

# レーザー直接赤外イメージングを使用した プラスチックボトルからのマイクロプラス チックの高速、広範囲、オンフィルタ解析

Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムによる  
金コーティングフィルタ上の粒子の直接解析

## 著者

Darren Robey, David Troiani  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

本研究では、Agilent 8700 レーザー直接赤外 (LDIR) ケミカルイメージングシステムを使用して、ポリエチレンテレフタレート (PET) ボトルに由来するマイクロプラスチックを金コーティングされたメンブレンフィルタ上で解析しました。8700 LDIR による粒子の直接オンフィルタ解析は、環境サンプル中のマイクロプラスチックのルーチン検査に適しています。シンプルな実験デザインを使用する LDIR メソッドは高い同定精度で、他の手法と比較して大幅な時間の節約ができ、使用経験のないオペレーターでも簡単に実施することができます。

## はじめに

工業化された経済が環境に与える影響が認識されるようになり、再生可能エネルギー、廃棄物の削減、材料の再利用など、より持続可能な慣行への投資がなされるようになっていきます。プラスチック廃棄物は問題の1つであり、最近の計算によると、世界の海には5兆2500億個以上のプラスチック粒子が浮遊していると推定されています。<sup>1</sup>プラスチックは時間が経つと粉砕されるため、その廃棄物は環境中のマイクロプラスチック汚染の主な原因でもあります。<sup>2</sup>多くの研究者は、ミクロンサイズの粒子(1 μm から 5 mm の間)が生態系に悪影響を与える可能性があることに関して意見が一致していますが、粒子の主な発生源についてもっと知る必要があります。

マイクロプラスチックの特性解析は、各サンプルで解析する粒子の数が多く、典型的なサンプルでは粒子が分布する領域が広いこと、課題が多くあります。水などの環境サンプルには、砂や有機廃棄物などのさまざまな種類の非マイクロプラスチックと混合された何千ものマイクロプラスチック粒子が含まれています。マイクロプラスチック粒子のサブセットを解析し、その結果を外挿して大規模なサンプル集団をシミュレートすることも可能です。ただし、サブセットの選択はランダムであるため、外挿された結果はサンプル全体を正確に表していないおそれがあります。

### サンプル集団全体の迅速な解析

さまざまな技術を使用して、数千の粒子を含む広範囲のマイクロプラスチックサンプルのすべての内容が解析されてきましたが、成功の度合いはさまざまです。フーリエ変換赤外 (FTIR) 顕微分光などの技術を使用すれば、広範囲のサンプルを画像化またはマッピングできます。ただし、視野が 100 × 100 μm に限られるため、顕微鏡スライドと同じ大きさの

サンプルをマッピングするには、数日から1週間以上かかる場合があります。通常、ラマン顕微分光は FTIR よりも高速ですが、分子蛍光干渉や特定のマイクロプラスチックの同定が難しいという制限があります。

アジレントは、FTIR およびラマン顕微分光の限界を克服する量子カスケードレーザー (QCL) 技術を使用した 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムを開発しました。8700 LDIR は、数千個の粒子を含むサンプルに対して、数分〜数時間で (数日〜数週間ではありません)、大量のサンプルに対して完全自動化されたマイクロプラスチック粒子解析を実現します。サンプルに存在するすべての粒子を LDIR によって比較的迅速に解析できるということは、サンプル集団を完全に代表する包括的な結果を取得できることを意味し、マイクロプラスチック研究の支援につながります。

### 高度に自動化された機器

8700 LDIR は波長可変の QCL IR 光源を使用しています。超高輝度レーザーは、サンプル内の任意の位置で中赤外 (MIR) 指紋領域 (1,800 ~ 900 cm<sup>-1</sup>) を掃引して、同定に使用する分子固有のスペクトル特性を提供します。既知の有機材料はすべて、この領域で MIR 活性であり、各タイプの分子は、振動および回転、並進モードを通じて、いくつかのユニークでシャープな分光学的特徴に寄与します。この指紋領域で有機材料の MIR 活性があることから、LDIR はマイクロプラスチックの特性解析に理想的な手法です。より広い MIR 領域 (3,300 ~ 1,800 cm<sup>-1</sup>) で見られる一般的な吸収バンドが、マイクロプラスチックの解析に役立つことがあります。ただし、この領域にバンド特異性がないため、データの役割は補助的なものとされ、マイクロプラスチックの同定には必要とされません。

