前处理时间,并对样品的荧光无干扰,并具有较高的加标回收率,是目前最常使用的方案^[17]。丁金凤等^[18]以 10% KOH 消解溶液,可完全消解贻贝类消化系统,4 种材质的微塑料回收精密度较好。当使用系列酶进行消解,可有效减少(98.3±0.1)%样品基质,并获得高回收率^[19]。Karlsson 等^[20]使用蛋白酶 K 分析生物群中微塑料时,塑料颗粒加标回收率为 97%,且未发生降解,不影响后续定性验证。综上表明,采用不同前处理方案,能有助于暴露隐藏在生物组织中的微塑料,对准确分析生物体内微塑料污染情况起重要作用。

光学显微镜因使用成本低,操作简单,可根据大小、形态、颜色等物理因素筛选潜在的微塑料,而受研究学者们青睐。然而,由于人眼识别存在个体差异、主观性强,以及观察时间过长会造成观察者的视觉疲劳,导致易忽略不明显的纤维和小颗粒等因素,常出现假阳性或假阴性结果^[21]。为缩短镜检时间,快速定位、精准筛选塑料颗粒,可使用荧光染色法对微塑料进行染色标记,其中,脂溶性尼罗红荧光染料是最常被使用的荧光染色剂之一。其可通过与聚合物表面的相互作用^[22],原位染色标记,使计数更加简单便捷,易于可视化^[23-24],弥补常规光学显微观察的不足,实现对疑似颗粒的快速捕捉。Wang 等^[25]用尼罗红溶液对 PP、PET、低密度聚乙烯(low density polyethylene, LDPE)等 7 种微塑料进行染色,得到每种塑料在 355~425 nm 和 460~500 nm 激发波长下的两种荧光图像,根据融合后的组合荧光指数的差异,实现对不同类型塑料的初步鉴别。Giardino 等^[26]发现经尼罗红染色的样品在 365 nm 照射下,利用图

像算法分析软件,能准确、快速(大约 10 秒/每幅)处理,且偏差可降至 8%左右。研究表明在傅里叶红外光谱仪的验证下,使用微塑料荧光染色定量的回收率可达 90%以上^[27],这说明使用荧光染色标记微塑料是一种具有应用前景的技术。但由于尼罗红会同时标记天然聚合物^[28],这对样品前处理过程中杂质的去除提出了更高的要求,而基于此方法对前处理优化的研究却鲜有报道。

菲律宾帘蛤(*Ruditapes philippinarum*)是一种典型的滩涂埋栖性贝类,也是最常见的双壳类水产消费品,其软体部中蛋白质和粗脂肪含量占干重的 61.28%和 8.61%^[29]。因其分布广泛且具有固着生活的特征,对微塑料有较高的富集能力,可作为我国贝类微塑料污染的主要指示生物之一^[30]。本研究以菲律宾帘蛤为实验样品,PP、PET、聚苯乙烯(polystyrene, PS)和 LDPE 颗粒为标准物质,以 10% KOH 溶液和蛋白酶 K 溶液对菲律宾帘蛤组织进行消解,对比这两种方案处理后的消解效率、堵膜率、回收率、红外光谱及荧光图像等指标变化,考察结合荧光染色,不同消解方案的差异,以期为菲律宾帘蛤中微塑料的高效分离与检测提供理想方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究所用菲律宾帘蛤体重(7.91±1.82) g,带壳长度(33.73±4.97) mm,分别采购于浙江省温州市大润发超市鹿城店、菜蔬生黄龙店和大田园超市黄龙店,以提高研究样本的代表性。购买后用铝箔纸包裹,放入自封袋中,-20℃下保存。所用微塑料标准品:PP、PET、PS、LDPE 分别购自顾特服(上海)贸易有限公司[粒径为 3~5 mm,其中:PP, (4.37±0.13) mm; PS, (4.00±0.11) mm; PET, (2.78±0.08) mm; LDPE, (4.23±0.17) mm]和东莞市鸿兴新材料有限公司[粒径 400~600 μm,其中:PP, (553.76±73.53) μm; PS, (526.20±92.54) μm; PET, (544.11±78.85) μm; LDPE, (560.59±63.52) μm]。

氢氧化钾(KOH)、丙酮购自国药集团化学试剂有限公司;蛋白酶 K 溶液(BR Grade)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;十二烷基磺酸钠

(SDS)购自国药集团化学试剂有限公司;氯化锌(ZnCl_2)购自西陇科学股份有限公司;盐酸购自浙江中星化工试剂有限公司;尼罗红试剂($\geq 98.0\%$, HPLC)购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 测试前将菲律宾帘蛤放在室温下解冻 1 h, 用已过滤的去离子水冲洗干净。微塑料标准品: PP、PET、PS 和 LDPE 用去离子水冲洗 3 次, 放入 30 °C 烘箱干燥备用。

1.2.2 消解方案的确定

(1) 样品消化效率实验: 随机挑取 2~4 个菲律宾帘蛤, 用不锈钢镊子取出整个软体部分, 剪碎、混合均匀, 称取(1.05 ± 0.07) g 样品置于 150 mL 锥形瓶中, 按照下述方法加入消解溶液: 方案一, 加入 30 mL 10% KOH 溶液; 方案二, 先加入 30 mL 去离子水, 再加入 90 μL 蛋白酶 K 溶液(20 $\mu\text{g/mL}$), 用铝箔封口, 超声 10 min 后取出, 置于 SYC-B 恒温振荡培养箱(50 °C、150 rpm)中消解 4 h、16 h 和 24 h。每种方案的不同消解温度组分别设置 3 组平行和 2 个进行消解处理的空白对照。消解溶液使用真空抽滤装置过滤至玻璃纤维滤膜(GF/A, 孔径 1.6 μm , 直径 25 mm)上, 并用去离子水反复冲洗。将滤膜转移到玻璃称量皿中, 放入 50 °C 干燥箱中烘至恒重后称滤膜总重, 按照公式(1)计算消解效率。在真空抽滤过程中, 以连续 2 滴消解溶液下落时间超过 10 s 为更换滤膜标准, 记录使用的滤膜总数, 按照公式(2)计算堵膜率。

(2) 塑料回收率和红外光谱检测: 称取(1.05 ± 0.06) g 整个软体部分放入锥形瓶中, 分别添加 4 种塑料标准品(4 颗 3~5 mm 粒径和 20 颗 400~600 μm 粒径), 按 1.2.2 方法(1)进行消解。将抽滤后的滤膜置于 50 °C 烘箱烘干, 取出后将滤膜置于 50 mL 玻璃烧杯中, 加入 10 mL ZnCl_2 溶液($\rho > 1.50$ g/mL), 室温下超声 3 min, 倒出上清液, 重复 3 次。收集所有上清液 4000 r/min 离心 5 min 后再次抽滤, 以去除未消解的杂质(如砂石、甲壳素)^[15,31]。滤膜烘干装入滤膜盒中单独保存。调节 Nikon Ti-U 倒置荧光显微镜至明场状态, 观察消解前后塑料颗粒的外观变化, 并计算回收率。使

