

LDIR ケミカルイメージングシステムを用いた プラスチックボトル由来マイクロプラスチックの 高速大面積分析

Agilent 8700 LDIR による赤外反射スライドガラスおよび
金コーティングフィルタ上の粒子の直接分析



著者

Wesam Alwan, David Troiani,
and Darren Robey
Agilent Technologies, Inc.

概要

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、Agilent 8700 Laser Direct Infrared (LDIR) ケミカルイメージングシステムを使用して、赤外反射スライドガラスおよび金コーティングメンブレンフィルタ上で分析しました。8700 LDIR による粒子の直接分析は、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最適です。複雑でない実験デザインを用いた LDIR メソッドは、他の手法と比較して同定の精度が高く、大幅に時間を節約できると同時に、経験が浅いオペレータでも簡単に分析できます。

はじめに

マイクロプラスチックは長さが 5 mm 以下のプラスチックの小片であり、さまざまな生息域、食品、および飲料水中に存在しています。生態系でのマイクロプラスチックの負の影響を理解するためには、これらの粒子を適切に特性解析することがきわめて有効です。¹ 粒子の数、サイズ、形状、およびポリマーの種類観点から、さまざまなマトリクス中のマイクロプラスチックを分光分析により特性解析することは、この分野での客観的な科学的知識を構築するために不可欠です。²

マイクロプラスチックの特性解析は、各サンプル中で分析対象となる粒子の数が多く、代表的なサンプルでは、粒子が分布している面積が広いこと、非常に困難です。このアプリケーションノートでは、多数の粒子を含むスライドガラスまたはフィルタ上の完全自動化されたマイクロプラスチック粒子分析における、Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステム (図 1) の優れた機能について実証します。粒子を含む大面積のスライドガラスまたはフィルタの分析は、他の手法では数日～数週間を要しますが、8700 LDIR を使用することにより数分～数時間以内で実施できます。PET ボトル由来のマイクロプラスチックを、8700 LDIR ケミカルイメージングシステムを使用して、スライドガラスおよび金コーティングメンブレンフィルタ上で分析しました。LDIR を使用すると、サンプル上に存在するすべての粒子を比較的短時間で分析でき、マイクロプラスチックの研究に非常に役に立つ、代表的なサンプル母集団に関する包括的なデータが得られます。



図 1. Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムおよび Agilent Clarity ソフトウェアの粒子分析ワークフローのスクリーンショット。環境サンプル中のマイクロプラスチックの代表的なイメージを表示

高度に自動化された Agilent 8700 LDIR

8700 LDIR では、波長が可変の量子カスケードレーザー (QCL) IR 光源を使用しています。超高輝度のレーザーは、サンプル中のあらゆる位置で中赤外 (MIR) の指紋領域 ($1,800 \sim 900 \text{ cm}^{-1}$) 全体を掃引して、同定で使用される分子固有のスペクトル特性を提供します。すべての既知のマイクロプラスチックが存在する既知の有機物は、すべてこの領域で MIR 活性があり、各種の分子が振動、回転、および並進モードを通して、いくつかの独自の分光特性を提供しています。マイクロプラスチックの特性解析では、この指紋領域で有機物に MIR 活性があることにより LDIR が最適の手法になります。大きい MIR 領域 ($3,300 \sim 1,800 \text{ cm}^{-1}$) 内の各場所に存在する広く一般的な吸収バンドは、マイクロプラスチックの分析に役立つ場合があります。ただし、この領域でバンドに特異性がない場合、データの役割は低くなります。これは、マイクロプラスチックの同定に厳密には必要ないためです。

8700 の QCL 光源は、特定の波数においてサンプル全体を高速に走査することにより、サンプル上のどこにでも存在するマイクロプラスチックの粒子を LDIR で即座に特定できます。粒子サイズの情報も報告され、アプリケーションの目的に応じて、自動的に分類する、またはユーザー定義のグループに振り分けることができます。8700 には、低倍率用 1 台と高倍率用 1 台の 2 台の高品質の視覚カメラが搭載されており、これらは Agilent Clarity ソフトウェアにより完全に制御されています。8700 LDIR では、従来の IR およびラマン顕微分光法に必要な多大なトレーニングを実施しなくても、完全に自動化された IR 顕微分光分析を実行できます。また、8700 を使用すると、他の手法の場合と比較して、より広い範囲をより短時間で、より多くのサンプルを分析することもできます。