8700 の QCL 光源は、特定の波数でサンプル全体を迅速にラスタリングできるため、マイクロプラスチック粒子がサンプルのどこにあっても、LDIR は粒子をすばやく見つけることができます。粒子サイズの情報も得られ、アプリケーションの目的に応じて、自動分類したりユーザー定義のグループに分割したりできます。8700 には、低倍率と高倍率の2つの高品質の可視カメラが装備されており、Agilent Clarity ソフトウェアによって完全に制御されます。8700 LDIR は、完全に自動化された IR 顕微分光ソリューションを提供します。従来の IR およびラマン顕微分光技術のように長時間のトレーニングは必要ありません。また 8700 を使用することで、他の技術に比べてはるかに短い時間で、より多くのサンプルをより広い範囲で解析できます。

本研究では、8700 LDIR ケミカルイメージングシステムを使用して、金コーティングされたメンブレンフィルタ上で PET ボトル由来のマイクロプラスチックの解析を行いました。

## 実験方法

### サンプル前処理法

金物店ならどこでも入手できるダイヤモンドコーティングされた金属工具を使用して、ペットボトルの一部を微粉末に粉砕しました。この粒子はエタノールを入れたバイアルに集められ、激しく振とうし、一晩放置しました。この溶液の少量を脱イオン (DI) 水にピペットで入れて、希釈マイクロプラスチック溶液を調製しました。続いて、次のセクションで説明するように、マイクロプラスチック溶液をろ過しました。

### 吸引ろ過装置

金コーティングされたメンブレンフィルタはデリケートで柔軟であるため、フィルタの支持構造として小孔ガラスフリット吸引ろ過フィルタベースを使用しました。ガラスフリットの高い

細孔密度とソリッド構造により、真空圧がより均一に分散され、吸引ろ過中に金コーティングされたメンブレンフィルタが不可逆的に変形するのを防ぎます。この吸引ろ過ガラス器具を、最大真空 70 mbar が可能な Vacuubrand ME 2 NT オイルフリーダイアフラム真空ポンプ (Wertheim、ドイツ) に取り付けました。ポンプには、手動調整バルブとグリセリン充填アナログ圧力計も装備されています (図 1)。SPI Supplies Inc (ウエストチェスター、ペンシルバニア州、米国) 製の金コーティングされたポリカーボネートメンブレンフィルタ (直径 25 mm、孔径 0.8  $\mu\text{m}$ ) を使用して、溶液から粒子を抽出しました。



図 1. 粒子の吸引ろ過を行うために使用した真空装置。

### ろ過処理

ろ過前にフィルタを溶媒 (DI 水) であらかじめ湿らせました。メンブレンフィルタがデリケートであったため、各粒子溶液をろ過するために 600 mbar の穏やかな真空圧を用いました (図 2 を参照)。この設定は、90 秒で約 15 mL のろ過速度に相当します。溶液をろ過している間に、図 3 に示すように、3M 468MP 両面接着パッチを顕微鏡スライド (75 × 25 mm) に合わせてカットしました。