用 Nicolet is5 傅里叶变换红外光谱仪读取 500~4000/ cm 波数的透光率值。

1.2.3 消解方案优化 选取两种消解条件进行优化, 方法一, 使用 10% KOH 溶液消解 4 h, 消解溶液用 5% 盐酸溶液调节 pH 至中性。方法二, 使用蛋白酶 K 溶液消解 16 h, 消解溶液加入 10 mL 5% SDS 溶液, 再超声 30 min。处理后的消解溶液同 1.2.2 步骤(2), 每组平行 3 次和 2 个空白对照, 考察消解效率、堵膜率、塑料回收率和红外光谱变化。

1.2.4 菲律宾帘蛤样品检测 将菲律宾帘蛤按上述(1.2.3)相同条件处理, 设置 3 组平行和 2 个空白对照。滤膜烘干后滴加 10 $\mu\text{g/mL}$ 尼罗红溶液直至完全浸透, 干燥 30 min, 装入滤膜盒中单独保存。

将放有滤膜的载玻片置于倒置荧光显微镜(激发滤光片 465~495 nm, 分光镜 DM 505, 吸收滤光片 BA 515~595 nm, 发绿光)下, 以“Z”形移动观察并拍摄照片, 然后同一视野下切换普通光源进行明场观察。

利用 Renishaw InVia Reflex 共聚焦显微拉曼光谱仪(785 nm 激发光光源, 1200 l/mm 光栅, 曝光时间 10 s, 累计 3 次), 使用 50 倍物镜观察, 经光致漂白 5 min 后采集 200~3000/ cm 的强度值。绘制后的拉曼光谱基线进行平滑、降噪和分峰拟合处理, 与塑料标准图谱的特征峰^[32]进行比较, 以匹配 4 个及以上特征峰位置为定性判断依据。

1.2.5 质量控制 所有试剂均经 1.6 μm 玻璃纤维滤膜过滤, 操作台用乙醇擦拭消毒。实验所用的工具、器皿均为玻璃或不锈钢材质, 用去离子水冲洗 3 次, 烘干后使用, 敞口容器用铝箔覆盖以减少来自环境的污染。实验过程中穿着棉质白大褂, 佩戴丁腈手套, 严格控制实验期间人员的走动。同时每组处理均设置 2 个空白对照, 以检测实验过程中的污染情况。

1.3 数据处理

菲律宾帘蛤消解效率按照公式(1)^[33]计算。

$$\text{消解效率}(\%) = [1 - (M_1 - M_0)/M] \times 100\% \quad (1)$$

式中, M_1 为使用并干燥后滤膜的质量, g; M_0 为滤膜初始质量, g; M 为初始软体组织质量, g。

根据所使用的滤膜数量, 按照公式(2)^[34]计算

堵膜率。

堵膜率(%)=(N/M)×100% (2)

式中, *N* 为过滤所需滤膜数(张); *M* 为初始软体组织质量(g)。

塑料回收率根据消解前后塑料颗粒的数量, 按照公式(3)^[35]计算。

回收率(%)=(*N*₀/*N*₁)×100% (3)

式中, *N*₀ 为荧光显微镜下观察到的颗粒数(个); *N*₁ 为标准品实际添加的颗粒数(个)。

1.4 统计分析

数据以平均值±标准偏差($\bar{x}\pm SD$)表示, 微塑料结果以微塑料个数/g(湿重)表示。采用 SPSS

26.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 并对不同组数据之间做 Tukey’s 多重比较检验, 以 *P*<0.05 表示数据差异显著, *P*<0.01 表示数据差异极显著。使用 Origin 2018 进行绘图, 荧光照片使用 Image J 统计分析。

2 结果与分析

2.1 消解方案的确定

2.1.1 不同消解方式对菲律宾帘蛤的消解效率 实验处理前记录菲律宾帘蛤的基本生物数据, 如长度、重量, 经碱法消解和酶法消解处理, 其消解效率和堵膜率见表 1。

表 1 不同消解方案中菲律宾帘蛤样品的基本信息、消解效率及堵膜率
Tab. 1 Basic information, digestion efficiency and membrane obstruction rate of *Ruditapes philippinarum* analyzed by different digestion schemes

消解溶液 digestion solution	消解时间/h digestion time	菲律宾帘蛤样品基本信息 basic information of <i>Ruditapes philippinarum</i>			消解效率/% digestion efficiency	堵膜率/% membrane obstruction rate
		壳长/mmshell length	湿重/gwet weight	样本量 sample size		
10% KOH 氢氧化钾	4	31.08±4.21	5.47±1.82	10	99.46±0.49 ^{Aa}	126.17±53.30
	16	33.46±5.33	6.27±2.21	10	95.52±0.62 ^{Bb}	171.31±76.17
	24	34.90±2.95	6.90±1.74	10	96.46±0.25 ^{Bb}	191.00±2.24
蛋白酶 K Protease K	4	35.37±2.75	7.47±1.65	10	99.37±0.12 ^b	172.86±9.51 ^{Aa}
	16	32.52±2.99	5.54±1.51	10	99.66±0.08 ^a	98.79±3.24 ^{Bb}
	24	33.61±3.29	6.65±2.08	10	99.65±0.06 ^a	93.48±7.90 ^{Bb}

注: 数据上标大写字母表示不同处理平均值间差异极显著(*P*<0.01), 小写字母则表示不同处理平均值间差异明显(*P*<0.05)。加黑数字指各消解方案中综合最佳的消解时间、消解效率和堵膜率。
Note: The superscript capital letters showed extremely significant differences among the average values of different treatments (*P*<0.01), while lowercase letters showed significant differences among the average values of different treatments (*P*<0.05). The numbers in black refer to the best digestion time, digestion efficiency and membrane obstruction rate in each resolution scheme.

由表 1 可知, 在 50 ℃, 10% KOH 消解体系下, 3 组处理的消解效率存在极显著差异(*P*<0.01)。以 4 h 组的消解效率最高, 为(99.46±0.49)%, 堵膜率为(126.17±53.30)%。其次为 24 h 组, 消解效率为(96.46±0.25)%, 堵膜率为(191.00±2.24)%。16 h 组消解情况最差, 消解效率和堵膜率分别为(95.52±0.62)%和(171.31±76.17)%。

在 50 ℃, 蛋白酶 K 消解体系下, 3 组处理的消解效率存在显著差异(*P*<0.05), 其中 16 h 组的平均消解效率最高, 为(99.66±0.08)%, 其次为 24 h 组的(99.65±0.06)%, 4 h 组消解效率最差, 为(99.37±0.12)%。观察消解溶液可发现, 4 h 组消解溶液中存在肉眼可见的小颗粒组织样品, 导致堵

膜率最高, 为(172.86±9.51)%。其余两组的堵膜率分别为(98.79±3.24)%和(93.48±7.90)%, 各处理组之间存在极显著差异(*P*<0.01)。

为进一步探究堵膜现象产生的原因, 检测包含空白对照的 8 组消解溶液的 Zeta 电位, 以判断溶液稳定性。由图 1 可得, 采用 10% KOH 溶液消解的 3 组, Zeta 电位在−5~5 mV 范围内, 绝对值与空白溶液相近, 说明溶液里颗粒的电泳运动极其缓慢, 几乎和布朗运动及其他运动在一个数量级。使用蛋白酶 K 消解的溶液中颗粒带负电, Zeta 电位绝对值由高到低分别是 4 h 组(−24.22 mV)、24 h 组(−19.57 mV)和 16 h 组(−12.60 mV), 均大于空白组。这可能是随着水解反应的进行, 体系