実験方法

サンプル前処理

多くの工具店で入手可能な金属ヤスリを使用して、PET ボトルの一部を微粉体に粉碎しました。エタノールを入れたバイアルに粒子を採取し、激しく振とうし、一晩置きました。これ以上のマイクロプラスチック溶液は生成せずに、少量の溶液をピペットで 5 mL の無水エタノール (Scharlau ET00052500、CAS No: 64-17-5) に移しました。次に、マイクロプラスチック溶液を前処理して、次の 2 つの方法で分析しました。

1. 赤外反射スライドガラス上での分析

マイクロプラスチック溶液を 10 μ L ずつ、複数の赤外反射スライドガラス (7.5 \times 2.5 cm, MirriR, Kevley Technologies、オハイオ州、米国、図 2) にピペットを使用して移しました。次に、スライドガラスを室温で乾燥させ、エタノールを蒸発させてから分析しました。LDIR による表流水および処理済み放流水を分析した以前の実験と同様のサンプル前処理手順を使用しました。³

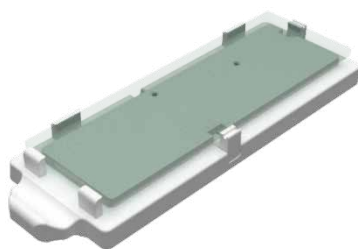


図 2. 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムで使用される赤外反射スライドガラスホルダ

2. 金コーティングメンブレンフィルタ上での分析

5 mL のマイクロプラスチック溶液を、ポンプに取り付けられている吸引ろ過ガラス容器を使用してろ過しました。その後、次のセクションで説明されているように、金コーティングメンブレンフィルタをフィルタホルダに移しました。

吸引ろ過装置

金コーティングメンブレンフィルタはデリケートで曲がりやすい性質があるため、フィルタの支持構造物としてポアサイズの小さいガラスフリット吸引ろ過フィルタ基部を使用しました。ガラスフリットはポア密度が高く中空の構造ではないため、吸引ろ過時に真空圧を均一に分布させ、金コーティングメンブレンフィルタが不可逆的に変形するのを防止するのに有効でした。この吸引ろ過ガラス容器を真空ポンプ (JAVAC、モデル: CC-81、ビクトリア州、オーストラリア) に取り付けました。このポンプには手動真空レギュレータ (SMC Metric M6 ポート 140 L/min、図 3) も搭載されていました。ポリエステル (PETG) 金コーティングメンブレンフィルタ、ポアサイズ 0.8 μ m、コーティング 100/0 nm、直径 25 mm、Sterlitech Corporation (オーバーン、ワシントン州、米国) 製を使用して、溶液から粒子を抽出しました。メンブレンフィルタはデリケートなため、各粒子溶液のろ過時には 700 mbar (-30 kPa) の弱い真空圧を印加しました (図 3 参照)。真空圧設定を 30 秒間に約 15 mL のろ過に変換しました (ろ過率約 34 分/L)。

