



## **Analyse de microparticules : échantillonnage, classification et identification rapides**

Arnaud DI BITETTO / Bruno Beccard

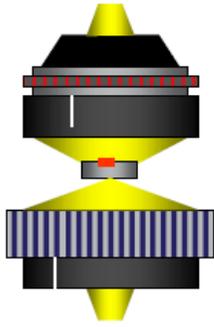
- Complémentarité et robustesse IRTF et Raman
- Vers la microscopie
- Thématique : microparticules/microplastiques
- Echantillonnage (filtration)
- Solutions proposées pour l'analyse par microscopies IRTF et Raman
  - Analyse ponctuelle et manuelle simple
  - Imagerie
  - Analyse totalement automatisée : les Wizards



## Complémentarité IRTF et Raman

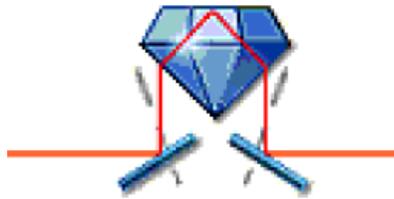
# IR-Raman → Techniques complémentaires

Infrarouge (FT)	Raman (FT-dispersif)
Spectroscopie d'absorption avec modes Transmission, Réflexion et ATR	Spectroscopie d'émission avec dispersion de l'échantillon
Vibrations sensibles → Changement moment dipolaire (O-H, N-H, C=O)	Vibrations sensibles → Changement Polarisabilité (C=C)
Signaux intenses des groupes terminaux	Signaux intenses du squelette
Préparation éventuelle de l'échantillon	Peu de préparation
Interférence avec H <sub>2</sub> O	Sans interférence avec H <sub>2</sub> O
Pas interférence fluorescence	Forte interférence fluorescence avec laser faible longueur d'onde
Pas d'analyse confocale Fenêtres utilisées en KBr, ZnSe	Possibilité confocalité (analyser échantillon au travers du verre ou de l'emballage)
Information chimique surtout	Information chimique et physique
Visualisation et acquisition simultanées Résolution spatiale < 7X7 micron	Visualisation puis acquisition (exposition Laser) Résolution spatiale < 1micron



## Transmission

- Méthode de choix pour le quantitatif
- Echantillon mélangé et pressé, bonne sensibilité
- Echantillon doit être mince



## Réflexion

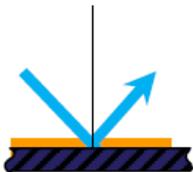
- **Attenuated Total Reflectance (ATR)**

- Echantillon en contact avec cristal
- Simple et rapide, en général non-destructif



- **Réflexion diffuse (DRIFTS)**

- Dilution échantillon dans matrice (ex KBr)
- Simple, mais nécessite un mélange

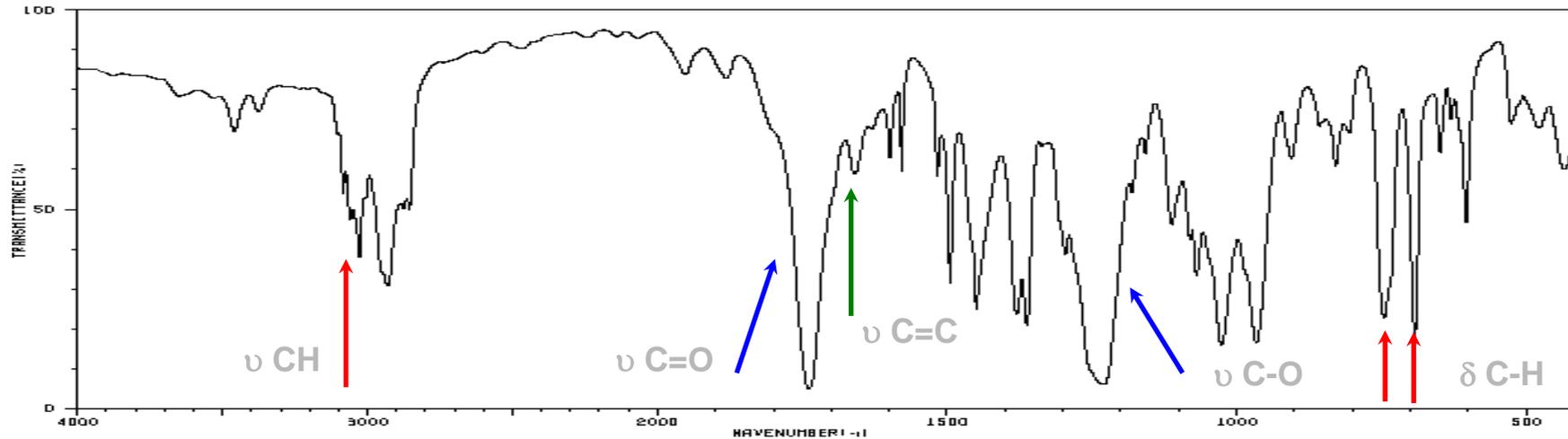


- **Réflexion spéculaire**

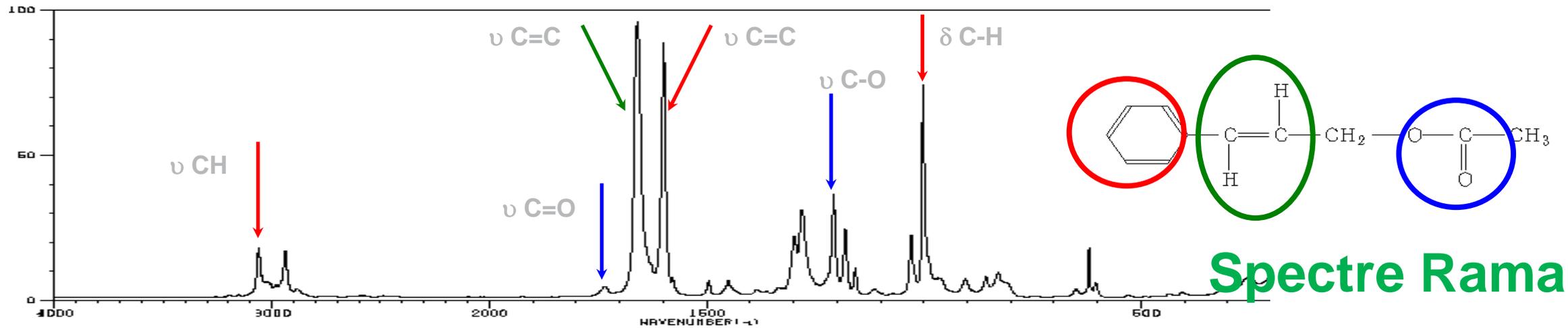
- Echantillon doit être réfléchissant ou sur miroir
- Signaux peuvent être très faibles

# IR-Raman → Techniques complémentaires pour la sélectivité des pics

## ■ Trans-cinnamyl acetate



**Spectre IR**

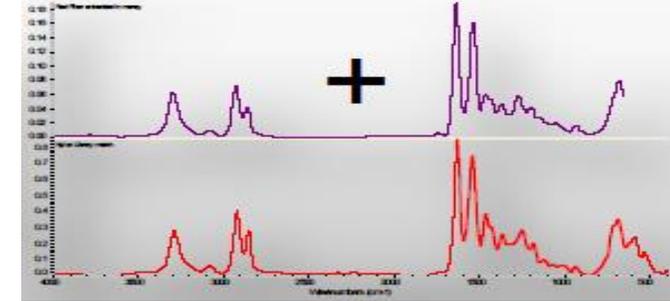


**Spectre Raman**

# 3 méthodes d'acquisition

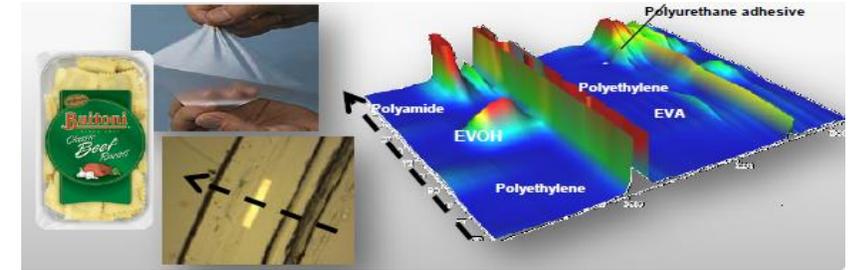
- **Pointer et acquérir pour...**

- Identification de spécimens uniques
  - ❖ Fibres , particules , inclusions
  - *Observer, obtenir un spectre, et identifier*



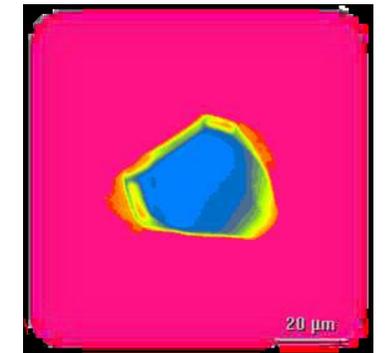
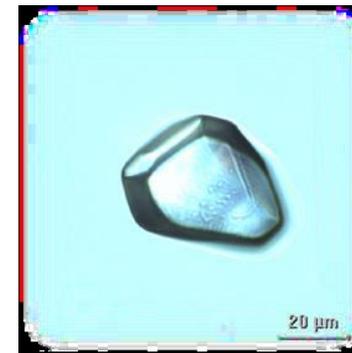
- **Cartographier pour...**

- Caractériser des sections et petites surfaces
  - ❖ Films multicouches et laminés
  - ❖ Ecailles peintures et autres petites coupes
  - ❖ Distribution sur petites surfaces
  - *Observer, obtenir une série de spectres, identifier / mesurer*



- **Imager pour...**

- Caractériser de larges surfaces
  - *Observer, définir une surface, obtenir un jeu de spectres et en extraire l'information chimique*





# Les microplastiques

Arnaud DI BITETTO

# Les microparticules/microplastiques

- Les microparticules sont des particules dont la taille est comprise entre le micron et le millimètre
- De nos jours, on parle de plus en plus des microplastiques, qui sont de petits morceaux de plastiques présents dans les Océans.
- Les microplastiques les plus communs sont le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP) et le polyéthylène téréphtalate (PET).
- Sources
  - Primaire : microparticules directement synthétisées (cosmétique...)
  - Secondaire : microparticules formées par décomposition de plus gros objets (déchets...)