Zeta 电位呈现先快速增加再缓慢降低的趋势,且在反应过程即将结束时,会出现一种特殊的电位回复现象,但反应结束时的电位依然大于未反应时^[36]。根据上述分析,排除受离子电荷运动而出现堵膜现象的可能。

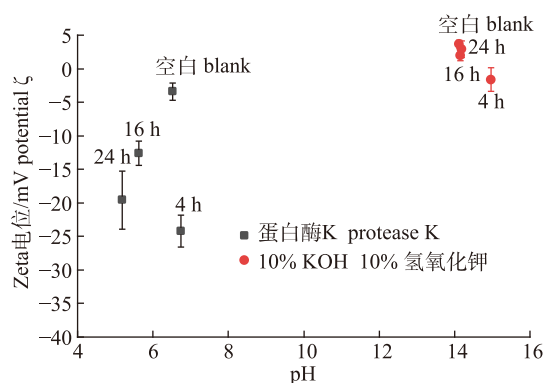


图 1 各消解方案的 Zeta 电位值
Fig. 1 Zeta potential values of each resolution scheme

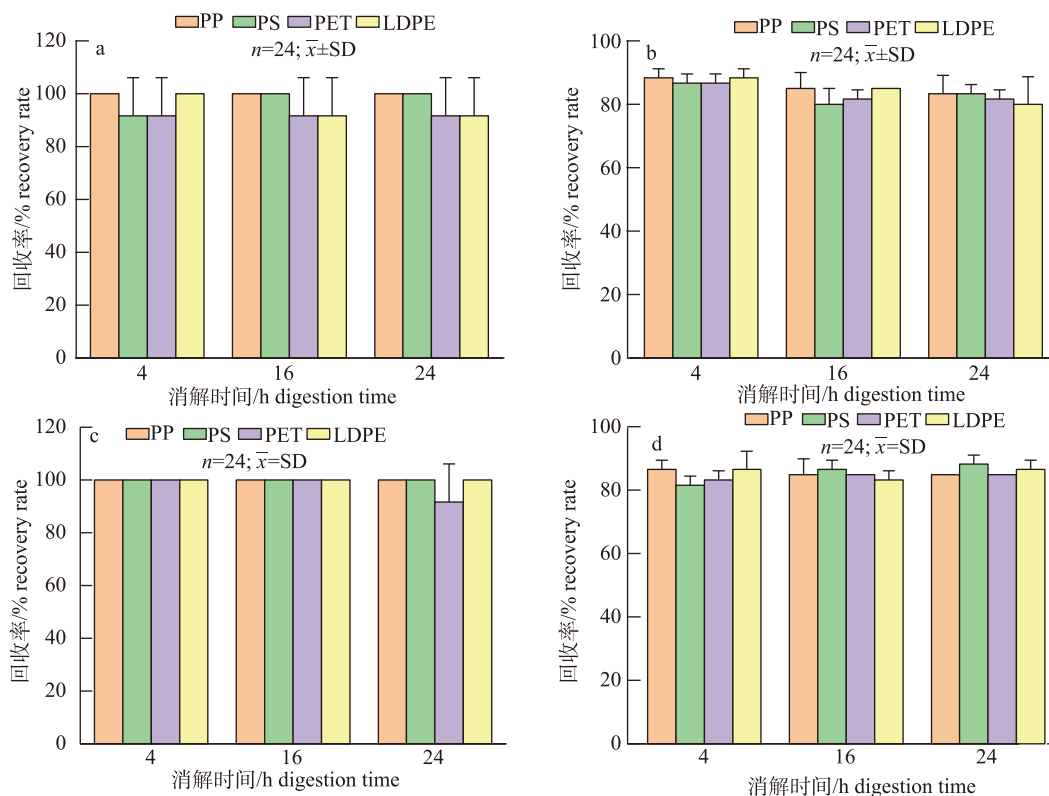


图 2 不同消解方式对不同粒径微塑料回收率的影响

a (3–5 mm 粒径塑料颗粒)、b (400–600 μm 粒径塑料颗粒)为 10% KOH 消解体系; c (3–5 mm 粒径塑料颗粒)、d (400–600 μm 粒径塑料颗粒)为蛋白酶 K 消解体系。实验各组间无显著性差异($P>0.05$)。

Fig. 2 Influence of different digestion methods on the recovery rate of microplastics with different particle sizes
a (3–5 mm particle size plastic particles)、b [(400–600) μm particle size plastic particles] for 10% KOH digestion system; c (3–5 mm particle size plastic particles)、d [(400–600) μm particle size plastic particles] for protease K digestion system. There was no significant difference among all groups ($P>0.05$).

基于以上结果,当使用 10% KOH 溶液,由于玻璃纤维滤膜不耐受碱,在碱性条件下容易破碎而使孔径发生变化,导致高堵膜率现象的发生^[37]。蛋白酶 K 通过断裂肌原纤维,破坏肌原纤维的结构完整性^[38],消解后溶液中带负电荷的小分子短肽和氨基酸残基含量增加,以及存在未降解的油脂,从而影响过滤速度。

2.1.2 不同消解方式对微塑料回收率的影响 在两种消解方式下,不同粒径的 PP、PET、PS 和 LDPE 微塑料回收率见图 2。

由图 2 可知,实验各组间无显著性差异($P>0.05$),当使用 10% KOH 溶液消解时,3~5 mm 粒径的塑料颗粒回收率为 91.7%~100% (4 h 组=16 h 组=24 h 组),400~600 μm 粒径的回收率介于 80%~88.3%之间(4 h 组>16 h 组>24 h 组)。当消解溶液为蛋白酶 K 溶液时,回收率分别为 91.7%~

100% (4 h 组=16 h 组>24 h 组)和 81.7%~86.7% (24 h 组>16 h 组>4 h 组)。一方面, 实验针对抽滤后的玻璃纤维滤膜进行密度分离, 回收上清液时, 3~5 mm 粒径的 PS、PET 和 LDPE 存在被滤膜阻挡的情况, 导致 KOH-4 h、KOH-16 h、KOH-24 h 和蛋白酶 K-24 h 这 4 组出现部分标品损失。另一方面, 因为采用真空抽滤以减少过滤时间, 小粒径塑料颗粒易附着于过滤器底部, 造成部分颗粒的丢失, 使得小粒径(400~600 μm)的回收率略低于大粒径(3~5 mm), 这与其他研究结果相符合^[39-40]。综合分析, 使用 10% KOH 溶液消解 4 h 和蛋白酶 K 消解 16 h 处理, 微塑料颗粒的回收率高于其他实验方案。