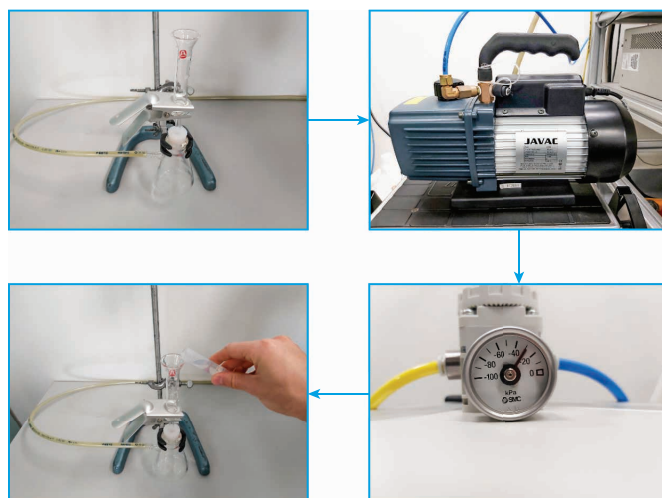


図 3. 粒子の吸引ろ過に使用した真空装置と印加した真空圧

フィルタ処理

ろ過が完了してフィルタが十分に乾燥したら、次の手順によりフィルタをフィルタホルダ (図 4) に移しました。

1. フィルタホルダから真鍮部品を取り外します。
2. ピンセットを使用してガラス容器からフィルタを慎重に取り外し、フィルタホルダの隆起部の上部に静かに置きます。
3. フィルタの位置を妨害しないように慎重に、真鍮部品をホルダにゆっくりと戻します。
4. フィルタを所定の位置に固定してフィルタが平らになるように、真鍮を締めます。
5. サンプルホルダを 8700 LDIR に挿入します。

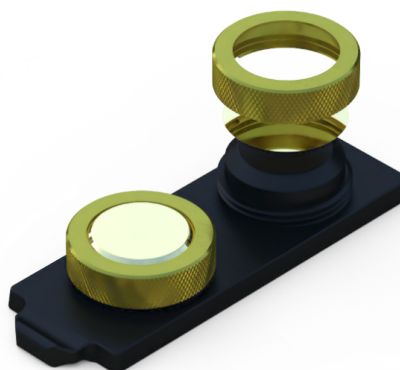


図 4. 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムで使用されるフィルタホルダ。2 枚の金コーティングポリエステルメンブレンフィルタに対応しています。

理想的には、8700 LDIR による分析のためのサンプル前処理の際に、表面形状の高さの差を 10 µm 未満（局部 3 × 3 mm）にする必要があります。ただし、サンプル表面の高さの差が 50 µm 以下であれば、許容できる結果が得られます。

粒子分析ワークフロー

Clarity ソフトウェアの自動された粒子分析ワークフローを使用して、8700 LDIR によりスライドガラスと 2 枚のフィルタサンプルを分析しました。粒子分析ワークフローでは、サンプルのユーザー定義領域内の粒子をすべて自動的に同定して、各粒子周辺の境界を描画し、写真を撮影して各粒子を同定します。次に、ソフトウェアはユーザー定義の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。8700 LDIR の操作パラメータを表 1 に示します。

表 1. Agilent 8700 LDIRパラメータ

パラメータ	設定値
分析ワークフロー	粒子/ピーク分析
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
フォーカスメソッド	フィルタでのマニュアルフォーカス
スキャンスピード	デフォルト (8)
掃引速度	デフォルト (3、高速)
フォーカスオフセット	0
偏光 (度)	デフォルト (0)
減光 (%)	デフォルト (0) /オート

8700 LDIR はマイクロプラスチック分析の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く影響する場合があります。Clarity ソフトウェアには基本的なマイクロプラスチックライブラリが含まれていますが、これは広範な参照ライブラリとして使用するのではなく、機器の機能を示すことのみを目的としています。マイクロプラスチック分析で最高品質のデータが得られるためには、複数のベンダーから入手可能なプラスチックとポリマーの標準物質を基に、ユーザーが独自のライブラリを作成することを推奨します。この実験で実施した分析では、マイクロプラスチックの同定専用開発されたライブラリを使用しました。

結果と考察

8700 LDIR ケミカルイメージングシステムでは、赤外反射スライドガラスおよび 2 枚の金コーティングフィルタ上の PET ボトルに由来する PET マイクロプラスチック粒子を同定することができました。スライドガラスおよびフィルタの高反射性のコーティングにより、優れたスペクトル応答とコントラスト、および粒子のシャープな IR イメージと可視イメージが得られました。

メソッド A：赤外反射スライドガラスサンプルの粒子分析ワークフロー

スライドガラス上で 8700 LDIR により検出された粒子の数は合計 7,949 個であり、直径のサイズ範囲は 10 ~ 486 µm でした。検出された粒子のうち、95.2 % (7,566 個) は PET として正確に同定されており、4.6 % (362 個) はポリアミドで、残りの少数は他の微量汚染物でした（ポリウレタン、ポリプロピレン、および少数のその他の物質）。この結果を図 5 に示します。