Nom	Abréviation
Polystyrène expansé	EPS
Polypropylène	PP
Polyéthylène	PE
Acrylonitrile butadiène styrène	ABS
Polystyrène	PS
Polyamide (Nylon)	PA
Polyméthyl méthacrylate	PMMA
Polycarbonate	PC
Acétate de cellulose	CA
Polychlorure de vinyle	PVC
Polyéthylène téréphtalate	PET
Polytétrafluoroéthylène	PTFE

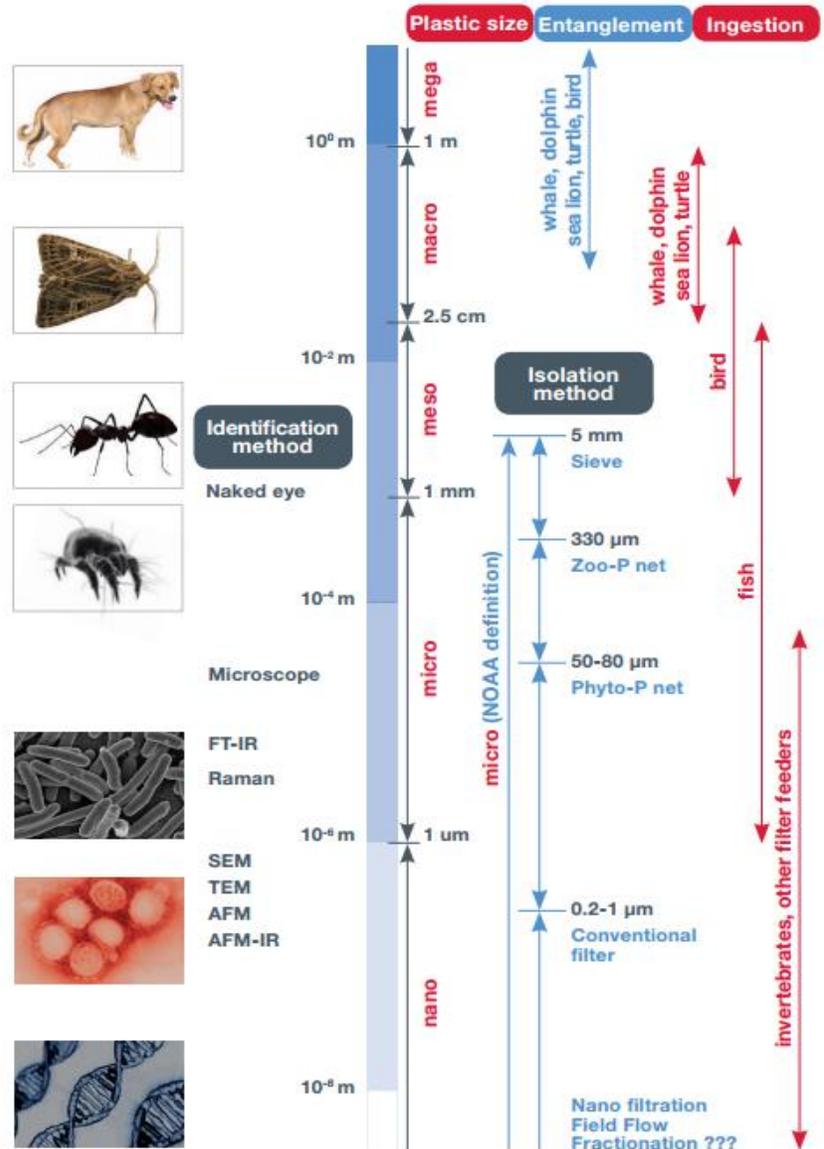
# Le problème des microplastiques

- Omniprésents
  - Ils sont retrouvés partout
- Problème environnemental
  - Vie aquatique
- Chaine alimentaire
  - Eau du robinet
  - Eau en bouteille
  - Poissons et fruits de mer



- Cela concerne 8 millions de tonnes de plastique
- 250 000 tonnes sont des microplastiques

# Tailles de particules plastiques , classification Nations Unies



- Macroplastics – 1m
- Mesoplastics – 2.5cm
- Microplastics – 5mm
- Nanoplastics – 1 $\mu$ m

- Omniprésents
  - Ils sont retrouvés partout
- Problème environnemental
  - Vie aquatique
- Chaine alimentaire
  - Eau du robinet
  - Eau en bouteille
  - Poissons et fruits de mer



Ces microplastiques peuvent véhiculer différents produits chimiques dangereux comme le bisphénol A (BPA), des métaux lourds, des phtalates, et d'autres polluants organiques persistants (POPs)

**BPA** : utilisé en emballage  
→ influence sur les hormones reproductrices, en particulier chez la femme

**Phtalates** : utilisés pour rendre le plastique flexible  
→ pourraient favoriser la croissance de cellules cancéreuses (sein)

**POPs** : produits chimiques qui restent présents  
→ pesticides par exemple, dangereux pour la santé

# Caractérisation des microplastiques

- Questions communes
  - Combien ?
  - De quel type ?
  - De quelle dimension/taille ?
- L'identité du plastique est lié à :
  - La source
  - La toxicité potentielle
    - Certains contiennent des perturbateurs endocriniens
    - Certains ont le potentiel d'être vecteur de toxines

- La technique utilisée pour identifier les microparticules dépend de plusieurs paramètres :
    - ❖ La taille des particules
    - ❖ L'information recherchée
      - Identité
      - Taille de particules
      - Distribution en taille
      - Nombre de particules à analyser
- IRTF et Raman sont des techniques de choix pour l'étude des microparticules, et plus particulièrement des microplastiques

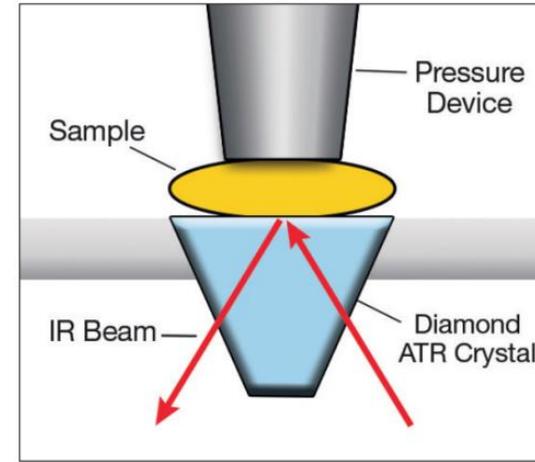


**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C

**Particules > 100 microns**

# Particules > 100 µm

- Pour les particules visibles à l'oeil nu
  - Manipulées avec pince
  - La microscopie n'est pas nécessaire
  - Un spectromètre IRTF avec ATR est très souvent utilisé
- 
- Possibilité d'ajouter un accessoire de microspectroscopie Survey IR pour les particules les plus proches de 100 µm



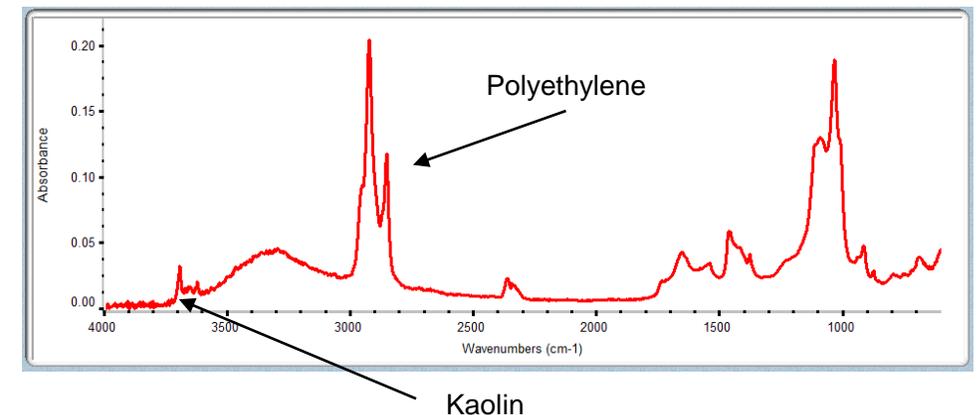
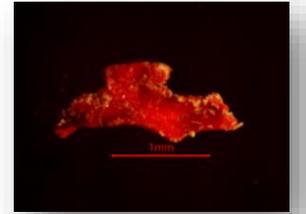
# Particules > 100 µm – Exemple d'impact sur la vie marine

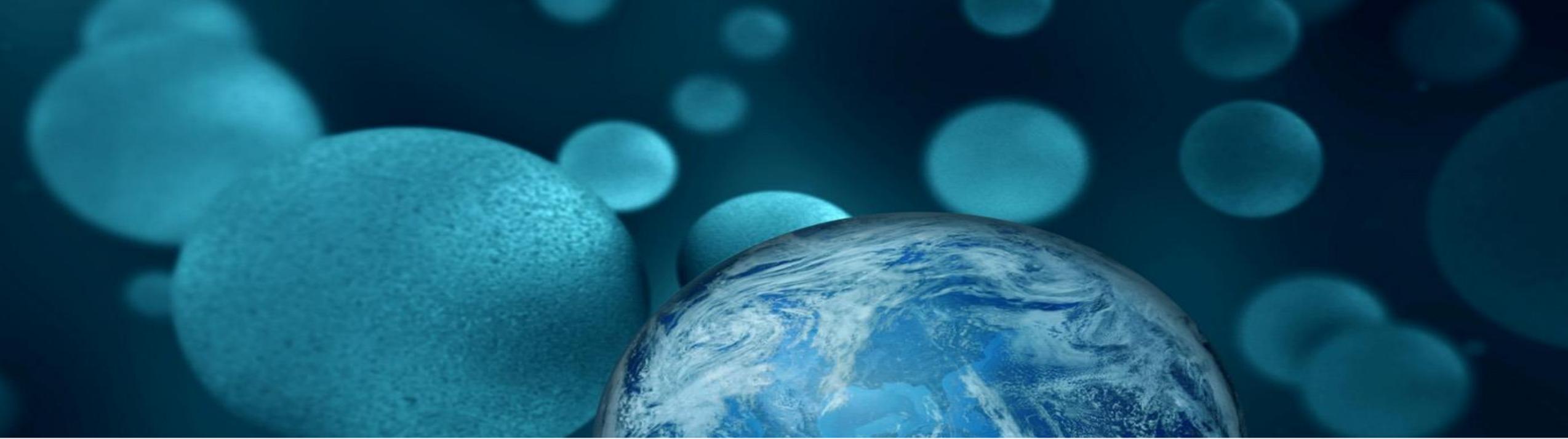
1. Excréments de phoques à Cap Cod (USA)
2. Microplastiques recueillis lors du lavage et de la filtration des échantillons
3. Identification des particules en IRTF par ATR