2.1.3 不同消解方式下微塑料的光谱变化 图 3 是在衰减全反射(ATR)测量模式下, 消解前后微

塑料颗粒的红外光谱图。从图中可发现, 经不同处理的微塑料颗粒, 其主要特征峰数量相同, 但在峰强、峰位置和谱图质量等方面与质控组存在差异。PP 颗粒经 10% KOH 或蛋白酶 K 消解 24 h 后, 在 1700~1300/ cm^{-1} 处出现较多干扰峰。PS 颗粒组的 KOH-16 h 和 KOH-24 h, 698/ cm^{-1} 处的芳环上的 $=\text{C}-\text{H}$ 面外弯曲振动, 强度明显降低, 且稍向右偏移, 相似情况也出现在蛋白酶 K-24 h。经全部 6 组消化方案消解后的 PET 颗粒, 在 1105/ cm^{-1} 和 1230/ cm^{-1} 处的 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 伸缩振动, 强度减弱。而 LDPE 颗粒在 1470~1850/ cm^{-1} 出现杂峰。这可能受样品表面的平整度、洁净度和测试环境的影响, 谱图出现一定程度的变化。基于以上比较结果, 在所有测试条件中, 以 10% KOH, 50 $^{\circ}\text{C}$, 4 h 和蛋白酶 K, 50 $^{\circ}\text{C}$, 16 h 消解的效果最佳。

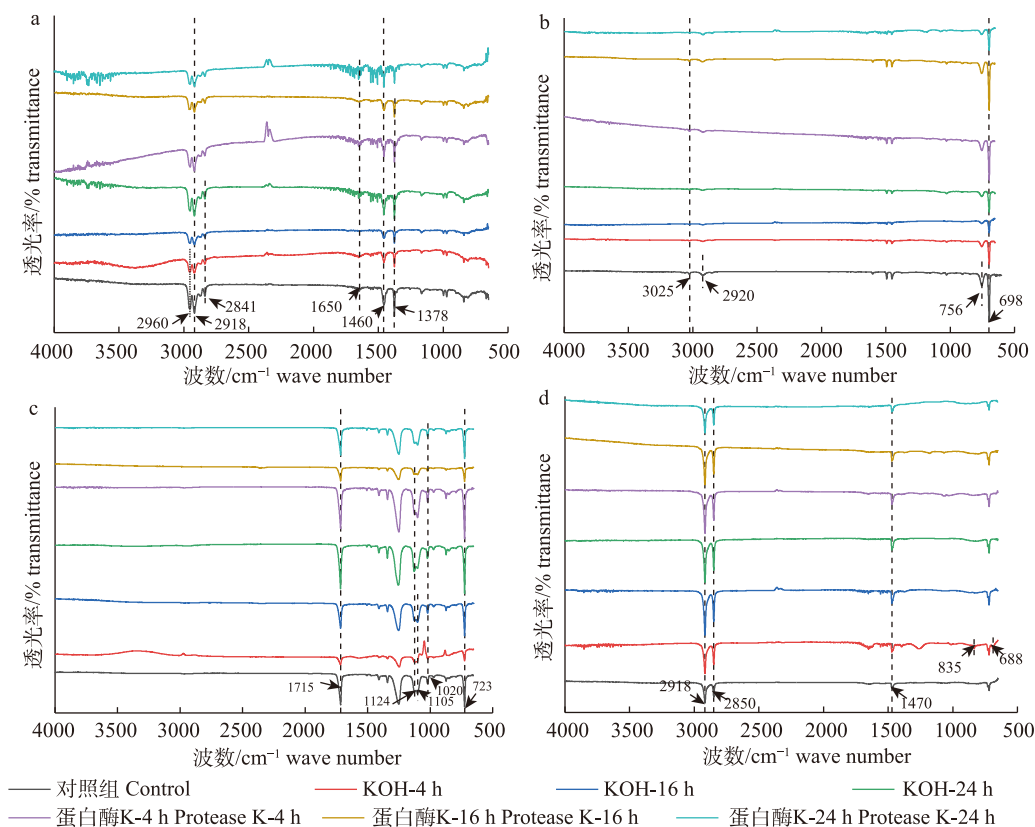


图 3 不同消解方式下微塑料颗粒的红外光谱图

a. PP; b. PS; c. PET; d. LDPE. 黑色箭头指向不同塑料颗粒红外光谱中的主要特征吸收峰, 其后标注的数值代表该吸收峰的位置。

Fig. 3 Infrared spectra of microplastic particles under different digestion methods

a. PP; b. PS; c. PET; d. LDPE. The black arrows point to the main characteristic absorption peaks in the infrared spectra of different plastic particles, and the values indicated after that represent the positions of the absorption peak

2.2 优化方案的考察

使用 10% KOH, 50 $^{\circ}\text{C}$, 4 h 和蛋白酶 K, 50 $^{\circ}\text{C}$,

16 h 消解后, 菲律宾帘蛤组织的消解效率能达到 99%, 但出现抽滤耗时长, 需要更换滤膜的情况,

为解决这一问题, 基于这两种消解条件进行优化。实验结果表明, 经优化处理的两组方案各项指标良好, 在保持高消解效率同时, 堵膜率显著下降, 两种粒径的 4 种标准品回收率可达到 85% 以上, 蛋白酶 K 优化组 Zeta 电位值在 ± 30 至 ± 40 范围内, 此时溶液较稳定^[41](表 2), 并且各类型颗粒的红外光谱图无明显差异(图 4)。综上分析, 表明优化方法适用于样品中微塑料的提取。因此, 确

定最佳消解条件为: 10% KOH, 50 ℃, 4 h, 5%稀盐酸溶液调节 pH 和蛋白酶 K, 50 ℃, 16 h, 加入 SDS 再次超声 30 min。

2.3 菲律宾帘蛤中微塑料的检测

为验证优化方案与荧光染色结合的有效性, 使用倒置荧光显微镜和共聚焦显微拉曼光谱仪进行验证。结果发现, 在蛋白酶 K 优化组的滤膜上, 观察到许多假阳性红色荧光点(图 5)。这可能是由

表 2 优化消解方案的消解效率、堵膜率、Zeta 电位值和回收率
Tab. 2 Digestion efficiency, membrane obstruction rate, Zeta potential values and recovery rate analyzed by optimized digestion schemes

n=20; $\bar{x}\pm SD$

消解溶液 digestion solution	消解时间/h digestion time	菲律宾帘蛤样品基本信息 basic information of <i>Ruditapes philippinarum</i>		消解效率/% digestion efficiency	Zeta 电位/ mV ζ potential	堵膜率/% membrane obstruction rate	回收率/% recovery rate	
		壳长/mm shell length	湿重/g wet weight					
							3-5 mm	400-600 μm
10% KOH	4	31.39±4.15	5.69±2.51	99.80±0.06	-1.67±0.94	95.78±6.51	97.92±3.61	89.58±4.14
蛋白酶 K protease K	16	34.91±3.20	7.19±1.88	99.97±0.02	-37.33±4.80	94.37±9.85	97.92±3.61	87.08±2.69