スライドガラス上で粒子の分析を実施する利点は、スキャン範囲が広いこと（この例では、約 60 × 22.5 mm）および多数の粒子を特性解析できることです。さらに、いったんサンプルを LDIR に挿入してパラメータを設定すれば、分析者に求められる入力是最小限になります。

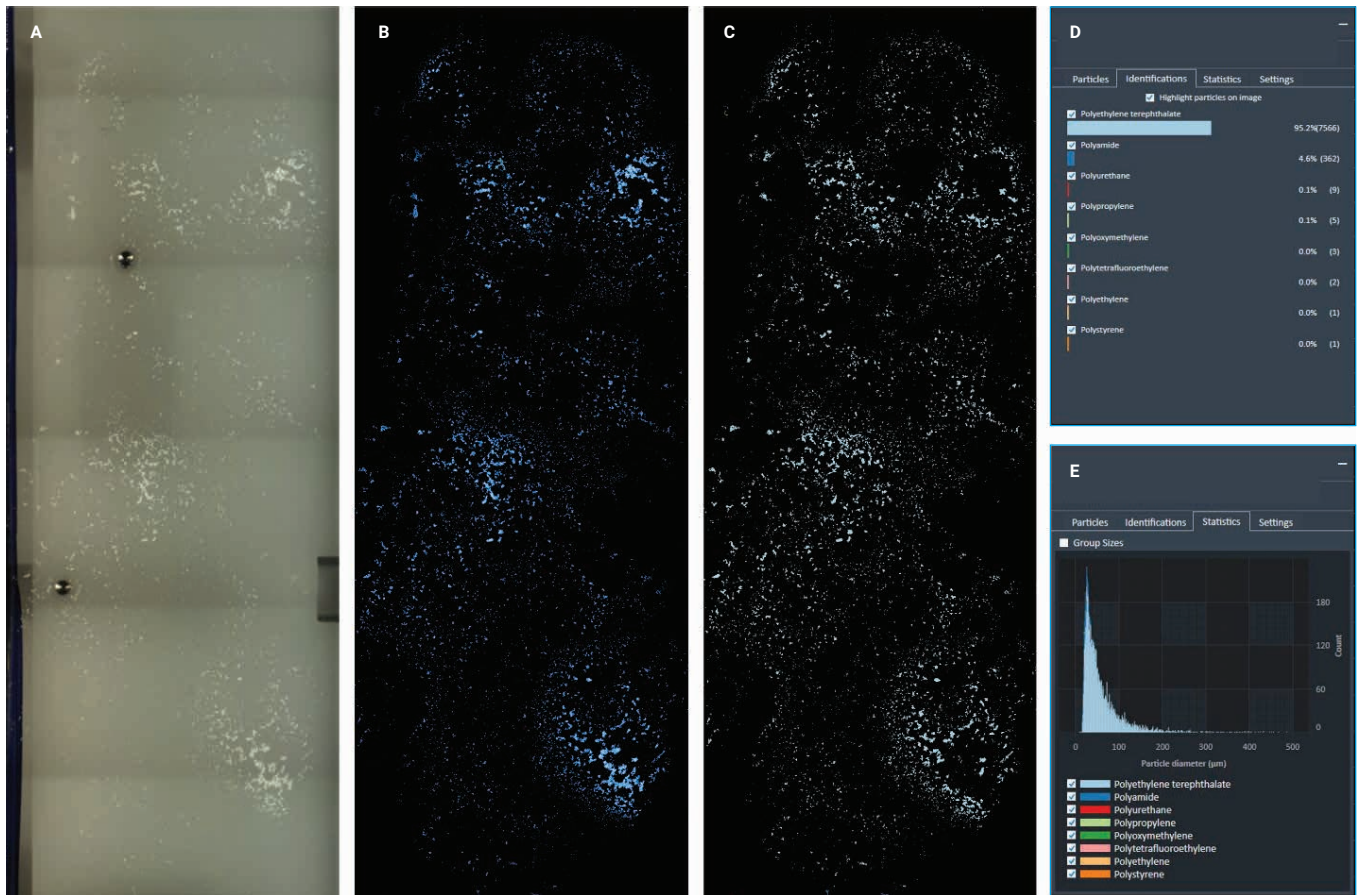


図 5. Agilent 8700 LDIR を使用してスライドガラス上で直接分析したマイクロプラスチックの同定および分類データ。(A) 可視イメージ。(B) 1,442 cm⁻¹ でスキャンした IR イメージ。(C) 検出された粒子の強調表示。マイクロプラスチックの種類に基づいて、粒子を色分けしています。(D) マイクロプラスチックの同定に基づいて生成された自動統計データ。(E) さまざまなサイズ範囲に基づいた、マイクロプラスチック粒子の統計データ