図 2. ろ過に適用した真空圧。

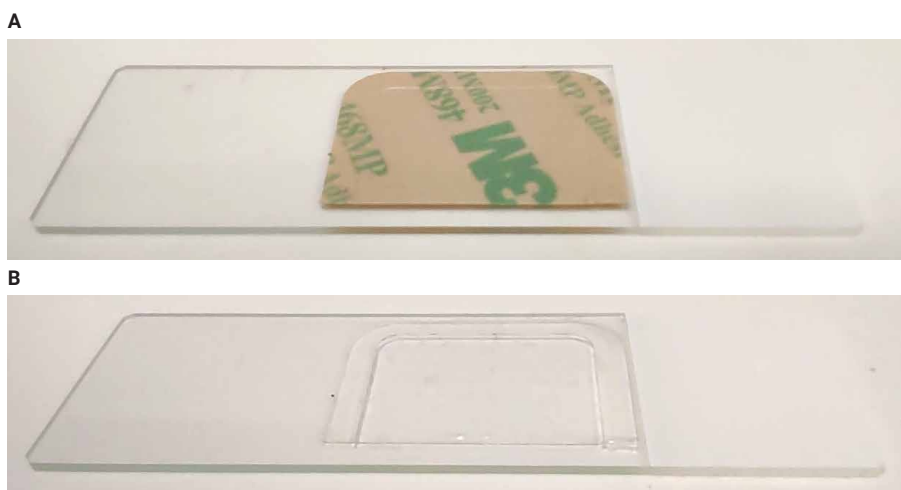


図 3. 両面接着テープを取り付けた顕微鏡スライド (75 × 25 mm)。(A) 両面テープの上部保護層。(B) 上部保護層を取り除いた両面テープ。フィルタを取り付ける準備ができた状態。

接着パッチの切った端が平らで、接着パッチの他のどの部分よりも高く突き出ないように細心の注意を払いました。ろ過が完了し、フィルタが十分に乾燥したら、フィルタはピンセットを使用してガラス器具から慎重に取り外し、顕微鏡スライドの上に静かに置きました。フィルタの外周をピンセットで軽くたたいて、接着パッチ上で平らになるようにしました。フィルタをガラス器具から顕微鏡スライドに移動するために真空ワンドを使用すると、フィルタの端を軽くたたいて平坦性を確保する必要が少なくなります。フィルタを少なくとも 30 分間放置して、吸引ろ過中の一時的な変形をもとに戻し、平らな形状を回復させました (図 4)。8700 LDIR での目標は、表面形状の差が 10  $\mu\text{m}$  以下の表面のサンプルを準備することです。ただし、フィルタを使用すると、表面全体で最大 50  $\mu\text{m}$  の差が見られ、それでも通常は許容できる結果が得られます。顕微鏡スライドを 8700 LDIR サンプルホルダーに置き、解析のために一度に 1 枚ずつ 8700 LDIR に挿入しました。

### 粒子のオンフィルタ解析

Clarity ソフトウェアの自動粒子解析ワークフローを使用して、8700 LDIR によりフィルタサンプルの解析を行いました。あらかじめ搭載されたマイクロプラスチック分析メソッドを選択すると、粒子解析ワークフローが、ユーザー定義領域内のサンプルのすべての粒子を自動的に識別し、各粒子の周囲に境界を描き、写真を撮り、それぞれを同定します。ソフトウェアはライブラリ検索を実行し、IR スペクトルに基づいて各粒子の同定を確認します。ユーザーは、使用するスペクトルライブラリを選択できます。8700 LDIR の操作パラメータを表 1 に示します。