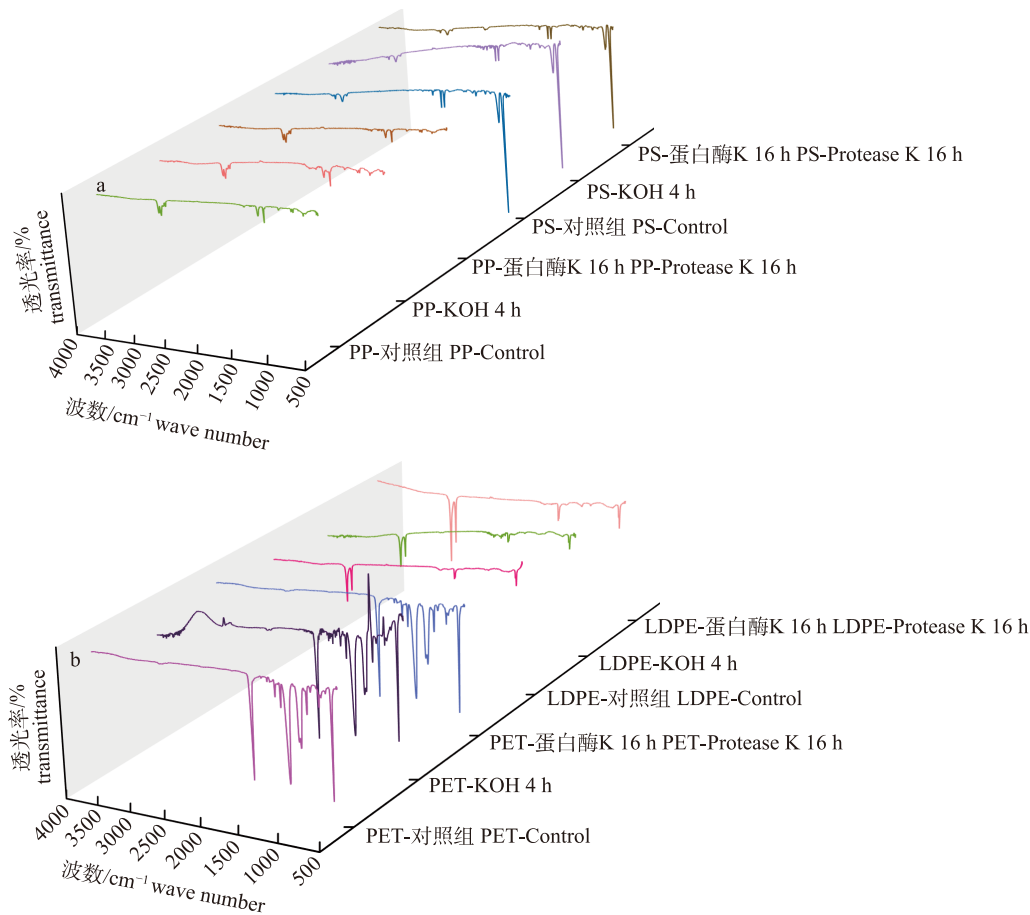


图 4 优化消解方式下微塑料颗粒的红外光谱图
Fig. 4 Infrared spectra of microplastic particles under optimized digestion methods

于 SDS 离子在疏水效应的影响下, 其在尼罗红分子表面具有吸附活性而实现增溶, 形成原胶束^[42]。而 10% KOH 优化组的滤膜上未出现此类情况, 共检出两种成分微塑料, 包含 PET (图 6a) 和 ABS (图 6b)。经过 3 次重复测量, 计算得出在市售菲律宾帘蛤样品中有 0.99 个/克(湿重)微塑料, 分别是 PET [纤维状, 长度为 $(971.23 \pm 22.01) \mu\text{m}$] 和 ABS [颗粒, 粒径为 $(26.88 \pm 1.69) \mu\text{m}$]。

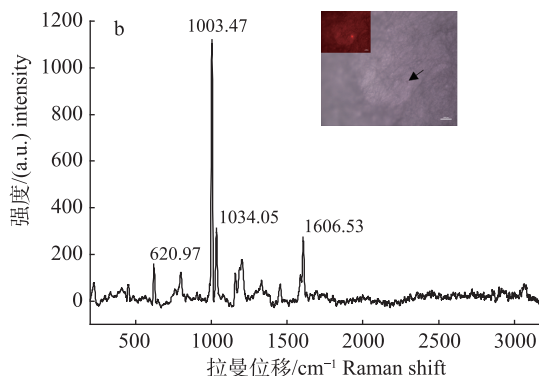
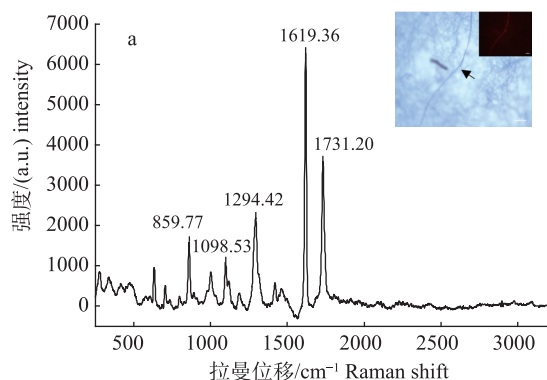


图 6 菲律宾帘蛤中检测出的 PET 和 ABS

右上角为荧光显微镜观察图像(黑色箭头); a. PET 拉曼光谱图; b. ABS 拉曼光谱图。

Fig. 6 PET and ABS detected in *Ruditapes philippinarum*

The upper right corner is the fluorescence microscope image (black arrow), a. PET Raman spectra, b. ABS Raman spectra.

3 讨论

3.1 碱法消解和酶法消解的优化

生物组织消解是一个涉及多环节的复杂生化过程。已建立的多种实验室检测方法中, 多以消解效率、回收率、红外光谱变化为依据, 对不同消解方案进行比较。邹亚丹等^[43]对喂食了荧光 PS 微球大型溞(*Daphnia magna*)和斑马鱼分别使用 6 种消解剂(KOH、NaOH、H₂O₂、HNO₃、HNO₃:HCl 和 HNO₃:HClO₄)处理, 利用荧光分光光度计证实 KOH 消解法对微塑料的荧光强度影响最小, 且微塑料的表面形态没有明显影响, 回收率为 $(96.3 \pm 0.5)\%$ 。钟莺莺等^[44]以贻贝为基质, 采用酸消解、碱消解、氧化消解和酶消解, 对 PS、PP、PET 聚碳酸酯(polycarbonate, PC)、聚乙烯(polyethylene, PE)、聚酰胺 6 (polyamide 6, PA 6) 和聚酰胺 66 (polyamide 66, PA 66) 7 种微塑料进行消解, 发现利用 10% KOH 溶液进行样品消解, 4 h 能基本完成, 而在 37 °C, 24 h 条件下蛋白酶达到

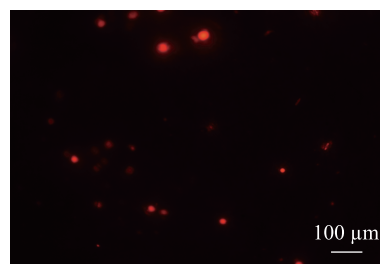


图 5 经优化蛋白酶 K 组滤膜的荧光照片

Fig. 5 Fluorescent photo of optimized Protease K group filter membrane

最大消解效果。本研究中, 10% KOH, 4 h 组和蛋白酶 K, 16 h 组, 消化效率可达 99%, 两种粒径标准样品的回收率超过 85%, 与之前报道一致。

实验过程中两种消解方案均出现不同程度抽滤难的现象, 但蛋白酶 K 堵膜情况好于碱法消解。通过对各消解溶液 Zeta 电位值的分析, 排除受离子电荷运动影响的可能。本研究一方面利用 SDS 良好的起泡、分散能力, 使用低浓度的 SDS 溶液超声 30 min, 乳化生物组织中的脂肪^[35,45], 促进蛋白酶 K 更有效分解贝类组织, 同时不会对微塑料造成损害。另一方面, 采用酸中和 KOH 溶液可以促进过滤^[46], 优化方案中使用稀盐酸调节 pH 值至中性的碱性消解溶液, 不会因过快散热而影响溶液稳定性, 且在消解效率和堵膜率上有显著改善。这表明当使用特定材质滤膜时, 溶液的酸碱性对过滤快慢起重要作用。