*Christine A Hudak and Lisa Sette*

*Center for Coastal Studies, Provincetown, MA, USA*





**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C

**Particules < 100  $\mu\text{m}$**

## Microscope Raman

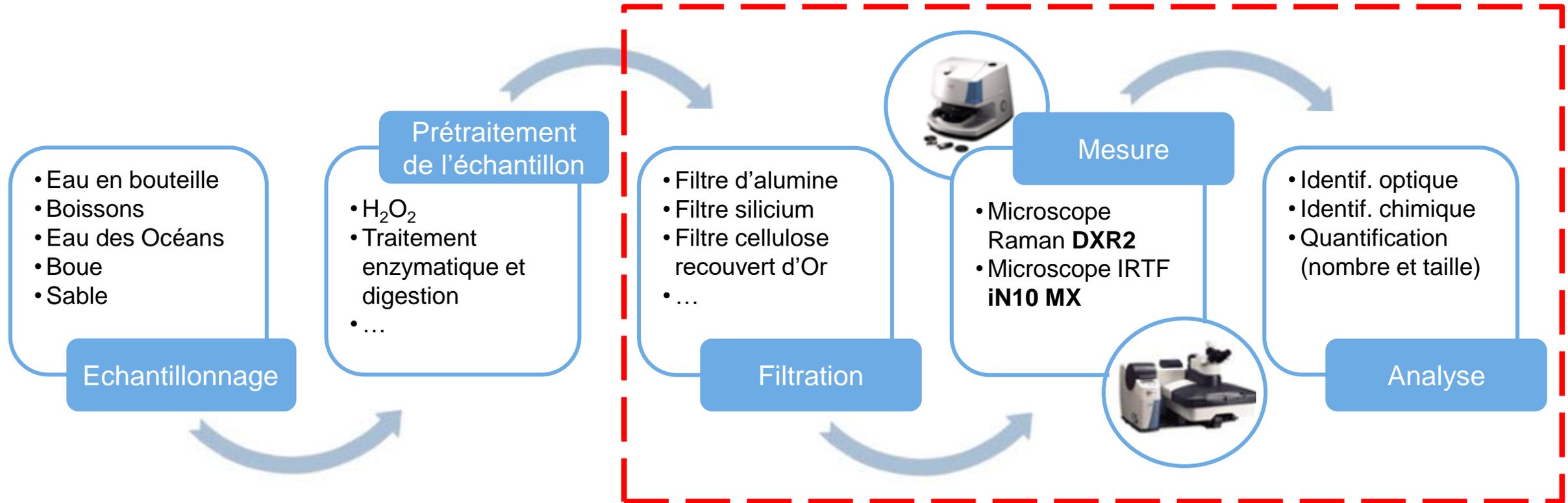


## Microscope IRTF



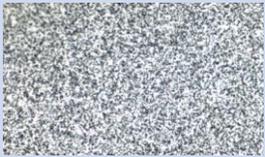
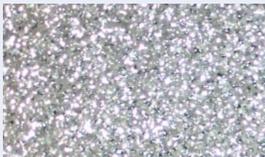
- Pour les particules de taille inférieure à 100  $\mu\text{m}$ , la microscopie est nécessaire
  - Pour visualiser l'échantillon
  - Pour focaliser le faisceau sur une taille suffisamment petite
- La microscopie a deux bénéfices
  - La capacité à analyser de petites particules
  - La capacité à analyser un grand nombre de particules de manière automatisée
- IRTF et Raman sont tous deux disponibles en version microscope

# Protocole de preparation et d'analyse de microparticules



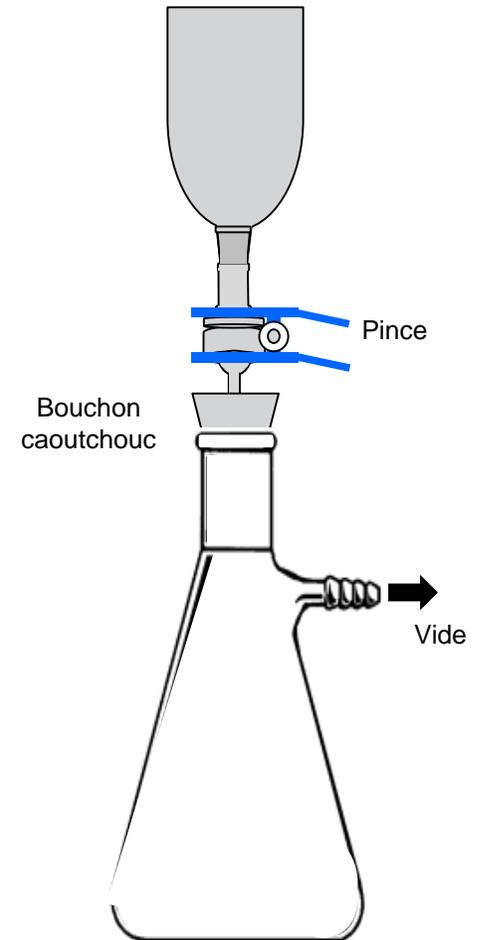
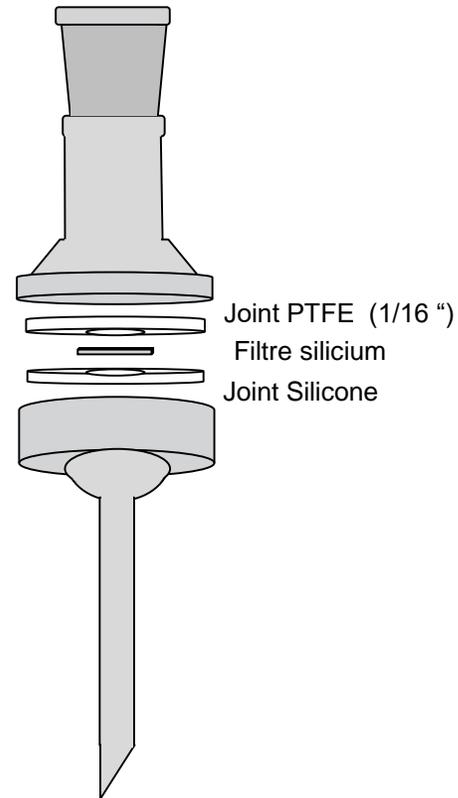
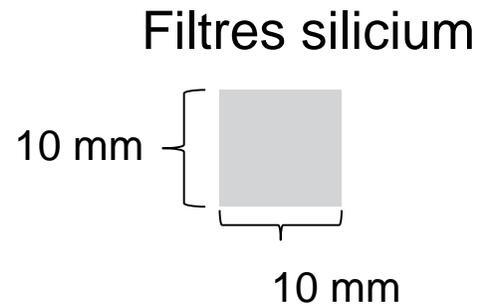
- Besoin d'un filtre avec la signature caractéristique la plus faible possible (IR/Raman)
- Possibilité de travailler de manière automatisée sur le filtre
- Résistants

# Le choix des filtres

Type de filtres	Avantages	Inconvénients	FTIR	Raman	Visualisation (obj x20)
Polycarbonate recouvert d'or	Peut être utilisé avec un appareil de filtration sans joint	Ne reste pas parfaitement plat  Une surface hautement réfléchissante peut nuire au contraste (reconnaissance des particules)	Bon choix pour la réflexion  Possible d'observer des franges	Possible d'avoir les bandes du polycarbonate  Décalage de ligne de base avec certains laser	
Argent	Complètement métallique  Moins cher que l'or	Surface plus réactive	Convenable pour la réflexion (moins bon que l'or)	Quelques artéfacts spectraux à cause des filtres	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Plus rigide  Lumière transmise si assez intense  Moins cher	Délicat : casse facilement  Image visuelle : problème de contraste possible.	Peut être utilisé en transmission mais pas en dessous de 1250 cm <sup>-1</sup>  Faible réflexion	Quelques contributions spectrales Raman des filtres (mais facilement reconnaissables)	
Silicium	Rigide  Très bonnes images optiques	Filtres de forme carrée	Transmission et réflexion possibles.	Des bandes du silicium peuvent être présentes mais facilement reconnaissables → pas un problème	