メソッド B：2 枚の金コーティングフィルタサンプルの粒子分析ワークフロー

1 枚目のフィルタ上で 8700 LDIR により検出された粒子の数は合計 4,384 個であり、直径の粒子サイズ範囲は 11 ~ 413 μm でした。検出された粒子のうち、99.2 % (4,347 個) は PET として正確に同定されており、0.8 % はポリアミド、ポリプロピレン、およびその他の物質として同定されました (図 6)。2 枚目のフィルタでは 5411 個の粒子が検出されており、そのうちの 98.4 % (5,324 個) は PET として同定され、< 1.6 % はポリアミドおよびその他の物質として同定されました (図 6)。

フィルタ上での直接分析の利点の方が、粒子をスライドガラスに移すという時間と労力のかかる多段階の処理よりも勝っています。この直接メソッドでは、必要なサンプル処理および前処理の手順が少ないため、コンタミネーションの可能性も大幅に低減されます。また、2 枚のフィルタを分析する際に、1 つの粒子分析ワークフローを使用する、またはフィルタごとに個別のワークフローを使用するというオプションが選択できます。さらに、粒子分析ワークフローは両方のフィルタを自動的に並べるため、Clarity ソフトウェアはそれらのフィルタを順番に分析できます。メソッドを自動化することにより、分析の効率と生産性が向上します。図 5 に、同じフィルタホルダに取り付けられた 2 枚の直径 25 mm の金コーティングポリエステルメンブレンフィルタを示します。

