



**TURUN
YLIOPISTO**

Nanomuovien tunnistus merivedestä

Kemian laitos, Materiaalikemian tutkimusryhmä
Pro gradu -tutkielma

Laatija:
Joonas Huopalahti

31.5.2023
Turku

Turun yliopiston laatuvarmistuksen mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Kemia

Tekijä: Joonas Huopala

Otsikko: Nanomuovien tunnistus merivedestä

Ohjaajat: Arto Hiltunen, Pia Damlin ja Jari Hänninen

Sivumäärä: 71 sivua

Päivämäärä: 31.5.2023

Muovien kasvaneen tuotannon ja käytön seurauksena myös muovijäte on lisääntynyt ja levinnyt lähes kaikkialle. Roskaamisen ja puutteellisen jätteenkäsittelyn seurauksena muovijätettä päätyy meriimme yhä enemmän ja enemmän. Pienimmät muovirokset voidaan jakaa mikro- (1 µm – 5 mm) ja nanomuoveihin (< 1 µm). Muovi voi hajota mikro- ja nanomuoveiksi muun muassa mekaanisen hankauksen tai auringon UV-säteilyn vaikutuksesta. Toistaiseksi nanomuovien haitoista on vähäisesti tietoa, mutta niistä aiheutuvat mahdolliset ympäristö- ja terveysvaikutukset ovat herättäneet huolta.

Nanomuovien tunnistus ympäristönäytteistä on vielä hyvin haastavaa ja uusia menetelmiä tarvitaan niiden tunnistamiseksi. Nanomuoveja on aiemmin tunnistettu merivedestä massaspektrometrisillä menetelmillä. Näillä menetelmillä ei kuitenkaan saada selville nanomuovien kokojakaumaa tai muotoa. Raman- ja pyyhkäisyelektronimikroskopiaa (SEM) käyttämällä voidaan nanomuoveja tunnistaa niin, että myös niiden muoto ja kokojakauma saadaan selville. Raman-mikroskopian käyttöä rajoittaa kuitenkin pienistä partikkeleista saatava heikko Raman-signaali ja niiden haastava visuaalinen havaitseminen.

Tässä työssä ohuella kulta- tai platinakerroksella päällystettyä suodatinta käytetään tehokkaampaan nanomuovien tunnistamiseen Raman-mikroskopiolla. Ohut metallipäällystys tuottaa SERS-ilmiön (engl. *surface-enhanced Raman spectroscopy/scattering*), jonka seurauksena nanomuoveista saatavat Raman-signaalit voimistuvat. Taustana toimiva metallipäällystys auttaa myös nanomuovien havaitsemisessa suodattimelta kontrastieron ansiosta. Tässä työssä kehitettyjä metallipäällysteisiä suodattimia käytetään myös osana menetelmää, jolla voitaisiin erotella, tunnistaa ja kuvata nanomuoveja merivedestä. Käsitelty merivesi voidaan aluksi suodattaa metallipäällysteiselle suodattimelle. Raman-mikroskopiolla voidaan tunnistaa yksittäinen partikkeli suodattimelta nanomuoviksi, jonka jälkeen partikkeli voidaan kuvata SEM:llä. Työssä esitettyjen tulosten on tarkoitus auttaa ymmärtämään muovijätteen leviämistä, hajoamista sekä niistä aiheutuvia haittavaikutuksia paremmin ja täten ehkäisemään muovijätteestä aiheutuvia ongelmia.

Avainsanat: nanomuovit, tunnistus, Raman-spektroskopia, SERS, SEM, merivesi, suodatus

Kiitokset

Tämä Pro gradu -tutkielma suoritettiin Turun yliopiston kemian laitoksen, biodiversiteettiyksikön aerobiologian laboratorion sekä fysiikan ja tähtitieteen laitoksen tiloja ja laitteita käyttäen. Lisäksi näytteenoton kaukaisemmilta vesiltä mahdollisti FINMARI-konsortion (*Finnish Marine Research Infrastructure*) tutkimusinfrastruktuuri. Weisell-säätiötä kiitän suuresti tutkimukseen saadusta taloudellisesta tuesta.

Olen erittäin kiitollinen, että pääsin osaksi tutkijatohtori Arto Hiltusen ja apulaisprofessori Jari Hännisen aloittamaa nanomuoviprojektia biodiversiteettiyksikössä. Heidän tarjoama tuki ja opit ovat olleet korvaamaton apu tutkielmaa tehdessä. Erityisesti haluaisin kiittää tutkijatohtori Hiltusta hänen erinomaisesta ohjaustyöstään. Suuri kiitos kuuluu myös laboratoriopäällikkö Sirkku Häkkilälle, joka mahdollisti työskentelyn aerobiologian laboratoriossa.

Kemian laitokselta suurin kiitos kuulu dosentti Pia Damlinille. Ilman hänen loistavaa ohjaustyötään, ei tätä tutkielmaa olisi syntynyt. Lisäksi haluaisin kiittää professori Carita Kvarnströmiä ja koko materiaalikemian tutkimusryhmää tuesta sekä opeista läpi opintojeni.

Turku, 31.5.2023

Joona Huopalainen

Sisällysluettelo

Lyhenteet	5
1 Johdanto	6
2 Teoreettinen tausta	8
2.1 Muovien historiaa	8
2.2 Nanomuovien määritelmä	9
2.3 Nanomuoveiksi hajoaminen	9
2.4 Nanomuovien mahdolliset haitat	10
2.5 Nanomuovien stabiilius merivedessä	11
2.6 Nanomuovien tunnistus	13
2.6.1 Raman	14
2.7 Muovien erottelu ympäristönäytteistä	19
2.8 Mahdollisia virhelähteitä nanomuovitutkimuksessa	22
3 Materiaalit ja menetelmät	23
3.1 PS-kuulat	24
3.2 Suodattimet ja suodatus	24
3.3 Raman-mittaukset	24
3.4 SEM-kuvaukset	25
3.5 Nanomuovien tunnistamista tehostavat suodattimet	25
3.6 Merivesi ja nanomuovit	26
3.6.1 H ₂ O ₂ :n vaikutus PS-kuuliin ja meriveteen	26
3.6.2 NaOH:n ja HCl:n vaikutus PS-kuuliin	26
3.6.3 PS-kuulien pysyvyys konsentroidessa suodattamalla	27
3.6.4 Merivesi-, nolla-, ja referenssinäytteen käsittely	27
3.6.5 Raskasnestekäsittely ja sentrifugointi	28
4 Tulokset ja niiden tarkastelu	29
4.1 Nanomuovien tunnistamista tehostavat suodattimet	29
4.1.1 Raman-signaalin voimistuminen kehitetyillä suodattimilla	36
4.2 Merivesi ja nanomuovit	43
4.2.1 PS-kuulien yhteensopivuus käytettyjen erottelumenetelmien kanssa	44
4.2.2 Käsittelystä merivesinäytteestä löytyneitä muoveja	48
5 Johtopäätökset ja yhteenveto	52
Lähteet	54

Lyhenteet

AEF	<i>analytical enhancement factor</i>
AgNW	<i>silver nanowire</i> , hopea nanolanka
BBB	<i>blood-brain barrier</i> , veri-aivoeste
CCC	<i>critical coagulation concentration</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i> , varauskytketty laite
CEAP	<i>circular economy action plan</i>
CM	<i>chemical mechanism</i> , kemiallinen mekanismi
CT	<i>charge-transfer</i> , varauksensiirto
DOM	<i>dissolved organic matter</i> , liuennut orgaaninen aines
EF	<i>enhancement factor</i>
EM	<i>electromagnetic mechanism</i> , sähkömagneettinen mekanismi
EPS	<i>extracellular polymeric substance</i> , solunulkoisen polymeerinen aine
FTIR	Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
LSP	<i>localized surface plasmon</i> , lokalisoitunut pintaplasmoni
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
MS	massaspektrometria
PA	polyamidi
PC	polykarbonaatti
PE	polyeteeni
PES	polyeetterisulfonyli
PET	polyeteenitereftalaatti
PM	<i>particulate matter</i> , pienhiukkanen
PP	polypropeeni
PS	polystyreeni
PVC	polyvinyylidikloridi
PTFE	teflon
Py-GC-MS	pyrolyysi-kaasukromatografia-massaspektrometria
SEM	<i>scanning electron microscope</i> , pyyhkäisyelektronimikroskooppi
SERS	<i>surface-enhanced Raman spectroscopy/scattering</i>
SMEF	<i>single molecular enhancement factor</i>
TD-PTR-MS	lämpödesorptio-protoninsiirtoreaktio-massaspektrometria

1 Johdanto

Muovit ovat yksiä valmistetuimmista materiaaleista maailmassa ja on arvioitu, että vain vajaa kymmenys kaikista valmistetuista muoveista on kierrätetty.¹ Vuonna 2010 vuosittaisen mereen päätyvän muovijätteen määrän arvioitiin olevan peräti 12,7 miljoonaa tonnia (Mt).² Meret kattavat maapallon pinnasta noin 70 %, joissa myös suurimman osan maapallon biodiversiteetistä arvioidaan olevan.³ Merien hyvinvoinnin on osoitettu olevan vahvasti yhteydessä ihmisten terveyteen.^{4,5} Tästä yksinkertaisena esimerkkinä on ravinnoksi päätyvät merenelävät.^{4,5}

Pienimpien muoviroskien, jotka voidaan jakaa mikro- (1 µm – 5 mm) ja nanomuoveiksi (< 1 µm), aiheuttamat ihmisiin kohdistuvat mahdolliset terveyshaitat ovat alkaneet herättää huolta. Pienhiukkasten (engl. *particulate matter*, PM) tapauksessa on aiemmin todettu, että mitä pienemmille partikkeleille altistutaan, sitä haitallisempaa se on terveydelle.⁶ Myös nanomuovien on arvioitu olevan mikromuoveja vaarallisempia.⁷ Nanomuovien terveysvaikutukset ovat kuitenkin toistaiseksi vielä hyvin vähän tunnettuja johtuen muun muassa niiden haastavasta tunnistuksesta. Nano- ja mikromuovisaasteen seuraamiseksi tarvitaan uusia standardoituja menetelmiä, joilla näytteet voidaan kerätä, käsitellä ja analysoida. Menetelmien tarve on nostettu esiin muun muassa EU:n CEAP (engl. *circular economy action plan*) -projektiin liittyvässä *PlasticTrace* -hankkeessa.^{8,9}

Mikro- ja nanomuovia voi syntyä muun muassa jo muovituotteiden käytössä tai kun muoviroskat hajoavat ympäristössä pienemmäksi esimerkiksi mekaanisen hankauksen tai auringon UV-säteilyn seurauksena. Mikro- ja nanomuovit päätyvät ympäristöihin, joista niitä on vaikea tunnistaa niiden pienen koon takia. Merivedestä on aikaisemmin tunnistettu nanomuoveja massaspektrometrisia (MS) menetelmiä käyttäen.^{10,11} Käytetyillä menetelmillä ei kuitenkaan voida nähdä nanomuovien muotoa tai kokojakaumaa. Fourier-muunnos infrapuna- (FTIR) ja Raman-spektroskopiaa käyttämällä mikroskopian kanssa puolestaan voidaan tunnistaa muoveja niin, että myös muoto ja kokojakauma saadaan selville. FTIR-mikroskopian spatiaalinen resoluutio on kuitenkin vain 10 µm, eikä näin sovellu nanomuovien tunnistamiseen.¹² Perinteisen Raman-mikroskopian spatiaalinen resoluutio on puolestaan ~300 nm ja näin ollen riittävä.¹²

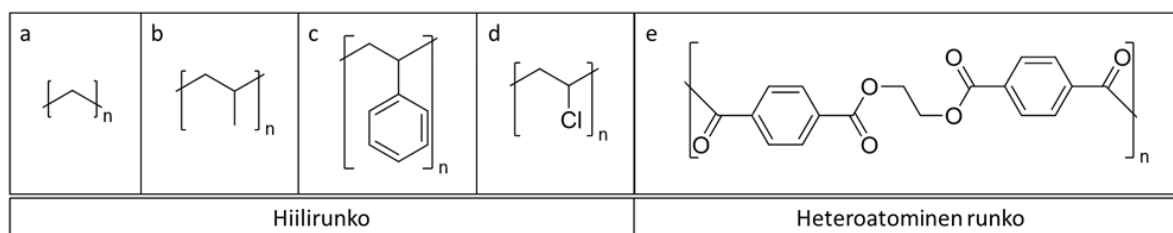
Tässä työssä esittelemme, kuinka Raman-mikroskopiaa ja pyyhkäisyelektronimikroskooppia (engl. *scanning electron microscope*, SEM) voidaan käyttää yksittäisten merivesinäytteestä

löytyvien nanomuovien tunnistamiseen ja kuvantamiseen Raman-signaalia parantavien kulta- ja platinapäälysteisten suodattimien päältä. Suodattimien kyky parantaa Raman-signaalia, perustuu SERS-ilmiöön (engl. *surface-enhanced Raman spectroscopy/scattering*), joka saadaan aikaiseksi suodattimen pintaan muodostuvalla metallinanorakenteella. Työssä esitellään myös mahdollisia tapoja erotella nanomuovit merivedestä ennen niiden tunnistamista kehittämiltämme metallipäälysteisiltä suodattimilta.

2 Teorettinen tausta

2.1 Muovien historiaa

Muovi on synteettisesti tai osittain synteettisesti valmistettu polymeereistä koostuva materiaali.¹³ Polymeerit ovat puolestaan pitkiä molekyyliketjuja, jotka koostuvat pienemmistä molekyyleistä, monomeereistä. Ensimmäinen täysin synteettisesti valmistettu polymeeri juontaa juurensa vuoteen 1907, jolloin belgialainen kemisti Leo Baekeland onnistui valmistamaan fenolin ja formaldehydin kondensaatioreaktiolla muovia, jonka hän nimesi bakeliitiksi.¹⁴ Termi ”muovi” (engl. *plastic*) on peräisin kreikan kielen sanasta ”*plastikos*”, joka tarkoittaa muovattavaa.¹⁵ Baekelandin julkaisun myötä 1909 termi ”muovi” alkoi kuitenkin vakiintua nykyisessä merkityksessään.¹⁶ Myöhemmin 1930–1950-luvuilla saivat alkunsa muovit, kuten polyvinyylidikloridi (PVC), polystyreeni (PS), polyeteeni (PE), polyeteenitereftalaatti (PET) ja polypropeeni (PP), jotka kuuluvat nykyäänkin käytetyimpien muovien joukkoon.¹⁷ Nämä muovit voidaan jakaa runkorakenteidensa perusteella niihin, joiden runkorakenteessa on vain hiiltä (hiilirunko) ja niihin, joissa hiilen lisäksi rungossa voi olla muita atomeita, kuten happea (heteroatominen runko) (kuva 1).



Kuva 1. Muovien rakenteet: a) PE, b) PP, c) PS, d) PVC, e) PET

Toisen maailmansodan (1939–1945) aiheuttaman materiaalipulan seurauksena muovien tuotanto lisääntyi suuresti, kun tarvittiin paljon kestäviä ja kevyitä materiaaleja, joita voitiin valmistaa nopeasti ja edullisesti.¹⁸ Pian muovit alkoivat korvata myös arkielämässä tarvittuja materiaaleja.¹⁸ Painavat materiaalit, kuten keramiikka, lasi ja metallit voitiin korvata monessa sovelluksessa kevyellä muovilla, joka oli helposti muokattavissa. Muovien massatuotanto alkoikin 1940 ja 1950-luvuilla, kun muovien lukemattomat käyttömahdollisuudet oli tiedostettu.¹⁹ Vuonna 1950 muovia tuotettiin maailmassa noin 2 Mt²⁰ ja vuonna 2021 vuosittaisen muovin tuotannon arvioitiin olevan jo yli 390 Mt.²¹ Nykyään muovia löytyykin lähes kaikkialta ja elämää ilman muovia voi olla vaikea kuvitella. Muovien tuotannon ja käytön

kasvua on edistänyt niiden erinomaiset ominaisuudet. Ne ovat kestäviä, kevyitä, halpoja, helposti muokattavia, ne eivät ruostu ja niillä on erinomainen kyky eristää sähköä ja lämpöä.

Puutteellisen kierrätyksen ja jätteenkäsittelyn seurauksena, sekä muovituotteiden esituotannossa käytettyjen muovipellettien päätyessä ympäristöön, myös muovijäte on levinnyt kaikkialle. Muovijätteen leviämiseen meriympäristössä havahduttiin 1970-luvun alussa, kun muoviroskaa alettiin havainnoida suuria määriä Atlantin valtamerellä^{22,23} ja keskellä Tyntämerta.²⁴ Aikaisemmin muoviroskaa oli havaittu merilintujen suolistoista 1960-luvulla.¹⁹

2.2 Nanomuovien määritelmä

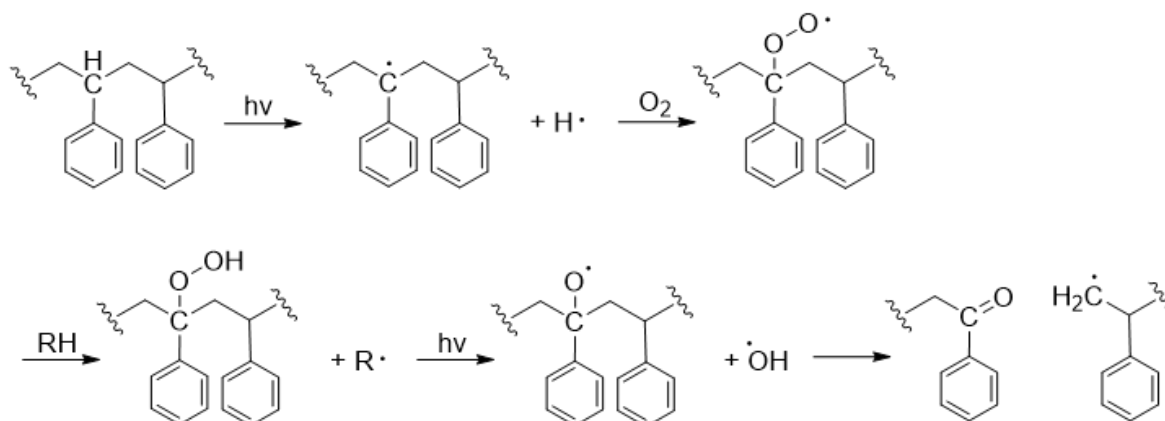
Pienet muoviroskat (< 5 mm) voidaan jakaa niiden koon perusteella mikro- ja nanomuoveiksi. Vielä ei ole täyttä yhteisymmärrystä siitä, mitkä ovat tarkat kokorajat mikro- ja nanomuoveille. Usein mikromuovien kooksi on kuitenkin määritelty 1 µm – 5 mm²⁵ ja nanomuoveille puolestaan 1 nm – 1 µm.²⁶ Nanomateriaalit ovat puolestaan usein määritelty 1–100 nm kokoisiksi vähintään yhdessä ulottuvuudessa. Gigault et al. kuitenkin ehdottivat vuonna 2018 nanomuoveille kokorajaa 1 nm – 1 µm niillä perustein, että toisin kuin nanomateriaalit, nanomuovit eivät ole tarkoituksenmukaisesti valmistettuja.²⁶ Lisäksi kaikki partikkelit, jotka ovat vähintään yhdessä ulottuvuudessa 1 nm – 1 µm, on luokiteltu kolloidisiksi.^{26,27}

Vaikka Gigault et al. ehdottivat määritelmässään, etteivät nanomuovit ole tarkoituksenmukaisesti valmistettuja, voi ympäristöstä löydetyn nanomuovin todistaminen tarkoituksesta valmistetuksi olla hyvin vaikeaa. Tästä syystä tässä työssä nanomuoveiksi luokitellaan kaikki muovipartikkelit, jotka ovat halkaisijaltaan alle 1 µm kokoisia. Nanomuovit voidaan täten luokitella niiden alkuperän mukaan, joko sekundäärisiksi tai primäärisiksi.²⁸ Sekundäärisillä nanomuoveilla tarkoitetaan niitä nanomuoveja, jotka hajoavat ympäristötekijöiden seurauksena isommista muovituotteista pienemmiksi partikkeleiksi.²⁸ Primäärisillä nanomuoveilla viitataan puolestaan alle 1 µm kokosiin muovipartikkeleihin, joita laitetaan jo valmistusvaiheessa tuotteeseen.²⁸ Primäärisiä nanomuoveja voi olla muun muassa osana maaleja²⁹ ja kasvojen kuorinta-aineita.³⁰

2.3 Nanomuoveiksi hajoaminen

Muovin hajoamiseen ympäristössä vaikuttavat abioottiset ja bioottiset tekijät.³¹ Abioottisilla tekijöillä tarkoitetaan elottomia kemiallisia ja fysikaalisia ympäristön tekijöitä, kuten vettä, lämpöä ja säteilyä.³¹ Bioottisilla tekijöillä tarkoitetaan puolestaan eläviä organismeja, kuten

tässä tapauksessa pääasiassa sieniä ja bakteereita.³¹ Usein abiottiset tekijät hajottavat aluksi muovia pienemmiksi.^{32,33} Tämä voi käytännössä tapahtua, kun muovi altistuu UV-säteilylle ja hapelle, jolloin muovi hajoaa valohapetuksen myötä.^{28,32,33} Kaaviossa 1 on esitetty PS:n hajoamismekanismi, kun siihen kohdistuu UV-säteilyä hapen läsnä ollessa. Aluksi UV-säteily (hv) irrottaa PS:n hiilirungosta vedyn, jonka tilalle liittyy happea esimerkiksi ilmasta muodostaen peroksidiradikaalin. Radikaaliin voi tämän jälkeen liittyä vety esimerkiksi lähellä olevasta PS:n hiilirungosta (RH), jolloin peroksidiradikaalista muodostuu hydroperoksidi. Altistuessaan UV-säteilylle hydroperoksidista irtoaa hydroksyyli-ryhmä ja PS:n runkoon jää jäljelle alkoksiradikaali, jonka seurauksena PS-ketju katkeaa. Meriympäristössä muovit altistuvat myös mekaaniselle rasitukselle, jonka virtaukset ja vuorovaikutukset esimerkiksi hiekan kanssa voivat aiheuttaa.^{34,35} Muovit voivat hajota lisäksi bioottisten mikrobien erittämien entsyymien vaikutuksesta.³⁶



Kaavio 1. PS:n hajoamismekanismi (mukailtu Yousif et al.:n julkaisusta ³⁷)

Sekundäärisiä mikro- ja nanomuoveja voi syntyä lisäksi jo muovituotteita käyttäessä. Esimerkiksi muovipulloja käyttämällä on todettu syntyvän mikromuovia.^{38,39} Nanomuovia on osoitettu niin ikään syntyvän muovipulloista ^{40,41} ja lisäksi muun muassa kertakäyttökupeista,⁴² teepusseista ⁴²⁻⁴⁴ sekä kypsennys- ja jääpalapusseista.⁴³ Lukuisista keittiövälineistä, kuten paistinpannuista,⁴⁵ leikkuulaudoista ⁴⁶ ja astianpesuun tarkoitetuista vaahtomuovisista ”pesusienistä”,⁴⁷ on arvioitu irtoavan käytössä mikro- ja nanomuoveja. Myös vaatteista on osoitettu irtoavan nanomuoveja niitä pestäessä, tai kun niihin kohdistuu hankausta.⁴⁸

2.4 Nanomuovien mahdolliset haitat

Nanomuoveja on vaikea tunnistaa, minkä takia myös niiden terveyshaitoista on vielä toistaiseksi vähän tietoa.⁴⁹ Niistä heränneet terveyshuolet perustuvat niiden pieneen kokoon.

Nanomuovit voivat päätyä ihmiskehoon pääasiassa syömisen, juomisen tai hengittämisen kautta.^{50,51} Pienen kokonsa vuoksi nanomuovien oletetaan pystyvän tunkeutumaan soluihin ja alle 200 nm kokoiset nanomuovien voivan läpäistä veri-aivoesteen (engl. *blood-brain barrier*, BBB).⁵² Näin ne voivat edetä keuhkoista tai suolistosta verenkiertoon, soluihin ja lopulta päätyä jopa aivoihin.^{50,51}

Nanomuovien on raportoitu eläinkokeiden perusteella aiheuttavan mahdollisesti muun muassa sisäelinten tulehduksia⁵³ ja aineenvaihduntahäiriöitä.⁵⁴ Myös solujen kuolevuuden on raportoitu lisääntyvän niiden altistuessa nanomuoveille.⁵⁵ Tutkimuksissa käytettyjä konsentraatioita on kuitenkin vaikea asettaa vastaamaan todellisia altistumiskonsentraatioita nanomuovien haastavan tunnistamisen takia.^{49–52} Mahdollisiin terveyshaittoihin vaikuttavat koon lisäksi partikkelin muoto ja muovilaatu.⁵⁶ Tähän mennessä nanomuovien haittavaikutuksia on pääasiassa tutkittu pallon muotoisilla PS-partikkeleilla.^{50,52} Nanomuoveja esiintyy kuitenkin lukuisissa eri muodoissa sekä laaduissa ja niissä voi olla lisäaineita.⁵⁰ Näin ollen haittavaikutusten testaaminen pelkillä kaupallisilla PS-kuulilla antaa suppean käsityksen todellisista terveysriskeistä.