# Filtration : le starter kit

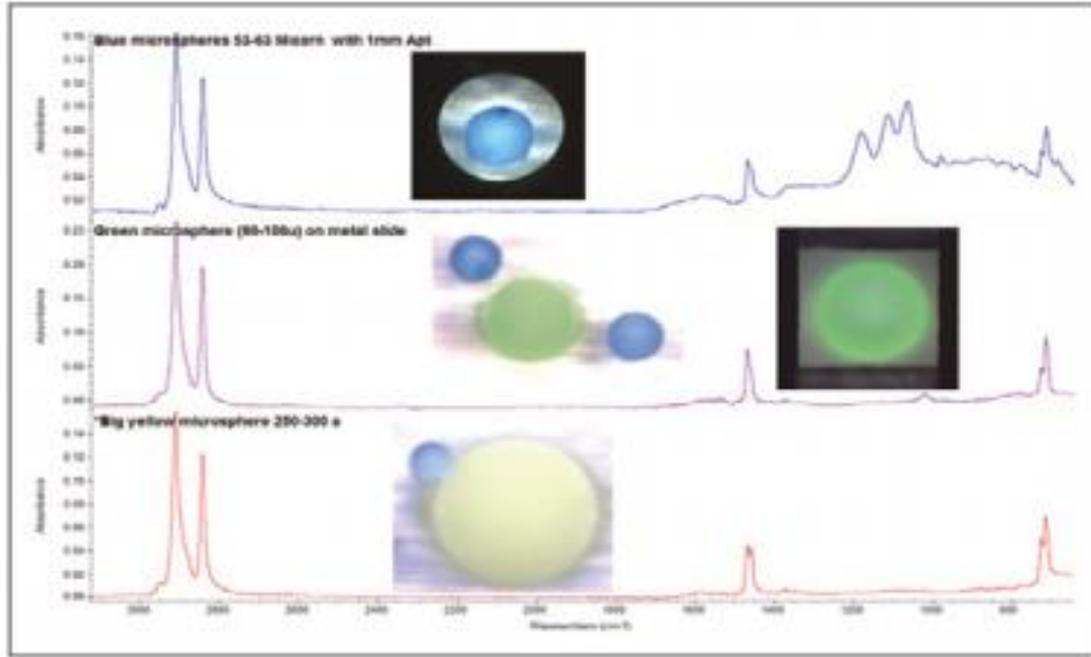
20 filtres Silicium  
20 Joints PTFE  
20 Joints Silicone  
Verrerie pour filtration  
Pince





**Microscope IRTF : pour les particules de taille  $> 10 \mu\text{m}$**

# Analyse ponctuelle : exemple de microbilles



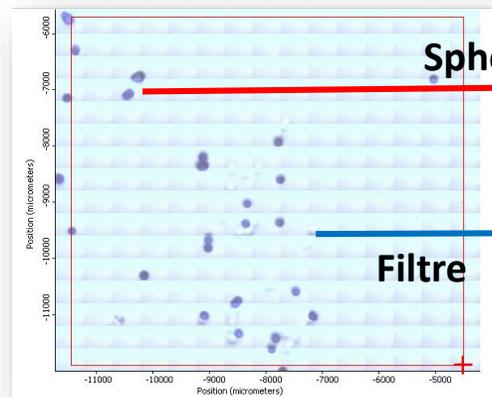
- Microbilles recueillies dans un soin exfoliant
- Les billes ont une taille comprise entre 25 et 100  $\mu\text{m}$
- L'analyse ponctuelle est réalisée avec un microscope IRTF équipé d'un ATR
- Les microbilles sont identifiées comme du polyéthylène



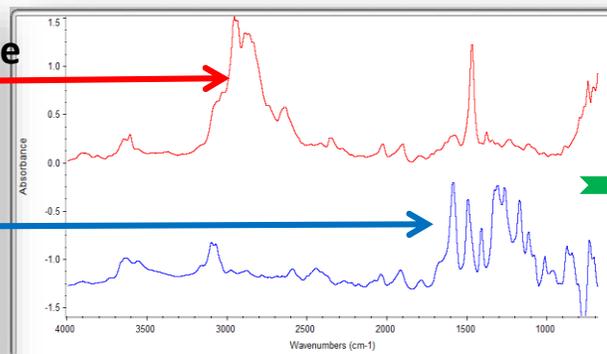
# Analyse par imagerie : exemple de spheres de PE



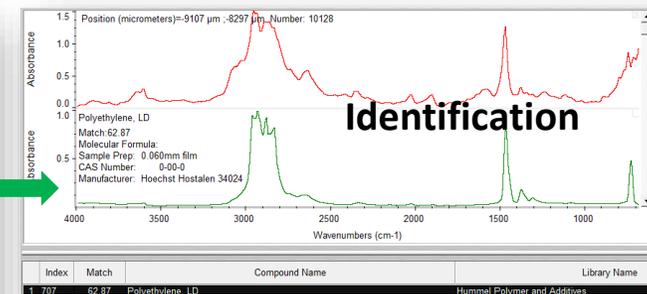
Surface de 7 x 6 mm  
17,500 spectres  
Pas de 50 µm  
Detecteur MCT  
Mode ultra-fast  
10 spectres/s  
(tot ~ 30 min)



(A) Image visuelle du filtre pour voir les microsphères



(B) Spectre d'une sphère et du filtre

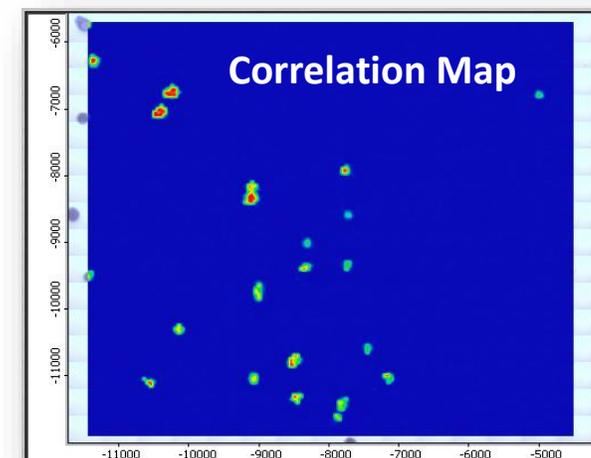
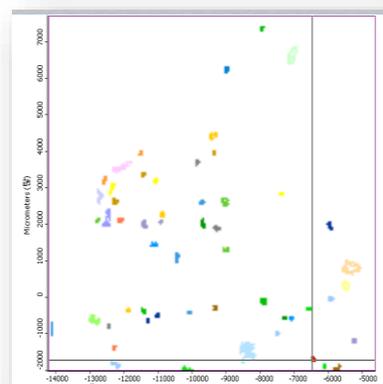


(C) Recherche en bibliothèque pour identifier la nature de la microsphère

Feature #	Area (µm²)	Length (µm)	Width (µm)	Aspect
1	2999	302.40	150.00	2.0
2	1499	75.00	100.00	0.8
3	2749	149.98	150.00	1.0
4	3999	167.16	150.00	1.2
5	1999	92.68	150.00	0.6
6	1749	92.68	100.00	0.9
7	18249	1095.18	299.99	2.6
8	2249	100.00	150.00	0.7
9	1749	85.35	150.00	0.6
10	1499	75.00	100.00	0.8
11	1999	276.07	150.00	1.9
12	1499	75.00	100.00	0.8
13	1499	75.00	100.00	0.8
14	1749	85.35	150.00	0.6
15	6749	331.50	299.99	1.1
16	1999	92.68	100.00	0.9
17	1499	75.00	100.00	0.8
18	1749	85.35	150.00	0.6
19	2249	106.13	100.00	1.1
20	1999	100.00	100.00	1.0
21	1999	110.35	150.00	0.7
22	3749	142.67	199.99	0.7
23	2499	110.35	150.00	0.7
24	6999	195.71	249.99	0.8
25	13749	495.07	449.99	1.1
26	3499	160.35	199.99	0.8
27	2749	150.00	150.00	1.0
28	2749	160.35	150.00	1.1
29	2999	133.93	199.99	0.7
30	2999	145.71	150.00	1.0
31	3749	153.03	199.99	0.8

Image Analysis

(E) Analyse d'image pour nombre et taille des sphères



(D) Image en corrélation pour localiser les particules avec la même composition



## Analyse automatique en routine des microparticules sur filtres (disponible en IRTF et Raman)

### Processus automatisé en 4 étapes

- Localisation
- Extraction
- Identification
- Rapport

Le temps d'analyse passe de plusieurs heures à quelques minutes

Ce n'est pas magique, mais breveté





Si vous souhaitez étudier les **étoiles**, allez vous étudier l'ensemble du **ciel** ?  
Ou juste pointer les **étoiles** ?



Si vous souhaitez analyser les **particules**, allez-vous étudier l'ensemble du **filtre** ?  
Ou juste pointer les **particules**

## Notre proposition et ses bénéfices

**Analyse automatique** → Localise, analyse, identifie, quantifie (nombre et taille des particules)

**FTIR et Raman** → Disponible pour les deux techniques avec la même approche

**Optimisation du temps de travail**

**Augmentation de la productivité**



## 1) Mosaique



## 2) Lancer le Wizard Particules

**Particles Wizard**  
Particles spread across an area such as a salt plate, a mirror or any reflective surface

**When to use the Particles Wizard?**  
Particles spread across an area such as a salt plate, a mirror or any reflective surface. Use in Reflection and Transmission modes.

**Why use the Particles Wizard?**  
The wizard allows you to quickly locate and identify all particles in your sample.

**What does the Particles Wizard do?**  
The wizard will locate sample particles and determine the optimal aperture size for each particle. The wizard will automatically collect a spectrum and background for all particles, report the percent area of each particle and the best library match.

**How do I prepare a sample for the Particles Wizard?**  
To prepare your sample, simply place your particles on a mirrored slide for reflection. For transmission analysis, place your sample on a IR transparent salt window or use a compression cell.

**NOTE:** Use the roller knife included in your sample kit to flatten the particles before analysis, if not using a compression cell. However, diffuse samples work as well.

**Example:**  
Particles obtained after micro-filtration, at a crime scene, or surface contaminates.



3) Les particules sont détectées par niveau de gris.

L'utilisateur choisit les paramètres de contraste et l'intervalle de taille de particules à retenir.