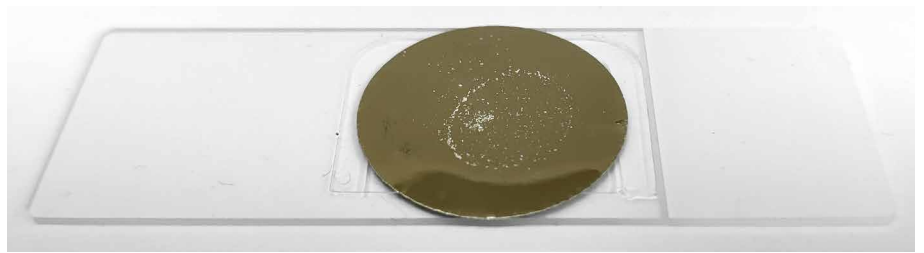


図 4. 顕微鏡スライド上にセットされた金コーティングされたメンブレンフィルタ。

表 1. Agilent 8700 LDIR の操作設定とデータ取り込みパラメータ。

パラメータ	設定値
解析ワークフロー	粒子/ピーク解析
バックグラウンドメソッド	オート/フィルタバックグラウンド
フォーカシング方法	フィルタに手動でフォーカス
スキャンスピード	デフォルト (8)
掃引スピード	デフォルト (3、ハイスピード)
フォーカスオフセット	0
偏光 (°)	デフォルト (0)
減光 (%)	デフォルト (0) / オート
ライブラリ	ユーザー作成のマイクロプラスチックライブラリ
解析した総粒子数	949
総解析時間	1.5 時間 (IR 画像のみ)
粒子あたりの時間	6 秒 (IR 画像のみ)

8700 LDIR はマイクロプラスチック解析には比較的新しい手法であるため、ライブラリの選択がマイクロプラスチックの同定結果の精度に大きな影響を与える可能性があります。Clarity ソフトウェアには基本的な Microplastics Starter Library が含まれていますが、このライブラリは、広範な参照ライブラリとして使用することを目的としたものではなく、機器の機能を実証することのみを目的としています。

最高品質のデータを確実に取得するには、複数のベンダーから容易に入手できるプラスチックおよびポリマーの標準に基づいて独自のライブラリを作成することをお勧めします。Kevley (low-e IR 反射型) スライドは、プラス

チックおよびポリマー標準の基板として使用することが可能で、初期の比較検討では、金コーティングされたメンブレンフィルタから得られたスペクトルとの優れた適合性が示されています。残念ながら、標準的な市販の FTIR ATR ライブラリに含まれるスペクトルは、8700 LDIR の鏡面反射スペクトルと大きく異なっているため、信頼性のある同定には使用できません。この不便さに対処するために、この分野で研究が進行中です。本研究で実施した解析では、Kevley スライドを用いて既知の純粋なプラスチックおよびポリマー標準を解析した結果を用いてマイクロプラスチック用に特別に開発されたアジレントの内部ライブラリを参照しました。

## 結果と考察

PET ボトルからのマイクロプラスチック粒子のオンフィルタ直接解析に、8700 LDIR ケミカルイメージングシステムを使用しました。金コーティングされたポリカーボネートフィルタの IR 反射率の高いコーティングのおかげで、優れたスペクトル応答とコントラスト、および粒子の鮮明な IR と可視画像が得られました (図 5)。直接オンフィルタ解析は、サンプル前処理中にいくつかの点で注意が必要ですが、粒子をフィルタからスライドに移す面倒で多段階のプロセスを経る必要がないという利点があります。直接法は、サンプルの取り扱いや準備ステップが少なく済むため、汚染の可能性も大幅に減少します。

8700 LDIR によって検出されたフィルタ上の粒子数は合計 978 個で、サイズ範囲は直径 20 ~ 478  $\mu\text{m}$  でした。検出された粒子のうち、88% (863 個) が PET として正しく同定され、9% (89 個) が不明、1% (14 個) がセルロースとして同定されました。その他微量の汚染物質 (ポリメチルメタクリレート、ポリアクリルアミド、その他の数個) がわずかに検出されました。