2.5 Nanomuovien stabiilius merivedessä

Kuten edellä mainittiin, nanomuovit ovat kolloidisia partikkeleita. Kolloidisen liuoksen stabiiliudella tarkoitetaan sitä, että kolloidiset partikkelit pysyvät erillään toisistaan ja muista liuoksen partikkeleista. Kun partikkelit pysyvät kolloidisina, ovat ne Brownin liikkeessä eli jatkuvassa satunnaisessa liikkeessä.^{57,58} Tällöin partikkelit eivät sedimentoidu liuoksen pohjalle tai nouse pintaan, vaan ne jakautuvat tasaisesti liuosfaasiin. Kun kolloidiset partikkelit yhdistyvät toisiinsa puhutaan aggregoitumisesta, agglomeroitumisesta, koaguloitumisesta tai flokkuloitumisesta. Tässä tutkielmassa aggregoitumista käytetään pääasiassa kuvaamaan kolloidisten partikkelien toisiinsa kiinnittymistä. Kolloidisten partikkelien stabiilius voi heikentyä joko homo- tai heteroaggregoitumisen seurauksena.⁵⁹ Homoaggregoitumisessa samanlaiset partikkelit yhdistyvät toisiinsa, kun taas heteroaggregoitumisessa yhdistyneillä partikkeleilla on erilaisia fysikaalisia tai kemiallisia ominaisuuksia.⁵⁹

Kolloidisen liuoksen stabiiliutta voidaan kuvata DLVO-teorialla, joka on saanut nimensä Derjaguinin, Landaun, Verweyn ja Overbeekin mukaan, jotka olivat merkittävimpiä fyysikoita ja kemistejä kyseisen teorian synnyssä. Kolloidisiin partikkeleihin vaikuttavat DLVO-teorian mukaan Van der Waalsin voimat, jotka vetävät partikkeleita lähemmäs toisiaan, ja vastavoimana puolestaan sähköstaattiset hylkimisvoimat, jotka johtuvat partikkelien pinnassa

olevista sähköisistä kaksoiskerroksista. Sähköisellä kaksoiskerroksella tarkoitetaan yhteenlaskettua varausta, joka syntyy, kun partikkeli on nesteessä ja sen pintavaraus on vetänyt puoleensa vastakkaisesti varautuneita ioneita Coloumbin lain mukaisesti. Partikkelien kokonaisvaraukseen ja samalla kolloidisen liuoksen stabiiliuteen vaikuttavat muun muassa partikkelin koko, tiheys, konsentraatio, liuoksen ionivahvuus, lämpötila ja liuoksen pH.^{59,60}

Liuoksen ionivahvuuden tärkeimpänä mittarina kolloidisten partikkelien stabiiliuden kannalta voidaan pitää CCC (engl. *critical coagulation concentration*) -arvoa, joka ilmaisee vastakkaisesti varautuneiden ioneiden vähimmäiskonsentraatiota, jossa kolloidisten partikkelien aggregoituminen alkaa olla diffuusiorajoitettua.⁶¹ Mitä suurempi CCC kolloidisella liuoksella on, sitä stabiilimpi se on. Vaikka meriveden suolapitoisuus ei ole vakio, on meriveden tyypillisen suolapitoisuuden arvioitu olevan 35 g/kg.^{62,63} Itämeren suolapitoisuuden on raportoitu olevan keskiarvoltaan vain 7 g/kg.^{63,64} Tyypillistä meriveden koostumusta vastaamaan on valmistettu ”synteettistä merivettä”, jossa suolapitoisuus koostuu pääasiassa liuenneista Cl⁻ ja Na⁺ ioneista.⁶⁵ Muita tyypillisiä metallikationeita, joita meriveteen on liennut, ovat Mg²⁺, Ca²⁺ ja K⁺.⁶⁵ Metallikationeista Na⁺ -ioneita on merivedessä eniten (~10,78 g/kg) ja seuraavaksi eniten Mg²⁺-ioneita (~1,28 g/kg).⁶⁵ Nämä arvot tarkoittavat, että veden tiheyden ollessa 1 kg/dm³, Na⁺ -ionikonsentraatio on karkeasti 469 mM ja Mg²⁺-ionikonsentraatio puolestaan ~53 mM. Mitä suurempi hapetusluku metallikationilla on, sitä pienempi CCC on (Schulze-Hardy sääntö).⁶⁶

Nanomuovien stabiiliudesta merivedessä on raportoitu vaihtelevia arvioita pääasiassa CCC:n perusteella. Singh et al. arvioivat 240 nm halkaisijaltaan olevien PS-kuulien CCC:n olevan 140 mM NaCl:lle. Tämä viittaisi siihen, että nanomuovit olisivat epästabiileja merivedessä ja sedimentoituisivat ajan myötä meren pohjaan. Singh et al. testasivat myös liunneen orgaanisen aineen (engl. *dissolved organic matter*, DOM) vaikutusta nanomuovien stabiiliuteen lisäämällä humushappoa NaCl-liuokseen. Tällöin PS-nanokuulien CCC arvioitiin nousevan 545 mM NaCl:lle, joka puolestaan viittaa siihen, että jotkut aineet merivedessä voivat lisätä nanomuovien stabiiliutta. Tutkimuksen mukaan NaCl-liuokseen lisättäessä savikolloideja PS-nanokuulien stabiilius puolestaan laski. PS-nanokuulia laitettiin myös suoraan meriveteen, jossa ne alkoivat aggregoitumaan.⁶⁷

Mao et al. puolestaan mittasivat 100 nm halkaisijaltaan olevien PS-kuulien CCC:n olevan 590,96 mM NaCl:lle ja 74,10 mM MgCl₂:lle.⁶⁸ Tämä puolestaan viittaa kyseisten nanomuovien olevan stabiileja meriveden suolapitoisuuksissa. Tutkimuksessa myös todettiin nanomuovien

muuttuvan stabiilimmiksi ikäännyttyään ja kun joukkoon lisättiin solunulkoisia polymeerisiä aineita (engl. *extracellular polymeric substance*, EPS).⁶⁸ Shams et al. tutkivat niin ikään nanomuovien stabiiliutta vesiympäristöissä.⁶⁹ Tutkimuksessa todistettiin PS-nanomuovien (CCC NaCl:lle 800 mM) olevan stabiilimpia verrattuna PE-nanomuoveihin (CCC NaCl:lle 80 mM).⁶⁹ Myös tässäkin tapauksessa humushapon lisääminen kasvatti nanomuovien stabiiliutta.⁶⁹ Nämä tulokset viittaavat siihen, että ainakin PS-nanomuovit voivat olla stabiileja merivedessä.

Li et al. puolestaan huomasivat 100 nm halkaisijaltaan olevien PS-kuulien sedimentoituvan 200 mM NaCl-liuoksessa pohjalle jo 100 h jälkeen todeten, että meren pinnassa PS-nanomuoveja on todennäköisesti suhteellisen vähän.⁷⁰ Vastaavanlaisesti Kim et al. määrittelivät 50 nm halkaisijaltaan olevien PS-kuulien CCC:n olevan 220 mM NaCl:lle.⁷¹ Lisäksi vastakkaisesti varautuneiden hematiittipartikkelien lisääminen merivedessä olevien PS-nanokuulien sekaan kasvatti heteroaggregaatiota. Näiden tuloksien perusteella nanomuovien arveltiin sedimentoituvan meren pohjaan pian niiden päädyttyä mereen.⁷¹

Aikaisemmin raportoidut arviot nanomuovien stabiiliudesta ovat hyvin vaihtelevia ja niistä voidaan huomata, kuinka monesta asiasta stabiilius on riippuvainen. Lisäksi muovien lisäaineet ja pintakäsittely voivat vaikuttaa niiden stabiiliuuteen muovien ollessa nanomittakaavassa.⁷² Kuten edellä mainittiin, meriveden suolapitoisuus voi vaihdella hyvin paljon alueellisesti. Lisäksi meriveden suolapitoisuus riippuu ajankohdasta ja sen syvyydestä.^{73,74}

Aikaisemmissa tutkimuksissa, joissa nanomuoveja on tunnistettu merivedestä, merivesi on kerätty pinnasta. Lisäksi mikromuoveja on osoitettu löytyvän pintavedestä, vaikka niiden on arvioitu pääasiassa sedimentoituvan meren pohjaan.⁷⁵ Vaihtelevat arviot nanomuovien stabiiliudesta ja tutkimukset, joissa nanomuoveja on tunnistettu pintavedestä, viittaavat vahvasti siihen, että ainakin osa nanomuoveista esiintyy pintavedessä. Tämän takia tässäkin työssä merivesinäytteet kerättiin suoraan pinnasta.

2.6 Nanomuovien tunnistus

Toistaiseksi nanomuoveja on osoitettu löytyvän merivedestä käyttäen pyrolyysi-kaasukromatografia-massaspektrometriaa (Py-GC-MS)¹¹ ja lämpödeserptio-protoninsiirto-reaktio-massaspektrometriaa (TD-PTR-MS).¹⁰ Materic et al. arvioivat alle 200 nm kooltaan olevien PS-nanomuovien pitoisuuden olevan Vattimeren pintavedessä keskimäärin 4,2 µg/l.¹⁰ Ter Halle et al. eivät puolestaan kyenneet antamaan arviota nanomuovikonsentraatiosta Atlantilta kerätystä näytteestä.¹¹ Py-GC-MS:lla on myös osoitettu, että nanomuoveja löytyy

muun muassa rantahiekasta,⁷⁶ maaperästä,⁷⁷ vesijohtovedestä⁷⁸ ja verestä.⁷⁹ TD-PTR-MS:lla on lisäksi osoitettu, että nanomuoveja löytyy esimerkiksi ilmasta,⁸⁰ makeista vesistä,⁸¹ lumesta^{82,83} ja jäästä.⁸⁴ Näillä tunnistusmenetelmillä ei voida kuitenkaan määrittää nanomuovien muotoa tai kokojakaamaa. SEM:lla voidaan puolestaan ottaa korkean resoluution kuvia nanomuoveista, jolloin saadaan hyvin tarkka käsitys nanomuovin morfologiasta.¹² SEM:lla ei kuitenkaan voida itsessään tunnistaa ympäristöstä löytyviä pieniä partikkeleita nanomuoveiksi.¹²

Jotta ympäristönäytteistä voitaisiin tunnistaa nanomuoveja ja kuvata tunnistetut nanomuovit tarkemmin, voidaan SEM:a käyttää yhdessä esimerkiksi Raman-spektroskopian kanssa. Raman-spektroskopiaa on toistaiseksi sovellettu hyvin vähän ympäristöstä löytyvien nanomuovien tunnistamiseen. Sillä on tähän mennessä tunnistettu yksittäisiä nanomuoveja muun muassa ilmanäytteistä.⁸⁵ Schmidt et al. tunnistivat lisäksi lapsivesinäytteestä yksittäisen nanomuovin Raman-spektroskopiaa käyttäen, mutta eivät olleet varmoja muovipartikkelin alkuperästä.⁸⁶

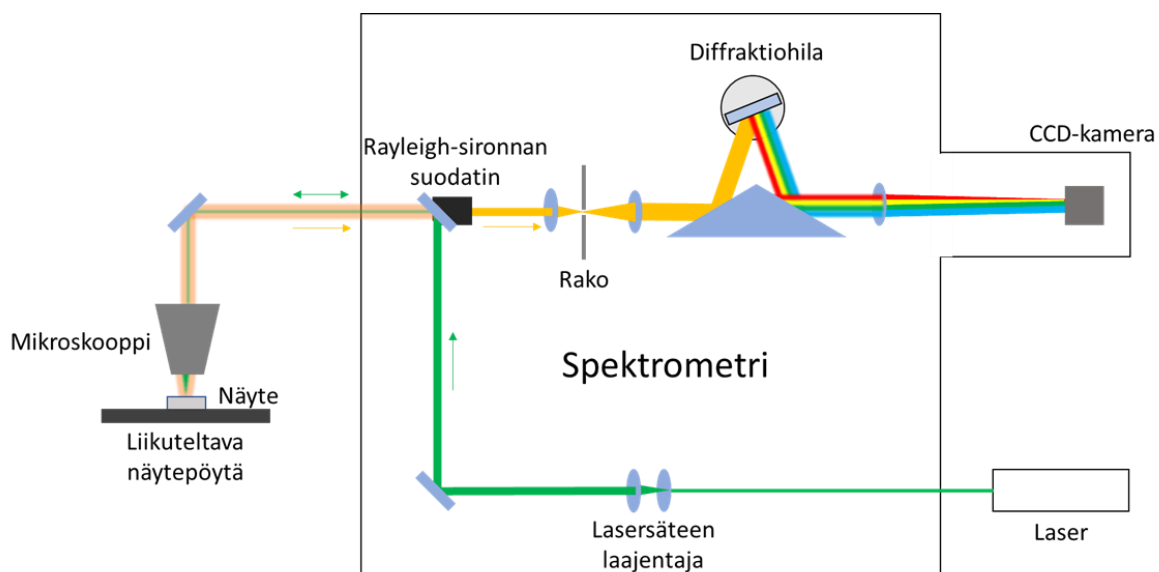
2.6.1 Raman

Raman-spektroskopia on molekyylien värähtelyyn perustuva tunnistusmenetelmä IR-spektroskopian ohella. Toisin kuin IR-spektroskopiassa, jossa pooliset ryhmät absorboivat voimakkaasti IR-säteilyä, Raman-spektroskopiassa poolittomat ryhmät tuottavat voimakkaamman Raman-spektrin.⁸⁷ Siinä näytteeseen kohdistetaan valoa ja valon sironnasta voidaan saada tietoa yhdisteen rakenteesta. Raman-spektrometristä saadaan sironnan perusteella Raman-spektri, joka toimii yhdisteen ”sormenjälkenä”. Raman-spektroskopiaa käytetäänkin laajasti tuntemattomien yhdisteiden kvalitatiiviseen analysointiin. Raman-spektrometri voidaan yhdistää myös optisen mikroskoopin kanssa (Raman-mikroskooppi), mikä tekee siitä entistä monipuolisemman välineen näytteiden tunnistamisessa. Raman-mikroskoopilla voidaan nanomuovitutkimuksessa havaita alle 1 µm partikkelit aluksi optisesti (optisen mikroskoopin resoluutio: ~300 nm)⁸⁸ ja tämän jälkeen tunnistaa, mistä muovilaadusta ne koostuvat, jos kyseessä on nanomuovi.⁸⁹

Kun näytteeseen kohdistetaan lasersäteilyä, näytteen molekyylit värähtelevät ja osa säteilystä siroaa. Jos säteily siroaa niin, ettei fotonin energia muutu, puhutaan elastisesta sironnasta (Rayleigh-sironta). Jos puolestaan fotonin energia pienenee (Stokes-sironta) tai kasvaa (anti-Stokes-sironta), puhutaan epäelastisesta sironnasta eli Raman-sironnasta. Suurin osa sironnasta on Rayleigh-sirontaa. Seuraavaksi eniten sironnasta on Stokes-sirontaa, jota yleensä Raman-

spektroskopiolla tutkitaan. Kun fotonin energia pienenee, myös säteilyn taajuus pienenee eli sen aallonpituus kasvaa. Tämä ilmaistaan Raman-spektrissä Raman-siirtymänä, joka tarkoittaa siis sitä, kuinka paljon aallonpituus on kasvanut laserin aallonpituudesta. Raman-siirtymää kuvataan yleensä aallonumerona ja sen yksikkö on usein cm^{-1} . Intensiteetti kuvaa puolestaan Raman-sironnan suuruutta ja se esitetään siirtymän funktiona.^{89,90}

Kuvassa 2 on esitetty hahmotelma työssä käytetystä Raman-mikroskoopista ja sen toimintaperiaatteesta. Lasersäde ohjataan aluksi spektrometrin kautta mikroskoopin läpi näytteen pintaan, jossa monokromaattinen säteily siroaa. Yleisesti mitä pienemmän aallonpituuden laseria käytetään, sitä voimakkaampaa Raman-sironta on.⁹¹ Kolmessa ulottuvuudessa liikuteltava näytepöytä mahdollistaa tarkan partikkelianalyysin. Näytteestä sironnut säteily ohjataan takaisin spektrometriin, jossa aluksi Rayleigh-sironta suodatetaan pois. Jäljelle jäänyt Raman-sironta ohjataan tämän jälkeen raon läpi diffraktiohilaan. Mitä suurempi rako on, sitä suurempi Raman-sironnan intensiteetti voidaan havaita.⁹² Pientäessä rakoa Raman-spektrin resoluutio kuitenkin paranee.⁹² Diffraktiohilan pinta koostuu tasavälein sijoitetuista uurteista (engl. *lines*, l), jotka jakavat heijastuvan säteilyn eri aallonpituuksiin. Mitä suurempi urien tiheys (l/mm) on, sitä suurempi spektrin resoluutio on.⁹² Tiheyden kasvaessa kuitenkin spektrialue ja intensiteetti pienenevät.⁹² Eri aallonpituuksille jakautunut säteily ohjataan lopulta detektorille, joka tässä tapauksessa on Raman-mikroskoopeissa yleisesti käytetty CCD-kamera (engl. *charge-coupled device*). Kyseinen detektorin koostuu ristikosta pikseleitä, jotka muuttavat säteilyn sähköisiksi signaaleiksi.



Kuva 2. Hahmotelma tutkielmassa käytetystä Raman-mikroskoopista

Parametrejä, jotka vaikuttavat saadun Raman-spektrin laatuun raon ja diffraktiohilan lisäksi, ovat muun muassa laserin aallonpituus ja voimakkuus; objektiivilinssi; aika, joka spektrin keräämiseen käytetään (engl. *acquisition time*) ja toistojen määrä eli se, kuinka monta spektriä otetaan ja yhdistetään yhdestä kohdasta (engl. *number of accumulations*). Resoluutio puolestaan määräytyy valitun objektiivin ja laserin perusteella.

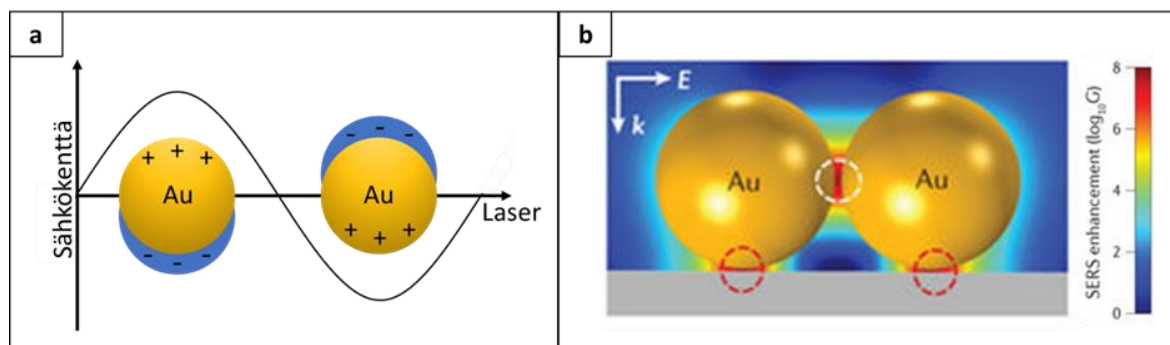
Raman-mikroskoopin käyttöä rajoittavat pääasiassa fluoresenssi ja tutkittavan partikkelin koko. Fluoresenssia ilmenee, jos näytteen molekyylit virittyvät laserin fotonien vaikutuksesta. Molekyylien virittyessä niiden elektronit siirtyvät korkeammalle energiatasolle. Purkautuessaan viritystilalta molekyylit emittoivat fluoresenssisäteilyä. Fluoresenssin ollessa voimakasta heikot Raman-signaalit peittyvät fluoresenssisignaalien varjoon. Mitattaessa Raman-spektrejä pienistä partikkeleista spektrin tulkintaa estävä fluoresenssi voi aiheutua, jos partikkeli on fluoresoivaa taustaa vasten tai, jos siihen on aggregoitunut fluoresoivia partikkeleita.⁹¹ Merivedessä useat biologiset hiukkaset ja muu orgaaninen aines voivat fluoresoida.⁹³ Lisäksi muoveissa voi olla usein fluoresoivia lisä- ja väriaineita.⁹⁴

Vaikka perinteisellä Raman-spektroskopiolla voidaan saavuttaa teoreettisesti ~300 nm spatiaalinen resoluutio, on alle 1 µm kokoisten nanomuovien tunnistamisen raportoitu olevan haastavaa heikon Raman-signaalin takia.^{12,88} Tätä varten voidaan hyödyntää SERS-ilmiötä, joka lisää yhdisteestä tai pienestä partikkelista saatavaa Raman-sirontaa. Yleisesti SERS-ilmiö saadaan aikaiseksi, kun yhdiste tai partikkeli on karkeaa metallipintaa tai metallista nanorakennetta vasten. Myös erimuotoisia metallisia nanopartikkeleita lisäämällä substraatille, jossa näyte on, voidaan saada aikaiseksi SERS-ilmiö.⁹¹

SERS-ilmiö aiheutuu nykykäsityksen mukaan metallinanorakenteiden pintaplasmonien aiheuttaman sähkömagneettisen mekanismin (engl. *electromagnetic mechanism*, EM) sekä kemiallisen mekanismin (engl. *chemical mechanism*, CM) seurauksena. EM:n vaikutusta pidetään pääasiallisena SERS-ilmiön aiheuttajana. CM:n vaikutus puolestaan on usein huomattavasti pienempi ja ajoittain vaikea erottaa EM:n vaikutuksesta. CM voidaan kuitenkin jakaa kolmeen erilaiseen mekanismiin, joita on vielä vaikeampi erottaa toisistaan ja näin ollen niitä käsitellään usein yhtenä mekanismina (CM).⁹⁵⁻⁹⁷

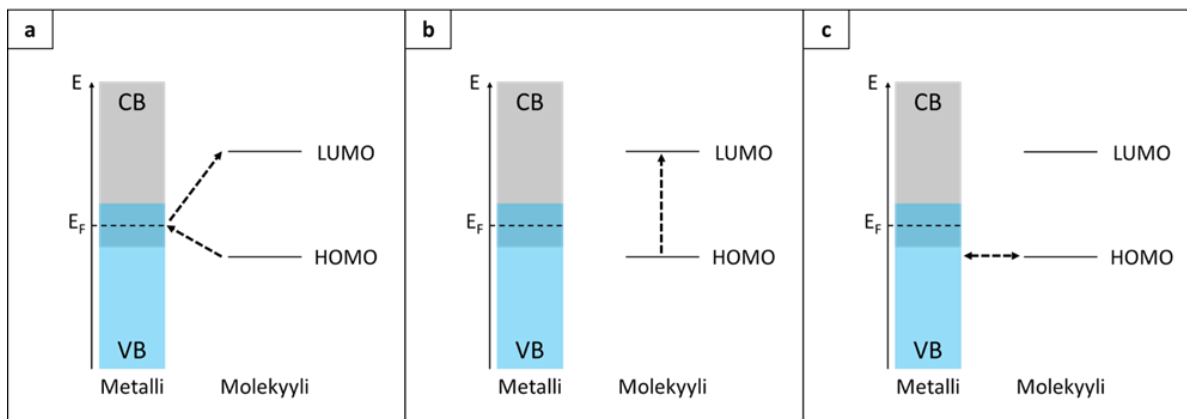
Kun valo osuu karkeaan metallipintaan (nanorakenteisiin), se aiheuttaa metallien pinnassa olevien elektronien virittymisen, josta seuraa puolestaan pintaplasmonin synty. Pintaplasmoni voi ilmetä joko metallin pinnassa etenevänä sähkömagneettisena aaltona tai lokalisoituneena elektronien värähtelynä (engl. *localized surface plasmon*, LSP) riippuen metallipinnan

geometriasta. Kuvassa 3 a on esitetty laserin aiheuttama elektronien värähtely kultananopartikkeleissa. Pintaplasmonien ansiosta valon sähkömagneettinen kenttä lähellä metallipintaa kasvaa ja näin ollen sekä lasersäteily että Raman-sironta voimistuvat. Metallinanorakenteissa pintaplasmonien aiheuttaman parannetun Raman-signaalin voimakkuus on riippuvainen näytteen sijainnista substraatilla. Kohtaa, josta saadaan voimakkain Raman-signaali, kutsutaan termillä ”hot spot”. Tällaisia kohtia voi esimerkiksi sijaita kahden metallisen nanopartikkelin välissä (kuva 3 b).⁹⁸



Kuva 3. a) Laserin aiheuttama lokalisoitunut elektronien värähtely ja b) kohdat, joissa Raman-signaali vahvistuu eniten ("hot spots"). Kuva b on mukailtu Ding et al.:n julkaisusta.⁹⁹

CM voidaan jakaa ”varauksen siirto” (engl. *charge-transfer*, CT) ja resonanssimekanismiin sekä mekanismiin, joka perustuu molekyylin ja pinnan välisiin ei-resonoiviin vuorovaikutuksiin. Kun molekyyli adsorboituu kemiallisesti (kemisorptio) metallipintaan, sen elektronikonfiguraatio voi muuttua merkittävästi ja molekyyli-metallikompleksin muodostuessa elektronit pääsevät liikkumaan kompleksissa. Kun laser virittää kompleksia, elektronit voivat siirtyä molekyylin energiatasoltaan matalimmalta molekyyliorbitaalilta (engl. *highest occupied molecular orbital*, HOMO) metallin Fermi-tasolle tai Fermi-tasolta molekyylin energiatasoltaan korkeimmalle molekyyliorbitaalille (engl. *lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO). Näillä elektronien siirtymillä viitataan CT-mekanismiin (kuva 4 a). Laserin virittäessä molekyyliä elektronit voivat myös siirtyä suoraan HOMO:lta LUMO:lle, jolloin viitataan resonanssimekanismiin (kuva 4 b). Kun laser resonoi näiden siirtymien kanssa, Raman-signaali voimistuu. Molekyylin polarisoituvuus muuttuu myös pelkästään kompleksin muodostuessa, mikä voi aiheuttaa itsessään Raman-signaalin voimistumisen. Tällä viitataan ei-resonoivaan mekanismiin, joka on esitetty kuvassa 4 c.^{96,97,100}



Kuva 4. Elektronien siirtymiset a) CT-mekanismissa, b) resonanssimekanismissa ja c) ei-resonoivassa mekaniismissa, jossa E kuvaa energiaa, E_F Fermi-tasoa, CB metallin johtavuusvyötä (engl. *conduction band*) ja VB metallin valenssivyötä (engl. *valence band*). Kuva on mukailtu Cong et al.:n julkaisusta.⁹⁷

SERS-ilmiön aiheuttamaa intensiteetin kasvua kuvataan yleensä EF:llä (engl. *enhancement factor*). Luonnollisesti EF:n suuruuteen vaikuttavat edellä mainitut EM ja CM. Siihen vaikuttavat muun muassa metallisen nanorakenteen muoto ja valittu metalli sekä laserin aallonpituus. Lisäksi se on riippuvainen tutkittavasta näytteestä ja siitä, miten näyte reagoi metallisen nanorakenteen kanssa. Yksittäisestä molekyylistä saatavan Raman-sironnan voimakkuus voi vaihdella suuresti samalla SERS-substraatilla olevilla molekyyileillä riippuen esimerkiksi siitä, onko molekyyli ”hot spot” -kohdassa vai ei. EF voidaan määrittellä esimerkiksi jakamalla SERS-substraatilla olevan yksittäisen molekyylin tunnusomaisen piikin intensiteetti (yhtälössä 1: I_{SERS}) saman piikin intensiteetillä, joka saadaan ilman SERS-substraattia (yhtälössä 1: I). Tällöin puhutaan yksittäisen molekyyliin perustuvasta EF:stä (engl. *single molecular EF*, SMEF).¹⁰¹

$$SMEF = \frac{I_{SERS}}{I} \quad (1)$$

Toinen tapa määrittellä SERS-ilmiön suuruus on analyttinen EF (AEF). Siinä tietyn konsentraation (yhtälössä 2: c) näyteliuksesta saatua Raman-signaalin intensiteettiä (yhtälössä 2: I) verrataan samasta näyteliuksesta (voi olla eri konsentraatio (yhtälössä 2: c_{SERS})) saatuun Raman-signaalin intensiteettiin (yhtälössä 2: I_{SERS}), johon vaikuttaa lisäksi SERS-ilmiö.¹⁰¹

$$AEF = \frac{I_{SERS}/c_{SERS}}{I/c} \quad (2)$$

Yleisin tapa puolestaan EF:n määrittelyyn on esitetty yhtälössä 3 (tässä tutkielmassa esitetty EF', jotta erottuu EF-yleistelmästä), jossa I_{SERS} ja I kuvaavat taas SERS-ilmiöllä ja ilman sitä

saatavia intensiteettejä. N_{SERS} ja N puolestaan kuvaavat molekyylien lukumäärää, joista SERS- ja perinteinen Raman-signaali on saatu. ^{101,102}

$$EF' = \frac{I_{\text{SERS}}/N_{\text{SERS}}}{I/N} \quad (3)$$

Nanomuovitutkimuksissa yleisesti käytetty tapa ilmaista SERS-ilmiön suuruutta on edellä mainitut AEF ^{103–105} ja EF' ^{85,106}. Usein konsentraatio tai molekyylien lukumäärä on kuitenkin ilmaistu arvolla 1, jolloin voimakkuus arvioidaan käytännössä yhtälön 1 mukaisesti (SMEF).