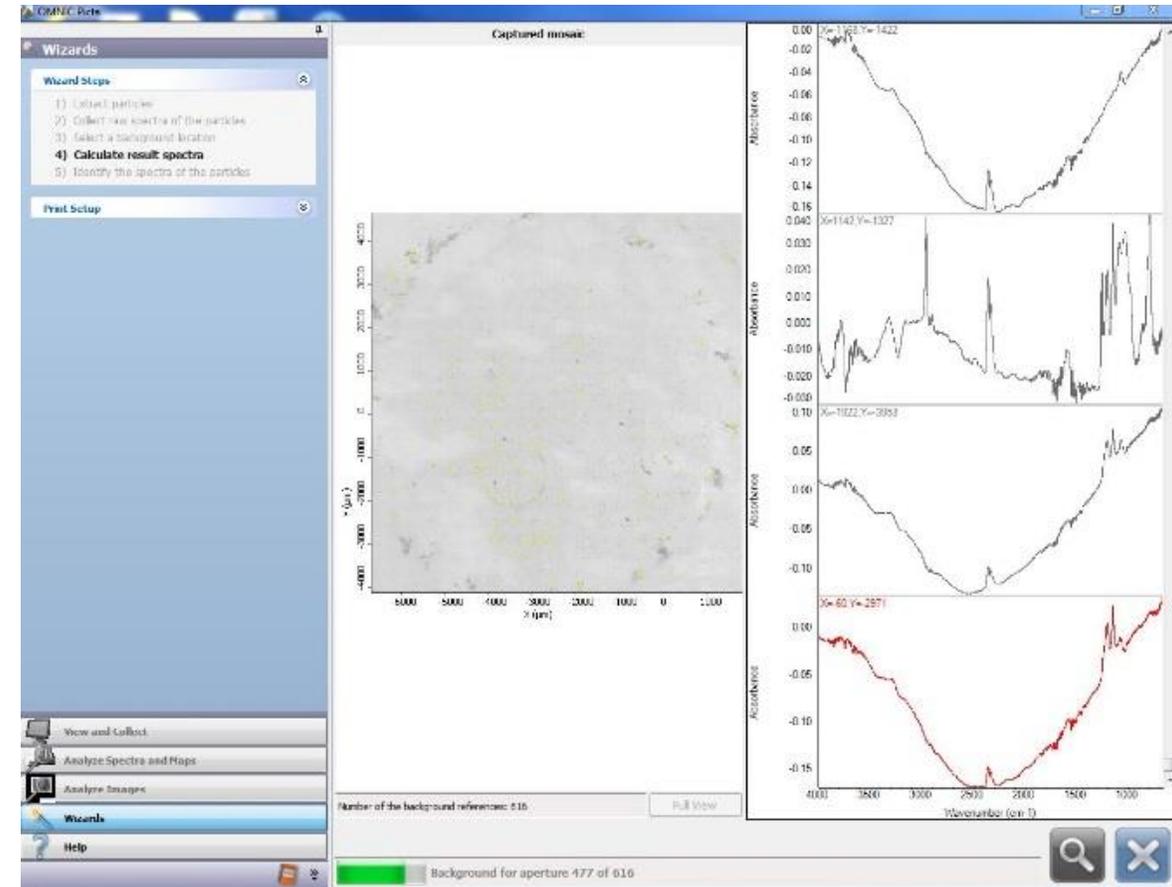
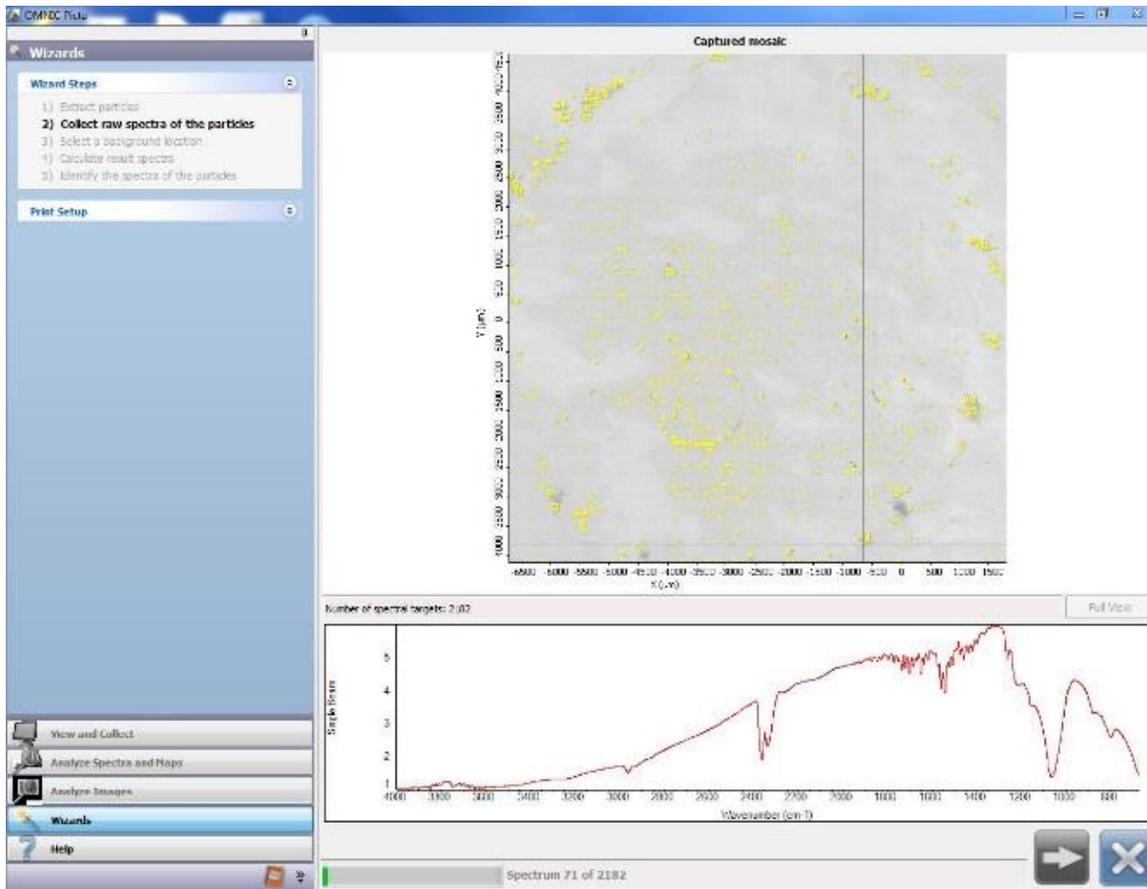
The screenshot displays the OMNIC Picta software interface. On the left, the 'Wizards' panel shows the 'Wizards Steps' section with a list of five steps: 1) Extract particles, 2) Collect raw spectra of the particles, 3) Select a background location, 4) Calculate result spectra, and 5) Identify the spectra of the particles. Below this, the 'Particle Analysis Options' section includes checkboxes for 'Auto-mask particles', 'Image Preprocessing' (with 'Smooth' checked), 'Fill holes whose size is:' (with a slider from Small to Any), 'Separate touching particles' (checked), and 'Exclude partially visible particles'. The 'Particle Mask Intensity' section has 'Auto-detect intensity' unchecked and 'Dark' selected. The 'Particle mask threshold' section has a slider from Less to More. At the bottom of the wizard panel, there is a 'Print Setup' section and a navigation menu with 'View and Collect', 'Analyze Spectra and Maps', 'Analyze Images', 'Wizards', and 'Help'.

The main window shows a 'Captured mosaic' image with a coordinate system (X and Y in  $\mu\text{m}$ ) ranging from -6000 to 4000. Below the image, there are two histograms: 'Image intensity histogram' and 'Particle size sieve ( $\mu\text{m}$ )'. The 'Image intensity histogram' shows a distribution of intensities from 0% to 100%. The 'Particle size sieve' histogram shows a distribution of particle sizes from 0 to 1000  $\mu\text{m}$ . At the bottom of the interface, it displays 'Number of target particles: 2182' and a 'Full View' button.



4) Le logiciel ajuste automatiquement l'ouverture à la taille de chaque particule et enregistre les spectres.

5) L'utilisateur choisi une position pour le background. Le logiciel enregistre le background pour chaque ouverture utilisée



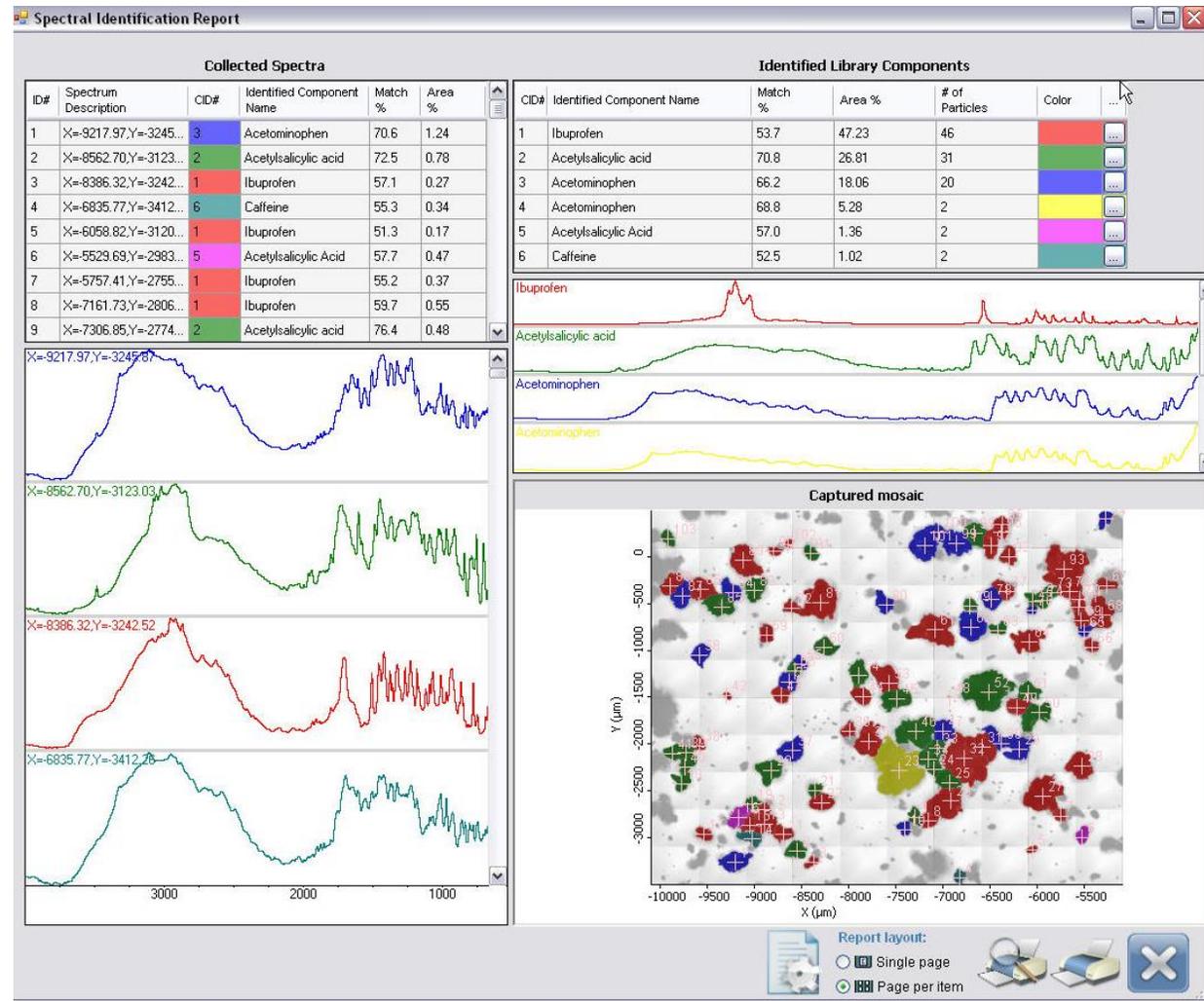
# Analyse automatisée grace au Wizard pour particules (Picta)