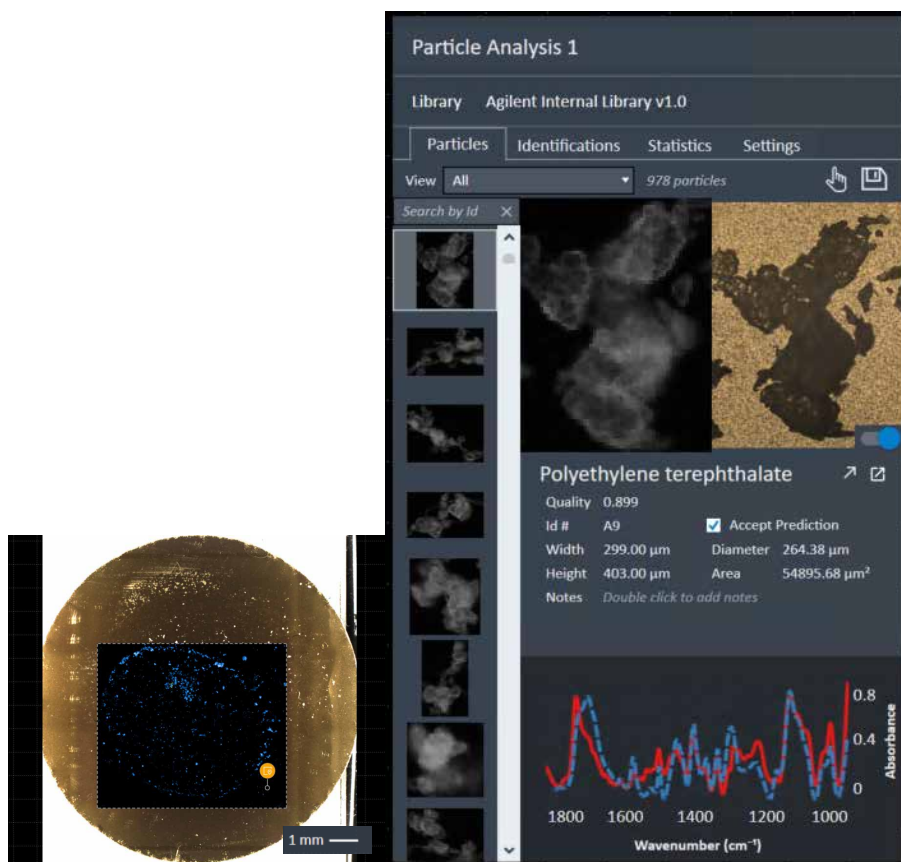


図 5. 金コーティングされたポリカーボネートメンブレンフィルタ上に直接置かれたマイクロプラスチックの可視画像と IR 画像。

ユーザーは、Clarity ソフトウェアによる粒子の同定の品質を、高または中、低の信頼度、およびヒットクオリティインデックス (HQI) スコアに基づいて確認できます。ここで、1.0 は完全一致のライブラリマッチです。HQI スコアは、正しく同定された PET 粒子の大部分で 0.8 よりも高く、同定された PET 粒子は信頼度の高いグループに分類されました。図 6 は、粒子の同定と分類データに関する Clarity ソフトウェアの概要を示しています。

0 ~ 20  $\mu\text{m}$  の直径サイズ範囲に含まれる粒子は、どの MIR 機器でも正しく同定するのが困難です。これらの小さな粒子は、測定で使用する MIR 波長の物理的サイズに近づきます。粒子サイズと波長との関係によっては、MIR ビームパッチがしばしば粒子自体よりも大きくなることを意味します。ごくわずかな数のセルロース粒子が存在するのは、サンプル処理中の汚染が原因である可能性があり、ヒトの皮膚細胞または毛髪から生じている可能性があります。ポリメチルメタクリレートおよびポリアクリルアミド粒子は、衣料品からの汚染物質である可能性があります。

同じ顕微鏡スライド上で複数のフィルタを解析することが可能です。Clarity ソフトウェアを使用すると、ユーザーは必要な数だけ粒子解析メソッドを作成でき、それぞれに独自の独立したサンプリング領域と同定ライブラリを用いることができます。複数の粒子解析メソッドを使用する場合、1 つの粒子解析ワークフローで複数のフィルタを解析するか、フィルタごとに個別のワークフローを使用するかを選択できます。図 7 は、同じ顕微鏡スライドに取り付けられた直径 25 mm の 2 つのフィルタを示しています。これらは独立して解析できます。理論的には、解析効率を高めるために、ユーザーは同じスライドに複数の小さなフィルタを取り付けることができます。