Ongelmaksi kaikkien edellä mainittujen EF:n kanssa muodostuu, jos molekyylistä, näyteliuksesta tai pienestä partikkelista ei saada Raman-signaalia ilman SERS-ilmiötä. Tällöin piikin intensiteetti on käytännössä nolla. Jos SERS-ilmiön kanssa samasta näytteestä saadaan puolestaan minkä tahansa suuruinen Raman-signaali, verrataan sitä tällöin nolnaan ja EF siis lähestyy ääretöntä. Lisäksi EF:n suuruus on riippuvainen näytteestä, jonka perusteella EF lasketaan. Myös näytteestä valittava piikki, jonka intensiteetin suuruutta verrataan ilman SERS-ilmiötä ja sen kanssa, vaikuttaa EF:n suuruuteen. Näiden tekijöiden takia kirjallisuudessa esiintyvät EF:n arvot vaihtelevat laajasti suuruudeltaan ja niiden vertaaminen toisiinsa voi olla hankalaa. ^{101,107}

2.7 Muovien erottelu ympäristönäytteistä

Ennen kuin nanomuovit voidaan tunnistaa ympäristönäytteistä, tulee näytteitä käsitellä usein niin, että eloperäinen materiaali hajotetaan näytteestä erilaisilla hapettavilla ja syövyttävillä aineilla. Tärkeää käsittelyssä on olla vahingoittamatta tutkittavia muovipartikkeleita. Yleisesti mikro- ja nanomuovitutkimuksessa on käytetty happoja, kuten HCl ja HNO₃, sekä emäksiä, kuten NaOH ja KOH. Yleisesti hapettimena on puolestaan käytetty H₂O₂:a. ^{93,108–110}

Pfeiffer et al. testasivat kaikkia edellä mainittuja aineita eri konsentraatioilla, lämpötiloilla ja reaktioajoilla lehtopyökin oksien (kova kasvikuodos) ja lehtien (pehmeä kasvikuodos), sekä simpukoiden kalkkikuorten hajottamiseen. Lisäksi he testasivat mikromuovien kestävyyttä samoille aineille. He totesivat H₂O₂:n, NaOH:n ja KOH:n hajottavan kasvikuodosia, mutta vain HCl:n ja HNO₃:n liuottavan näytteistä kalkkikuoret. Korkeissa konsentraatioissa (~10 %) ja lämpötiloissa (> 60 °C) NaOH ja KOH hajottivat myös PET-mikromuoveja. HCl ja HNO₃ puolestaan hajottivat polyamidi (PA) -mikromuoveja kaikissa tilanteissa lukuun ottamatta 10 % HCl:a huoneenlämmössä. ¹¹¹

Karami et al. niin ikään testasivat samoja aineita eri konsentraatioilla ja lämpötiloilla kalakudoksen hajottamiseen. Aluksi he testasivat, mitkä eri aineet voivat hajottaa kalakudoksen yli 95 % teholla 96 h aikana. Tällä teholla kalakudos hajosi vain käytettäessä 10 % KOH:a, 37 % HCl:a, 69 % HNO₃:a ja 35 % H₂O₂:a. Lisäksi he testasivat näiden aineiden yhteensopivuutta mikromuovien kanssa. HCl:n ja yli 50 °C lämpötilassa olleen KOH:n raportoitiin hajottavan PET-mikromuoveja. HNO₃:n raportoitiin hajottavan lisäksi PE- ja PP-mikromuoveja.¹¹²

Rist et al. puolestaan altistivat planktoneita PS-nanomuoveille ja tutkivat muun muassa sitä, millä aineella planktonit saatiin hajotettua nanomuovien seasta. He testasivat 65 % HNO₃:a, 1 M NaOH:a, 30 % H₂O₂:a, 25 % TMAH:a ja entsyymiä nimeltä proteinaasi K. He totesivat HNO₃:n, NaOH:n ja H₂O₂:n aiheuttavan vahvaa partikkelien aggregoitumista, minkä takia niitä ei käytetty. Vaikka partikkelien aggregoitumista esiintyi vähiten TMAH:lla, proteinaasi K:n arvioitiin puolestaan olevan parempi vaihtoehto, koska TMAH ei ollut tarpeeksi tehokas hajottamaan planktoneita.¹¹³

Eloperäisen aineksen hajottamista on käytetty lisäksi ainakin seuraavissa nanomuovitutkimuksissa. Monikh et al. erottelivat nanomuoveja munan kuorista käyttämällä HCl:a ja TMAH:a.¹¹⁴ Correia et al. erottelivat nanomuoveja kalasta HNO₃:lla ja proteinaasi K:lla.¹¹⁵ Lin et al. tunnistivat nanomuoveja kalasta sekä jokivedestä käyttämällä KOH:a.¹¹⁶ Xu et al. puolestaan käyttivät H₂O₂:a hajottamaan eloperäistä ainesta ilmasta kerättyjen nanomuovien seasta.⁸⁵ On myös raportoitu, että tarpeeksi puhtaista näytteistä, kuten merivedestä tai pullotetusta juomavedestä ei tarvitse poistaa eloperäistä materiaalia mikro- ja nanomuovien tunnistamiseksi.^{11,110,117}

Lisäksi näytettä tulee usein myös konsentroida esimerkiksi perinteisesti suodattamalla, ultrasuodattamalla, haihduttamalla tai erilaisilla sentrifugointimenetelmillä.^{93,110} Konsentroidi mahdollistaa suuremman näytekoon ja täten nanomuoveja löytyy todennäköisemmin analysoitavasta näytteestä. Myös eloperäisen aineksen hajottaminen helpottuu, jos esimerkiksi merivesinäyte on konsentroidu.

Nanomuoveja tunnistettaessa SERS-menetelmillä, yleinen konsentroiditapa on suodattaminen. Nanomuoveja sisältävä näyte suodatetaan usein aluksi suodattimelle, josta nanomuovit irrotetaan esimerkiksi ultraäänellä liuokseen. Tämä liuos konsentroidaan vielä haihduttamalla, jonka jälkeen se voidaan pisaran muodossa asettaa SERS-substraatille. Suodatus on yksinkertainen ja tehokas tapa näytteiden konsentroidimiseen, mutta haittapuolena on se, että nanomuoveilla on taipumusta adsorboitua suodattimen pintaan.⁹³ Tällöin adsorboituneet

nanomuovit voivat jäädä prosessissa suodattimen pintaan eivätkä päädy lopulliselle SERS-substraatille. Suodatusta voidaan käyttää myös näytteiden konsentroidiin muissakin tapauksissa kuin SERS-menetelmällä nanomuoveja tutkiessa. Materic et al. esimerkiksi suodattivat merivettä suoraan lasikuitusuodattimelle, josta he leikkasivat palan, joka analysoitiin TD-PTR-MS-menetelmällä.¹⁰

Ultrasuodatusta ovat puolestaan käyttäneet muun muassa Ter Halle et al. heidän tunnistuessa nanomuoveja merivedestä Py-GC-MS-menetelmällä. He suodattivat 1 l Pohjois-Atlantilta kerättyä pintavettä aluksi 1,2 µm huokoskoon polyeetterisulfoni (PES) -suodattimen läpi. Tämän jälkeen he konsentroivat merivettä ultrasuodatuksella, jonka jälkeen konsentroidu merivesi kylmäkuivattiin. Kylmäkuivattu näyte jauhettiin puolestaan tasaiseksi tunnistusta varten.¹¹

Myös haihduttamista voidaan käyttää pääasiallisena konsentroidintimenetelmänä. Xu et al. keräsivät nanomuoveja ilmasta, jotka aluksi laitettiin H₂O₂:in, kuten edellä mainittiin.⁸⁵ Tämän jälkeen he suodattivat H₂O₂-liuoksen lasikuitusuodattimen läpi, huuhtoivat sen vedellä ja lopuksi konsentroivat liuoksen haihduttamalla, ennen kuin sitä pipetoitiin pisara SERS-substraatille.⁸⁵

Raskasnestekäsittely on mikromuovitutkimuksessa yleisesti käytetty erottelumenetelmä, jossa mikromuovit saadaan kellutettua raskasnesteliuoksen ja muovien tiheyserojen avulla. Nanomuovien erotteluun raskasnestekäsittely ei kuitenkaan sellaisenaan sovellu, koska kolloidisiin nanomuoveihin vaikuttaa yleisesti enemmän Brownin liike kuin tiheyseroista aiheutuva kellutus.^{118,119} Nanomuovit on kuitenkin mahdollista saada kellumaan niitä tiheämmässä liuoksessa, kun ne altistuvat keskipakokentälle sentrifugoidessa.¹²⁰ Nanomuovien kellutus sentrifugoinnin ja raskasnestekäsittelyn yhdistelmällä on arvioitu olevan tehokkaimmillaan, kun raskasnesteliuoksen tiheys on 1,6-1,8 g/cm³.¹²¹

Edellä mainituissa tutkimuksissa, joissa nanomuoveja oli tunnistettu merivedestä MS-menetelmillä, ei oltu kummassakaan käsitelty merivettä eloperäisen aineksen poistamiseksi.^{10,11} Materic et al. kuitenkin mainitsivat työssään, että eloperäisen aineksen hajottamista tulisi tutkia tarkemmin, koska se voi häiritä nanomuovien tunnistusta myös heidän menetelmää käyttäessä.¹⁰ Lisäksi Li et al. käsitelivät huomattavasti merivettä puhtaampaa vesijohtovettä HCl:lla ja H₂O₂:lla nanomuovien tunnistamiseksi.⁷⁸ Tässä pro gradu -tutkielmassa eloperäisen aineksen hajottamiseen käytettiin H₂O₂:a, NaOH:a ja HCl:a. Merivesinäytteitä puolestaan konsentroidtiin suodattamalla.

2.8 Mahdollisia virhelähteitä nanomuovitutkimuksessa

Tärkeää nanomuovitutkimuksessa on myös poissulkea mahdolliset virhelähteet, jotta muovien alkuperä voidaan todistaa. Muovisten näytteenottovälineiden tai esimerkiksi muovisten vaatteiden käyttöä tulisi välttää näytteitä käsiteltäessä. Monet laboratoriovälineet ovat nykyaikana muovia ja suuri osa vaatteista sisältää muovia. Lisäksi rakentamisessa muovi on hyvin yleinen materiaali. Oletettavaa on siis, että huoneilmassa on lukuisia eri kontaminaatiolähteitä. Käyttämällä laminaarikaappia tai puhdastilaa näytteen kontaminaatoriskiä voidaan pienentää. Tässä työssä merivesinäytteet kerättiin lasisiin näytepulloihin, yleisimpien muovien (PE, PP, PS, PET ja PVC) käyttöä pyrittiin välttämään ja näytteenkäsittely suoritettiin laminaarikaapissa käyttäen puuvillaisia laboratoriotakkeja.

3 Materiaalit ja menetelmät

Taulukko 1. Käytettyjen materiaalien tarkemmat tiedot

Materiaali	Valmistaja	Valmistajan kuvaus
PS-kuulat 500 nm	Thermo Scientific	<i>5000 Series Polymer Particle Suspension, Catalog No.: 5050A</i>
PS-kuulat 3 µm	EPRUI Biotech	<i>PS/DVB Microspheres, 3µm</i>
PC-suodatin, huokoskoko: 0,2 µm, halkaisija: 25 mm	Sartorius	<i>Polycarbonate Track-Etched Filters / 0.2 µm / 25 mm Discs</i>
PC-suodatin, huokoskoko: 0,2 µm, halkaisija: 47 mm	Whatman	<i>Nuclepore™ Track-Etched Membrane, Catalog No.: 10417012</i>
Al ₂ O ₃ -suodatin, huokoskoko: 0,2 µm, halkaisija: 25 mm	Whatman	<i>Anodisc Circle with Support Ring, 25 mm, 0.2 µm</i>
PES-suodatin, huokoskoko: 0,2 µm, halkaisija: 47 mm	Sartorius	<i>Polyethersulfone Membrane Filters - Type 15407</i>
suodatinlaitteisto	Sartorius	<i>Glass Vacuum Filtration Device, 47/50 mm, Catalog No.: 16316”;</i> <i>”Glass Vacuum Filtration Device, 25 mm, Catalog No.: 16315</i>
Raman-mikroskooppi	Renishaw	<i>inVia Qontor</i>
532 nm laser	Renishaw	<i>RL532C</i>
633 nm laser	Renishaw	<i>RL633</i>
785 nm laser	IPS	<i>785 nm Spectrum Stabilized Laser Module</i>
SEM	Thermo Scientific	<i>Apreo S FE-SEM</i>
mikroskooppilasi	VWR	<i>Cover glasses, square, 22x22 mm, #2</i>
sputteri (Au)	Leica	<i>EM ACE200</i>
sputteri(Pt)	Quorum	<i>150V ES Plus</i>
UV-Vis- spektrofotometri	Agilent	<i>Cary 60 UV-Vis</i>
reflektanssispektrometri	Avantes	<i>AvaSpec HS-TEC</i>
valonlähde reflektanssimittaukseen	Avantes	<i>AvaLight-DHc</i>
H ₂ O ₂	Fisher Scientific	<i>Hydrogen peroxide 100 volumes >30% w/v, Analytical reagent grade</i>
NaOH	VWR	<i>Sodium hydroxide pellets, 98.9 %</i>
HCl	VWR	<i>Hydrochloric acid 37%, AnalaR® NORMAPUR® Reag. Ph. Eur. analytical reagent</i>
sentrifugi	Eppendorf	<i>Centrifuge 5804</i>
LST-raskasneste	Central Chemical Consulting	<i>LST Heavy Liquid</i>

Taulukossa 1 on esitetty työssä käytettyjen PS-kuulien, suodattimien, kemikaalien ja laitteiden tarkemmat tiedot.

3.1 PS-kuulat

Työssä käytetyt 3 μm ja 500 nm PS-kuulat olivat alkujaan 10 m% liuoksissa. PS-kuulien käyttöä varten valmistettiin 1000x laimennokset pipetoimalla 10 μl 10 m% PS-kuulaliuosta Milli-Q-veden (10 ml) sekaan. Kaikissa työn kohdissa, joissa PS-kuulia on lisätty, on käytetty kyseisiä laimennoksia. Näihin laimennoksiin viitataan alla ”3 μm PS-kuulaliuoksena” ja ”500 nm PS-kuulaliuoksena”. Kuulat (500 nm) toimivat työssä standardinäytteinä merivettä käsiteltäessä

3.2 Suodattimet ja suodatus

Työssä käytettiin yhteensä neljää erilaista suodatinta. Näistä ensimmäinen on 25 mm halkaisijaltaan oleva PC-suodatin, jonka huokoskoko on 0,2 μm . Tätä suodatinta käytettiin vain suodatettaessa 3 μm PS-kuulia (tästä erikseen maininta kyseisessä kohdassa). Seuraava suodatin, jota käytettiin, on 25 mm halkaisijaltaan oleva Al_2O_3 -suodatin, jonka huokoskoko on 0,2 μm . Meriveden käsittelyvaihetta varten käytettiin 47 mm halkaisijaltaan olevaa PC-suodatinta (huokoskoko: 0,2 μm). Eloperäisen aineksen hajottamiseen käytettyjen aineiden suodattamiseen käytettiin puolestaan 47 mm halkaisijaltaan olevia polyeetterisulfoni (PES) -suodattimia (huokoskoko: 0,2 μm). Kaikki suodatukset suoritettiin vaakumisuodattamalla käyttäen lasisia suodatinlaitteistoja, joissa suodattimen pidikkeenä oli teflonista (PTFE) valmistettu rengas, jonka päällä oli PTFE-päällysteinen teräsritilä.

3.3 Raman-mittaukset

Nanomuovien tunnistamiseen ja näytteiden mikroskooppiseen kuvantamiseen käytettiin konfokaalista Raman-mikroskooppia. Kaikki työn mittaukset suoritettiin pistemittauksina yksittäisistä partikkeleista ja spektrit kerättiin alueelta $\sim 100\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$. Laserin, jonka aallonpituus on 532 nm, kanssa käytettiin 1800 l/mm hilaa, 633 nm laserin kanssa 1800 l/mm hilaa ja 785 nm laserin kanssa 1200 l/mm hilaa. Laserin teho asetettiin mahdollisimman korkeaksi, mutta kuitenkin niin, etteivät PS-kuulat palaneet. Tämä vastasi 532 nm laserille 0,5 % tehoa, 633 nm laserille 1 % tehoa ja 785 nm laserille 0,5 % tehoa. Kaikki Raman-spektrit (lukuun ottamatta 3 μm PS-kuulista mitattuja Raman-spektrejä) mitattiin käyttämällä edellä mainittuja tehoja, 100x objektiivia ja 100 s mittausaikaa yhdellä toistolla. Mitatessa 3 μm PS-

kuulista Raman-spektrejä käytettiin poikkeuksellisesti 785 nm laseria 5 % teholla ja 10 s ajan yhdellä toistolla. Taustojen poisto suoritettiin spektreistä Renishaw:in ”*WiRE 5*” -ohjelmalla.

3.4 SEM-kuvaukset

SEM-kuvat otettiin käyttäen 2 kV kiihtyvyydjännitettä, 25 pA virtaa ja työskentelyetäisyytenä 6–11 mm. Pelkistä suodattimista otetuissa kuvissa käytettiin ETD-detektoria. Suodattimella, jonka läpi merivesinäyte oli suodatettu, käytettiin ETD:n lisäksi myös T2-detektoria.

3.5 Nanomuovien tunnistamista tehostavat suodattimet

Ensimmäistä suodattimien testausta varten 10 µl 3 µm PS-kuulaliuosta pipetoitiin 30 ml:an Milli-Q-vettä. Tämä suodatettiin 25 mm halkaisijaltaan olevalle PC-suodattimelle (huokoskoko: 0,2 µm). Samanlainen liuos valmistettiin uudestaan ja suodatettiin puolestaan Al₂O₃-suodattimelle. Suodattimet analysoitiin Raman-mikroskoopilla. Seuraavaksi 10 µl 500 nm PS-kuulaliuosta pipetoitiin 30 ml:an Milli-Q-vettä. Liuos suodatettiin niin ikään Al₂O₃-suodattimelle ja suodatin analysoitiin Raman-mikroskoopilla.

SERS-ilmiötä varten sputterointia testattiin aluksi mikroskooppilaseille optisen tiheyden määrittämiseksi. Mikroskooppilaseille sputterointiin kerrokset kultaa ja platinaa käyttäen Argonkaasua. Nämä analysoitiin käyttäen UV-Vis-spektrofotometriä. Mikroskooppilaseista määritetyn metallikerroksen optisen tiheyden perusteella kultaa sputterointiin Al₂O₃-suodattimelle 16 nm kerros ja toiselle Al₂O₃-suodattimelle sputterointiin 12 nm platinakerros. Näistä suodattimista mitattiin reflektanssispektrit. Valkoisena referenssinä reflektanssimittauksissa käytettiin päällystämätöntä Al₂O₃-suodatinta. Päällystämättömästä, kultapäällysteisestä ja platinapäällysteisestä Al₂O₃-suodattimesta otettiin SEM-kuvat.

Kulta- ja platinapäällysteiselle suodattimelle suodatettiin kummallekin 30 ml Milli-Q-vettä, johon oli pipetoitu sekaan 10 µl 500 nm PS-kuulaliuosta. Suodattimet analysoitiin Raman-mikroskoopilla, jonka jälkeen tuloksia verrattiin päällystämättömään suodattimeen. Metallipäällysteisille suodattimille laskettiin EF:t usealla eri tavalla käyttäen osiossa 2.6 esiteltyjä yhtälöitä. Yksittäisistä kuulista saadut Raman-spektrit keskiarvoistettiin OriginLab:in ”*Origin 64-bit*” -ohjelmalla.

3.6 Merivesi ja nanomuovit

Työssä käytetyt merivedet kerättiin Turun seudun uimarannoilta (Kansanpuiston, Ispoisten ja Saaronniemen uimaranta) 14.7.2022 ja Halikonlahdelta 20.9.2022 niin, että pintavettä pulloitettiin ~5 l suoraan lasisiin hioskorkillisiin 5 l pulloihin. Merivedet säilöttiin kylmässä (~4 °C) valolta suojattuna käsittelyyn saakka. Halikonlahdelta kerättyä merivettä suodatettiin suoraan Pt/Al₂O₃-suodattimelle niin, että päällimmäiset 2 l merivettä kaadettiin aluksi 5 l pullosta dekantterilasiin (näin merivesinäytteessä oleva suurin osa hiekasta ja muusta raskaasta aineksesta pysyi 5 l pullon pohjalla), josta 100 ml merivettä suodatettiin Pt/Al₂O₃-suodattimelle. Tämän jälkeen suodatin analysoitiin Raman-mikroskoopilla.

3.6.1 H₂O₂:n vaikutus PS-kuuliin ja meriveteen

H₂O₂:n vaikutusta 500 nm PS-kuuliin testattiin pipetoimalla 10 µl 500 nm PS-kuulaliuosta suodatetun H₂O₂:n (20 ml) sekaan. Kuulien annettiin olla H₂O₂:ssa vuorokauden ajan niin, että noin 7 h ajasta H₂O₂ PS-kuulineen olivat vesihautessa 50 °C:ssa. Vuorokauden kuluttua H₂O₂ PS-kuulineen suodatettiin Au/Al₂O₃-suodattimelle. Suodatin analysoitiin Raman-mikroskoopilla ja tuloksia verrattiin Milli-Q-vedessä olleisiin PS-kuuliin, jotka oli suodatettu Au/Al₂O₃-suodattimelle.

Eloperäisen aineen poistamiseksi testattiin 30 % H₂O₂:a seuraavasti. Ispoisten uimarannalta kerättyä merivettä kaadettiin aluksi 2 l dekantterilasiin 5 l pullosta. Dekantterilasissa oleva merivesi suodatettiin aluksi PC-suodattimelle. Kun merivesi oli suodatettu, PC-suodatin siirrettiin keittopulloon, johon lisättiin 20 ml suodatettua 30 % H₂O₂:a. Suodattimen annettiin olla 3 vuorokautta H₂O₂:ssa, niin että ensimmäisen vuorokauden aikana H₂O₂ suodattimiseen olivat vesihautessa 50 °C:ssa 7 h ajan. Tämän jälkeen H₂O₂ suodatettiin uudelle PC-suodattimelle. Keittopullo huuhdeltiin kolmesti noin 20 ml:lla Milli-Q-vettä samalle PC-suodattimelle. PC-suodatin siirrettiin seuraavaksi dekantterilasiin, jossa sitä huuhdeltiin Milli-Q-vedellä kolmesti 20 ml:lla lopulliselle Pt/Al₂O₃-suodattimelle, jota analysoitiin Raman-mikroskoopilla.

3.6.2 NaOH:n ja HCl:n vaikutus PS-kuuliin

NaOH:n vaikutusta 500 nm PS-kuuliin testattiin valmistamalla aluksi 1 M NaOH liuos Milli-Q-vedeen. 10 µl 500 nm PS-kuulaliuosta pipetoitiin suodatetun 1 M NaOH:n (20 ml) sekaan.

Kuulien annettiin olla NaOH:ssa vuorokauden ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen NaOH PS-kuuliseen suodatettiin Pt/Al₂O₃-suodattimelle.

HCl:n vaikutusta 500 nm PS-kuuliin testattiin valmistamalla aluksi 10 % HCl liuos Milli-Q-vedeen. 10 µl 500 nm PS-kuulaliuosta pipetoitiin suodatetun 10 % HCl:n (20 ml) joukkoon. Kuulien annettiin olla HCl:ssa vuorokauden ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen HCl PS-kuuliseen suodatettiin Pt/Al₂O₃-suodattimelle.

Pt/Al₂O₃-suodattimia, joille NaOH ja HCl PS-kuuliseen oli suodatettu, analysoitiin Raman-mikroskoopilla. Tuloksia verrattiin Milli-Q-vedessä olleisiin PS-kuuliin, jotka oli suodatettu Pt/Al₂O₃-suodattimelle.

3.6.3 PS-kuulien pysyvyys konsentroidessa suodattamalla

500 nm PS-kuulien pysyvyyttä prosessissa tutkittiin pipetoimalla aluksi 10 µl 500 nm PS-kuulaliuosta Milli-Q-veden (20 ml) sekaan. Milli-Q-vesi kuuliseen suodatettiin aluksi PC-suodattimelle. Suodatin siirrettiin tämän jälkeen keittopulloon. Suodatinta keittopullossa huuhdeltiin kolmesti lopulliselle Pt/Al₂O₃-suodattimelle käyttäen 20 ml Milli-Q-vettä yhdellä huuhtelulla. Pt/Al₂O₃-suodatin kuvattiin Raman-mikroskoopilla ja PS-kuulien määrää verrattiin Milli-Q-vedessä olleisiin PS-kuuliin, jotka olivat suodatettu suoraan Pt/Al₂O₃-suodattimelle. PS-kuulat laskettiin mikroskooppikuvista manuaalisesti käyttäen ImageJ-ohjelmaa.

3.6.4 Merivesi-, nolla-, ja referenssinäytteen käsittely

Ispoisten uimarannalta kerättyä merivettä kaadettiin aluksi 2 l:aa isosta 5 l:n pullosta dekanterilasiin. Dekanterilasissa oleva merivesi suodatettiin aluksi PC-suodattimelle. Kun merivesi oli suodatettu, PC-suodatin siirrettiin keittopulloon, johon lisättiin 20 ml 30 % H₂O₂:a. Suodattimen annettiin olla H₂O₂:ssa viiden vuorokauden ajan niin, että kahtena ensimmäisenä vuorokautena H₂O₂ suodattimiseen olivat vesihautessa 50 °C:ssa 7 h/vuorokausi. Toisena vuorokautena keittopulloon lisättiin myös 10 ml 30 % H₂O₂:a. Viiden vuorokauden kuluttua H₂O₂ suodatettiin PC-suodattimelle. Keittopullo huuhdeltiin kolmesti samalle suodattimelle käyttäen 20 ml Milli-Q-vettä yhdellä huuhtelulla. Seuraavaksi suodattimen pinnalle laitettiin 10 ml 10 % HCl:a, kun suodatin oli vielä suodatinlaitteistossa ja suodatinlaitteiston imu pois päältä. HCl:n annettiin olla suodattimen päällä aluksi 30 min, jonka jälkeen HCl suodatettiin läpi kytkemällä imu päälle. Imu kytkettiin tämän jälkeen pois päältä ja suodattimen päälle lisättiin uudestaan 10 ml 10 % HCl:a, jonka annettiin vaikuttaa vastaavasti 30 min. Kun 30 min

oli taas kulunut, suodatettiin HCl läpi kytkemällä jälleen imu päälle. Lopuksi suodattimen läpi suodatettiin vielä kolmesti 20 ml Milli-Q-vettä, jonka jälkeen suodatin siirrettiin dekantterilasiin, johon lisättiin 30 ml 1 M NaOH:a. Suodattimen annettiin olla NaOH:ssa aluksi vuorokauden ajan, jonka jälkeen dekantterilasiin lisättiin 10 ml 10 % HCl:a NaOH:n neutraloimiseksi. Jäljelle jäänyt neutraloitu liuos jaettiin tasan kahteen Falcon-putkeen (20 ml kumpaankin) raskasnestekäsittelyä varten. Dekantterilasi huuhdeltiin 23 ml LST-raskasnestettä ($\rho = 2,8 \text{ g/ml}$), joka jaettiin myös tasan kyseisiin Falcon-putkiin niin, että tiheys liuoksille oli $\sim 1,7 \text{ g/ml}$. Liuoksia sentrifugoitiin 5000 rpm nopeudella 15 min ajan. Heti sentrifugoinnin jälkeen ylin 7,5 ml kummastakin Falcon-putkesta suodatettiin lopulliselle Pt/Al₂O₃-suodattimelle, jonka jälkeen suodattimen läpi suodatettiin vielä kolmesti 20 ml Milli-Q-vettä, jottei LST-raskasnestekiteytyneet suodattimen pintaan.