- Exemple de rapport édité

liste particules + tailles

spectres particules



Matières identifiées

Spectres matières identifiées

Filtre avec code couleur pour particules

# Résumé microparticules par analyse IRTF

L'analyse des microparticules de taille  $> 10 \mu\text{m}$  peut être réalisée par microscopie IRTF via :

- Une acquisition ponctuelle et manuelle simple
- L'imagerie
- **Le wizard d'analyse de particules** → La meilleure solution

- Le wizard Particules sur Picta peut être utilisé pour l'analyse automatisée de microparticules
- Le wizard a été amélioré pour permettre de travailler avec de larges mosaïques (approx.  $16 \text{ mm} * 14 \text{ mm}$ ) et plus de 10000 particules
- L'image visuelle est utilisée pour sélectionner les particules et pour évaluer leurs tailles
- Les spectres IRTF sont utilisés pour identifier les particules (ouverture ajustée automatiquement pour chaque particule + background)
- Les résultats peuvent être obtenus sous forme de rapport (PDF) de fichiers textes ou de map classiques

...Pour les particules de taille  $< 10 \mu\text{m}$ , la microscopie Raman est recommandée



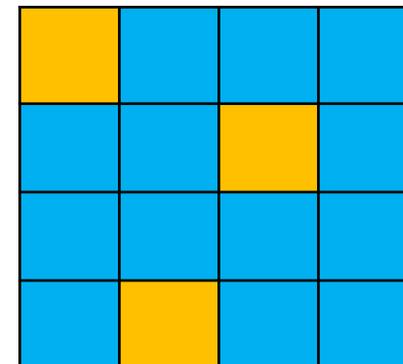
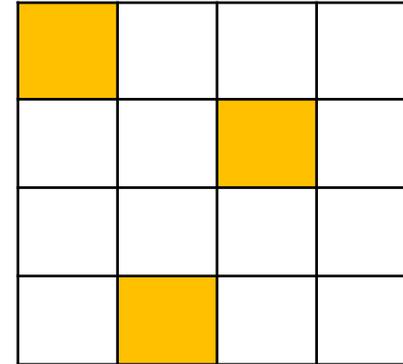
**Microscope Raman : pour les particules de taille  $< 10 \mu\text{m}$**

# Microscopie Raman pour les petites particules

- Les particules de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$  peuvent être étudiées par microscopie IRTF et par microscopie Raman
- Pour les particules de taille inférieure à 10 microns, la microscopie Raman est recommandée
- Meilleure performance en lumière blanche du microscope
  - Plus facile de voir les échantillons, en particulier les petites particules
- Meilleure résolution spatiale



- Point unique
  - L'analyse est réalisée sur un seul point
- Plusieurs points
  - De nombreuses particules sont analysées en séquence (analyse automatisée)
- Imagerie
  - Les données sont enregistrées de manière continue sur une surface pour obtenir une image chimique de l'échantillon



## ECHANTILLONNAGE

Rivage de la plage de Pellestrina (GPS: 45° 15' 58.507" N 12° 18' 7.639" E), une des deux longues îles au bord de Venise

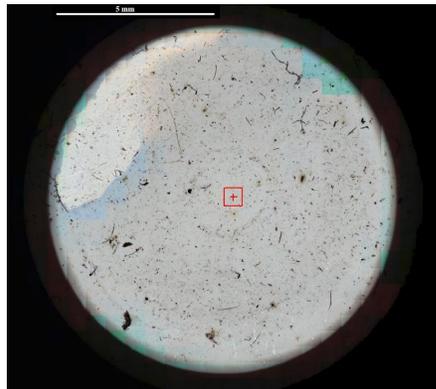
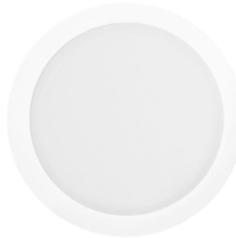


Image après filtration

## FILTRATION

Filtration sur un filtre d'alumine (Whatman)



## TRAITEMENT

L'extraction est réalisée en faisant flotter 250 grammes de sédiments dans une solution d'iodure de sodium ( $1,8 \text{ g cm}^{-3}$ ) avec un flux d'air (30 min) pour secouer les sédiments et favoriser la flottaison des microplastiques

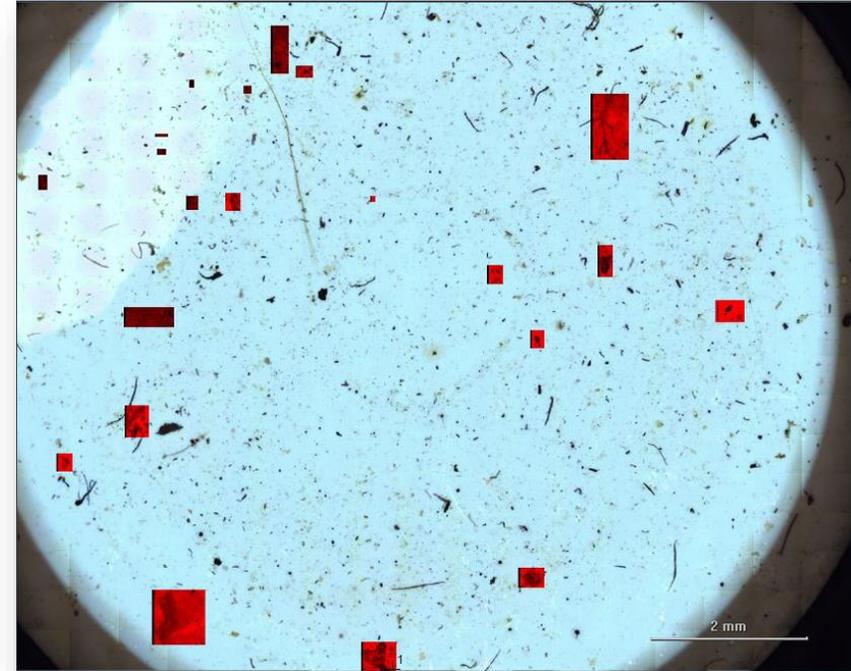
Une purification est réalisée avec du peroxyde d'hydrogène pour éliminer la matière organique

M. Rocchia, I. Ruff et A. Vianello

# Analyse par imagerie : exemple de microplastiques dans des sédiments (Italie)

- Conditions expérimentales

- DXR3 xi
- Longueur d'onde laser : 532 nm
- Puissance laser : 5mW
- Vitesse d'acquisition: 200 Hz , 100 passages
- On sélectionne ici 22 régions (possibilité d'analyser le filtre complet mais énormément de données)



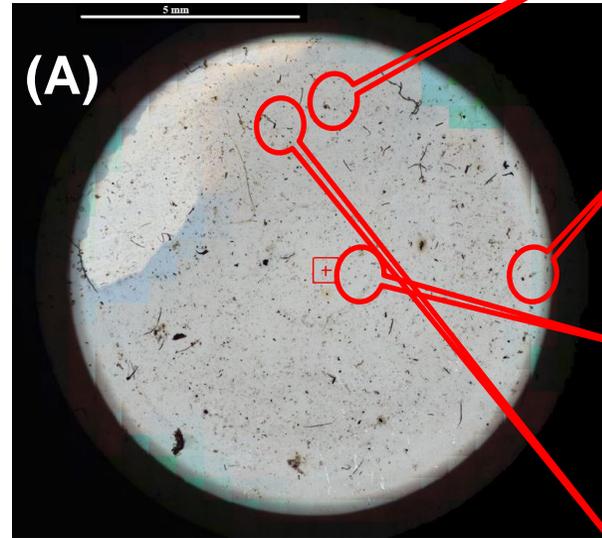
# Analyse par imagerie : exemple de microplastiques dans des sédiments (Italie)

(A) Image visible du filtre (mosaïque)

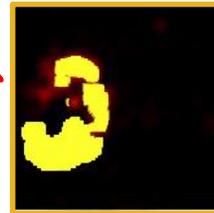
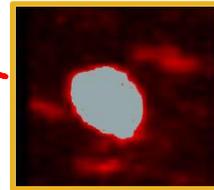
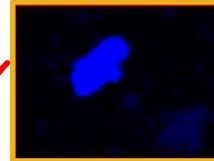
(B) Acquisition des spectres Raman