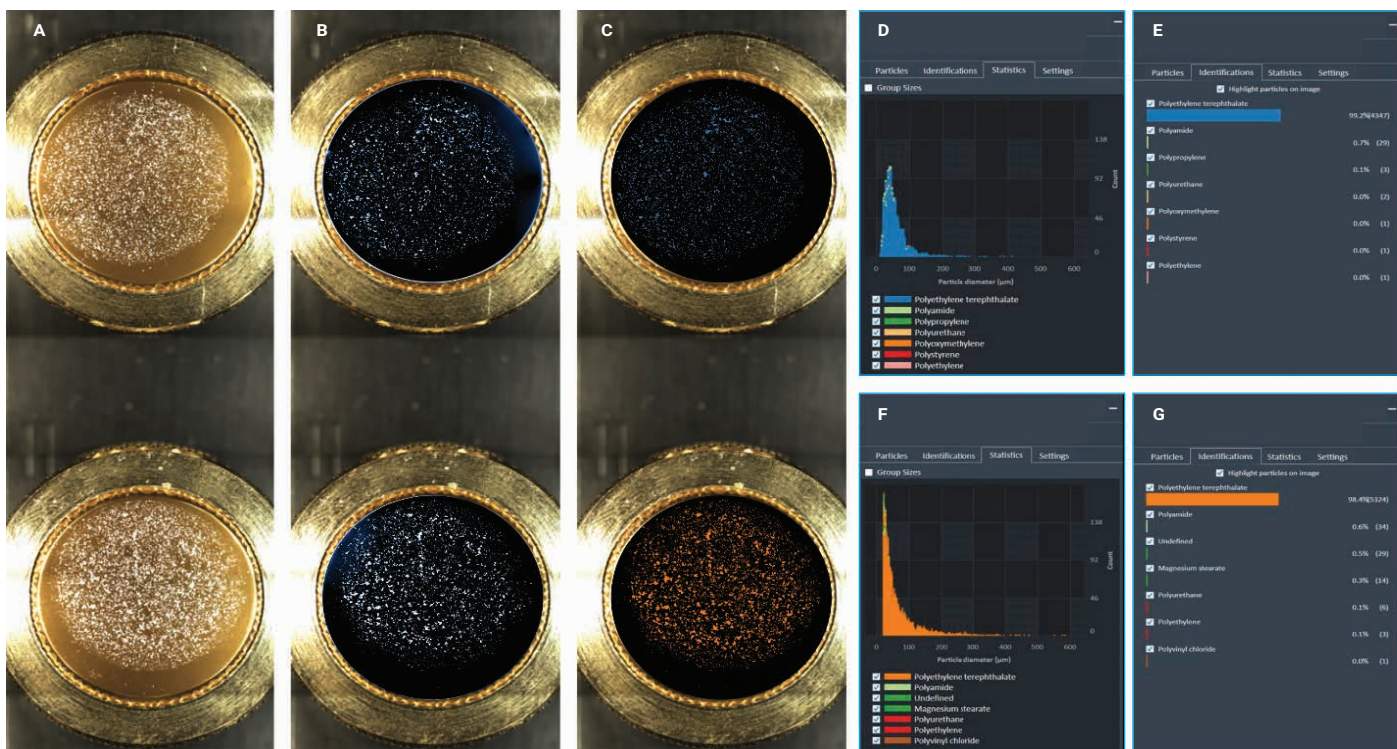


図 6. Agilent 8700 LDIR を使用して金コーティングポリエチレンメンブレンフィルタ（直径約 18 mm）上で直接分析したマイクロプラスチックの同定および分類データ。(A) 2枚のフィルタの可視イメージ。(B) $1,442\text{ cm}^{-1}$ でスキャンした2枚のフィルタの IR イメージ。(C) 検出された粒子の強調表示。2枚のフィルタのマイクロプラスチックの種類同定に基づいて、粒子を色分けしています。(D) フィルタ 1 のさまざまなサイズ範囲に基づいた、マイクロプラスチック粒子の統計データ。(E) フィルタ 1 のマイクロプラスチックの同定に基づいて生成された自動統計データ。(F) フィルタ 2 のさまざまなサイズ範囲に基づいた、マイクロプラスチック粒子の統計データ。(G) フィルタ 2 のマイクロプラスチックの同定に基づいて生成された自動統計データ

さまざまな粒子サイズ範囲にわたる高ヒットクオリティインデックス

高信頼度、中信頼度、または低信頼度、およびヒットクオリティインデックス (HQI) スコア（ここでは、1.0 が同一ライブラリー一致）に基づいて、Clarity ソフトウェアで粒子の同定の品質を確認できます。HQI スコアは、正確に同定された PET 粒子の大部分に対しては 0.8 より高くなり、同定された PET 粒子は高信頼度グループに分類されました。

図 7 と 8 に、スライドガラスとメンブレンフィルタそれぞれに対する、粒子の同定および分類のデータを示します。直径が約 $10\text{ }\mu\text{m}$ 程度の小さい粒子も、高信頼度で PET として正確に同定されました。Clarity ソフトウェアを使用することにより、独自のサンプリング領域と同定ライブラリを備えた粒子分析ワークフローを必要な数だけ作成できます。