Edellä mainittu prosessi tehtiin myös nolla- ja referenssinäytteelle. Nollanäytteenä toimi 2 l Milli-Q-vettä, jota oli säilötty vastaavasti kuin merivettäkin. Referenssinäytteenä puolestaan käytettiin vastaavasti säilöttyä Milli-Q-vettä (2 l), jonka sekaan pipetoitiin 10 μl 500 nm PS-kuulaliuosta. Aluksi Pt/Al₂O₃-suodatin, jolle oli suodatettu merivesinäyte, analysoitiin Raman-mikroskoopilla ja kuvattiin SEM:lla. Tämän jälkeen Pt/Al₂O₃-suodattimet, joille oli suodatettu nolla- ja referenssinäyte, analysoitiin Raman-mikroskoopilla.

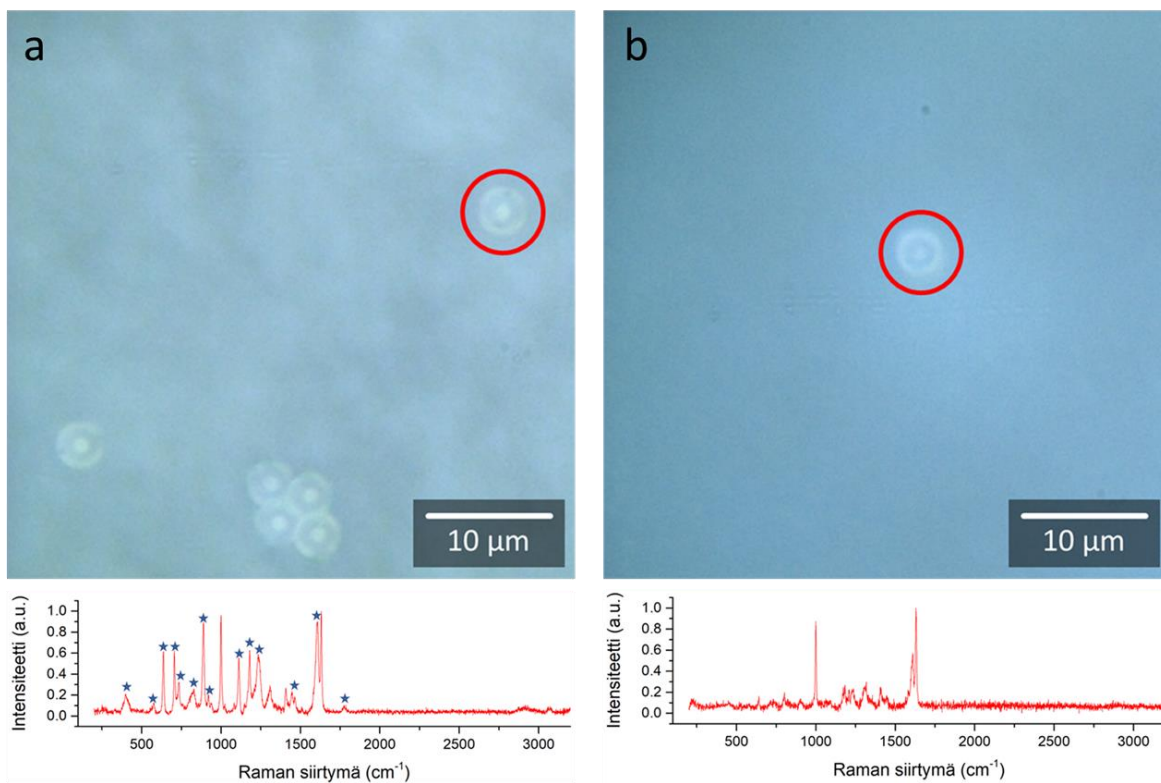
3.6.5 Raskasnestekäsittely ja sentrifugointi

Lopuksi testattiin vielä raskasnestekäsittelyn ja sentrifugoinnin toimivuus seuraavasti. Dekantterilasiin, jossa oli 40 ml Milli-Q-vettä, pipetoitiin 10 μl 500 nm PS-kuulaliuosta sekaan. Milli-Q-vesi PS-kuulineen jaettiin tämän jälkeen tasan kahteen Falcon-putkeen. Dekantterilasi huuhdeltiin 23 ml LST-raskasnestettä, joka jaettiin myös tasan kyseisiin Falcon-putkiin niin, että tiheys liuoksille oli jälleen $\sim 1,7 \text{ g/ml}$. Liuoksia sentrifugoitiin 5000 rpm nopeudella 15 min ajan. Heti sentrifugoinnin jälkeen ylin 7,5 ml kummastakin Falcon-putkesta suodatettiin Pt/Al₂O₃-suodattimelle, jonka jälkeen suodattimen läpi suodatettiin vielä kolmesti 20 ml Milli-Q-vettä. Suodatinta kuvattiin Raman-mikroskoopilla ja PS-kuulien määrää verrattiin niihin PS-kuuliin, jotka olivat olleet Milli-Q-vedessä, ja jotka olivat suodatettu suoraan Pt/Al₂O₃-suodattimelle.

4 Tulokset ja niiden tarkastelu

4.1 Nanomuovien tunnistamista tehostavat suodattimet

Aluksi suodattimien toimivuutta mikromuovien taustana Raman-mittauksissa testattiin suodattamalla 3 μm PS-kuulia 25 mm halkaisijaltaan oleville PC- ja Al_2O_3 -suodattimille (huokoskoko: 0,2 μm). Kuvasta 5 voidaan nähdä, että PS-kuulat näkyvät mikroskoopilla selkeästi kummallakin suodattimella. Punaisella ympyröidyistä kuulista mitattiin Raman-spektrit, jotka näkyvät mikroskooppikuvien alla, käyttäen 785 nm laseria. PC-suodattimella olevasta PS-kuulasta mitatussa Raman-spektrissä näkyy myös PC:lle tunnusomaisia piikkejä, mikä tekee PC-suodattimesta huonon taustan pienille muovipartikkeleille Raman-mittauksien kannalta. Kuvan 5 a spektriin on merkattu PC:n tunnusomaiset piikit sinisillä tähdillä. Loput piikeistä kuuluvat PS:lle. Al_2O_3 -suodattimella olevasta PS-kuulasta mitatussa Raman-spektrissä näkyy puolestaan vain PS:lle tunnusomaisia piikkejä, eikä taustana toimiva suodatin tällöin häiritse Raman-spektrin tulkintaa.

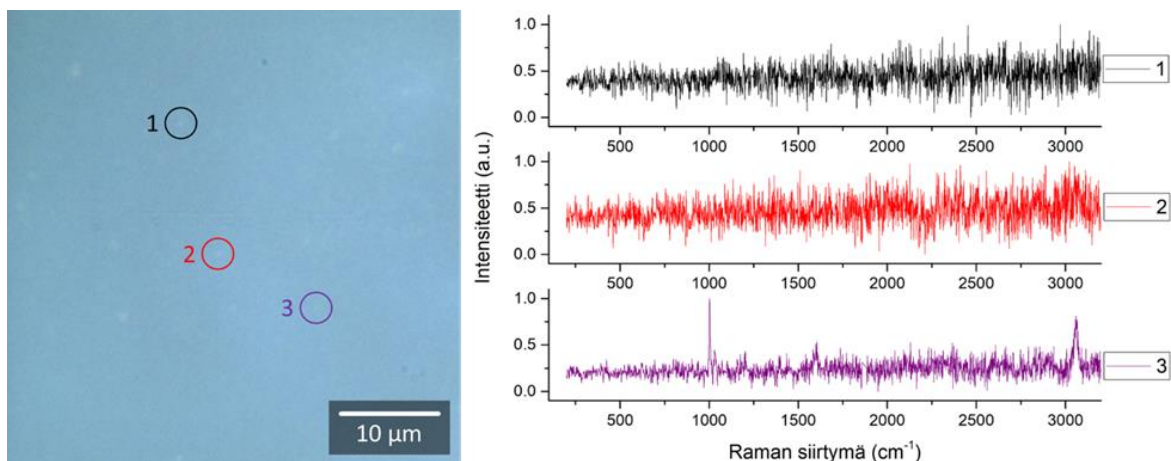


Kuva 5. 3 μm PS-kuulista otetut mikroskooppikuvat ja Raman-spektrit a) PC-suodattimella ja b) Al_2O_3 -suodattimella

Mikromuovien tunnistamiseen Raman-spektroskopiolla on aikaisemminkin käytetty suodattimia taustana. Käßpler et al. muun muassa kehittivät piistä valmistetun suodattimen

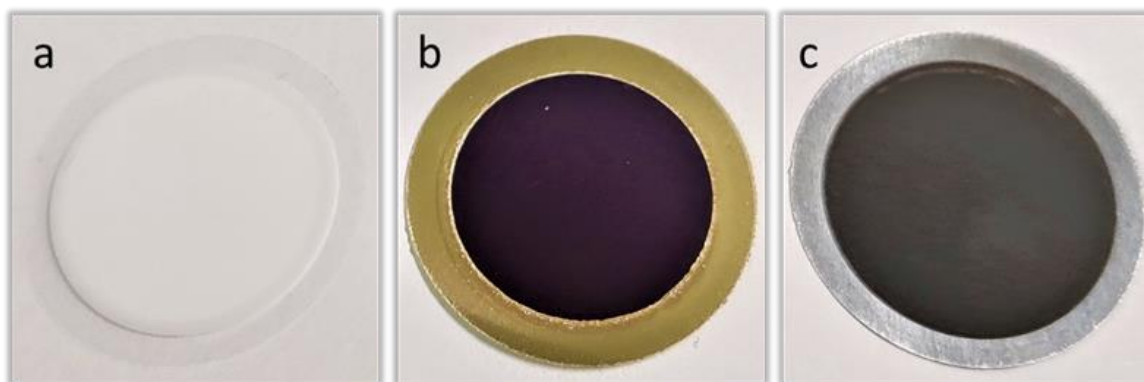
(huokoskoko: 10 μm), jota käytettiin taustana noin 500 μm leveille ja 15 μm paksuille mikromuoveille käyttäen 532 nm laseria.¹²² Osassa muovien spektreissä näkyivät myös taustana olleen piin tunnusomaiset piikit.¹²² Di et al. käyttivät lasikuitusuodatinta (huokoskoko: 0,45 μm) mikromuovien taustana käyttäen niin ikään 532 nm laseria.¹²³ Mikromuovit olivat kuitenkin tässä tapauksessa niin isoja, etteivät taustana toimivan lasin tyypilliset piikit vaikuttaneet häiritsevän mikromuovien tunnistusta.¹²³ Leung et al. kokeilivat puolestaan kolmea eri materiaalista valmistettua suodatinta 10 μm PS-kuulien taustana ja totesivat lasikuiduista ja selluloosaestereistä valmistettujen suodattimien häiritsevän merkittävästi PS-kuulien tunnistusta 785 nm laserilla.¹²⁴ Ruostumattomasta teräksestä valmistettu suodatin antoi kuitenkin tasaisen taustan ilman piikkejä, jonka ansiosta PS-kuulat oli helppo tunnistaa suodattimelta.¹²⁴ Kuten tässäkin työssä, Oßmann et al. käyttivät PC-suodatinta (huokoskoko: 0,4 μm) 1 μm PS-kuulien taustana ja huomasivat myös PC-suodattimesta saatavan Raman-sironnan häiritsevän muovien tunnistamista 532 nm laserilla.¹²⁵ Miclea et al. puolestaan käyttivät mikromuovien taustana Al_2O_3 -suodatinta (huokoskoko: 0,1 μm) ja totesivat sen sopivan hyvin Raman-mittauksiin, koska sillä ei ole ”Raman-sormenjälkeä”.¹²⁶ Heidän käyttämän laserin aallonpituus oli 488 nm.¹²⁶

Koska Al_2O_3 toimi erinomaisesti 3 μm PS-kuulien tunnistamiseen, testattiin seuraavaksi sen sopivuutta nanomuovien tunnistamiseen 500 nm PS-kuulilla. PC-suodatin jätettiin pois sen antaman huonon taustan takia. Kuvasta 6 voidaan huomata, kuinka heikosti PS-kuulat näkyvät suodattimella. Mikroskooppikuvassa on ympyröitynä kolme kuulaa, joista mitattiin Raman-spektrit 532 nm laserilla. PS-kuulien Raman-spektrejä yritettiin aluksi mitata 785 nm laserilla, mutta spektreinä saatiin vain kohinaa. Kun laserin aallonpituus vaihdettiin pienemmäksi (532 nm), osasta kuulia saatiin PS:lle tyypillinen Raman-spektri. Tämä voidaan selittää sillä, että lyhyemmän aallonpituuden laserilla saadaan voimakkaampi signaali Raman-sironnan voimakkuuden kasvaessa aallonpituuden neljännen potenssin funktiona. Kuvasta 6 voidaan nähdä, että kuulista 1 ja 2 mitatut spektrit ovat vain kohinaa, mutta kuula 3 voidaan tunnistaa PS:ksi. Tulokset ovat linjassa aiempien tutkimusten kanssa. Esimerkiksi Miclea et al. raportoivat, että heidän menetelmällään Raman-mikroskoopilla voidaan tunnistaa 2 μm muovipartikkeleita Al_2O_3 -suodattimelta.¹²⁶ Vaikka osasta PS-kuulia saatiinkin niille tyypillinen spektri, ei suodatin sellaisenaan vaikuttanut olevan riittävän hyvä nanomuovien laajempaa tunnistusta varten.



Kuva 6. Mikroskooppikuva 500 nm PS-kuulista Al_2O_3 -suodattimella ja niistä mitatut Raman-spektrit 532 nm laserilla

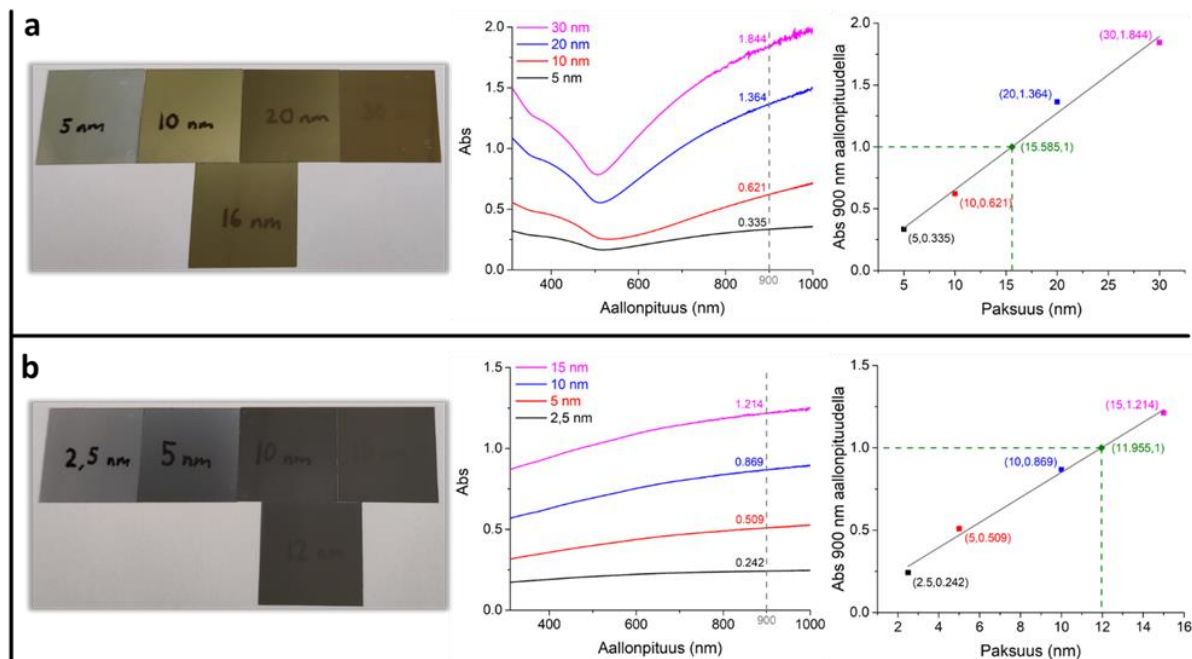
Jotta Al_2O_3 -suodattimesta saataisiin parempi tausta nanomuoveille Raman-mittauksia varten, suodattimen pintaan luotiin metallinen nanorakenne SERS-ilmiön aikaansaamiseksi. Yhden suodattimen pintaan sputteroitettiin 16 nm kerros kultaa ja toisen suodattimen pintaan 12 nm platinaa. Kuvassa 7 näkyy päällystämätön, kullalla päällystetty ja platinalla päällystetty Al_2O_3 -suodatin. Suodattimien ympärillä on suodatinta tukeva muovirengas, joka näkyy kuvassa läpinäkyvänä ja värittömänä päällystämättömälle suodattimelle. Päällystetyille suodattimille puolestaan muovirengas näyttäytyy kullan ja platinan ominaissävyissä. Kullalla päällystetyn suodattimen väri on muuten ruskean, punaisen ja violetin väliltä riippuen valon tulokulmasta ja platinalla päällystetty suodatin on puolestaan harmaan sävyinen.



Kuva 7. a) päällystämätön, b) kullalla päällystetty ja c) platinalla päällystetty Al_2O_3 -suodatin

Sputteroitavien metallikerrosten paksuudeksi valikoitui 16 nm (Au) ja 12 nm (Pt), koska kerroksista pyrittiin tekemään optisesti yhtä tiheitä 900 nm aallonpituudella. Aluksi mikroskooppilaseille sputteroitettiin 5, 10, 20 ja 30 nm kerros kultaa (kuva 8 a) sekä 2,5; 5; 10 ja

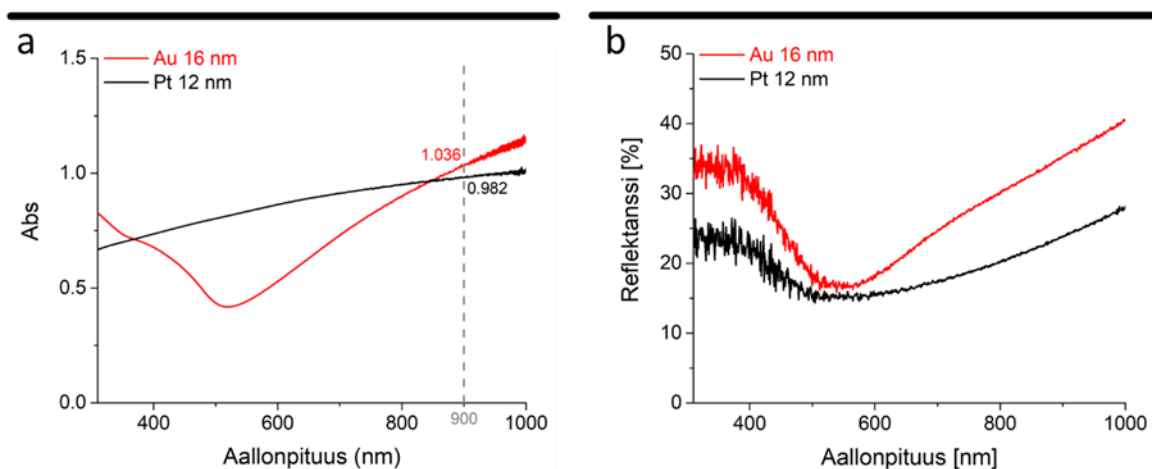
15 nm kerros platinaa (kuva 8 b). Kuvassa 8 on esitetty vasemmalta oikealle aluksi kuvat eripaksuisista metallikerroksista mikroskooppilaseilla, sitten niiden UV-Vis-spektrit ja lopuksi spektreistä saatavista absorbansseista (900 nm aallonpituudella) sovitetut suorat, joista voidaan nähdä vihreällä merkatut metallikerroksien paksuudet, kun absorbanssiksi halutaan 1 (kullalle 15,585 nm ja platinalle 11,956 nm). Paksuudet pyöristettiin lähimpään nanometriin.



Kuva 8. Mikroskooppilaseille sputteroidut a) kulta- ja b) platinakerrokset sekä niiden UV-Vis-spektrit ja 900 nm aallonpituudella oleville absorbansseille sovitetut suorat, joista valittu suodattimille sputteroitavat paksuudet

Mikroskooppilaseille sputteroitettiin vielä 16 nm kulta- ja 12 nm platinakerrokset (näkyvät kuvassa 8). Näistä mitattiin UV-Vis-spektrit, jotka on esitetty kuvassa 9 a. Kuten voidaan huomata, absorbanssi 900 nm aallonpituudella näille metallikerroksille on hyvin lähellä haluttua arvoa (abs = 1). Seuraavaksi sputteroitettiin 16 nm kulta- ja 12 nm platinakerrokset Al_2O_3 -suodattimille ja mitattiin niistä reflektanssispektrit (kuva 9 b). Toisin kuin mikroskooppilaseit, Al_2O_3 -suodattimet eivät päästäneet juurikaan valoa läpi ja näin ollen ne eivät soveltuneet UV-Vis-absorptio mittauksiin, jotka perustuivat näytteen läpäisevän valon absorptioon. Kullalla päällystetyn suodattimen reflektanssispektristä voidaan huomata reflektanssin nousevan, kun aallonpituus on alle 400 nm tai sen ollessa yli 600 nm. Nämä viittaavat suodattimen havaittuun violettiin ja punaiseen sävyyn. Platinalla päällystetyn suodattimen reflektanssispektri on puolestaan paljon tasaisempi mitatulla aallonpituusalueella, mikä viittaa havaittuun harmaaseen sävyyn. Kaikille työssä käytetyille platinapäälysteisille

suodattimille platinakerroksen paksuus oli 12 nm ja kullalla päällystetyille suodattimille kultakerroksen paksuus oli 16 nm.

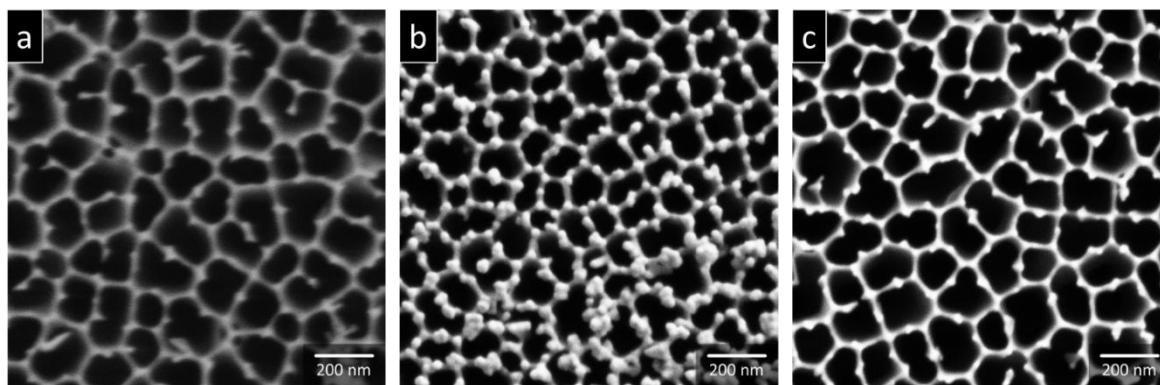


Kuva 9. a) UV-Vis-spektrit 16 nm kulta- ja 12 nm platinakerroksille mikroskooppilaseilla sekä b) reflektanssispektrit 16 nm kulta- ja 12 nm platinakerroksille Al_2O_3 -suodattimilla

Värieroa tasaiselle mikroskooppilasille ja huokoiselle suodattimelle sputteroidussa metallikerroksessa voidaan selittää suodattimen huokoisella rakenteella. Wang et al. sputteroiivat 7 nm kromi- ja hopeakerroksia eri huokoskoon (230-490 nm) Al_2O_3 -substraateille.¹²⁷ Sputteroitujen substraattien väri vaihteli laajasti lähes koko näkyvän valon aallonpituudella riippuen huokoskoosta ja sputteroidusta metallista.¹²⁷ Luonnollisesti huokoisuuden lisäksi tässäkin työssä väriin vaikutti sputteroitava metalli. Wang et al. ottivat myös SEM-kuvia sputteroiduista substraateista ja huomasivat selkeän eron kromi- ja hopeapäällysteisten substraattien morfologiassa.¹²⁷ Punaiselta näyttävässä kromipäällysteisessä substraatissa kromi vaikutti olevan kertynyt isommiksi saarekkeiksi, kun taas keltaiselta näyttävässä hopeapäällysteisessä substraatissa hopea vaikutti olevan tasaisemmin jakautunut huokoiseen pintaan.¹²⁷

Kuvassa 10 on esitetty SEM-kuvat tässä työssä käytetyistä päällystämättömästä, kullalla päällystetystä ja platinalla päällystetystä Al_2O_3 -suodattimesta. Päällystämättömästä suodattimesta saatu SEM-kuva on sumeampi kuin muut, koska yleisesti SEM-kuvauksissa käytetty metallipäällyste parantaa saadun kuvan laatua estämällä näytteen varautumisen ja parantamalla sekundääristen elektronien antamaa signaalia. Kullalla päällystetyille suodattimelle voidaan puolestaan huomata kertyneen suurempia partikkeleita kultaa, kun taas platina näyttää levittäytyneen tasaisesti suodattimen pintaan. Lee et al. sputteroiivat 10 nm kultaa huokoiselle Al_2O_3 -substraatille ja huomasivat myös, että päällystetty kulta on

pikemminkin partikkelien, kuin tasaisen kalvon muodossa.¹²⁸ Koska he tarvitsivat sovellukseensa tasaisen kerroksen, he tekivät kultapartikkeleista koostuvasta päällystyksestä tasaisen kalvon hehkuttamalla sitä.¹²⁸ Tässä työssä huokoiselle Al_2O_3 -suodattimelle muodostuneiden eri kokoisten kultan nanopartikkeleiden aiheuttamien LSP resonanssien voidaan selittää aiheuttavan suodattimelle havaitun sävyn.¹²⁹



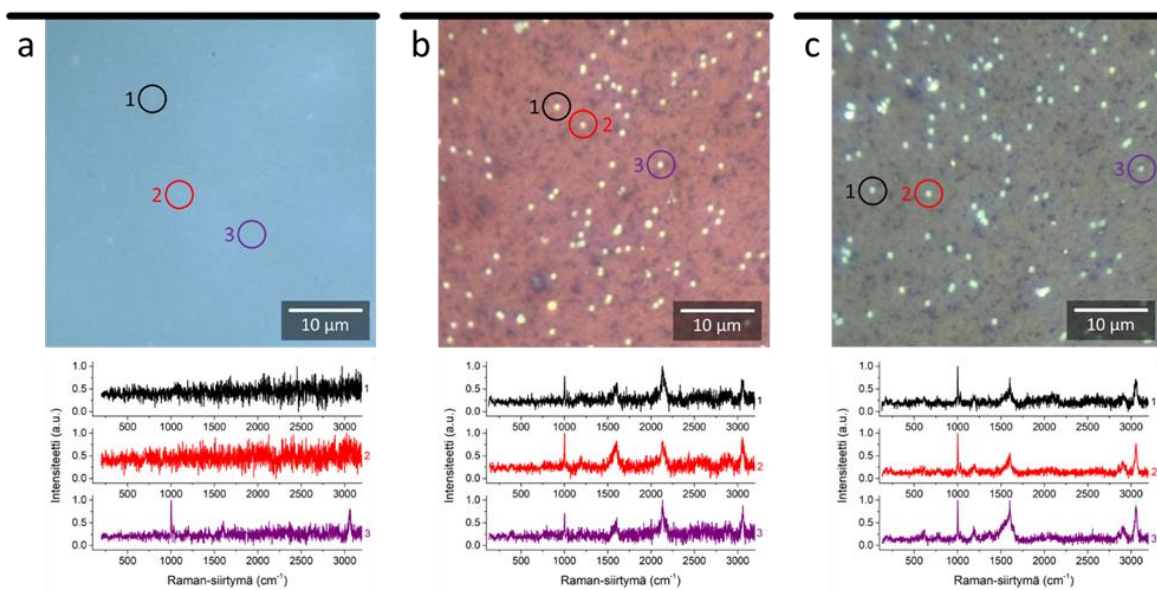
Kuva 10. SEM-kuvat a) päällystämättömästä, b) kullalla päällystetystä ja c) platinalla päällystetystä Al_2O_3 -suodattimesta