(C) Images chimiques en corrélation

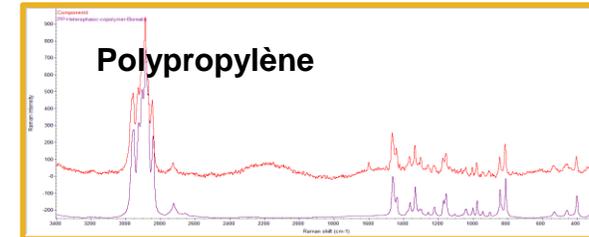
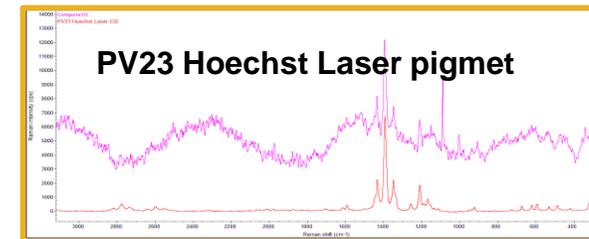
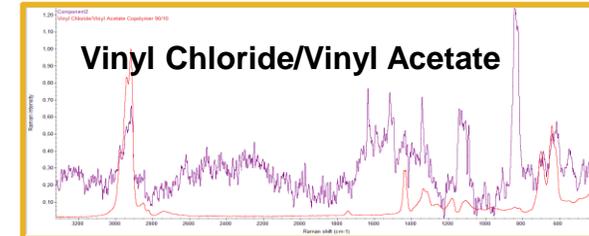
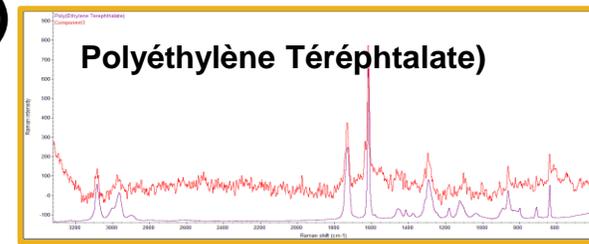
(D) Recherche en bibliothèque pour identifier les particules



(C)



(D)



Au total, 6 types de plastiques ont été identifiés dont PP, PET, LLDPE, PVC

## Analyse automatique en routine des microparticules sur filtres (disponible en IRTF et Raman)

### Processus automatisé en 4 étapes

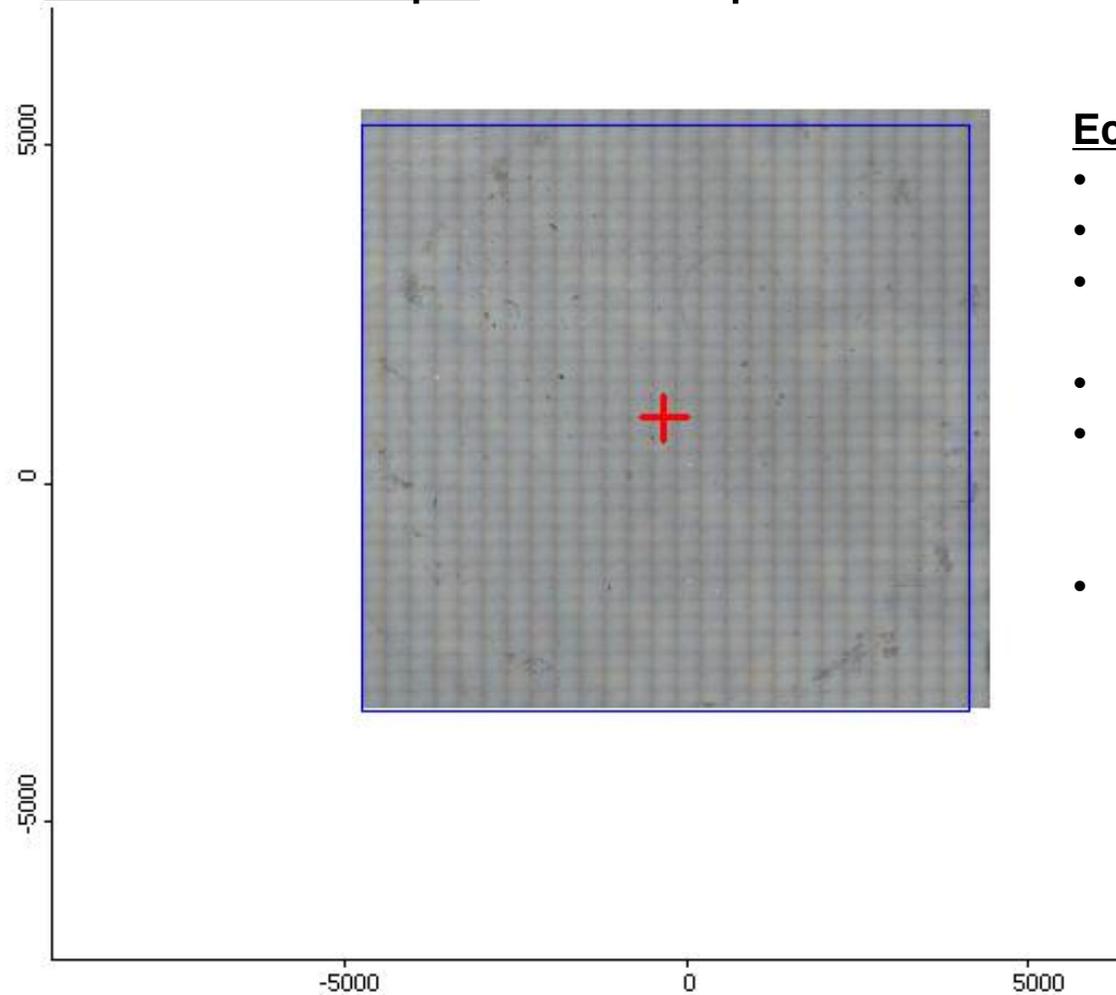
- **Localisation**
- **Extraction**
- **Identification**
- **Rapport**

Le temps d'analyse passe de plusieurs heures à quelques minutes

Ce n'est pas magique, mais breveté

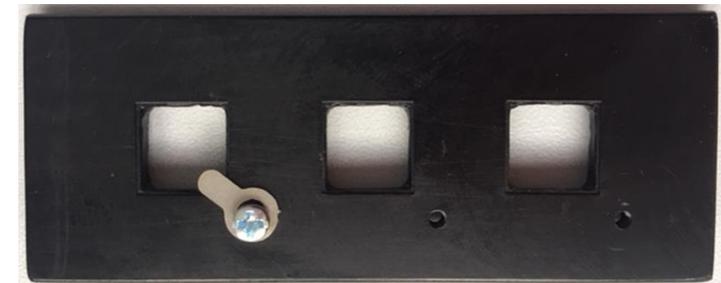


## Première étape : mosaïque

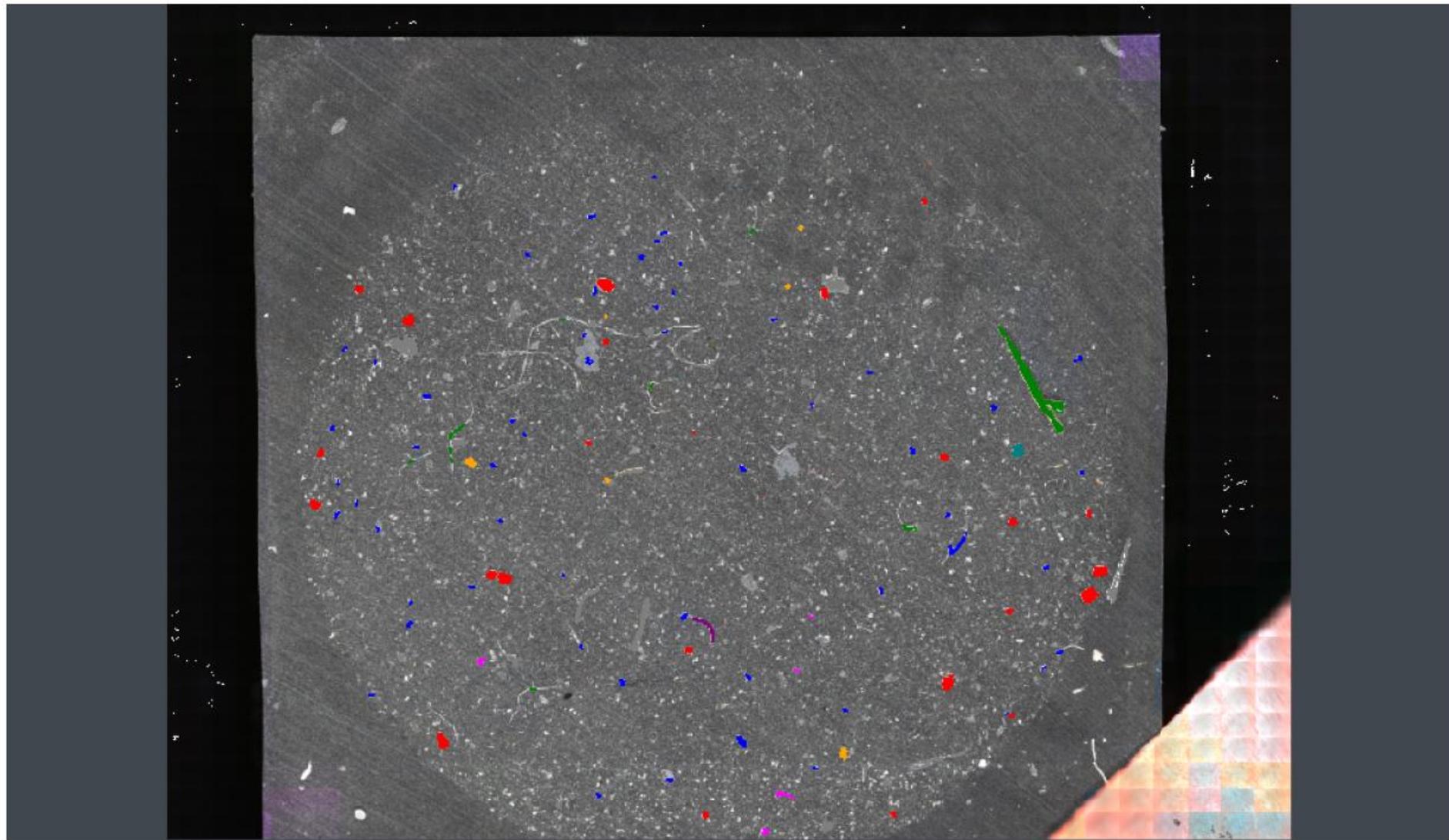


### Echantillonnage

- Echantillon : 500 mL d'eau en bouteille
- Filtre silicium
- Aire circulaire de diamètre 8 mm (défini par les joints)
- Objectif 20X
- L'image visible est utilisée pour sélectionner les particules et déterminer leur taille (niveau de gris)
- Les spectres Raman sont utilisés pour identifier les particules