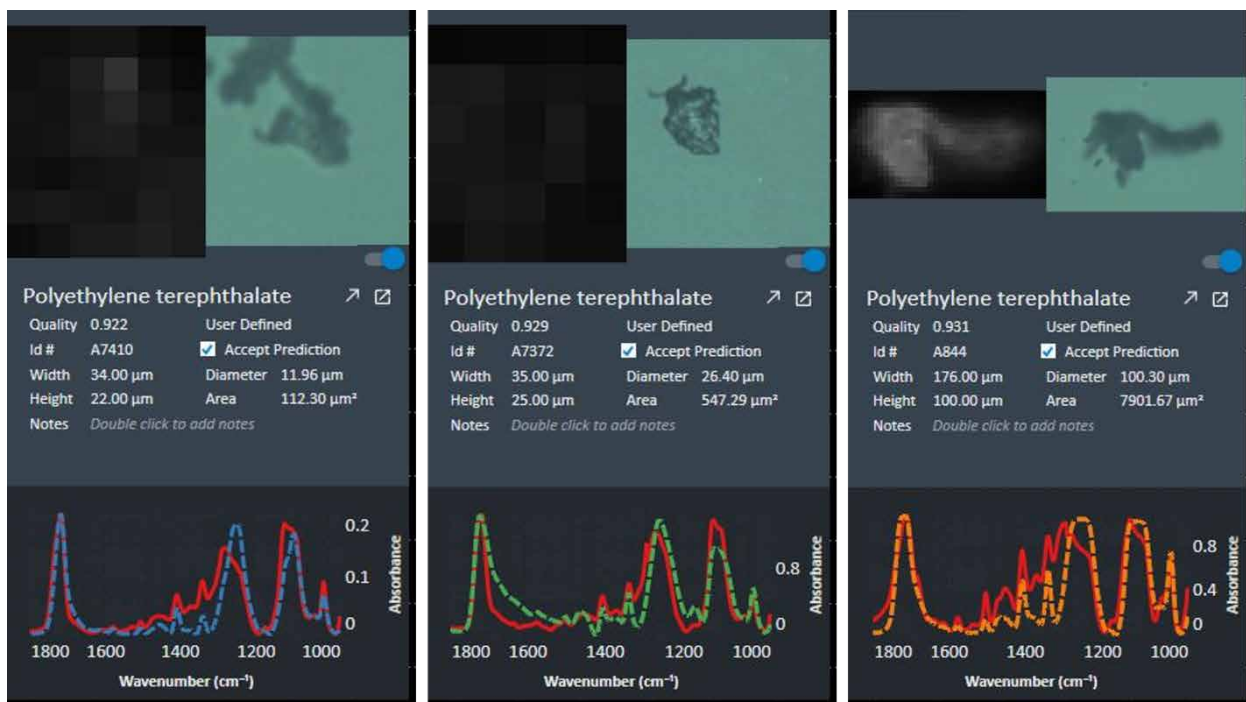


図 7. Agilent Clarity ソフトウェアから得られた、赤外反射スライドガラス上で分析した粒子のヒットクオリティおよびサイズ情報。IR イメージ、可視イメージ、ヒットクオリティインデックス、およびスペクトル（赤線）と一致したライブラリスペクトル（破線）の重ね表示のような粒子情報を表示できます。