Seuraavaksi 500 nm PS-kuulia suodatettiin kulta- ja platinapäällysteisille Al_2O_3 -suodattimille, jotta niiden toimivuus nanomuovien tunnistamiseen voitiin testata. Kuvassa 11 voidaan nähdä, kuinka hyvin PS-kuulat näkyvät mikroskooppikuvissa (100x objektiivi) kulta- ja platinapäällysteisillä suodattimilla parantuneen kontrastieron ansiosta. Valkoiset PS-kuulat näkyvät paremmin tummaa taustaa vasten verrattuna päällystämättömän suodattimen luomaan valkoiseen taustaan. Chang et al. raportoivat, että heidän menetelmällään 800 nm PS-kuulat olivat vielä havaittavissa optisella mikroskoopilla (100x objektiivi), mutta PS-kuulien ollessa 500 nm kokoisia, raportoitiin niiden olevan vaikeita erottaa mikroskooppikuvista.¹³⁰ Myös Yang et al. huomasivat vain yli 500 nm nanomuovien havaitsemisen olevan mahdollista optisella mikroskoopilla (50x objektiivi) heidän valmistamaltaan SERS-substraatilta.¹⁰⁶ Edellä mainittuja tutkimuksia yhdistää nanomuovien taustana oleva karkea pinta, joka voi hankaloittaa pienien partikkelien havaitsemista mikroskoopilla.¹²⁵ Oßmann et al. kokivat tosin jo 1 μm värittömien PS-kuulien havaitsemisen mikroskoopilla (50x objektiivi) olevan haasteellista PC-suodattimilta. Värittömät kuulat eivät näkyneet valkoisella PC-suodattimella, mutta kun suodatin vaihdettiin mustaksi, kaupalliseksi metallipäällysteiseksi tai sille tehtiin metallipäällystys elektronisuihkuhöyrystimellä, saatiin kuulat näkyviin syntyneen kontrastieron seurauksena samaan tapaan kuin tässäkin pro gradu -tutkielmassa.¹²⁵ Mielenkiintoista on, että Oßmann et al.:n tutkimuksessa kuulat näkyivät vain tumman kentän

valaistuksessa (engl. *dark-field illumination*) kun taas tässä pro gradu -tutkielmassa kuulat näkyivät valkoisen valon alla.¹²⁵

Aikaisemmin raportoidut vaikeudet liittyen nanomuovien havaitsemiseen mikroskoopilla voidaan ratkaista käyttäen tässä työssä esiteltyä menetelmää ainakin värittömien nanomuovien osalta. Värittömien PS-kuulien ja tumman suodattimen välisen kontrastieron ansiosta PS-kuulat näkyvät suodattimella selkeästi heijastuneen valon mikroskopiolla. Itämerestä löydettyjen mikromuovien värijakaumaa on pyritty aikaisemmin selvittämään yhtenevin tuloksin. Aigars et al. tutkivat pintavedestä löytyviä mikromuoveja, joista suurin osa (30,1 %) oli valkoisia ja seuraavaksi eniten mustia (24,6 %).¹³¹ Mishra et al. puolestaan raportoivat pintavedestä löydettyjen mikromuovien olevan pääasiassa mustia/harmaita (29,7 %) sekä valkoisia (22,6 %).¹³² Kummankin tutkimuksen mukaan löydettyjen mikromuovikuitujen yleisin väri oli musta tai sininen, kun taas muille kuin kuiduille, tyypillisin väri oli valkoinen.^{131,132} Näiden tulosten valossa tässä työssä kehitettyjen suodattimien uskotaan auttavan myös nanomuovien havaitsemisessa Itämerestä kerätyistä pintavesinäytteistä.

Kulta- ja platinapinnoitusten aikaansaaman SERS-ilmiön vaikutus havaitaan kuvan 11 alla olevista Raman-spektreistä. Mikroskooppikuviin on merkattu kolmesta yksittäisestä PS-kuulasta saadut Raman-spektrit käyttäen 532 nm laseria. Kuten voidaan huomata, kulta- ja platinapäälysteisillä suodattimilla olevista PS-kuulista saadaan jokaisesta PS:lle tyypillinen Raman-spektri toisin kuin päällystämättömällä suodattimella olevista PS-kuulista. Lisäksi Raman-signaalit ovat voimakkaampia metallipäälystettä vasten.

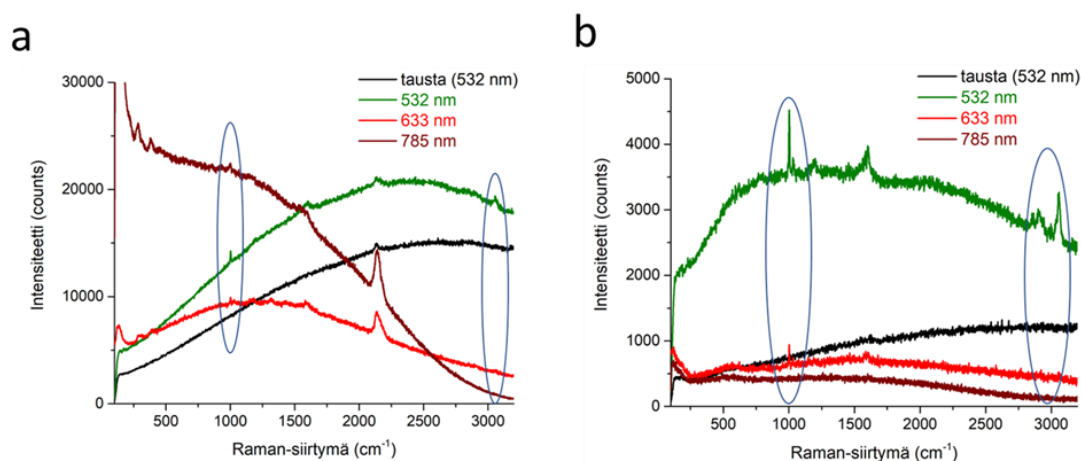


Kuva 11. Mikroskooppikuvat ja Raman-spektrit 500 nm PS-kuulista a) päällystämättömällä, b) kullalla päällystetyllä ja c) platinalla päällystetyllä suodattimella

4.1.1 Raman-signaalin voimistuminen kehittyillä suodattimilla

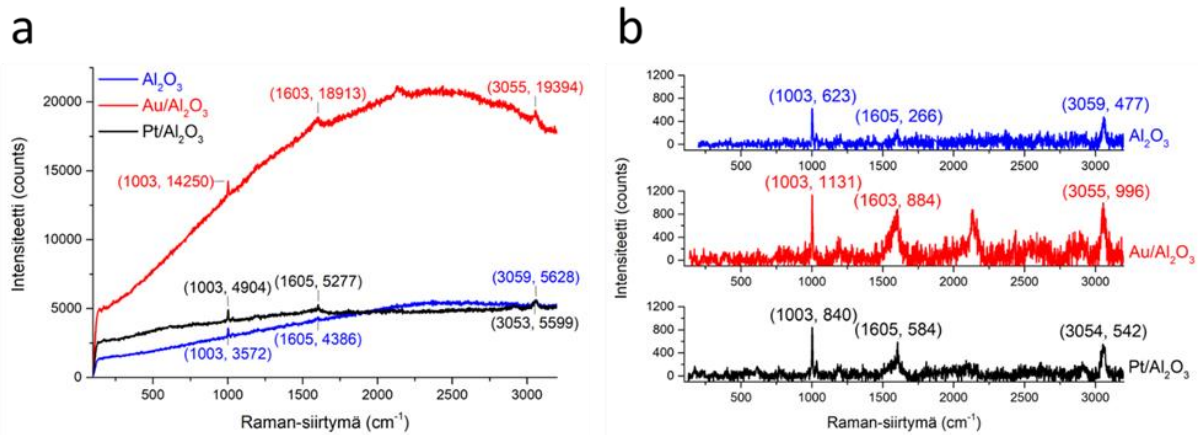
Kulta- ja platinapäällysteisillä suodattimilla olevista PS-kuulista mitattiin Raman-spektrit käyttäen myös suuremman aallonpituuden lasereita (633 ja 785 nm). Kuvassa 12 on esitetty Raman-raakaspektrit eri aallonpituuden lasereilla mitatuista PS-kuulista kulta- ja platinapäällysteisillä suodattimilla. Myös suodattimien (joiden läpi ei ollut suodatettu mitään) luomasta taustasta saatava Raman-raakaspektri 532 nm laserilla on lisätty kuvaajiin. Kumpikin taustasta saatava spektri on hyvin tasainen lukuun ottamatta kultapäällysteisestä suodattimesta saatavaa signaalia 2130 ja 2140 cm^{-1} välillä. Kyseinen piikki voi olla seurausta siitä, että kultaa sputteroidessa voi syntyä syaniyhdisteitä.¹³³ Merlen et al. sputteroivat kultaa lasille ja huomasivat Raman-spektrissä voimakkaan piikin 2135 cm^{-1} kohdalla 514 nm laserilla.¹³³ Kun mittaus suoritettiin 633 nm laserilla, 2135 cm^{-1} kohdalla oleva piikki oli voimakkaampi ja Raman-spektrissä näkyivät lisäksi piikit 130, 300 ja 388 cm^{-1} kohdissa.¹³³ Piikki 2135 cm^{-1} kohdalla johtuu CN-venytyksistä, kun taas pienemmän aaltoluvun piikit viittaavat Au-CN-taivutuksiin.¹³³ Vastaavia tuloksia saatiin myös tässä työssä tehdyissä mittauksissa. Taustasta 532 nm laserilla mitatussa spektrissä näkyy vain piikki 2130 ja 2140 cm^{-1} välillä, mutta suuremmilla aallonpituuksilla PS-kuulista mitatuista spektreistä voidaan huomata kyseisen piikin voimistuvan ja lisäksi kolmen uuden piikin näkyvän pienemmällä aaltoluvun alueella (100–400 cm^{-1}). On myös mahdollista, että signaali 2130 ja 2140 cm^{-1} välillä on seurausta kultapintaan adsorboituneesta CO:sta.^{134–136}

Kuvassa 12 on ympyröitynä sinisellä PS:n tyypilliset piikit Raman-spektrissä. Aaltoluvun 1000 cm^{-1} alueella näkyvä voimakas piikki viittaa PS:n bentseenirenkaan hengitysvärähtelyyn (engl. *ring breathing mode*) ja piikit 3000 cm^{-1} alueella viittaavat puolestaan PS:n symmetrisiin ja asymmetrisiin CH_2 -venytyksiin sekä aromaattiseen CH -venytykseen.¹³⁷ Kultapäällysteisellä suodattimella olevista PS-kuulista saatiin kaikilla kolmella eri aallonpituuden laserilla 1000 cm^{-1} piikki näkyviin, mutta vain 532 nm laserilla saatiin myös 3000 cm^{-1} alueella olevat piikit näkyviin 100 s mittausajalla. Platinapäällysteisellä suodattimella olevista kuulista saatiin puolestaan vain 532 nm ja 633 nm laserilla 1000 cm^{-1} piikki näkyviin. Laserin aallonpituuden ollessa 785 nm ei PS-kuulista saatu enää tunnistettavaa spektriä. Tälläkin suodattimella 532 nm laserilla saatiin 3000 cm^{-1} alueen piikit näkyviin. Kuten kuvasta 12 voidaan nähdä, platinapäällysteinen suodatin yhdessä 532 nm laserin kanssa toimii parhaiten 500 nm PS-kuulien tunnistamiseen.



Kuva 12. Raman-raakaspektrit 500 nm PS-kuulista eri aallonpituuden lasereilla sekä taustasta mitattu Raman-raakaspektri a) kultapäällysteiseltä ja b) platinapäällysteiseltä suodattimelta

Kuvassa 13 a on esitetty yksittäisistä PS-kuulista saatavat Raman-raakaspektrit eri suodattimilla. Spektreihin on merkattu PS:n tyypillisten piikkien huiput ~ 1000 , ~ 1600 ja $3050\text{--}3060\text{ cm}^{-1}$ kohdilla. Kuvasta 13 a voidaan myös huomata, kuinka erilaiset taustat suodattimesta siroaa eri lasereita käytettäessä. Näillä vaihtelevilla taustoilla on negatiivinen vaikutus spektrien kvantitatiiviseen sekä kvalitatiiviseen analysointiin, minkä vuoksi taustojen poistoa suositellaan raakaspektreistä.¹³⁸ Myös nanomuovitutkimuksissa taustojen poisto on hyvin yleistä.^{85,103,105,106,139} Aina taustaa ei kuitenkaan ole poistettu (engl. *baseline correction*) spektreistä.¹⁰⁴ Tällä voi olla suuri merkitys EF:n suuruuteen. Tässä työssä spektreistä on poistettu taustat WiRE-ohjelmalla (kuva 13 b).



Kuva 13. Raman-spektrit muokkaamattomina (a) ja tausta poistettuina (b) yksittäisistä 500 nm PS-kuulista päällystämättömällä (Al_2O_3), kultapäällysteisellä ($\text{Au}/\text{Al}_2\text{O}_3$) ja platinapäällysteisellä ($\text{Pt}/\text{Al}_2\text{O}_3$) suodattimella. Piikkien huiput on merkattu spektreihin muodossa: (Raman-siirtymä, Intensiteetti).

Yksittäisistä nanomuoveista EF on usein laskettu yhtälön 3 (EF') mukaisesti.^{85,106} Xu et al. tutkivat 360 ja 500 nm sekä 1, 2 ja 5 μm PS-kuulista saatavaa Raman-signaalia kaupallisilla Klarite-SERS- ja lasisubstraateilla. He määrittivät yhtälön 3 $N:n$ ja $N_{\text{SERS}}:n$ arvoiksi 1, koska Raman-spektrit mitattiin samanlaisesta yksittäisestä partikkelista aluksi lasisubstraatilla ja sitten Klarite-substraatilla. Alle 1 μm PS-kuulista lasisubstraatilla ei saatu PS:n Raman-signaalia, johon SERS-ilmion kanssa saatua signaalia kuitenkin verrattiin.⁸⁵

Yang et al. puolestaan tutkivat 50, 100, 300, 500 ja 1000 nm PS-kuulista saatavaa Raman-signaalia Al_2O_3 -suodattimella sekä heidän kehittämällään hopea-nanolanka (engl. *silver nanowire*, AgNW) suodattimella. He määrittivät $N:n$ arvoksi 1, kun taas N_{SERS} arvioitiin lasersäteen pinta-alan mukaan Al_2O_3 -suodattimella, jonka oletettiin olevan tasaisesti täynnä PS-kuulia. Pienimpiä 50 nm PS-kuulia laskettiin olevan suodattimella lasersäteen pinta-alalla 3159 kpl.¹⁰⁶

Lee et al. kuvailivat heidän aikaansaamansa SERS-ilmion suuruutta prosentuaalisesti. He lisäsivät 600 nm PS-kuulien sekaan 50 nm kultananopartikkeleita, jotka aggregoituiivat PS-kuulien pintaan ja paransivat näin PS-kuulista saatavaa Raman-signaalia. PS-kuulista, joihin oli aggregoitunut kultananopartikkeleita, saatavaa Raman-signaalia verrattiin signaaliin, joka saatiin pelkistä PS-kuulista. SERS-ilmion suuruus vaihteli riippuen aggregoituneiden kultananopartikkelien määrästä.¹³⁹

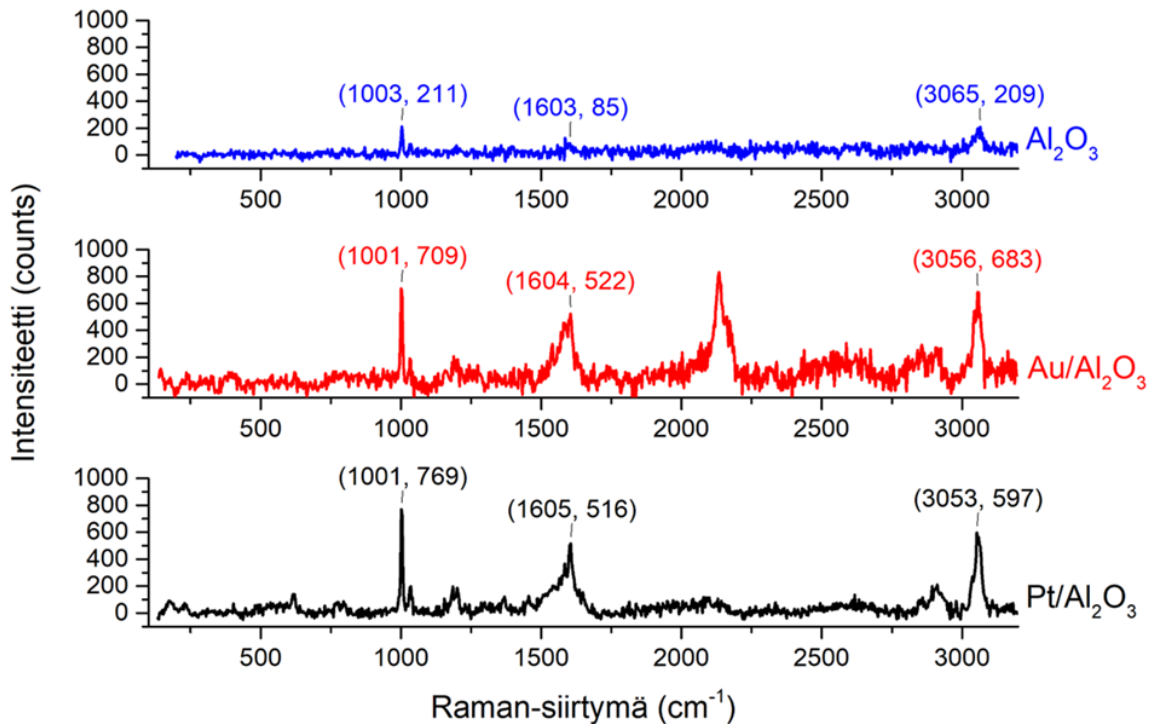
Myös yhtälöä 2 (AEF) on sovellettu yksittäisistä nanomuoveista saatavaan parannetun Raman-signaalin arvioimiseen. Yoo et al. sputteroivat piisubstraatin pintaan ohutkerroksen hopeaa, jonka päälle he tallettivat 125 ja 200 nm PS-kuulia. Kyseisistä kuulista ei kuitenkaan saatu

Raman-signaalia ilman SERS-ilmiötä ja näin ollen he vertasivat yksittäisestä 125 tai 200 nm kuulasta (hopealla) saatavaa signaalia 800 nm PS-kuulan (piisubstraatilla) signaaliin. Kuulien välisen konsentraatiosuhteen (c/c_{SERS}) he laskivat kuulien tilavuuden ja tiheyden avulla.¹⁰⁴

Kaikki edellä mainitut kirjallisuudessa esiintyvät EF:t yksittäisien PS nanomuovien tapauksissa on esitetty taulukossa 2. EF on laskettu kaikissa tapauksissa PS:lle ominaisien Raman-spektrien piikkien ~ 1000 tai ~ 1600 cm^{-1} intensiteettejä vertaamalla. Missään edellä mainituissa tutkimuksissa ei ollut mitattu piikkejä ~ 3000 cm^{-1} alueelta. Syynä voi olla se, että aallonnumeroaluetta rajaamalla voidaan lyhentää Raman-mittausaikoja.

Tässä työssä vain osasta 500 nm PS-kuulia saatiin Raman-signaali ilman SERS-ilmiötä, joten EF voidaan arvioida usealla eri tavalla. Kuvassa 13 yksittäisestä PS-kuulasta päällystämättömällä Al_2O_3 -suodattimella on saatu PS:lle tyypillinen Raman-spektri. Yksinkertainen tapa tässä tapauksessa on verrata spektrin ~ 1000 tai ~ 1600 cm^{-1} piikin intensiteettiä vastaaviin metallipäällysteisillä suodattimilla olevista PS-kuulista saataviin Raman-signaaleihin yhtälön 3 mukaisesti, jossa N ja N_{SERS} ovat 1. Niin muokkaamattomista kuin muokatuistakin spektreistä lasketut EF-arvot on esitetty taulukossa 2.

Toinen tapa, joka kuvaa paremmin tässä työssä saatua tulosta, on keskiarvoistaa kolmesta yksittäisestä PS-kuulasta saadut Raman-spektrit ja verrata näitä toisiinsa. Kuvassa 14 on esitetty kolmesta yksittäisestä kuulasta (kuva 11) saatujen Raman-spektrien (taustat poistettu) keskiarvoistetut spektrit päällystämättömällä sekä kullalla ja platinalla päällystetyllä suodattimella. Tämä vastaa sitä, että yhtälössä 3, I ja I_{SERS} olisivat kolmen yksittäisen kuulan Raman-signaalin (esimerkiksi ~ 1000 cm^{-1}) intensiteettien yhteenlaskettu summa ja N sekä N_{SERS} olisivat kumpikin 3. Spektrien keskiarvoistuksen ansiosta EF:t voidaan laskea suoraan vertaamalla kuvassa 14 näkyviä intensiteettejä yhtälön 1 mukaisesti. Lasketut EF:t on esitetty taulukossa 2.



Kuva 14. Kolmesta yksittäisestä 500 nm PS-kuulasta saatujen Raman-spektrien keskiarvoistetut spektrit eri suodattimilla. Piikkien huiput on merkattu spektreihin muodossa: (Raman-siirtymä, Intensiteetti).

Taulukosta 2 voidaan nähdä, että suurin EF:n arvo (6,1) niin kulta- kuin platinapäälysteisellekin suodattimelle saadaan vertaamalla PS:n $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ piikkejä keskiarvoistetuista spektreistä. Tuloksista voidaan huomata myös se kuinka paljon EF:n suuruus vaihtelee laskutavasta riippuen. Kultapäälysteiselle suodattimelle raakaspektreistä laskettu EF on huomattavasti suurempi verrattuna EF:n, joka on laskettu spektreistä, joista on poistettu tausta. Tämä johtuu kultapäälysteisen suodattimen aiheuttamasta korkeasta taustasta (kuva 13 a). Keskiarvoistetuista spektreistä lasketut EF:t ovat puolestaan keskimääräistä korkeammat, koska niissä on huomioitu se, että vain osasta PS-kuulia saatiin Raman-signaali päälystämättömällä Al_2O_3 -suodattimella. Lisäksi verrattavalla piikillä (~ 1000 vai $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$) on merkittävä vaikutus EF:n suuruuteen. Spektrien $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ piikeistä lasketut EF:t olivat lähes jokaisessa tapauksessa suurempia.

Samankaltaisimpia tuloksia ovat raportoineet Lee et al. Vaikka he ovatkin kuvailleet Raman-signaalin parantumista prosentuaalisesti, on tulokset helposti verrattavissa keskenään (100 % = 1). He mittasivat sekä normaalin, että SERS-Raman-signaalin yksittäisestä PS-kuulasta. Käytetyt kuulat olivat lähes samankokoisia, joista he saivat ilman SERS-ilmiötä heikon, mutta tunnistettavan Raman-signaalin. He raportoivat, että Raman-signaali parani 264,0 % (jos

laskettu $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ piikeistä) tai 324,8 % (jos laskettu $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ piikeistä). Nämä vastaavat siis EF:n arvoja 2,64 ja 3,248.¹³⁹

Muihin taulukossa 2 esitettyihin tutkimuksiin vertaaminen on haastavampaa erilaisten määrittystapojen takia. Xu et al. raportoivat Klarite-substraatille, jolla on 500 nm PS-kuulia, EF:n olevan 127, mutta he vertasivat SERS-ilmiön kanssa saatua Raman-spektriä normaaliin Raman-spektriin, josta ei voitu tunnistaa PS:n tyypillisiä piikkejä.⁸⁵ Tämä selittää huomattavasti suurempaa EF:n arvoa verrattuna tässä työssä esitettyihin arvoihin.

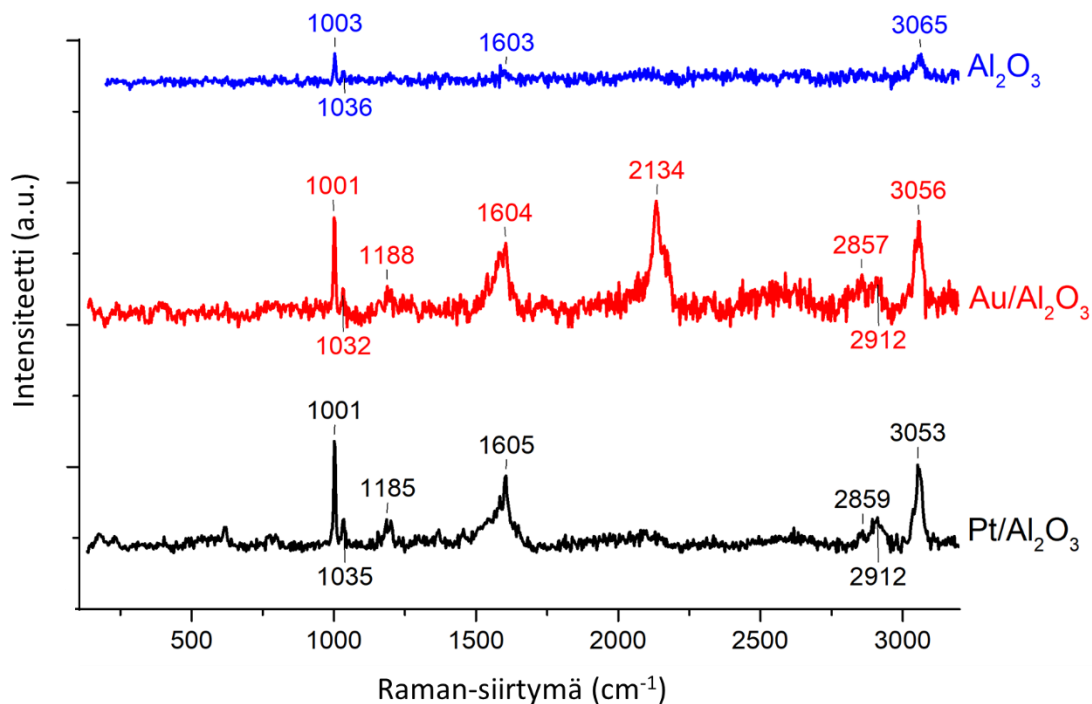
Yang et al. vertasivat AgNW-suodattimella olevan yksittäisen PS-kuulan Raman-signaalin ($\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$) intensiteettiä (I_{SERS}) intensiteettiin (I), joka saatiin Al_2O_3 -suodattimella olevista samankokoisista kuulista.¹⁰⁶ Tässä tapauksessa Al_2O_3 -suodattimen oletettiin kuitenkin olevan tasaisesti PS-kuulien peitossa, joten intensiteetti (I) jaettiin PS-kuulien lukumäärällä (N), joka arvioitiin lasersäteiden alueen perusteella.¹⁰⁶ Tämä arvioitu lukumäärä voi olla todellisuutta suurempi, joka voi osaksi selittää raportoituja suuria EF:n arvoja.