综上所述, 10% KOH, 4 h 优化组和蛋白酶 K, 16 h 优化组, 消化效率可达 99% 以上, 显著缩短生物组织前处理时间, 官能团结构未发生明显变

化,且两种粒径标准样品的回收率分别超过 95% 和 85%。优化后的两种消解方案,满足菲律宾帘蛤中微塑料高效分离的需求,达到预期目标。

3.2 荧光染色的初步筛选

荧光染色技术可外标记疏水性塑料颗粒,实现快速筛选微米或纳米水平的疑似颗粒,在显微目视检测中应用日趋广泛^[47-48]。Dowarah 等^[49]运用荧光染色技术对两种双壳类物种(*Perna viridis* 和 *Meretrix meretrix*)进行分析,获得了微塑料摄入情况。Guzman 等^[50]用尼罗红溶液研究不同大小的菲律宾帘蛤中微塑料含量,共检出 2.70~3.65 MP/g 软组织,其中以颗粒状 PS 为主。本研究以尼罗红荧光染料标记,在 10% KOH 溶液和蛋白酶 K 溶液优化消解后的滤膜上均观察到明显的荧光信号,但两种类型的荧光信号产生机制不一致,检测结果与共聚焦显微拉曼验证结果相符,因此排除使用蛋白酶 K 溶液与尼罗红荧光染料相结合检测的方案。

本研究采用经 4 h 碱溶液消解处理,结合荧光染色,在市售菲律宾帘蛤软体组织中分离观察并检测到 0.99 个/克(湿重)微塑料,这一实验的结果与预期类似,可为基于荧光染色的菲律宾帘蛤中微塑料的高效分离方案选择提供依据。但实验中也存在不足之处:由于双壳贝类中微塑料的含量可能与生物个体大小、摄食机制以及所处环境的微塑料污染程度有关,检出结果存在较大差异^[51],今后应拓宽检测样本物种,以获得更完善的微塑料摄入情况。实际环境中菲律宾帘蛤会摄入更小粒径的微塑料,需进一步考量小粒径塑料颗粒对消解溶液的耐受性能,以全面评价不同消解方案对微塑料的影响。另外,尼罗红的亲脂性会导致产生脂类等有机杂质的假阳性结果,在后续的研究中应搭配其他荧光染料,如罗丹明 B^[52]、荧光增白剂^[53],再结合密度分离技术,更好地排除其他物质的干扰。

4 结论

本研究以菲律宾帘蛤为实验样品,对碱法消解和酶法消解两组消化方式做优化实验,研究表明两组优化方案:样品经超声 10 min,放入 50 ℃,

150 r/min 水浴中,分别以 10% KOH, 4 h, 5%稀盐酸溶液调节 pH 和蛋白酶 K, 16 h, 加入 SDS 再次超声 30 min,消解溶液澄清且方便抽滤,微塑料的回收率可维持在 85%以上。在优化方案的基础上,利用尼罗红溶液染色,快速完成荧光标记,使用共聚焦显微拉曼光谱仪对疑似颗粒做原位定性。基于实验结果,经 SDS 溶液优化的酶法消解不适用于尼罗红染色,因此推荐使用以优化后的碱法消解为前处理方案。

参考文献:

- [1] Thompson R C, Olsen Y, Mitchell R P, et al. Lost at sea: Where is all the plastic?[J]. Science, 2004, 304(5672): 838.
- [2] Li W H, Jian M F, Yu H P, et al. Bioaccumulation effects of microplastics and heavy metals pollutants in the dominant freshwater fish species in the Longkou entry of Raohe River, Lake Poyang Basin[J]. Journal of Lake Sciences, 2020, 32(2): 357-369. [李文华, 简敏菲, 余厚平, 等. 鄱阳湖流域饶河龙口入湖段优势淡水鱼类对微塑料及重金属污染物的生物累积[J]. 湖泊科学, 2020, 32(2): 357-369.]
- [3] Yu J, Chen L, Wu B. Size-specific effects of microplastics and lead on zebrafish[J]. Chemosphere, 2023, 337: 139383.
- [4] Dai C M, Li S, Duan Y P, et al. Advances in research on effects of microplastics on migration, transformation and bioavailability of organic pollutants in water[J]. Materials Reports, 2020, 34(21): 21033-21037. [代朝猛, 李思, 段艳平, 等. 微塑料对水体中有机污染物迁移转化及生物有效性的影响研究进展[J]. 材料导报, 2020, 34(21): 21033-21037.]
- [5] Wan H Y, Wang J K, Zhang W. Key influencing factors for interactions between microplastics and heavy metals, persistent organic pollutants, and antibiotics in soil[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2022, 39(4): 643-650. [万红友, 王俊凯, 张伟. 土壤微塑料与重金属、持久性有机污染物和抗生素作用影响因素综述[J]. 农业资源与环境学报, 2022, 39(4): 643-650.]
- [6] Han Y, Zhou W S, Tang Y, et al. Microplastics aggravate the bioaccumulation of three veterinary antibiotics in the thick shell mussel *Mytilus coruscus* and induce synergistic immunotoxic effects[J]. Science of the Total Environment, 2021, 770: 145273.
- [7] Li A F, Li F X, Qiu J B, et al. Pollution status, biological toxicity and control strategy of microplastics in water