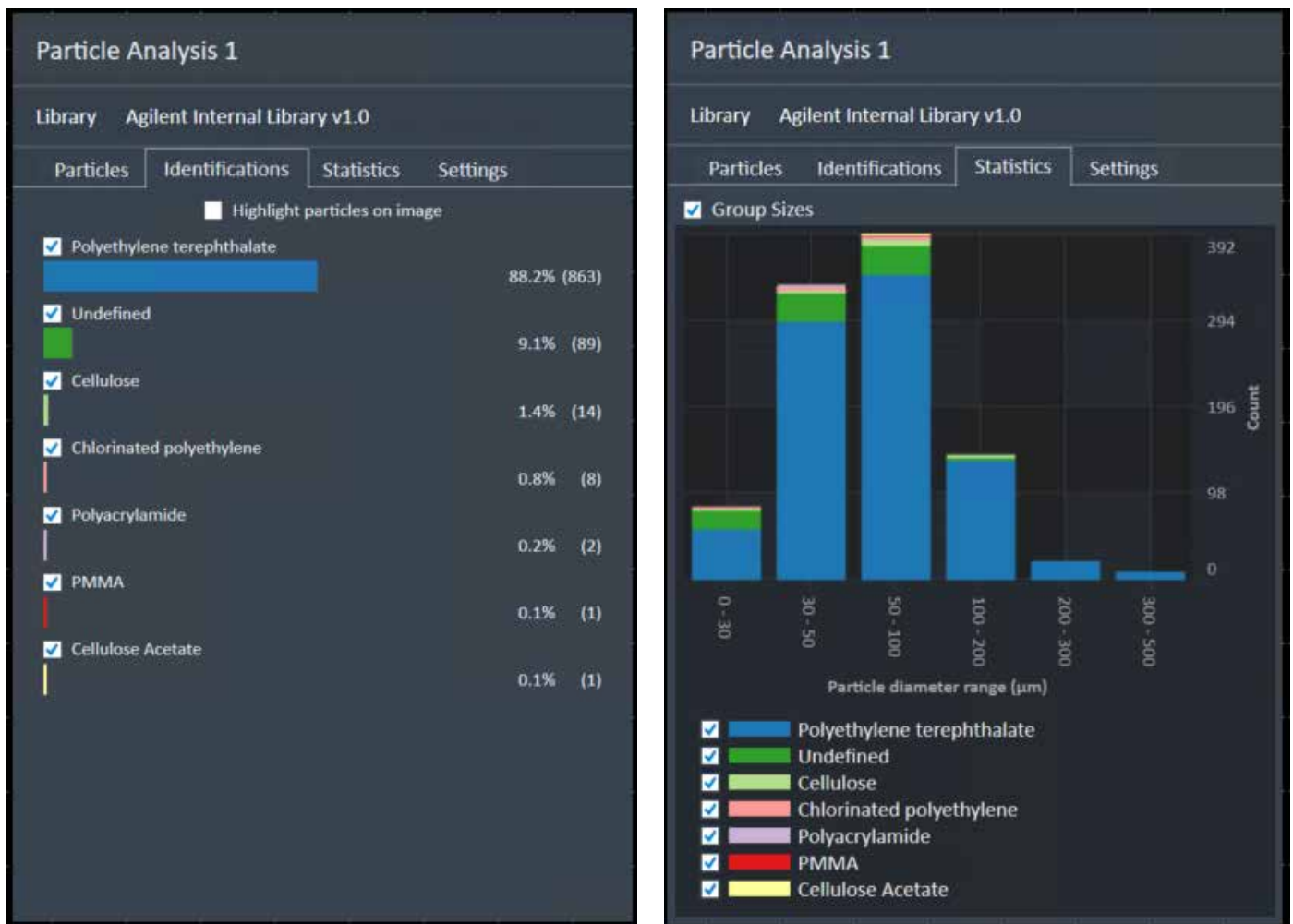


図 6. Agilent 8700 LDIR を使用して、金コーティングされたポリカーボネートメンブレンフィルタ上で直接解析されたマイクロプラスチックの同定および分類データ。