Yoo et al. puolestaan vertasivat SERS-substraatilla olevista 125 ja 200 nm PS-kuulista saatavan Raman-signaalin ($\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$) intensiteettiä piisubstraatilla olevista 800 nm PS-kuulista saatavaan Raman-signaalin intensiteettiin.¹⁰⁴ Intensiteetit jaettiin konsentraatioilla, jotka oli laskettu kuulien koon perusteella.¹⁰⁴ Tätä tapaa (AEF) käytetään kuitenkin yleensä mittaamaan SERS-ilmiön suuruutta suoraan liuoksesta tai liuoksesta, joka on kuivattu jollekin tasolle.^{103,105} Konsentraatiolla viitataan näissä tapauksissa siis liuokseen eikä yksittäiseen kiinteään partikkeliin. Tavan soveltaminen yksittäisiin partikkeleihin voi aiheuttaa poikkeavuutta EF:n suuruuteen.

Taulukko 2. Tässä työssä lasketut EF:t verrattuna kirjallisuudessa esiintyviin arvoihin

Tekijä	Näyte	SERS-menetelmä	Raakaspektri, tausta poistettu vai keskiarvoistettu	EF ~1000 cm ⁻¹	EF ~1600 cm ⁻¹
Tämä työ	PS 500 nm	Au/Al ₂ O ₃ -suodatin	raakaspektri	4,0	4,3
			tausta poistettu	1,8	3,3
			keskiarvoistettu	3,4	6,1
		Pt/Al ₂ O ₃ -suodatin	raakaspektri	1,4	1,2
			tausta poistettu	1,3	2,2
			keskiarvoistettu	3,6	6,1
Xu et al. ⁸⁵	PS 360 nm				172
	PS 500 nm				127
	PS 1 µm	Klarite-substraatti	tausta poistettu	-	97
	PS 2 µm				12
	PS 5 µm				20
Yang et al. ¹⁰⁶	PS 50 nm			238096,10	
	PS 100 nm			44168,85	
	PS 300 nm	AgNW-suodatin	tausta poistettu	840,36	-
	PS 500 nm			299,42	
	PS 1 µm			75,07	
Lee et al. ¹³⁹	PS 600 nm	Au-nanopartikkelit	tausta poistettu	264,0 %	324,8 %
Yoo et al. ¹⁰⁴	PS 125 nm	Ag/Si-substraatti	raakaspektri	2787	-
	PS 200 nm			2893	

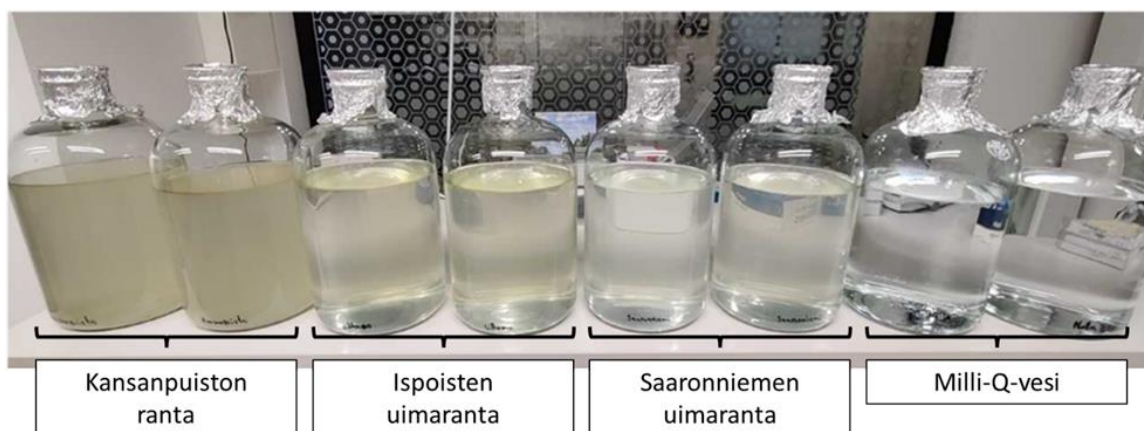
Kuten edellä on huomattu, EF:n suuruus määräytyy lukuisten tekijöiden summana, eikä se kerro kaikkea tässä työssä päällystettyjen suodattimien toimivuudesta. Keskiarvoistettuja spektrejä vertaamalla voidaan huomata, kuinka metallipäällysteisillä suodattimilla olevista PS-kuulista saadaan enemmän tunnistettavia PS:n ominaispiikkejä (kuva 15). Päällystämättömällä suodattimella olevista PS-kuulista saatavasta spektristä voidaan havaita selkeät Raman-signaalit 1001 ($\nu(\text{CC})$ bentseenirenkaan hengitysvärähtely) ja 3065 cm^{-1} ($\nu(\text{CH})$) kohdalla.¹³⁷ Spektristä näkyy hyvin heikosti myös signaalit 1036 ($\delta(\text{CH})$) ja 1603 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{C})$) kohdalla.¹³⁷ Nämä signaalit näkyvät huomattavasti voimakkaammin kullalla ja platinalla päällystetyillä suodattimilla. Näillä suodattimilla PS-kuulista saadaan lisäksi signaalit kohdissa ~1190 ($\delta(\text{CH})$), ~2860 ($\nu_s(\text{CH}_2)$) ja 2912 cm^{-1} ($\nu_{as}(\text{CH}_2)$).^{137,140}



Kuva 15. Raman-signaalit keskiarvostetuissa spektreissä

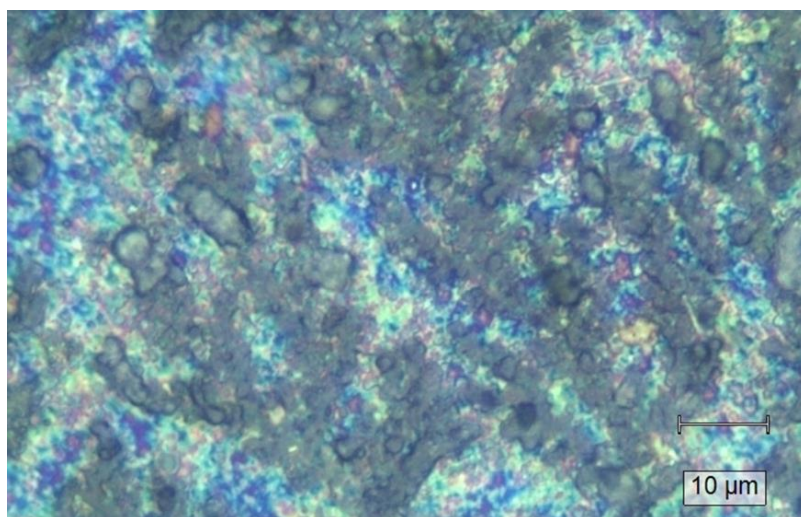
4.2 Merivesi ja nanomuovit

Kuvassa 16 on samana päivänä (14.7.2022) kerätyt merivesinäytteet kolmesta eri näytteenottopaikasta. Kuten meriveden väristä voidaan päätellä, merivedessä on paljon muutakin kuin muovia ja vettä. Kuvasta voidaan myös huomata, kuinka paljon meriveden laatu vaihtelee riippuen näytteenottopaikasta. Muovien erottelu voi olla haastavampaa, mitä enemmän eloperäistä (levää, planktoneita, bakteereita ym.) ja epäorgaanista (hiekkaa, savea ym.) ainesta merivesinäytteessä on.



Kuva 16. Turun seudun uimarannoilta kerätyt (14.7.2022) pintavesinäytteet ja vertailukohtana Milli-Q-vesi

Edellä esiteltyjä Raman-signaalia parantavia suodattimia testattiin osana nanomuovien erotteluprosessia merivedestä. Jos merivettä suodatetaan käsittelemättömänä, suodattimelle kertyy kuitenkin niin paljon ainesta, että siitä on vaikea erottaa nanomuoveja. Kuvassa 17 on mikroskooppikuva platinapäälysteisestä Al_2O_3 -suodattimesta, jolle on suodatettu 100 ml käsittelemätöntä merivettä. Suodattimen pintaa ei pystytä näkemään ja yksittäisten partikkelien erottaminen toisistaan on hyvin haastavaa. Jotta suodattimen SERS-ilmiötä voitaisiin käyttää, tulisi nanomuovien olla korkeintaan muutaman nanometrin päässä platinapinnasta.¹⁴¹ Jos nanomuovit ovat puolestaan kuvassa 17 esiintyvän suodattimelle jääneen materiaalin päällä, ei platinapäälysteisestä suodattimesta ole apua niiden tunnistuksessa. Muusta materiaalista kuin muoveista tulisi siis päästä eroon, jotta muovien tunnistus suodattimelta olisi mahdollista.

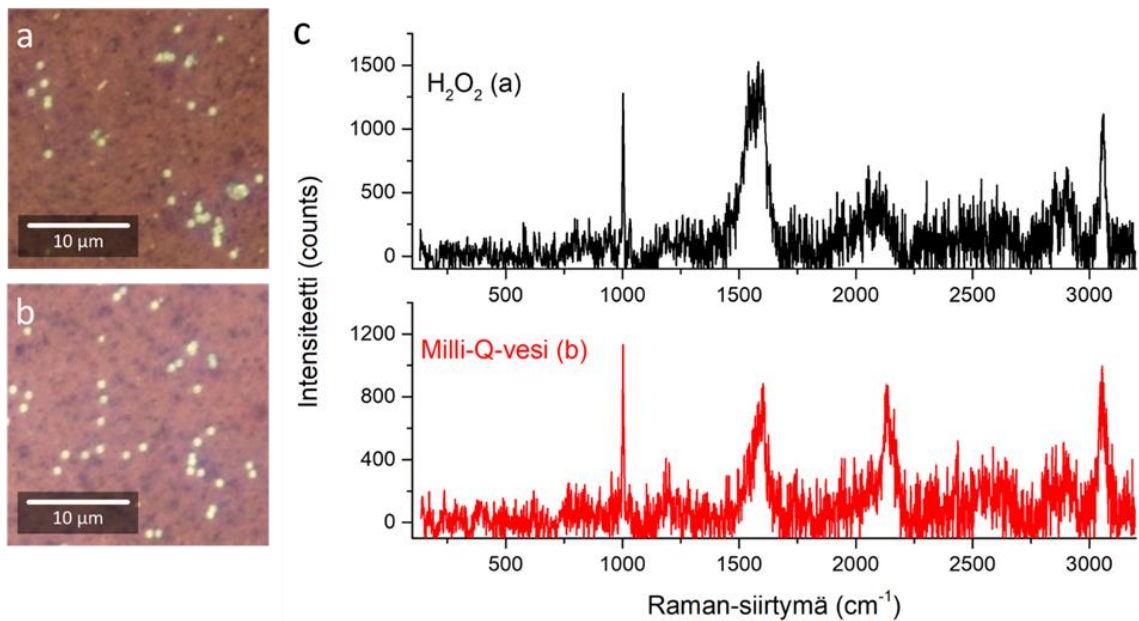


Kuva 17. 100 ml käsittelemätöntä merivettä suodatettuna platinapäälysteiselle Al_2O_3 -suodattimelle

4.2.1 PS-kuulien yhteensopivuus käytettyjen erottelumenetelmien kanssa

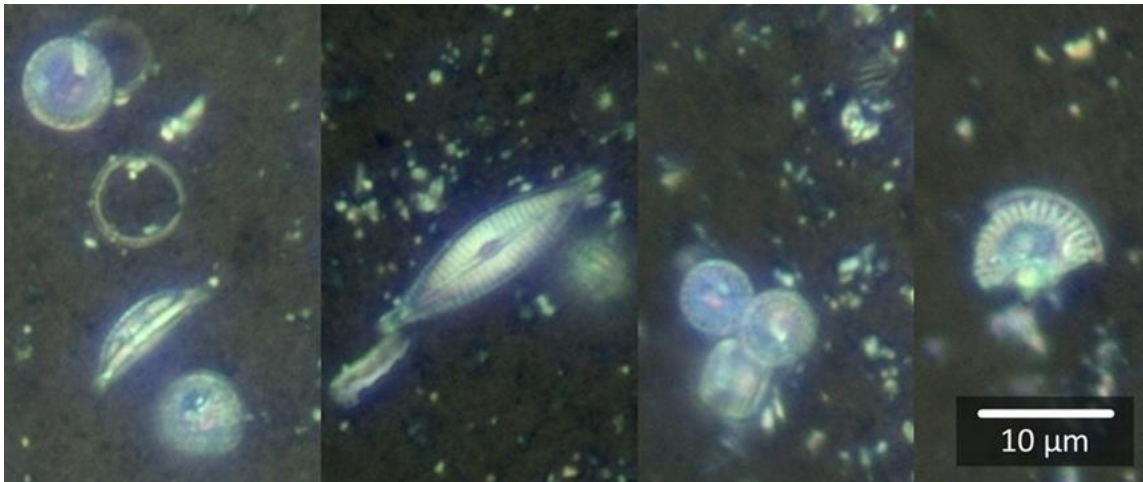
Aluksi yleisesti mikromuovitutkimuksissa käytetyn 30 % H_2O_2 :n vaikutusta 500 nm PS-kuuliin testattiin antamalla kuulien olla vuorokauden ajan H_2O_2 :ssa 50 °C:ssa. Kuulat H_2O_2 :ssa suodatettiin kultapäälysteiselle suodattimelle, koska H_2O_2 reagoi voimakkaasti platinan kanssa, muttei kullan kanssa. Kuvassa 18 on esitetty, miltä H_2O_2 :ssa olleet kuulat näyttävät (a) verrattuna Milli-Q-vedessä olleisiin kuuliin (b) mikroskooppikuvissa, ja minkälaiset Raman-spektrit yksittäisistä kuulista saadaan (c). Mikroskooppikuvista ei ole huomattavissa, että kuulien ulkonäkö olisi muuttunut. Kuvissa suodattimien pinnat näyttävät erivärisiltä, mikä on selitettävissä Raman-mikroskoopin valaistuseroista näiden kahden kuvauksen välillä. H_2O_2 :ssa

olleen kuulan Raman-spektristä voidaan huomata PS:n tyypilliset Raman-signaalit, eikä spektrissä ole merkittäviä eroja Milli-Q-vedessä olleisiin PS-kuuliin verrattuna.



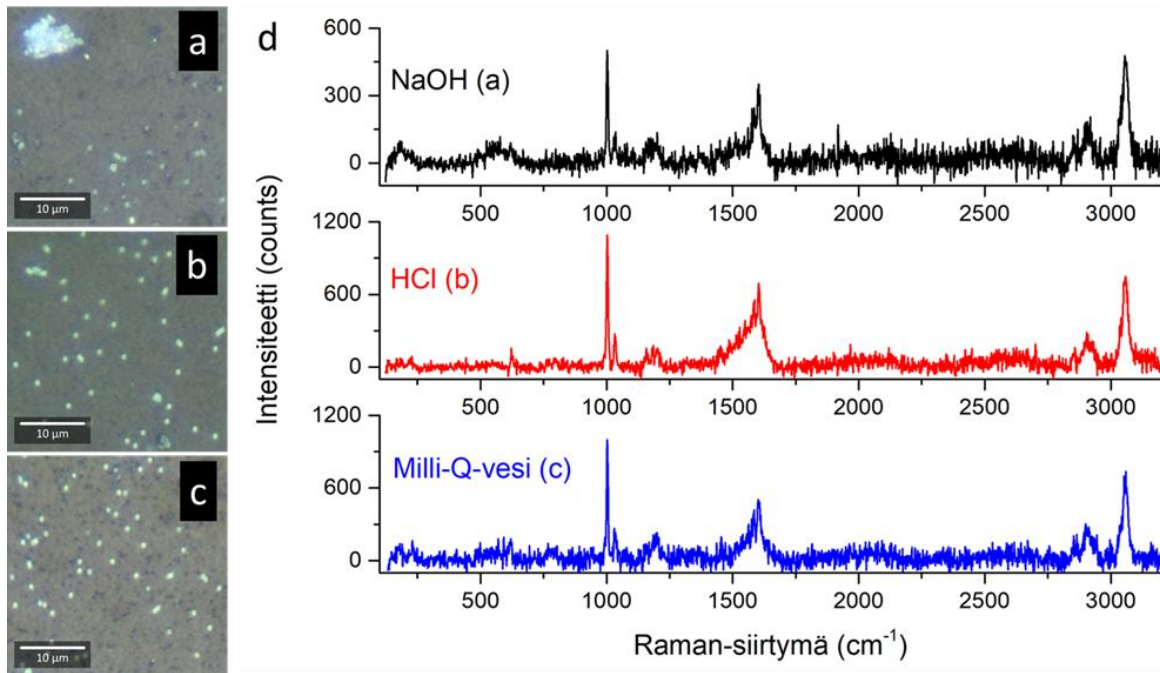
Kuva 18. Kultapäälysteiselle Al_2O_3 -suodattimelle suodatetut 500 nm PS-kuulat a) H_2O_2 :ssa ja b) Milli-Q-vedessä sekä c) niistä saadut Raman-spektrit

Koska H_2O_2 ei vahingoittanut PS-kuulia, käytettiin sitä eloperäisen aineen poistoon merivesinäytteestä. Merivesi suodatettiin aluksi PC-suodattimelle, joka siirrettiin H_2O_2 :in. H_2O_2 suodatettiin uudelleen PC-suodattimelle, josta suodattimen päälle jäänyt aines huuhdeltiin Milli-Q-vedellä Pt/ Al_2O_3 -suodattimelle. Kuvassa 19 voidaan huomata, että suodattimen pinta on nähtävissä, mutta jäljellä on muun muassa hajoamattomia piilevien kuoria, jotka koostuvat SiO_2 :sta.¹⁴² Taustalla näkyy myös paljon pienempiä partikkeleita, jotka voivat olla piilevien kuorien palasia. Esimerkiksi lisääntyessään piilevät voivat hajottaa oman SiO_2 -kuorensa pienemmiksi palasiksi.¹⁴² Yleensä SiO_2 :n liuottamiseen on käytetty HF:a, mutta kyseessä on hyvin vaarallinen happo, joka voi syövyttää myös työssä käytettävät lasiastiat.¹⁴³ Toinen tapa on käyttää NaOH:a, joka on myös yleisesti tunnettu menetelmä SiO_2 :n liuottamiseksi.^{144,145}



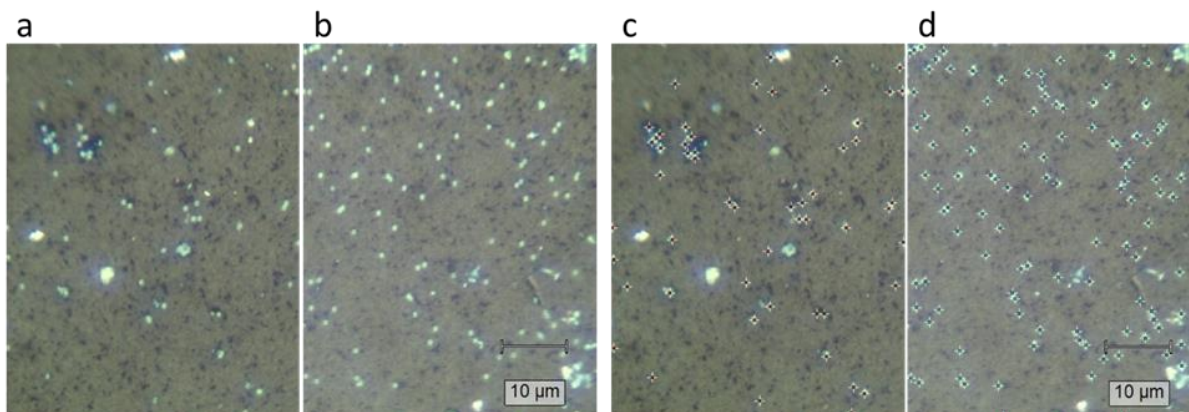
Kuva 19. Mikroskooppikuvia pelkällä H_2O_2 :lla käsitellystä merivesinäytteestä

NaOH:n vaikutusta 500 nm PS-kuuliin kokeiltiin antamalla kuulien olla 1 M NaOH:ssa vuorokauden ajan. Lisäksi HCl:n vaikutusta kuuliin testattiin samalla tavalla antamalla kuulien olla 10 % HCl:ssa vuorokauden verran. Kuvassa 20 on esitetty vasemmalla mikroskooppikuvat PS-kuulista, jotka ovat olleet a) NaOH:ssa, b) HCl:ssa ja vertailuna c) Milli-Q-vedessä. Yksittäisistä kuulista mitatut Raman-spektrit on esitetty kuvassa 20 d. NaOH:ssa olleiden kuulien voidaan huomata aggregoituneen osittain ja Raman-spektri on intensiteetiltään matalampi. Kuulat näyttävät suodattimella haaleammilta verrattuna Milli-Q-vedessä olleisiin kuuliin. Yksittäisiä kuulia on kuitenkin helposti havaittavissa ja Raman-spektristä on tunnistettavissa PS:n pääpiikit. Suodatin, jolle suodatettiin PS-kuulia HCl:ssa, näyttää puolestaan mikroskooppikuvassa puhtaammalta kuin suodatin, jolle suodatettiin Milli-Q-vedessä olleita PS-kuulia. Myös kuulat näyttävät vahingoittumattomilta ja yksittäisestä kuulasta saatava Raman-spektri on selkeästi PS:n.



Kuva 20. Platinapäälysteisille Al_2O_3 -suodattimelle suodatetut 500 nm PS-kuulat a) NaOH:ssa, b) HCl:ssa ja c) Milli-Q-vedessä sekä d) niistä saadut Raman-spektrit

Kuten edellä mainittiin, merivettä käsiteltiin H_2O_2 :ssa niin, että merivesi suodatettiin aluksi PC-suodattimelle, joka siirrettiin H_2O_2 :in, joka suodatettiin edelleen. Suodattimen vaihdossa oletettiin aiemmin suurimman osan aineksesta pysyvän prosessissa mukana. Tätä testattiin myös PS-kuulilla, jotka suodatettiin aluksi PC-suodattimelle. Suodatin siirrettiin keittopulloon, josta suodattimella olevat kuulat huuhdottiin kolmesti Milli-Q-vedellä Pt/ Al_2O_3 -suodattimelle. Kuvassa 21 a on esitetty mikroskooppikuva kyseisestä Pt/ Al_2O_3 -suodattimesta. Vieressä (b) on verrattavana sama määrä PS-kuulia, jotka suodatettiin suoraan Pt/ Al_2O_3 -suodattimelle. Kuvassa 21 c ja d näkyvät samat mikroskooppikuvat (a ja b), joihin on merkattu lasketut kuulat. Kuulia laskettiin olevan jäljellä 55 kpl mikroskooppikuvan alueella (c), kun kuulat olivat aluksi suodatettu PC-suodattimelle. Kuulia, jotka oli suoraan suodatettu Pt/ Al_2O_3 -suodattimelle (d), laskettiin olevan 109 kpl. Suodattimella näkyy myös isompia partikkeleita, jotka on jätetty laskuista pois. Laskettu määrä voi olla kummassakin tapauksessa siis hieman todellisuudesta poikkeava. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin huomata, että noin puolet kuulista pysyvät prosessissa mukana, vaikka suodatinta vaihdettiin. Tämän perusteella suodattimien vaihtelu tulisi pitää mahdollisimman vähäisenä käsiteltäessä merivettä.

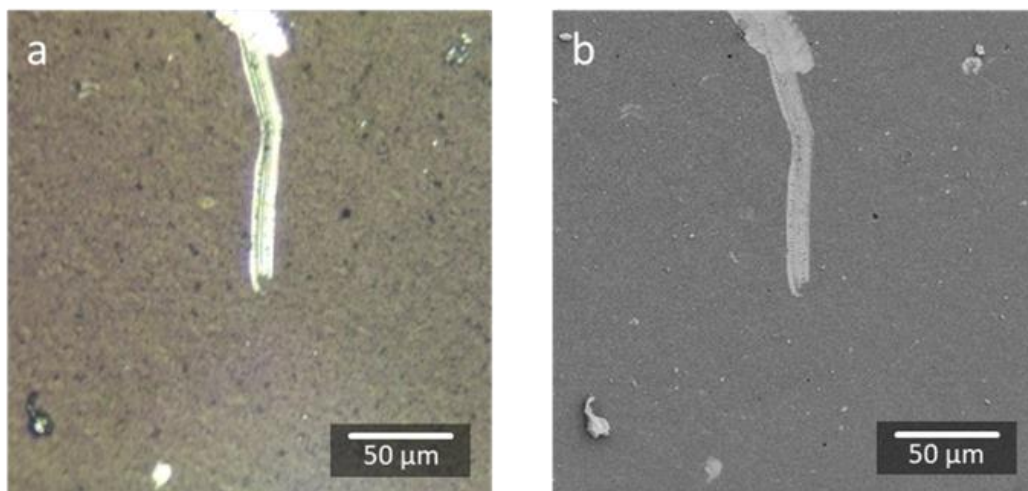


Kuva 21. Mikroskooppikuvat 500 nm PS-kuulista, jotka on suodatettu a) aluksi PC-suodattimelle ja sitten vasta Pt/Al₂O₃-suodattimelle, b) suoraan Pt/Al₂O₃-suodattimelle ja c, d) samat kuvat kuin a ja d, joihin on merkattu lasketut kuulat

4.2.2 Käsitelystä merivesinäytteestä löytyneitä muoveja

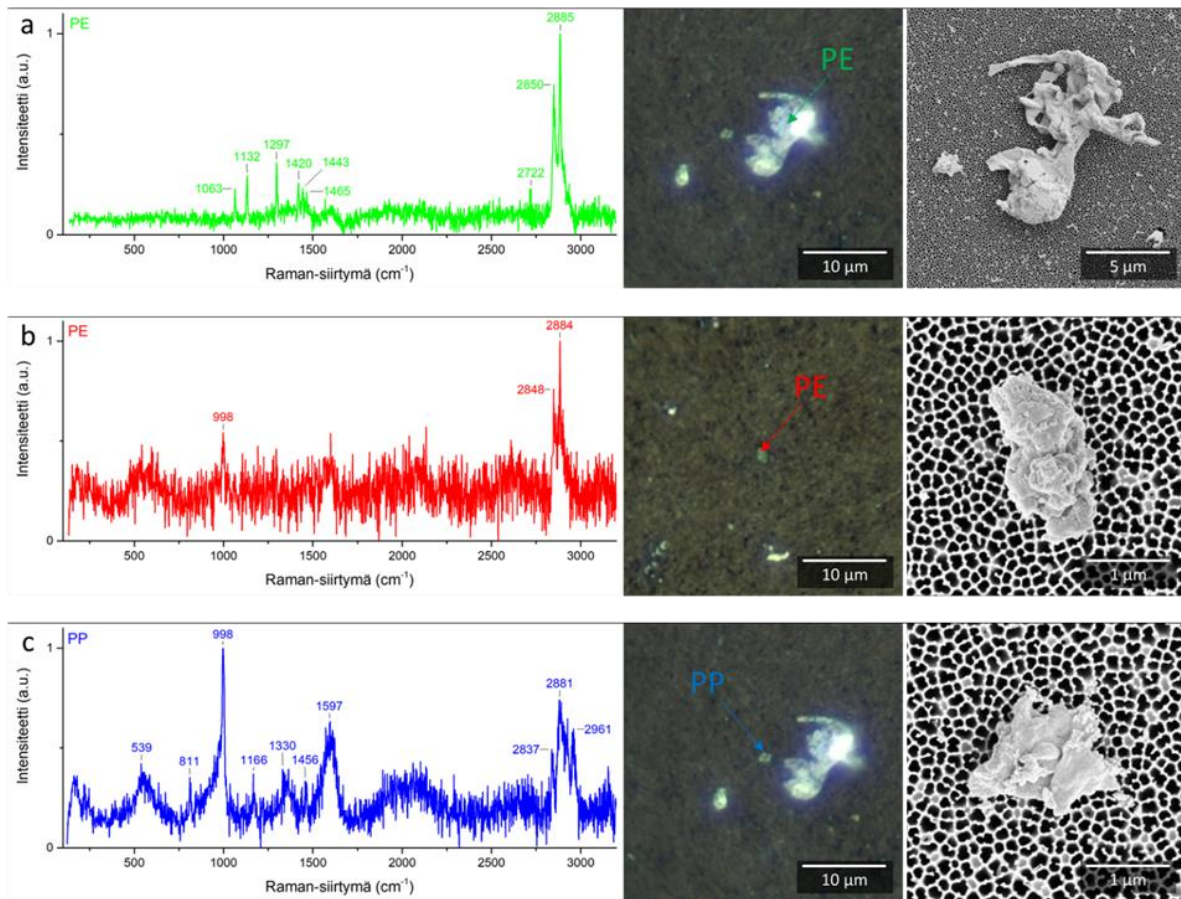
Seuraavaksi edellä testattuja aineita ja menetelmiä käyttämällä käsiteltiin 2 l merivettä, josta löydettiin pieniä muovipartikkeleita. Ohessa tehtiin myös nolla- (Milli-Q-vesi) ja referenssinäyte (500 nm PS-kuulat Milli-Q-vedessä), jotka kävivät saman prosessin läpi meriveden kanssa. Aluksi näyte (merivesi-, nolla- tai referenssinäyte) suodatettiin PC-suodattimelle. Suodatin siirrettiin H₂O₂:in, joka myöhemmin suodatettiin uudelle PC-suodattimelle, jota käsiteltiin HCl:ssa ja NaOH:ssa. Ennen lopullista suodatusta Pt/Al₂O₃-suodattimelle, näytteelle suoritettiin vielä raskasnestekäsittely sentrifugoinnin kanssa. Tämän tarkoituksena oli erotella muovit muista tiheimmistä aineista, joita liuoksessa olisi mahdollisesti jäljellä (hiekkaa ym.).