- environments: A review[J]. Periodical of Ocean University of China, 2019, 49(10): 88-100. [李爱峰, 李方晓, 邱江兵, 等. 水环境中微塑料的污染现状、生物毒性及控制对策[J]. 中国海洋大学学报, 2019, 49(10): 88-100.]
- [8] Li F Y, Wang J M, Zou Y L, et al. Advance of micro-nano plastics[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition), 2022, 35(1): 84-93. [李方轶, 王佳眉, 邹逸伦, 等. 微纳米塑料的研究进展[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2022, 35(1): 84-93.]
- [9] Leslie H A, van Velzen M J M, Brandsma S H, et al. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood[J]. Environment International, 2022, 163: 107199.
- [10] Jenner L C, Rotchell J M, Bennett R T, et al. Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy[J]. Science of the Total Environment, 2022, 831: 154907.
- [11] Ghosh S, Sinha J K, Ghosh S, et al. Microplastics as an emerging threat to the global environment and human health[J]. Sustainability, 2023, 15(14): 10821.
- [12] Ebrahimi P, Abbasi S, Pashaei R, et al. Investigating impact of physicochemical properties of microplastics on human health: A short bibliometric analysis and review[J]. Chemosphere, 2022, 289: 133146.
- [13] Teng J. Microplastic pollution in Laizhou Bay and its ecotoxic effects on typical bivalves[D]. Yantai: University of Chinese Academy of Sciences (Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences), 2021. [滕佳. 莱州湾微塑料污染特征及其对典型双壳贝类生态毒性效应研究[D]. 烟台: 中国科学院大学(中国科学院烟台海岸带研究所), 2021.]
- [14] Chen Y L, Sun K, Han L F, et al. Separation, identification, and quantification methods in soil microplastics analysis: A review[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(2): 364-380. [陈雅兰, 孙可, 韩兰芳, 等. 土壤中微塑料的分离及检测方法研究进展[J]. 土壤学报, 2022, 59(2): 364-380.]
- [15] Digka N, Tsangaris C, Torre M, et al. Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2018, 135: 30-40.
- [16] Wu W N, Gao J M, Shen Q, et al. Comparison of microplastic extraction methods from organisms[J]. China Environmental Science, 2019, 39(10): 4343-4349. [吴文楠, 高俊敏, 沈茜, 等. 生物体微塑料提取方法比选研究[J]. 中国环境科学, 2019, 39(10): 4343-4349.]
- [17] Bai C L, Liu L Y, Hu Y B, et al. Microplastics: A review of analytical methods, occurrence and characteristics in food, and potential toxicities to biota[J]. Science of the Total Environment, 2022, 806: 150263.
- [18] Ding J F, Li J X, Sun C J, et al. Separation and identification of microplastics in digestive system of bivalves[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2018, 46(5): 690-697. [丁金凤, 李景喜, 孙承君, 等. 双壳贝类消化系统中微塑料的分离鉴定及应用研究[J]. 分析化学, 2018, 46(5): 690-697.]
- [19] Löder M G J, Imhof H K, Ladehoff M, et al. Enzymatic purification of microplastics in environmental samples[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(24): 14283-14292.
- [20] Karlsson T M, Vethaak A D, Almroth B C, et al. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 122(1-2): 403-408.
- [21] Tirkey A, Upadhyay L S B. Microplastics: An overview on separation, identification and characterization of microplastics[J]. Marine Pollution Bulletin, 2021, 170: 112604.
- [22] Maes T, Jessop R, Wellner N, et al. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44501.
- [23] Li Y, Lu N. Extraction and identification of microplastics from soil[J]. Agriculture and Technology, 2021, 41(21): 7-9. [李燕, 卢楠. 土壤中微塑料来源提取鉴定[J]. 农业与技术, 2021, 41(21): 7-9.]
- [24] Hu J L, Zhang T L, Chen J, et al. Research progresses on source of microplastics in food and their identification technology[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2021, 40(11): 1672-1680. [胡佳玲, 张天龙, 陈杰, 等. 微塑料在食品中的来源及其检测技术研究进展[J]. 分析测试学报, 2021, 40(11): 1672-1680.]
- [25] Wang C, Jiang L J, Liu R Q, et al. Comprehensive assessment of factors influencing Nile Red staining: Eliciting solutions for efficient microplastics analysis[J]. Marine Pollution Bulletin, 2021, 171: 112698.
- [26] Giardino M, Balestra V, Janner D, et al. Automated method for routine microplastic detection and quantification[J]. Science of the Total Environment, 2023, 859(2): 160036.
- [27] Liu S D, Shang E X, Liu J N, et al. What have we known so far for fluorescence staining and quantification of microplastics: A tutorial review[J]. Frontiers of Environmental

- Science & Engineering, 2022, 16(1): article No.8.
- [28] Sturm M T, Myers E, Schober D, et al. Development of an inexpensive and comparable microplastic detection method using fluorescent staining with novel Nile Red derivatives[J]. *Analytica*, 2023, 4(1): 27-44.
- [29] Wu Y X, Liang J, Yan X W, et al. Analysis of the nutritional components of Manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2012, 34(4): 409-410, 413. [吴云霞, 梁健, 闫喜武, 等. 菲律宾蛤仔营养成分分析与评价[J]. *营养学报*, 2012, 34(4): 409-410, 413.]
- [30] Lin P. Ecological effect and mechanism of filter feeding behavior of *Ruditapes philippinarum*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022. [林朋. 菲律宾蛤仔滤食行为的生态学效应及机理研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022.]
- [31] Rani M, Ducoli S, Depero L E, et al. A complete guide to extraction methods of microplastics from complex environmental matrices[J]. *Molecules*, 2023, 28(15): 5710.
- [32] Liu J. Exploration and application of confocal micro-Raman spectroscopy in detection of marine sediment microplastics[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2020. [刘靖. 共聚焦显微拉曼光谱技术在海洋沉积物微塑料检测中的探索应用[D]. 北京: 中国科学院大学, 2020.]
- [33] Li Y, Sun Y X, Li J Z, et al. Research on the digestion efficiency of three chemical reagents to biological tissues and plastic polymers[J]. *Applied Chemical Industry*, 2021, 50(6): 1569-1571, 1581. [李游, 孙一鑫, 李瑾祯, 等. 三种化学试剂对生物组织和塑料聚合物的消解效果研究[J]. *应用化工*, 2021, 50(6): 1569-1571, 1581.]
- [34] Xiong A Q, Wu Y, Li Z Y, et al. Study on the digestion method in the detection of microplastics in food[J]. *Environmental Impact Assessment*, 2021, 43(4): 80-83. [熊安琪, 吴影, 李泽宇, 等. 食品微塑料检测中的消解方法研究[J]. *环境影响评价*, 2021, 43(4): 80-83.]
- [35] Sun H R. Study on detection method of microplastics in fish[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2018. [孙浩然. 鱼体内微塑料检测方法研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2018.]
- [36] Chen R H. The effects of enzymes and proteins surface charge properties to enzyme catalytic reaction[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2015. [陈瑞华. 酶与蛋白质表面电荷性质对酶催化反应的影响[D]. 大连: 大连工业大学, 2015.]
- [37] Thiele C J, Hudson M D, Russell A E. Evaluation of existing methods to extract microplastics from bivalve tissue: Adapted KOH digestion protocol improves filtration at single-digit pore size[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 142: 384-393.
- [38] Xiao C H, An D P, Zhang B C, et al. Review of methods of promoting protein digestion and absorption in the elderly[J]. *Food Science*, 2023, 44(9): 306-312. [肖长辉, 安东平, 张斌成, 等. 促老年人蛋白质消化吸收方法的研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(9): 306-312.]
- [39] He Y T, Yang J, Sui H X, et al. Research on detection methods for microplastics in bivalve marine organisms based on microspectroscopy[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2021, 40(7): 1055-1061. [贺雨田, 杨颀, 隋海霞, 等. 基于显微光谱法的双壳类海洋生物中微塑料的检测方法研究[J]. *分析测试学报*, 2021, 40(7): 1055-1061.]
- [40] Li J, Ji C, Zhang Q, et al. Research progress on detection methods and pollution status of microplastics in marine organisms[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2022, 39(6): 1242-1252. [李娟, 季超, 张芹, 等. 海洋生物微塑料检测方法及污染现状研究进展[J]. *农业资源与环境学报*, 2022, 39(6): 1242-1252.]
- [41] Kamble S, Agrawal S, Cherumukil S, et al. Revisiting Zeta potential, the key feature of interfacial phenomena, with applications and recent advancements[J]. *ChemistrySelect*, 2022, 7(1): e202103084.
- [42] Rusanov A I, Movchan T G, Plotnikova E V. Solubilization of Nile Red in micelles and protomicelles of sodium dodecyl sulfate[J]. *Molecules*, 2022, 27(22): 7667.
- [43] Zou Y D, Xu Q Q, Zhang G, et al. Influence of six digestion methods on the determination of polystyrene microplastics in organisms using the fluorescence intensity[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(1): 496-503. [邹亚丹, 徐擎擎, 张胥, 等. 6种消解方法对荧光测定生物体内聚苯乙烯微塑料的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 40(1): 496-503.]
- [44] Zhong Y Y, Zhao H Y, Wang T, et al. Comparison of digestion methods for the detection of microplastics in *Mytilus eduli*[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(22): 7357-7366. [钟莺莺, 赵海英, 王涛, 等. 贻贝中微塑料检测的消解方法比较[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(22): 7357-7366.]
- [45] Chen Z W, Pan Y H, Lin L M, et al. Isolation and identification of microplastics from several common seafood[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2021, 48(14): 56-57, 87. [陈誌伟, 潘永航, 林立闽, 等. 几种常见海产