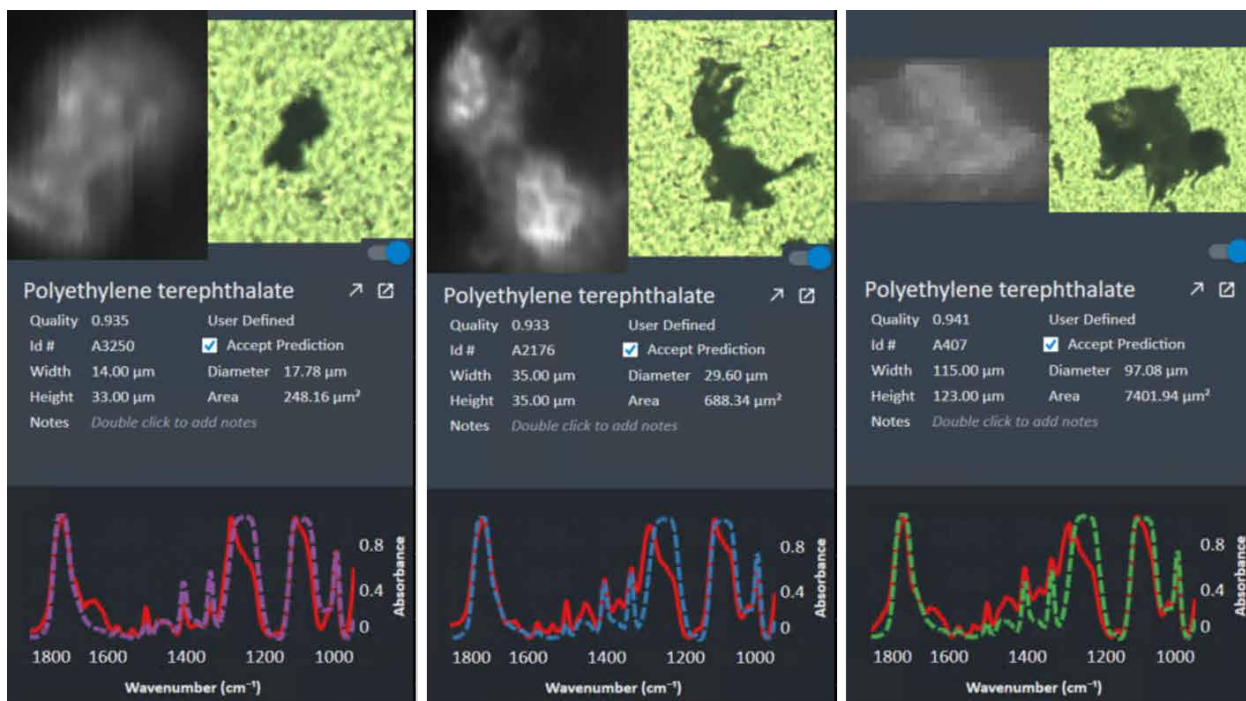


図 8. Agilent Clarity ソフトウェアから得られた、金コーティングポリエステルメンブレンフィルタ上で直接分析した粒子のヒットクオリティおよびサイズ情報。IR イメージ、可視イメージ、ヒットクオリティインデックス、およびスペクトル（赤線）と一致したライブラリスペクトル（破線）の重ね表示のような粒子情報を表示できます。

結論

Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムを使用して、PET ボトル由来マイクロプラスチック粒子をエタノール中で懸濁して分析しました。赤外反射スライドガラスおよびフィルタホルダに直接取り付けられた2枚の金コーティングポリエステルフィルタを使用して、分析のためにサンプルを前処理しました。Agilent Clarity ソフトウェアの自動化された粒子分析メソッドおよびマイクロプラスチックの分析専用開発されたスペクトルライブラリを使用して、スライドガラスおよびフィルタのデータを取り込みました。

スライドガラス上（精度 95.2 %）および2枚のフィルタ上（精度 99.2 および 98.4 %）の PET 粒子に対して、高い同定精度と信頼度を達成しました。この結果は、さまざまなメソッドを使用して前処理したマイクロプラスチック粒子の分析における本手法の柔軟性を実証しています。

スライドガラスおよび真空フィルタサンプル前処理手順および LDIR メソッドでは、ラマンおよびフーリエ変換赤外（FTIR）顕微分光法と比較して、時間が大幅に短縮されています。スライドガラスはスキャン面積が広いので、多数の粒子を調査できます。ただし、直接フィルタ LDIR メソッドは、スライドガラスメソッドよりも必要なサンプル処理が少なく済むため、サンプルへの汚染物混入の可能性が低減されます。どちらのメソッドも、従来の顕微分光法の場合と比較してルーチン分析への導入が簡単であり、フィルタ上メソッドは優れた精度と高いサンプルスループットを提供します。

8700 LDIR は分析が高速で操作が簡単であるため、多数のサンプルと高いサンプルスループットを必要とするマイクロプラスチックの研究に有効です。高度な自動化と直感的なソフトウェアを備えた 8700 は、顕微分光または IR 分光分析で機器を正しく操作するためのトレーニングがほぼ必要ありません。さらに、大面積の分析、自動粒子検出、同定、分類、検出されたすべての粒子の可視および IR イメージという利点もあります。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

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おりません。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。

DE52027264

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, October 18, 2022

5994-5309JAJP

参考文献

1. XiaoZhi, L. Microplastics Are Everywhere—But Are They Harmful? *Nature*, 4 May **2021**, <https://www.nature.com/articles/d41586-021-01143-3>
2. Schymanski, D. et al. Analysis of Microplastics in Drinking Water and Other Clean Water Samples With Micro-Raman and Micro-Infrared Spectroscopy: Minimum Requirements and Best Practice Guidelines. *Anal.Bioanal.Chem.* 413, 5969–5994, **2021**, <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03498-y>
3. Danence, L. et al. 表流水および処理済み放流水中のマイクロプラスチックの高速かつ容易な特性解析, Agilent publication number 5994-3932JAJP