Suodattimien karakterisointi aloitettiin käsitelystä merivesinäytteestä Raman-mikroskoopilla. Suodattimen, jolle käsitelty merivesinäyte oli suodatettu, keskelle tehtiin injektioneulalla naarmu, jota käytettiin nollapisteenä suodattimen mikroskopoinnissa, ja jonka avulla voitiin myöhemmin ottaa SEM-kuvia samoista partikkeleista. Kuvassa 22 näkyy naarmu a) Raman-mikroskoopilla ja b) SEM:lla. Suodattimen pinta näkyy kuvassa selkeästi ja ympärillä näkyy yksittäisiä partikkeleita.



Kuva 22. Pt/Al₂O₃-suodattimelle tehty naarmu a) mikroskooppi- ja b) SEM-kuvassa

Kuvassa 23 on esitetty käsitellystä merivesinäytteestä löytyneitä muoveja. Kuvassa 23 a esitetty PE-partikkeli ei ole alle 1 µm:n kokoinen, mutta se on lisätty havainnollistamaan kehitetyn menetelmän kykyä kuvata samoja partikkeleita aluksi Raman-mikroskoopilla ja sen jälkeen SEM:lla. Partikkelin Raman-spektristä voidaan erottaa selkeästi PE:n tunnusomaiset piikit. Piikit kohdissa 1297, 1420, 1443 ja 1465 cm⁻¹ viittaavat CH₂-taivutuksiin, kun taas piikit 1063 ja 1132 cm⁻¹ viittaavat C-C-venytyksiin.¹⁴⁶ PE:n voimakkaimmat piikit kohdissa 2850 ja 2885 cm⁻¹ viittaavat puolestaan symmetrisiin ja asymmetrisiin CH₂-venytyksiin.^{147,148} Pienemmän partikkelin (< 1 µm ainakin yhdessä ulottuvuudessa) (kuva 23 b) Raman-spektristä voidaan huomata vain nämä kaksi voimakkainta PE:n signaalia. Kuvatun PP:n (~ 1 µm) Raman-spektristä voidaan nähdä piikit kohdilla 2837, 2881 ja 2961 cm⁻¹, jotka viittaavat PP:n CH₂-venytyksiin sekä symmetrisiin ja asymmetrisiin CH₃-venytyksiin.¹⁴⁹ Lisäksi spektrissä on nähtävissä muita PP:lle tyypillisiä Raman-signaaleja kohdissa 811 (δ(CH₂) ja ν(C-C)), 998 (δ(CH₃)), 1166 (ν(C-C), δ(C-C) ja δ(CH₃)), 1330 (δ(CH) ja δ(CH₂)) ja 1456 cm⁻¹ (δ(CH₂) ja δ(CH₃)).^{149–151}

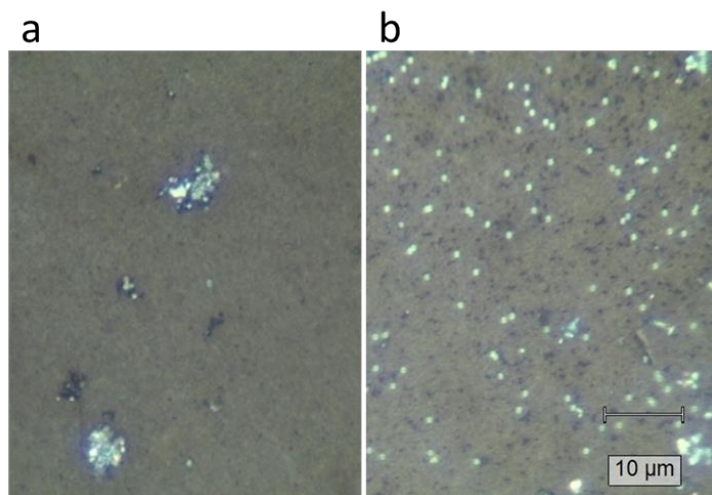


Kuva 23. Raman-spektrit (532 nm laserilla mitattu), mikroskoopi- ja SEM-kuvat käsitellystä merivesinäytteestä löydetyille PE (a, b) ja PP (c) -muoveille

Seuraavaksi karakterisoitiin nolla- ja referenssinäyte Raman-mikroskoopilla. Myös nollanäytteestä, jossa ei ideaalitulanteessa olisi mitään suodattimen päällä, löytyi muoveja ja muita partikkeleita. Nämä voivat olla peräisin muun muassa huoneilmasta, kun laboratoriovälineitä (keittopulloja, dekanterilaseja ym.) on siirretty laminaarikaappiin tai kun näyte on siirretty esimerkiksi Raman-mikroskoopille. Lisäksi referenssinäytteessä olleet 500 nm PS-kuulat eivät selvinneet prosessin läpi. On mahdollista, että PS-kuulat hajosivat prosessissa kaikkien edellä testattujen käsittelyvaiheiden yhteisvaikutuksesta. Yleisesti muovituotteisiin lisätään lisäaineita, joilla muoveista saadaan kestävämpiä.¹⁵² Työssä käytetyt kuulat koostuivat kuitenkin pelkästään PS:stä. Vaikka PS-kuulat olisivat hajonneet prosessissa, olisivat merivedessä olleet lisäaineita sisältävät nanomuovit saattaneet kestää käsittelyn muuttumattomina.

Koska referenssinäytteessä olleita PS-kuulia ei löydetty, testattiin vielä prosessissa käytetyn raskasnestekäsittelyn ja sentrifugoinnin toimivuutta. Kuten kuvasta 24 voidaan huomata, sentrifugoidessa 500 nm PS-kuulia raskasnestessä vain osa kuulista nousee raskasnesteen

pintaan ja niistäkin suurin osa on aggregoitunut toisiinsa. Tämä menetelmä soveltuu siis heikosti nanomuovien erotteluun ainakin käytetyillä kierrosnopeuksilla ja se voi selittää osakseen sitä, miksi käsitellyssä referenssinäytteessä ei havainnoitu olevan jäljellä PS-kuulia.



Kuva 24. 500 nm PS-kuulat, joita on sentrifugoitu raskasnestessä (a) ja kuulat, jotka on suodatettu suoraan Pt/Al₂O₃-suodattimelle (b)

Tuloksien perusteella ei voida todistaa, että kuvassa 23 esitetyt muovit olisivat merivedestä. Huomioitavaa on kuitenkin se, että prosessissa käytettiin 2 l merivettä, mikä on enemmän kuin aikaisemmissa nanomuovitutkimuksissa käytetyt merivesimäärät. Ter Halle et al. käyttivät 1 l merivettä tunnistaessaan siitä nanomuoveja Py-GC-MS:lla.¹¹ Materić et al. puolestaan tunnistivat nanomuoveja TD-PTR-MS:lla käyttäen 120 ml merivettä.¹⁰

5 Johtopäätökset ja yhteenveto

Tämän työn tavoitteena oli kehittää menetelmä nanomuovien tunnistamiseksi ja kuvaamiseksi merivedestä. Aikaisemmissa tutkimuksissa, joissa nanomuoveja on tunnistettu merivedestä, ei ole keskitytty nanomuovien muotoon tai kokojakaumaan vaan pelkästään konsentraatioon. Nanomuovien koko ja muoto vaikuttaa kuitenkin siihen, miten nanomuovit kulkeutuvat esimerkiksi elimistössä. Kehittämällämme menetelmällä on mahdollista tunnistaa ja kuvata yksittäisiä nanomuoveja Raman-mikroskoopilla ja SEM:lla.

Tähän tarkoitukseen valmistimme aluksi nanomuovien tunnistamista tehostavia suodattimia. Nanomuoveja on haastavaa erottaa mikroskooppikuvista, jos niiden tausta on samaa sävyä nanomuovien kanssa. Lisäksi perinteistä Raman-spektroskopiaa käyttämällä nanomuoveista saatavat Raman-signaalit ovat niin heikkoja, ettei niitä voida tunnistaa. Nanomuoveista saatavaa Raman-sirontaa voidaan kuitenkin voimistaa SERS-ilmiöllä, jossa nanomuovit ovat metallista nanorakennetta vasten. Tässä työssä kaupallisten Al_2O_3 -suodattimien pintaan sputteroitettiin ohuet kerrokset kultaa ja platinaa. Tällä saavutettiin tumma tausta, jota vasten nanomuovit erottuivat paremmin, ja metallinen nanorakenne, jolla saatiin aikaiseksi SERS-ilmiö. Suodattimen käyttö SERS-substraattina puolestaan mahdollisti suuremman näytekoon verrattuna yleiseen menetelmään, jossa SERS-substraatin pintaan pipetoidaan pisara, jonka annetaan kuivua.

Kehitettyjen suodattimien todettiin toimivan erinomaisesti testattaessa niitä Milli-Q-vedessä olleille kaupallisille 500 nm PS-kuulille. Vaaleat PS-kuulat tummia metallitaustoja vasten olivat selkeästi erotettavissa mikroskooppikuvista syntyneen kontrastieron ansiosta. Platinapäälysteisellä suodattimella olevista kuulista saatavan Raman-signaalin voimakkuus jopa kuusinkertaistui verrattuna päälystämättömällä suodattimella oleviin kuuliin.

Kehitettyjä suodattimia testattiin myös merivesinäytteille käyttäen mikromuovitutkimuksissa yleisesti käytettyjä muovien erotusmenetelmiä. Merivesinäytteestä pyrittiin hajottamaan kaikki eloperäinen aines käyttäen H_2O_2 :a, NaOH :a ja HCl :a, jotta jäljelle jäisivät vain muovit. Raskasnestekäsittelyn ja sentrifugoinnin avulla pyrittiin puolestaan pääsemään eroon muoveja tiheämmistä partikkeleista, kuten hiekasta. Lopulta käsitelty merivesinäyte suodatettiin platinapäälysteiselle suodattimelle, josta voitiin tunnistaa yksittäisiä partikkeleita muoveiksi, jonka jälkeen ne voitiin vielä kuvata tarkemmin SEM:lla. Merivesinäytteen ohella tehdyt referenssi- ja nollanäytteet antoivat kuitenkin viitteitä siitä, että meriveden käsittely

nanomuovien tunnistamiseksi vaatii vielä kehittämistä. Nollanäytteestä löydettiin kontaminaationa muovipartikkeleita ja referenssinäytteen PS-kuulia ei ollut havaittavissa käsittelyn jälkeen.

Menetelmiä nanomuovien tunnistamiseksi tarvitaan, jotta muovien hajoamista, kulkeutumista ja haittavaikutuksia voidaan seurata tarkemmin. Kun pienimpiäkin muoviroksia voidaan seurata, on niiden kontrolloiminenkin helpompaa. Työssä esitettyjen tulosten uskotaan auttavan ehkäisemään tulevaisuudessa nanomuovisaastetta niin merissä kuin muissakin ympäristöissä.

Lähteet

- (1) Geyer, R.; Jambeck, J. R.; Law, K. L. Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made. *Sci. Adv.* **2017**, *3* (7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- (2) Jambeck, J. R.; Geyer, R.; Wilcox, C.; Siegler, T. R.; Perryman, M.; Andrady, A.; Narayan, R.; Law, K. L. Plastic Waste Inputs from Land into the Ocean. *Science* (80-). **2015**, *347* (6223), 768–771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>.
- (3) Fenical, W.; Jensen, P. R. Developing a New Resource for Drug Discovery: Marine Actinomycete Bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2* (12), 666–673. <https://doi.org/10.1038/nchembio841>.
- (4) Anthony, K.; Eric, D.; Chris, F.; Jennifer, G.; Dan, B.; E, B. R.; Michael, D.; Linda, D.; E, F. L.; Tim, F.; Fredricka, M.; Richard, O.; A, S. W.; Umit, U. Indicators of Ocean Health and Human Health: Developing a Research and Monitoring Framework. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110* (9), 839–845. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110839>.
- (5) Fleming, L. E.; Broad, K.; Clement, A.; Dewailly, E.; Elmir, S.; Knap, A.; Pomponi, S. A.; Smith, S.; Solo Gabriele, H.; Walsh, P. Oceans and Human Health: Emerging Public Health Risks in the Marine Environment. *Mar. Pollut. Bull.* **2006**, *53* (10), 545–560. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.08.012>.
- (6) Chen, R.; Hu, B.; Liu, Y.; Xu, J.; Yang, G.; Xu, D.; Chen, C. Beyond PM2.5: The Role of Ultrafine Particles on Adverse Health Effects of Air Pollution. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2016**, *1860* (12), 2844–2855. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.019>.
- (7) Sharma, V. K.; Ma, X.; Lichtfouse, E.; Robert, D. Nanoplastics Are Potentially More Dangerous than Microplastics. *Environ. Chem. Lett.* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01539-1>.
- (8) Circular economy action plan https://environment.ec.europa.eu/strategy/circular-economy-action-plan_en (accessed May 29, 2023).
- (9) PlasticTrace – Tracing Micro and NanoPlastics in Food and Environment <https://plastictrace.eu/> (accessed May 29, 2023).

- (10) Materić, D.; Holzinger, R.; Niemann, H. Nanoplastics and Ultrafine Microplastic in the Dutch Wadden Sea – The Hidden Plastics Debris? *Sci. Total Environ.* **2022**, *846*, 157371. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157371>.
- (11) Ter Halle, A.; Jeanneau, L.; Martignac, M.; Jardé, E.; Pedrono, B.; Brach, L.; Gigault, J. Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (23), 13689–13697. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03667>.
- (12) Mandemaker, L. D. B.; Meirer, F. Spectro-Microscopic Techniques for Studying Nanoplastics in the Environment and in Organisms. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2023**, *62* (2), e202210494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.202210494>.
- (13) Hartmann, N. B.; Hüffer, T.; Thompson, R. C.; Hassellöv, M.; Verschoor, A.; Daugaard, A. E.; Rist, S.; Karlsson, T.; Brennholt, N.; Cole, M.; Herrling, M. P.; Hess, M. C.; Ivleva, N. P.; Lusher, A. L.; Wagner, M. Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (3), 1039–1047. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05297>.
- (14) Baekeland, L. H. The Synthesis, Constitution, and Uses of Bakelite. *Ind. Eng. Chem.* **1909**, *1* (3), 149–161.
- (15) Bakelite First Synthetic Plastic - National Historic Chemical Landmark - American Chemical Society.
- (16) Chalmin, P. The History of Plastics: From the Capitol to the Tarpeian Rock. *F. Actions Sci. Reports. J. F. actions* **2019**, 6–11.
- (17) Andrady, A. L.; Neal, M. A. Applications and Societal Benefits of Plastics. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *364* (1526), 1977–1984. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304>.
- (18) Brydson, J. A. *Plastics Materials*; Elsevier, 1999.
- (19) Thompson, R. C.; Swan, S. H.; Moore, C. J.; vom Saal, F. S. Our Plastic Age. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *364* (1526), 1973–1976. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0054>.
- (20) Geyer, R.; Jambeck, J. R.; Law, K. L. Production, Use, and Fate of All Plastics Ever

- Made. *Sci. Adv.* **2023**, 3 (7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- (21) Plastics - the Facts 2022 • Plastics Europe <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/> (accessed Nov 9, 2022).
- (22) Carpenter, E. J.; Smith, K. L. Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science* (80-.). **1972**, 175 (4027), 1240–1241. <https://doi.org/10.1126/science.175.4027.1240>.
- (23) Colton, J. B.; Burns, B. R.; Knapp Frederick D. Plastic Particles in Surface Waters of the Northwestern Atlantic. *Science* (80-.). **1974**, 185 (4150), 491–497. <https://doi.org/10.1126/science.185.4150.491>.
- (24) VENRICK, E. L.; BACKMAN, T. W.; BARTRAM, W. C.; PLATT, C. J.; THORNHILL, M. S.; YATES, R. E. Man-Made Objects on the Surface of the Central North Pacific Ocean. *Nature* **1973**, 241 (5387), 271. <https://doi.org/10.1038/241271a0>.
- (25) Frias, J. P. G. L.; Nash, R. Microplastics: Finding a Consensus on the Definition. *Mar. Pollut. Bull.* **2019**, 138, 145–147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.022>.
- (26) Gigault, J.; Halle, A. ter; Baudrimont, M.; Pascal, P.-Y.; Gauffre, F.; Phi, T.-L.; El Hadri, H.; Grassl, B.; Reynaud, S. Current Opinion: What Is a Nanoplastic? *Environ. Pollut.* **2018**, 235, 1030–1034. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>.
- (27) Everett, D. H. Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. **1972**, 31 (4), 577–638. <https://doi.org/doi:10.1351/pac197231040577>.
- (28) González-Pleiter, M.; Tamayo-Belda, M.; Pulido-Reyes, G.; Amariei, G.; Leganés, F.; Rosal, R.; Fernández-Piñas, F. Secondary Nanoplastics Released from a Biodegradable Microplastic Severely Impact Freshwater Environments. *Environ. Sci. Nano* **2019**, 6 (5), 1382–1392. <https://doi.org/10.1039/C8EN01427B>.
- (29) Müller, A.-K.; Brehm, J.; Völkl, M.; Jérôme, V.; Laforsch, C.; Freitag, R.; Greiner, A. Disentangling Biological Effects of Primary Nanoplastics from Dispersion Paints' Additional Compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2022**, 242, 113877. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113877>.

- (30) Hernandez, L. M.; Yousefi, N.; Tufenkji, N. Are There Nanoplastics in Your Personal Care Products? *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2017**, *4* (7), 280–285. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00187>.
- (31) Oliveira, J.; Belchior, A.; da Silva, V. D.; Rotter, A.; Petrovski, Ž.; Almeida, P. L.; Lourenço, N. D.; Gaudêncio, S. P. Marine Environmental Plastic Pollution: Mitigation by Microorganism Degradation and Recycling Valorization. *Front. Mar. Sci.* **2020**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.567126>.
- (32) Chamas, A.; Moon, H.; Zheng, J.; Qiu, Y.; Tabassum, T.; Jang, J. H.; Abu-Omar, M.; Scott, S. L.; Suh, S. Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8* (9), 3494–3511. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>.
- (33) Lambert, S.; Sinclair, C.; Boxall, A. Occurrence, Degradation, and Effect of Polymer-Based Materials in the Environment BT - Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 227; Whitacre, D. M., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2014; pp 1–53. https://doi.org/10.1007/978-3-319-01327-5_1.
- (34) Song, Y. K.; Hong, S. H.; Jang, M.; Han, G. M.; Jung, S. W.; Shim, W. J. Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion on Microplastic Fragmentation by Polymer Type. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (8), 4368–4376. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06155>.
- (35) Turner, A.; Arnold, R.; Williams, T. Weathering and Persistence of Plastic in the Marine Environment: Lessons from LEGO. *Environ. Pollut.* **2020**, *262*, 114299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114299>.
- (36) Kaushal, J.; Khatri, M.; Arya, S. K. Recent Insight into Enzymatic Degradation of Plastics Prevalent in the Environment: A Mini - Review. *Clean. Eng. Technol.* **2021**, *2*, 100083. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100083>.
- (37) Yousif, E.; Salimon, J.; Salih, N. New Stabilizers for Polystyrene Based on 2-N-Salicylidene-5-(Substituted)-1,3,4-Thiadiazole Compounds. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16* (3), 299–306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.01.011>.
- (38) Li, D.; Shi, Y.; Yang, L.; Xiao, L.; Kehoe, D. K.; Gun'ko, Y. K.; Boland, J. J.; Wang, J. J. Microplastic Release from the Degradation of Polypropylene Feeding Bottles during Infant Formula Preparation. *Nat. Food* **2020**, *1* (11), 746–754.

<https://doi.org/10.1038/s43016-020-00171-y>.

- (39) Singh, T. Generation of Microplastics from the Opening and Closing of Disposable Plastic Water Bottles. *J. Water Health* **2021**, *19* (3), 488–498.
<https://doi.org/10.2166/wh.2021.025>.
- (40) Huang, Y.; Wong, K. K.; Li, W.; Zhao, H.; Wang, T.; Stanescu, S.; Boulton, S.; van Dongen, B.; Mativenga, P.; Li, L. Characteristics of Nano-Plastics in Bottled Drinking Water. *J. Hazard. Mater.* **2022**, *424*, 127404.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127404>.
- (41) Winkler, A.; Fumagalli, F.; Cella, C.; Gilliland, D.; Tremolada, P.; Valsesia, A. Detection and Formation Mechanisms of Secondary Nanoplastic Released from Drinking Water Bottles. *Water Res.* **2022**, *222*, 118848.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118848>.
- (42) Zangmeister, C. D.; Radney, J. G.; Benkstein, K. D.; Kalanyan, B. Common Single-Use Consumer Plastic Products Release Trillions of Sub-100 Nm Nanoparticles per Liter into Water during Normal Use. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56* (9), 5448–5455.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06768>.
- (43) Cella, C.; La Spina, R.; Mehn, D.; Fumagalli, F.; Ceccone, G.; Valsesia, A.; Gilliland, D. Detecting Micro- and Nanoplastics Released from Food Packaging: Challenges and Analytical Strategies. *Polymers*. 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14061238>.
- (44) Hernandez, L. M.; Xu, E. G.; Larsson, H. C. E.; Tahara, R.; Maisuria, V. B.; Tufenkji, N. Plastic Teabags Release Billions of Microparticles and Nanoparticles into Tea. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (21), 12300–12310.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02540>.
- (45) Luo, Y.; Gibson, C. T.; Chuah, C.; Tang, Y.; Naidu, R.; Fang, C. Raman Imaging for the Identification of Teflon Microplastics and Nanoplastics Released from Non-Stick Cookware. *Sci. Total Environ.* **2022**, *851*, 158293.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158293>.
- (46) Luo, Y.; Chuah, C.; Amin, M. Al; Khoshyan, A.; Gibson, C. T.; Tang, Y.; Naidu, R.; Fang, C. Assessment of Microplastics and Nanoplastics Released from a Chopping Board Using Raman Imaging in Combination with Three Algorithms. *J. Hazard.*

- Mater.* **2022**, *431*, 128636.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128636>.
- (47) Luo, Y.; Qi, F.; Gibson, C. T.; Lei, Y.; Fang, C. Investigating Kitchen Sponge-Derived Microplastics and Nanoplastics with Raman Imaging and Multivariate Analysis. *Sci. Total Environ.* **2022**, *824*, 153963.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153963>.
- (48) Yang, T.; Luo, J.; Nowack, B. Characterization of Nanoplastics, Fibrils, and Microplastics Released during Washing and Abrasion of Polyester Textiles. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55* (23), 15873–15881. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04826>.
- (49) Lai, H.; Liu, X.; Qu, M. Nanoplastics and Human Health: Hazard Identification and Biointerface. *Nanomaterials*. 2022. <https://doi.org/10.3390/nano12081298>.
- (50) Lehner, R.; Weder, C.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (4), 1748–1765. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05512>.
- (51) Yee, M. S.; Hii, L.-W.; Looi, C. K.; Lim, W.-M.; Wong, S.-F.; Kok, Y.-Y.; Tan, B.-K.; Wong, C.-Y.; Leong, C.-O. Impact of Microplastics and Nanoplastics on Human Health. *Nanomaterials*. 2021. <https://doi.org/10.3390/nano11020496>.
- (52) Lim, X. Microplastics Are Everywhere—but Are They Harmful. *Nature* **2021**, *593* (7857), 22–25.
- (53) Brown, D. M.; Wilson, M. R.; MacNee, W.; Stone, V.; Donaldson, K. Size-Dependent Proinflammatory Effects of Ultrafine Polystyrene Particles: A Role for Surface Area and Oxidative Stress in the Enhanced Activity of Ultrafines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2001**, *175* (3), 191–199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/taap.2001.9240>.
- (54) Luo, T.; Zhang, Y.; Wang, C.; Wang, X.; Zhou, J.; Shen, M.; Zhao, Y.; Fu, Z.; Jin, Y. Maternal Exposure to Different Sizes of Polystyrene Microplastics during Gestation Causes Metabolic Disorders in Their Offspring. *Environ. Pollut.* **2019**, *255*, 113122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113122>.
- (55) Liu, X.; Tian, X.; Xu, X.; Lu, J. Design of a Phosphinate-Based Bioluminescent Probe for Superoxide Radical Anion Imaging in Living Cells. *Luminescence* **2018**, *33* (6),

- 1101–1106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bio.3515>.
- (56) Llorca, M.; Farré, M. Current Insights into Potential Effects of Micro-Nanoplastics on Human Health by in-Vitro Tests. *Front. Toxicol.* **2021**, *3*.
<https://doi.org/10.3389/ftox.2021.752140>.
- (57) Dukhin, A. S.; Dukhin, S. S.; Goetz, P. J. Gravity as a Factor of Aggregative Stability and Coagulation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *134–135*, 35–71.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.04.006>.
- (58) Mörters, P.; Peres, Y. *Brownian Motion*; Cambridge University Press, 2010; Vol. 30.
- (59) Hidalgo-Álvarez, R.; Martín, A.; Fernández, A.; Bastos, D.; Martínez, F.; de las Nieves, F. J. Electrokinetic Properties, Colloidal Stability and Aggregation Kinetics of Polymer Colloids. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1996**, *67*, 1–118.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0001-8686\(96\)00297-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0001-8686(96)00297-7).
- (60) Adamczyk, Z.; Weroński, P. Application of the DLVO Theory for Particle Deposition Problems. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, *83* (1), 137–226.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(99\)00009-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0001-8686(99)00009-3).
- (61) Jia, M.; Li, H.; Zhu, H.; Tian, R.; Gao, X. An Approach for the Critical Coagulation Concentration Estimation of Polydisperse Colloidal Suspensions of Soil and Humus. *J. Soils Sediments* **2013**, *13* (2), 325–335. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0608-8>.
- (62) Jain, C. K. Salinity BT - Encyclopedia of Snow, Ice and Glaciers; Singh, V. P., Singh, P., Haritashya, U. K., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2011; p 959.
https://doi.org/10.1007/978-90-481-2642-2_461.
- (63) The Baltic Sea's salinity varies.- Marinefinland.fi https://www.marinefinland.fi/en-US/The_Baltic_Sea_now/Water_quality/Salinity (accessed Apr 11, 2023).
- (64) Kniebusch, M.; Meier, H. E. M.; Radtke, H. Changing Salinity Gradients in the Baltic Sea As a Consequence of Altered Freshwater Budgets. *Geophys. Res. Lett.* **2019**, *46* (16), 9739–9747. <https://doi.org/https://doi.org/10.1029/2019GL083902>.
- (65) Dickson, A. G.; Goyet, C. *Handbook of Methods for the Analysis of the Various Parameters of the Carbon Dioxide System in Sea Water. Version 2*; United States, 1994. <https://doi.org/10.2172/10107773>.