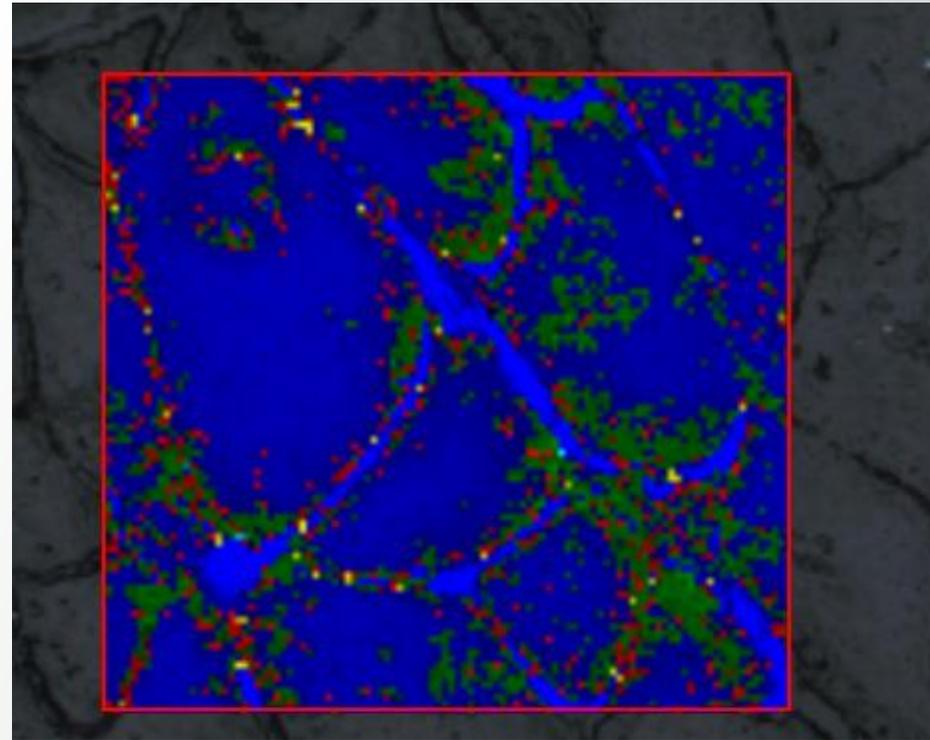
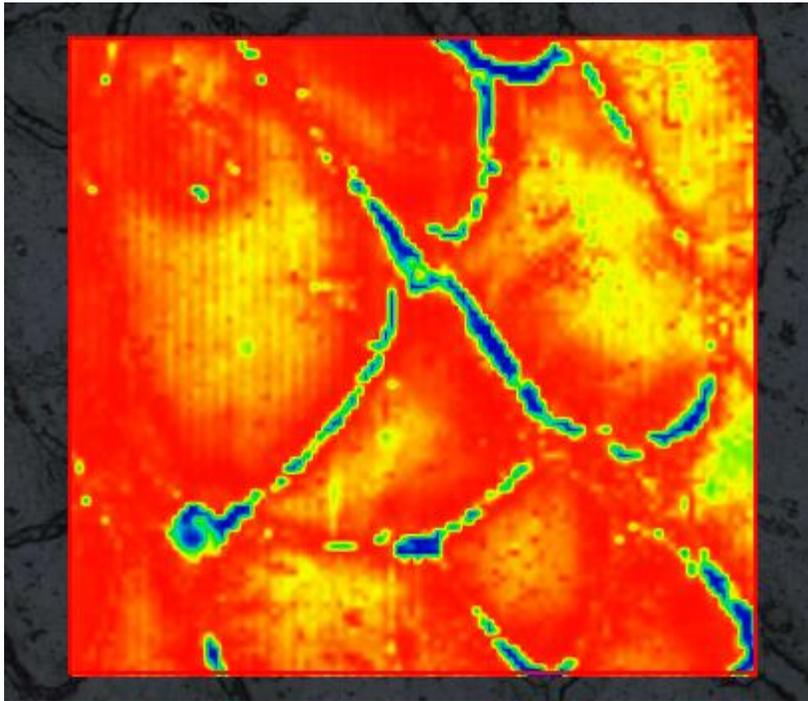
# Sel de cuisine



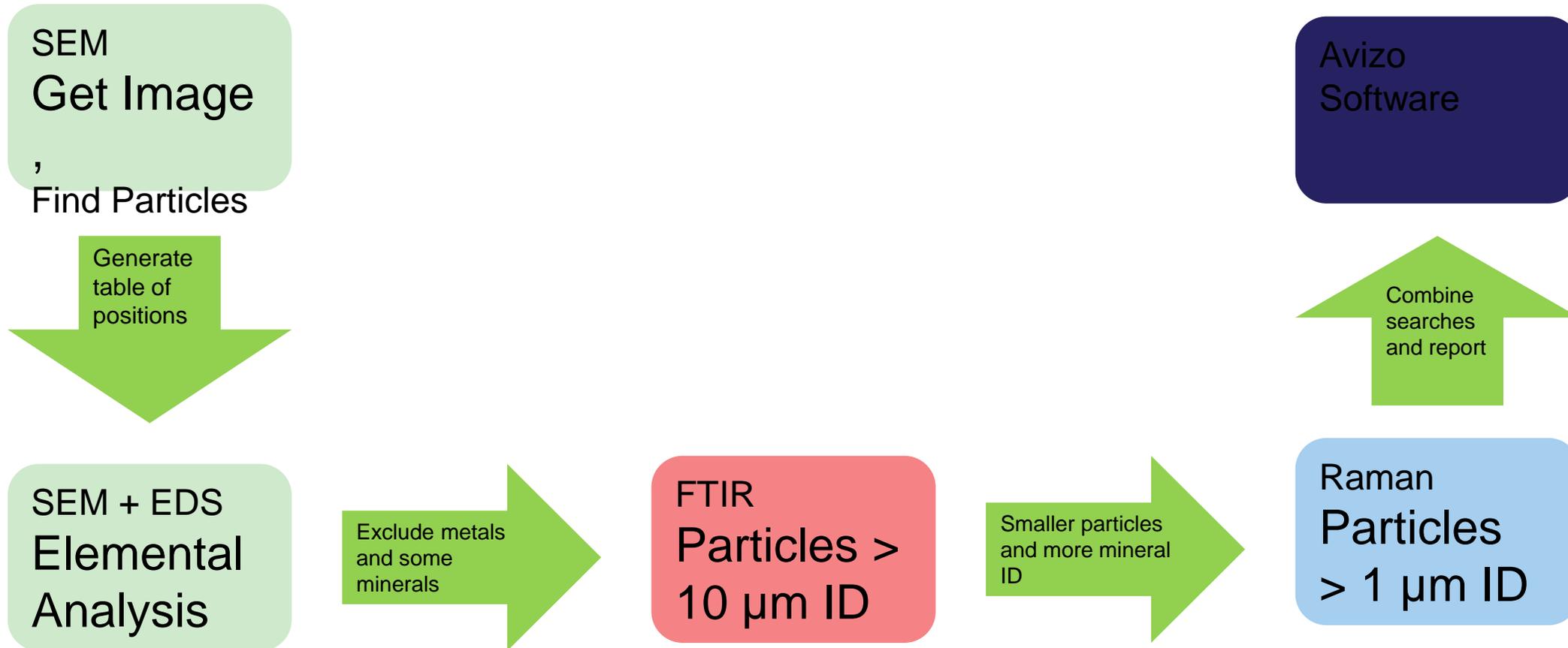
## Materials identified

#	Identified Component Name	Area %	# of Matches
1	Chalk	20.2	23
2	Lazurite	12.35	15
3	PU - Adhesive MDI based	10.83	56
4	LLDPE-TiO2-Schulmann	2.5	6
5	PP-Heterophasic-copolymer-Borealis	1.74	5
6	PP-Homopolymers-Borealis	1.53	1
7	Cuprite	1	1
8	Indian yellow	0.76	2
9	Enargite	0.76	1
10	Polyethylene	0.5	1
11	Styrene/Butadiene, ABA Block Copolymer	0.38	2
12	CopolymerEVA-Exxon Mobil	0.35	1
13	Cobalt blue	0.3	1
14	Hexamethylphosphoramide, 680-31-9	0.3	2
15	Propylene glycol monostearate	0.27	1
16	Styrol-PS-Dow	0.23	1
17	Yttrotantalite-(Y)	0.22	1
18	Evatane33-45	0.2	1
19	Zein, Purified	0.16	1
20	Tunisite	0.15	1
21	Diisodecyl adipate	0.13	1
22	Ankerite	0.12	1
23	Di(n-heptyl, n-nonyl) adipate	0.08	1
24	Red Lead	0.06	1

# Saumon fumé



# Projet S3 , le futur ?



# Conclusions

Les microscopies IRTF et Raman sont des méthodes de choix et complémentaires pour l'analyse de microplastiques.

La préparation des échantillons implique l'utilisation de filtres compatibles avec une étude par IRTF et Raman : les filtres en silicium sont une très bonne option.

Tandis que la microscopie IRTF peut être utilisée pour analyser des particules de taille  $> 10 \mu\text{m}$ , la microscopie Raman (plus résolutive) permet de descendre à des tailles de particules inférieures au micron (exemple d'utilisation : première étude par microscopie IRTF puis passage à la microscopie Raman pour les particules de taille  $< 10 \mu\text{m}$ )

Plusieurs possibilités pour réaliser l'analyse :

- L'analyse ponctuelle et manuelle (rapide pour une particule, mais long si beaucoup de particules)
- L'imagerie (durée modérée)
- **Les Wizards pour une analyse des filtres :**
  - automatisée,
  - productive,
  - de routine

**C'est la solution**