- 品中微塑料的分离与鉴定[J]. 广东化工, 2021, 14(48): 56-57, 87.]
- [46] Prata J C, Sequeira I F, Monteiro S S, et al. Preparation of biological samples for microplastic identification by Nile Red[J]. Science of the Total Environment, 2021, 783: 147065.
- [47] Shim W J, Song Y K, Hong S H, et al. Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining[J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 113(1-2): 469-476.
- [48] Lv L L. Research on detection method of microplastics in the marine[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2020. [吕露露. 海洋微塑料检测方法研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020.]
- [49] Dowarah K, Patchaiyappan A, Thirunavukkarasu C, et al. Quantification of microplastics using Nile Red in two bivalve species *Perna viridis* and *Meretrix meretrix* from three estuaries in Pondicherry, India and microplastic uptake by local communities through bivalve diet[J]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 153: 110982.
- [50] Guzman M K, Andjelković M, Jovanović V, et al. Comparative profiling and exposure assessment of microplastics in differently sized Manila clams from South Korea by μ FTIR and Nile Red staining[J]. Marine Pollution Bulletin, 2022, 181: 113846.
- [51] Xuan Y, Jin Z X, Chen J. Research progress on content and detection methods of microplastics/nanoplastics in biological samples[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2023, 40(7): 839-847. [宣洋, 金子曦, 陈瑾. 典型生物样本中微/纳米塑料含量及检测方法研究进展[J]. 环境与职业医学, 2023, 40(7): 839-847.]
- [52] Tong H Y, Jiang Q Y, Zhong X C, et al. Rhodamine B dye staining for visualizing microplastics in laboratory-based studies[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(4): 4209-4215.
- [53] Tarafdar A, Choi S H, Kwon J H. Differential staining lowers the false positive detection in a novel volumetric measurement technique of microplastics[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 432: 128755.

Research on the efficient separation of microplastics in Manila clam based on fluorescent staining

YAO Mengzhu¹, LIU Jiqiang², CHEN Yi³, SHEN Hao⁴, ZHANG Yiming¹

1. College of Food and Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China;

2. Key Laboratory of Submarine Geosciences, Second Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Hangzhou 310012, China;

3. Yuhang Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 311100, China;

4. Bureau Veritas Consumer Product Shen'ou (Wenzhou) Co., Ltd, Wenzhou 325027, China

Abstract: Microplastics are widely present in the atmosphere, soil, and water and can be transferred, enriched, and bioaccumulated through the food chain. The choice of digestion solution depends on test sample characteristics and the digestion time varies from a few hours to several days, which may have detrimental effects on the original plastic by causing dissolution, fracture, and degradation, thereby potentially interfering with experimental data. Each existing detection technology has its advantages and limitations. To establish an efficient pre-separation treatment scheme for shellfish microplastics based on fluorescence staining technology, this study focused on the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) because they are one of the main indicators of microplastic pollution in shellfish in China. We investigated digestion efficiency, membrane obstruction rate, microplastic recovery rate, as well as changes in the infrared spectrum under two digestion systems: 10% potassium hydroxide (KOH) and protease K. Digestion conditions were determined and optimized accordingly. Furthermore, we combined the optimization scheme with Nile red fluorescence staining to validate the unknown fluorescent particles using a confocal micro-Raman spectrometer to confirm the applicability of the proposed scheme. The results showed that

under a 10% KOH digestion system, there was an extremely significant difference in digestion efficiency among the three groups ($P<0.01$). The highest digestion efficiency was observed in the 4-h group at $(99.46\pm0.49)\%$ with a blocking rate of $(126.17\pm53.30)\%$. For the protease K digestion system, a significant difference was observed among the three groups ($P<0.05$), with the average digestion efficiency being highest in the 16-h group at $(99.66\pm0.08)\%$. No statistically significant differences were observed in recovery rates of standard microplastic particles among the experimental groups ($P>0.05$). The major characteristic peaks observed between the experimental and quality control groups were consistent; however, differences existed in peak intensity, position, spectral quality, and other aspects. Based on the aforementioned comparative results, it is evident that under all experimental conditions, the most effective digestion occurred with 10% KOH at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 h and protease K at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 16 h. To enhance vacuum filtration time, we optimized the two digestion schemes by incorporating a pH adjustment using a 5% dilute hydrochloric acid solution after the initial treatment with 10% KOH at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 h. Additionally, sodium laurylsulfonate (SDS) was added followed by ultrasound treatment for an additional duration of 30 min after digestion with protease K for 16 h. The experimental data demonstrated that the optimized KOH digestion scheme improved digestion efficiency to $(99.80\pm0.06)\%$ while reducing the membrane blockage rate to $(95.78\pm6.51)\%$. The recovery rate of plastic standard samples with particle sizes ranging from 3 to 5 mm and 400 to 600 μm was $(97.92\pm3.61)\%$ and $(89.58\pm4.14)\%$, respectively. For the optimized protease K digestion scheme, digestion efficiency improved and was found to be $(99.97\pm0.02)\%$ while the membrane blockage rate decreased to $(94.37\pm9.85)\%$. The recovery rates for both plastic standards (PP, PS, PET and LDPE) were over 95% and 85%, respectively. The infrared spectrum changes observed in plastics following each treatment scheme were not significant. Therefore, the optimized method presented here is suitable for microplastic extraction in samples. After staining with Nile red solution, SDS ions possess adsorption activity on the surface of Nile red molecules, resulting in solubilization and formation of original micelles. This phenomenon leads to numerous false positive fluorescent bright spots within the optimized protease K group which may interfere with the micro-Raman measurement. However, the KOH optimization group did not exhibit the same occurrence, and microplastics detected in the sample were 0.99 g (wet weight). These included fibrous polyethylene terephthalate with a length of $(971.23\pm22.01)\text{ }\mu\text{m}$ and particle-like acrylonitrile butadiene styrene with a particle size of $(26.88\pm1.69)\text{ }\mu\text{m}$. In conclusion, a 10% KOH solution was utilized as the digestion agent, followed by ultrasound treatment for 10 min. Subsequently, the solution was dissolved in a water bath at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and agitated at 150 rpm for 4 h. The pH was adjusted using a 5% dilute hydrochloric acid solution to achieve an optimal pre-treatment scheme. This approach was combined with Nile red fluorescence staining observation and confocal micro-Raman characterization, providing a simple, cost-effective, and efficient method for detecting and analyzing bivalve shellfish microplastics.

Key words: microplastics; *Ruditapes philippinarum*; digestion; fluorescent staining; KOH; protease K

Corresponding author: ZHANG Yiming. E-mail: zym7307@zju.edu.cn