- (66) Trefalt, G.; Szilagyi, I.; Téllez, G.; Borkovec, M. Colloidal Stability in Asymmetric Electrolytes: Modifications of the Schulze–Hardy Rule. *Langmuir* **2017**, *33* (7), 1695–1704. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04464>.
- (67) Singh, N.; Tiwari, E.; Khandelwal, N.; Darbha, G. K. Understanding the Stability of Nanoplastics in Aqueous Environments: Effect of Ionic Strength, Temperature, Dissolved Organic Matter, Clay, and Heavy Metals. *Environ. Sci. Nano* **2019**, *6* (10), 2968–2976. <https://doi.org/10.1039/C9EN00557A>.
- (68) Mao, Y.; Li, H.; Huangfu, X.; Liu, Y.; He, Q. Nanoplastics Display Strong Stability in Aqueous Environments: Insights from Aggregation Behaviour and Theoretical Calculations. *Environ. Pollut.* **2020**, *258*, 113760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113760>.
- (69) Shams, M.; Alam, I.; Chowdhury, I. Aggregation and Stability of Nanoscale Plastics in Aquatic Environment. *Water Res.* **2020**, *171*, 115401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115401>.
- (70) Li, Y.; Wang, X.; Fu, W.; Xia, X.; Liu, C.; Min, J.; Zhang, W.; Crittenden, J. C. Interactions between Nano/Micro Plastics and Suspended Sediment in Water: Implications on Aggregation and Settling. *Water Res.* **2019**, *161*, 486–495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.018>.
- (71) Kim, M.-J.; Herchenova, Y.; Chung, J.; Na, S.-H.; Kim, E.-J. Thermodynamic Investigation of Nanoplastic Aggregation in Aquatic Environments. *Water Res.* **2022**, *226*, 119286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119286>.
- (72) Zhang, F.; Wang, Z.; Wang, S.; Fang, H.; Wang, D. Aquatic Behavior and Toxicity of Polystyrene Nanoplastic Particles with Different Functional Groups: Complex Roles of PH, Dissolved Organic Carbon and Divalent Cations. *Chemosphere* **2019**, *228*, 195–203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.115>.
- (73) Xu, N.; Liu, Z.; Zhang, X.; Xu, Y.; Luo, N.; Li, S.; Xu, J.; He, X.; Shi, J. Influence of Temperature-Salinity-Depth Structure of the Upper-Ocean on the Frequency Shift of Brillouin LiDAR. *Opt. Express* **2021**, *29* (22), 36442–36452. <https://doi.org/10.1364/OE.443151>.
- (74) Whitehouse, M. J.; Priddle, J.; Symon, C. Seasonal and Annual Change in Seawater

- Temperature, Salinity, Nutrient and Chlorophyll a Distributions around South Georgia, South Atlantic. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **1996**, *43* (4), 425–443.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0967-0637\(96\)00020-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0967-0637(96)00020-9).
- (75) Auta, H. S.; Emenike, C. U.; Fauziah, S. H. Distribution and Importance of Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Sources, Fate, Effects, and Potential Solutions. *Environ. Int.* **2017**, *102*, 165–176.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.013>.
- (76) Davranche, M.; Lory, C.; Juge, C. Le; Blancho, F.; Dia, A.; Grassl, B.; El Hadri, H.; Pascal, P.-Y.; Gigault, J. Nanoplastics on the Coast Exposed to the North Atlantic Gyre: Evidence and Traceability. *NanoImpact* **2020**, *20*, 100262.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100262>.
- (77) Wahl, A.; Le Juge, C.; Davranche, M.; El Hadri, H.; Grassl, B.; Reynaud, S.; Gigault, J. Nanoplastic Occurrence in a Soil Amended with Plastic Debris. *Chemosphere* **2021**, *262*, 127784. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127784>.
- (78) Li, Y.; Wang, Z.; Guan, B. Separation and Identification of Nanoplastics in Tap Water. *Environ. Res.* **2022**, *204*, 112134.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112134>.
- (79) Leslie, H. A.; van Velzen, M. J. M.; Brandsma, S. H.; Vethaak, A. D.; Garcia-Vallejo, J. J.; Lamoree, M. H. Discovery and Quantification of Plastic Particle Pollution in Human Blood. *Environ. Int.* **2022**, *163*, 107199.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>.
- (80) Kirchsteiger, B.; Materić, D.; Happenhofer, F.; Holzinger, R.; Kasper-Giebl, A. Fine Micro- and Nanoplastics Particles (PM_{2.5}) in Urban Air and Their Relation to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Atmos. Environ.* **2023**, *301*, 119670.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2023.119670>.
- (81) Materić, D.; Peacock, M.; Dean, J.; Futter, M.; Maximov, T.; Moldan, F.; Röckmann, T.; Holzinger, R. Presence of Nanoplastics in Rural and Remote Surface Waters. *Environ. Res. Lett.* **2022**, *17* (5), 54036. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac68f7>.
- (82) Materić, D.; Kasper-Giebl, A.; Kau, D.; Anten, M.; Greilinger, M.; Ludewig, E.; van Seville, E.; Röckmann, T.; Holzinger, R. Micro- and Nanoplastics in Alpine Snow: A

- New Method for Chemical Identification and (Semi)Quantification in the Nanogram Range. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54* (4), 2353–2359.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07540>.
- (83) Materić, D.; Ludewig, E.; Brunner, D.; Röckmann, T.; Holzinger, R. Nanoplastics Transport to the Remote, High-Altitude Alps. *Environ. Pollut.* **2021**, *288*, 117697.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117697>.
- (84) Materić, D.; Kjær, H. A.; Vallelonga, P.; Tison, J.-L.; Röckmann, T.; Holzinger, R. Nanoplastics Measurements in Northern and Southern Polar Ice. *Environ. Res.* **2022**, *208*, 112741. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112741>.
- (85) Xu, G.; Cheng, H.; Jones, R.; Feng, Y.; Gong, K.; Li, K.; Fang, X.; Tahir, M. A.; Valev, V. K.; Zhang, L. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Facilitates the Detection of Microplastics <1 Mm in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54* (24), 15594–15603. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02317>.
- (86) Schmidt, R.; Nachtnebel, M.; Dienstleder, M.; Mertschnigg, S.; Schroettner, H.; Zankel, A.; Poteser, M.; Hutter, H.-P.; Eppel, W.; Fitzek, H. Correlative SEM-Raman Microscopy to Reveal Nanoplastics in Complex Environments. *Micron* **2021**, *144*, 103034. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103034>.
- (87) Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*; Elsevier, 1991.
- (88) Schwaferts, C.; Niessner, R.; Elsner, M.; Ivleva, N. P. Methods for the Analysis of Submicrometer- and Nanoplastic Particles in the Environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *112*, 52–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.014>.
- (89) Kudelski, A. Analytical Applications of Raman Spectroscopy. *Talanta* **2008**, *76* (1), 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.02.042>.
- (90) Bumbrah, G. S.; Sharma, R. M. Raman Spectroscopy – Basic Principle, Instrumentation and Selected Applications for the Characterization of Drugs of Abuse. *Egypt. J. Forensic Sci.* **2016**, *6* (3), 209–215.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.001>.
- (91) Pilot, R.; Signorini, R.; Durante, C.; Orian, L.; Bhamidipati, M.; Fabris, L. A Review

- on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Biosensors*. 2019.
<https://doi.org/10.3390/bios9020057>.
- (92) Tuschel, D. Spectral Resolution and Dispersion in Raman Spectroscopy. *Spectroscopy* **2020**, *35* (9), 9–15.
- (93) Xie, L.; Gong, K.; Liu, Y.; Zhang, L. Strategies and Challenges of Identifying Nanoplastics in Environment by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **2023**, *57* (1), 25–43. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c07416>.
- (94) Araujo, C. F.; Nolasco, M. M.; Ribeiro, A. M. P.; Ribeiro-Claro, P. J. A. Identification of Microplastics Using Raman Spectroscopy: Latest Developments and Future Prospects. *Water Res.* **2018**, *142*, 426–440.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.060>.
- (95) Langer, J.; Jimenez de Aberasturi, D.; Aizpurua, J.; Alvarez-Puebla, R. A.; Augu  , B.; Baumberg, J. J.; Bazan, G. C.; Bell, S. E. J.; Boisen, A.; Brolo, A. G.; Choo, J.; Cialla-May, D.; Deckert, V.; Fabris, L.; Faulds, K.; Garc  a de Abajo, F. J.; Goodacre, R.; Graham, D.; Haes, A. J.; Haynes, C. L.; Huck, C.; Itoh, T.; K  ll, M.; Kneipp, J.; Kotov, N. A.; Kuang, H.; Le Ru, E. C.; Lee, H. K.; Li, J.-F.; Ling, X. Y.; Maier, S. A.; Mayerh  fer, T.; Moskovits, M.; Murakoshi, K.; Nam, J.-M.; Nie, S.; Ozaki, Y.; Pastoriza-Santos, I.; Perez-Juste, J.; Popp, J.; Pucci, A.; Reich, S.; Ren, B.; Schatz, G. C.; Shegai, T.; Schl  cker, S.; Tay, L.-L.; Thomas, K. G.; Tian, Z.-Q.; Van Duyne, R. P.; Vo-Dinh, T.; Wang, Y.; Willets, K. A.; Xu, C.; Xu, H.; Xu, Y.; Yamamoto, Y. S.; Zhao, B.; Liz-Marz  n, L. M. Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2020**, *14* (1), 28–117. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04224>.
- (96) Jensen, L.; Aikens, C. M.; Schatz, G. C. Electronic Structure Methods for Studying Surface-Enhanced Raman Scattering. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (5), 1061–1073.
<https://doi.org/10.1039/B706023H>.
- (97) Cong, S.; Liu, X.; Jiang, Y.; Zhang, W.; Zhao, Z. Surface Enhanced Raman Scattering Revealed by Interfacial Charge-Transfer Transitions. *Innov.* **2020**, *1* (3), 100051.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100051>.
- (98) Champion, A.; Kambhampati, P. Surface-Enhanced Raman Scattering. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27* (4), 241–250. <https://doi.org/10.1039/A827241Z>.

- (99) Ding, S.-Y.; Yi, J.; Li, J.-F.; Ren, B.; Wu, D.; Panneerselvam, D. R.; Tian, Z.-Q. Nanostructure-Based Plasmon-Enhanced Raman Spectroscopy for Surface Analysis of Materials. *Nat. Rev. Mater.* **2016**, *1*. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.21>.
- (100) Shvalya, V.; Filipič, G.; Zavašnik, J.; Abdulhalim, I.; Cvelbar, U. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Chemical and Biological Sensing Using Nanoplasmonics: The Relevance of Interparticle Spacing and Surface Morphology. *Appl. Phys. Rev.* **2020**, *7* (3), 31307. <https://doi.org/10.1063/5.0015246>.
- (101) Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (37), 13794–13803. <https://doi.org/10.1021/jp0687908>.
- (102) Cara, E.; Mandrile, L.; Sacco, A.; Giovannozzi, A. M.; Rossi, A. M.; Celegato, F.; De Leo, N.; Hönicke, P.; Kayser, Y.; Beckhoff, B.; Marchi, D.; Zoccante, A.; Cossi, M.; Laus, M.; Boarino, L.; Ferrarese Lupi, F. Towards a Traceable Enhancement Factor in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Mater. Chem. C* **2020**, *8* (46), 16513–16519. <https://doi.org/10.1039/D0TC04364H>.
- (103) Caldwell, J.; Taladriz-Blanco, P.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Detection of Sub-Micro- and Nanoplastic Particles on Gold Nanoparticle-Based Substrates through Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Spectroscopy. *Nanomaterials*. 2021. <https://doi.org/10.3390/nano11051149>.
- (104) Yoo, H.; Lee, H.; Park, C.; Shin, D.; Ro, C.-U. Novel Single-Particle Analytical Technique for Submicron Atmospheric Aerosols: Combined Use of Dark-Field Scattering and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (38), 13028–13035. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01696>.
- (105) Lv, L.; He, L.; Jiang, S.; Chen, J.; Zhou, C.; Qu, J.; Lu, Y.; Hong, P.; Sun, S.; Li, C. In Situ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Detecting Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments. *Sci. Total Environ.* **2020**, *728*, 138449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138449>.
- (106) Yang, Q.; Zhang, S.; Su, J.; Li, S.; Lv, X.; Chen, J.; Lai, Y.; Zhan, J. Identification of Trace Polystyrene Nanoplastics Down to 50 Nm by the Hyphenated Method of Filtration and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Based on Silver Nanowire

- Membranes. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56* (15), 10818–10828.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.2c02584>.
- (107) Wei, H.; McCarthy, A.; Song, J.; Zhou, W.; Vikesland, P. J. Quantitative SERS by Hot Spot Normalization – Surface Enhanced Rayleigh Band Intensity as an Alternative Evaluation Parameter for SERS Substrate Performance. *Faraday Discuss.* **2017**, *205* (0), 491–504. <https://doi.org/10.1039/C7FD00125H>.
- (108) Stock, F.; Kochleus, C.; Bänsch-Baltruschat, B.; Brennholt, N.; Reifferscheid, G. Sampling Techniques and Preparation Methods for Microplastic Analyses in the Aquatic Environment – A Review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *113*, 84–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.014>.
- (109) Velimirovic, M.; Tirez, K.; Verstraelen, S.; Frijns, E.; Remy, S.; Koppen, G.; Rotander, A.; Bolea-Fernandez, E.; Vanhaecke, F. Mass Spectrometry as a Powerful Analytical Tool for the Characterization of Indoor Airborne Microplastics and Nanoplastics. *J. Anal. At. Spectrom.* **2021**, *36* (4), 695–705. <https://doi.org/10.1039/D1JA00036E>.
- (110) Cai, H.; Xu, E. G.; Du, F.; Li, R.; Liu, J.; Shi, H. Analysis of Environmental Nanoplastics: Progress and Challenges. *Chem. Eng. J.* **2021**, *410*, 128208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128208>.
- (111) Pfeiffer, F.; Fischer, E. K. Various Digestion Protocols Within Microplastic Sample Processing—Evaluating the Resistance of Different Synthetic Polymers and the Efficiency of Biogenic Organic Matter Destruction. *Front. Environ. Sci.* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.572424>.
- (112) Karami, A.; Golieskardi, A.; Choo, C. K.; Romano, N.; Ho, Y. Bin; Salamatinia, B. A High-Performance Protocol for Extraction of Microplastics in Fish. *Sci. Total Environ.* **2017**, *578*, 485–494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.213>.
- (113) Rist, S.; Baun, A.; Hartmann, N. B. Ingestion of Micro- and Nanoplastics in *Daphnia Magna* – Quantification of Body Burdens and Assessment of Feeding Rates and Reproduction. *Environ. Pollut.* **2017**, *228*, 398–407. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.048>.
- (114) Abdolahpur Monikh, F.; Grundschober, N.; Romeijn, S.; Arenas-Lago, D.; Vijver, M. G.; Jiskoot, W.; Peijnenburg, W. J. G. M. Development of Methods for Extraction and

- Analytical Characterization of Carbon-Based Nanomaterials (Nanoplastics and Carbon Nanotubes) in Biological and Environmental Matrices by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *Environ. Pollut.* **2019**, *255*, 113304.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113304>.
- (115) Correia, M.; Loeschner, K. Detection of Nanoplastics in Food by Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Coupled to Multi-Angle Light Scattering: Possibilities, Challenges and Analytical Limitations. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410* (22), 5603–5615. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0919-8>.
- (116) Lin, Y.; Huang, X.; Liu, Q.; Lin, Z.; Jiang, G. Thermal Fragmentation Enhanced Identification and Quantification of Polystyrene Micro/Nanoplastics in Complex Media. *Talanta* **2020**, *208*, 120478.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120478>.
- (117) Oßmann, B. E.; Sarau, G.; Holtmannspötter, H.; Pischetsrieder, M.; Christiansen, S. H.; Dicke, W. Small-Sized Microplastics and Pigmented Particles in Bottled Mineral Water. *Water Res.* **2018**, *141*, 307–316.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.027>.
- (118) Bain, A. Buoyancy and Brownian Motion of Plastics in Aqueous Media: Predictions and Implications for Density Separation and Aerosol Internal Mixing State. *Environ. Sci. Nano* **2022**, *9* (11), 4249–4254. <https://doi.org/10.1039/D2EN00525E>.
- (119) Nguyen, B.; Claveau-Mallet, D.; Hernandez, L. M.; Xu, E. G.; Farner, J. M.; Tufenkji, N. Separation and Analysis of Microplastics and Nanoplastics in Complex Environmental Samples. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52* (4), 858–866.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00602>.
- (120) Minelli, C.; Sikora, A.; Garcia-Diez, R.; Sparnacci, K.; Gollwitzer, C.; Krumrey, M.; Shard, A. G. Measuring the Size and Density of Nanoparticles by Centrifugal Sedimentation and Flotation. *Anal. Methods* **2018**, *10* (15), 1725–1732.
<https://doi.org/10.1039/C8AY00237A>.
- (121) Cerasa, M.; Teodori, S.; Pietrelli, L. Searching Nanoplastics: From Sampling to Sample Processing. *Polymers*. 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13213658>.
- (122) Käßpler, A.; Windrich, F.; Löder, M. G. J.; Malanin, M.; Fischer, D.; Labrenz, M.;

- Eichhorn, K.-J.; Voit, B. Identification of Microplastics by FTIR and Raman Microscopy: A Novel Silicon Filter Substrate Opens the Important Spectral Range below 1300 Cm^{-1} for FTIR Transmission Measurements. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (22), 6791–6801. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8850-8>.
- (123) Di, M.; Wang, J. Microplastics in Surface Waters and Sediments of the Three Gorges Reservoir, China. *Sci. Total Environ.* **2018**, *616–617*, 1620–1627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.150>.
- (124) Leung, M. M.-L.; Ho, Y.-W.; Lee, C.-H.; Wang, Y.; Hu, M.; Kwok, K. W. H.; Chua, S.-L.; Fang, J. K.-H. Improved Raman Spectroscopy-Based Approach to Assess Microplastics in Seafood. *Environ. Pollut.* **2021**, *289*, 117648. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117648>.
- (125) Oßmann, B. E.; Sarau, G.; Schmitt, S. W.; Holtmannspötter, H.; Christiansen, S. H.; Dicke, W. Development of an Optimal Filter Substrate for the Identification of Small Microplastic Particles in Food by Micro-Raman Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (16), 4099–4109. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0358-y>.
- (126) Miclea, P.-T.; Richter, S.; Hagendorf, C. Nanoporous Membrane Filter Cascade for Size-Selective Analysis of Nano- and Microplastic Particles. *Appl. Res.* **2022**, *n/a* (n/a), e202200094. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/appl.202200094>.
- (127) Wang, X.; Zhang, H.; Zhang, D.; Ma, Y.; Fecht, H.-J.; Jiang, J. Z. Color Tuning by Local Sputtering Metal Nanolayer on Microstructured Porous Alumina. *Microsc. Res. Tech.* **2012**, *75* (5), 698–701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jemt.21114>.
- (128) Lee, S. M.; Nam, D. H.; Lee, D.; Lim, S. H.; Son, S. J.; Lee, S. Gold Nanoparticles Deposited on a Conical Anodic Aluminum Oxide Substrate for Improved Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4* (12), 12905–12912. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c02105>.
- (129) Huang, X.; El-Sayed, M. A. Gold Nanoparticles: Optical Properties and Implementations in Cancer Diagnosis and Photothermal Therapy. *J. Adv. Res.* **2010**, *1* (1), 13–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>.
- (130) Chang, L.; Jiang, S.; Luo, J.; Zhang, J.; Liu, X.; Lee, C.-Y.; Zhang, W. Nanowell-Enhanced Raman Spectroscopy Enables the Visualization and Quantification of

- Nanoplastics in the Environment. *Environ. Sci. Nano* **2022**, *9* (2), 542–553.
<https://doi.org/10.1039/D1EN00945A>.
- (131) Aigars, J.; Barone, M.; Suhareva, N.; Putna-Nimane, I.; Dimante-Deimantovica, I. Occurrence and Spatial Distribution of Microplastics in the Surface Waters of the Baltic Sea and the Gulf of Riga. *Mar. Pollut. Bull.* **2021**, *172*, 112860.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112860>.
- (132) Mishra, A.; Buhhalko, N.; Lind, K.; Lips, I.; Liblik, T.; Väli, G.; Lips, U. Spatiotemporal Variability of Microplastics in the Eastern Baltic Sea. *Front. Mar. Sci.* **2022**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.875984>.
- (133) Merlen, A.; Pardanaud, C.; Coussan, S.; Panagiotopoulos, C.; Grauby, O.; Ruiz, C. M. Formation of Cyanide Compounds during Preparation of Gold Surfaces Evidenced by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **2018**, *49* (7), 1184–1189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.5365>.
- (134) Oberst, J. L.; Jhong, H.-R. “Molly”; Kenis, P. J. A.; Gewirth, A. A. Insight into the Electrochemical Reduction of CO₂ on Gold via Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and N-Containing Additives. *J. Solid State Electrochem.* **2016**, *20* (4), 1149–1154. <https://doi.org/10.1007/s10008-015-2874-z>.
- (135) Chang, X.; Vijay, S.; Zhao, Y.; Oliveira, N. J.; Chan, K.; Xu, B. Understanding the Complementarities of Surface-Enhanced Infrared and Raman Spectroscopies in CO Adsorption and Electrochemical Reduction. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 2656.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-30262-2>.
- (136) Kudelski, A.; Pettinger, B. Fluctuations of Surface-Enhanced Raman Spectra of CO Adsorbed on Gold Substrates. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *383* (1), 76–79.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cplett.2003.11.006>.
- (137) Winkler, W.; Musso, M.; Kirchner, E. C. Fourier Transform Raman Spectroscopic Data on the Fossil Resin Siegburgite. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34* (2), 157–162.
<https://doi.org/10.1002/JRS.971>.
- (138) Liu, J.; Sun, J.; Huang, X.; Li, G.; Liu, B. Goldindex: A Novel Algorithm for Raman Spectrum Baseline Correction. *Appl. Spectrosc.* **2015**, *69* (7), 834–842.
<https://doi.org/10.1366/14-07798>.

- (139) Lee, C.-H.; Fang, J. K.-H. The Onset of Surface-Enhanced Raman Scattering for Single-Particle Detection of Submicroplastics. *J. Environ. Sci.* **2022**, *121*, 58–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.08.044>.
- (140) Nandakumar, P.; Kovalev, A.; Volkmer, A. Vibrational Imaging Based on Stimulated Raman Scattering Microscopy. *New J. Phys.* **2009**, *11* (3), 33026. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/3/033026>.
- (141) Stiles, P. L.; Dieringer, J. A.; Shah, N. C.; Van Duyne, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1* (1), 601–626. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112814>.
- (142) Armbrust, E. V. The Life of Diatoms in the World's Oceans. *Nature* **2009**, *459* (7244), 185–192. <https://doi.org/10.1038/nature08057>.
- (143) Bossert, D.; Urban, D. A.; Maceroni, M.; Ackermann-Hirschi, L.; Haeni, L.; Yajan, P.; Spuch-Calvar, M.; Rothen-Rutishauser, B.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Petri-Fink, A.; Schwab, F. A Hydrofluoric Acid-Free Method to Dissolve and Quantify Silica Nanoparticles in Aqueous and Solid Matrices. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 7938. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44128-z>.
- (144) Okunev, A. G.; Shaurman, S. A.; Danilyuk, A. F.; Aristov, Y. .; Bergeret, G.; Renouprez, A. Kinetics of the SiO₂ Aerogel Dissolution in Aqueous NaOH Solutions: Experiment and Model. *J. Non. Cryst. Solids* **1999**, *260* (1), 21–30. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(99\)00568-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-3093(99)00568-2).
- (145) Greenberg, S. A. The Depolymerization of Silica in Sodium Hydroxide Solutions. *J. Phys. Chem.* **1957**, *61* (7), 960–965. <https://doi.org/10.1021/j150553a027>.
- (146) Sato, H.; Shimoyama, M.; Kamiya, T.; Amari, T.; Šašić, S.; Ninomiya, T.; Siesler, H. W.; Ozaki, Y. Raman Spectra of High-Density, Low-Density, and Linear Low-Density Polyethylene Pellets and Prediction of Their Physical Properties by Multivariate Data Analysis. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *86* (2), 443–448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.10999>.
- (147) Bredács, M.; Barretta, C.; Castillon, L. F.; Frank, A.; Oreski, G.; Pinter, G.; Gergely, S. Prediction of Polyethylene Density from FTIR and Raman Spectroscopy Using Multivariate Data Analysis. *Polym. Test.* **2021**, *104*, 107406.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107406>.

- (148) Bentley, P. A.; Hendra, P. J. Polarised FT Raman Studies of an Ultra-High Modulus Polyethylene Rod. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1995**, *51* (12), 2125–2131. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01513-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01513-3).
- (149) Arruebarrena de Báez, M.; Hendra, P. J.; Judkins, M. The Raman Spectra of Oriented Isotactic Polypropylene. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1995**, *51* (12), 2117–2124. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01512-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01512-1).
- (150) Nava, V.; Frezzotti, M. L.; Leoni, B. Raman Spectroscopy for the Analysis of Microplastics in Aquatic Systems. *Appl. Spectrosc.* **2021**, *75* (11), 1341–1357. <https://doi.org/10.1177/00037028211043119>.
- (151) Nielsen, A. S.; Batchelder, D. N.; Pyrz, R. Estimation of Crystallinity of Isotactic Polypropylene Using Raman Spectroscopy. *Polymer (Guildf)*. **2002**, *43* (9), 2671–2676. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00053-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00053-8).
- (152) Hahladakis, J. N.; Velis, C. A.; Weber, R.; Iacovidou, E.; Purnell, P. An Overview of Chemical Additives Present in Plastics: Migration, Release, Fate and Environmental Impact during Their Use, Disposal and Recycling. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *344*, 179–199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.014>.