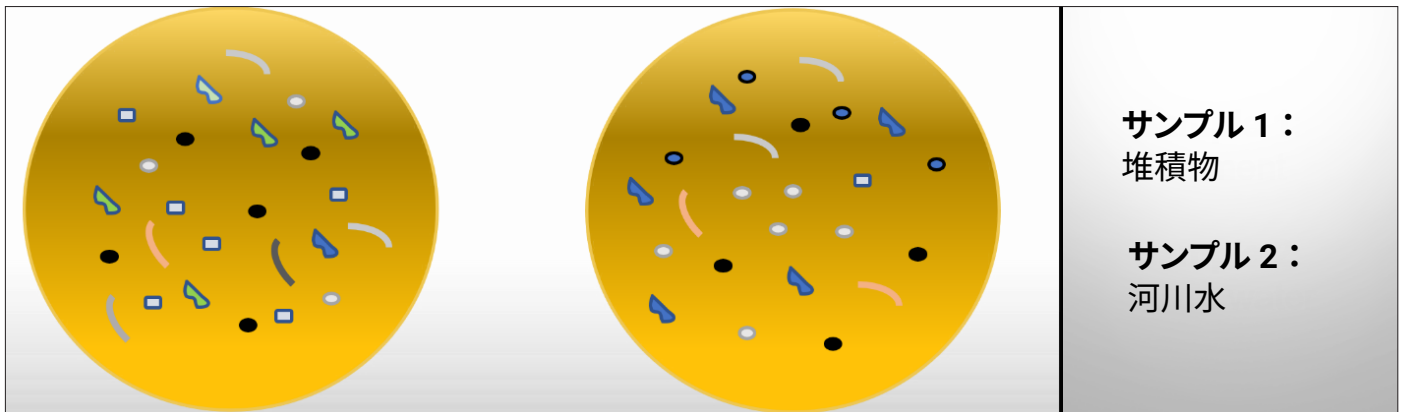


図 7. Agilent 8700 LDIR による解析のために、同じ顕微鏡スライドに取り付けられた別々のフィルタ上の異なるサンプルからのマイクロプラスチック。

## 結論

Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムを使用して、ポリエチレンテレフタレート (PET) ボトルに由来するマイクロプラスチック粒子をフィルタ上で直接解析しました。粒子は、顕微鏡スライドに直接貼り付けた金コーティングされたポリカーボネートフィルタにトラップされたものです。Agilent Clarity ソフトウェアの自動化された粒子解析メソッドと、アジレントが作成したスペクトルライブラリを使用して、PET 粒子を高いレベルの精度と信頼性で同定することができました。

真空フィルタを用いたサンプル前処理手順と LDIR メソッドにより、時間を大幅に節約しながら、サンプル汚染の可能性を低減できました。このメソッドはまた、従来の顕微鏡技術と比較して、日常的な解析設定での実装も簡単です。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE75311518

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2022  
Printed in Japan, April 26, 2022  
5994-4873JAJP

8700 LDIR の速度とシンプルさは、多数のサンプルの処理と高速なサンプルスループットが要求されるマイクロプラスチック研究活動に有用であると考えられます。高度に自動化され直感的なソフトウェアのおかげで、8700 を効果的に使用するための顕微分光や IR 分光分析のトレーニングは必要ありません。広範囲の解析、自動化された粒子検出、同定と分類、新しいライブラリによる結果の再処理機能、検出されたすべての粒子の可視画像と IR 画像などの便利な機能も利用できます。

## 参考文献

1. Eriksen, M. et al. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE* **2014**, 9.
2. XiaoZhi, L. Microplastics Are Everywhere-But Are They Harmful? *Nature*, 4 May **2021**, <https://www.nature.com/articles/d41586-021-01143-3>.