食品



乳児用調製粉乳中のマイクロプラスチックの 正確な特性解析

Agilent 8700 Laser Direct Infrared (LDIR) ケミカルイメージングシステム



概要

マイクロプラスチックの偏在に関するレポートは、主に環境内の存在に注目してきましたが、マイクロプ ラスチックが健康に与える影響の調査に対する関心も高まっています。¹多くの人は、幼児がマイクロプ ラスチックにさらされる機会は限定的であると思い込んでいます。ところが、乳児用調製粉乳からマイク ロプラスチックを摂取する可能性があることがわかってきました。²乳児用調製粉乳は製法が多様であ り、脂肪、タンパク質、ミネラル、ビタミン、砂糖などのさまざまな原料や成分が含まれます。このため、 乳児用調製粉乳からマイクロプラスチックを抽出、分離することが難しい場合があります。³このアプリ ケーションノートでは、マイクロプラスチックの分析における品質管理の重要性について説明します。ま た、Agilent 8700 Laser Direct Infrared (LDIR) ケミカルイメージングシステムを用いて、乳児用調製 粉乳に含まれるマイクロプラスチックを正確に同定および定量化する方法についても説明します。

著者

Subharthe Samandra and Bradley O. Clarke Australian Laboratory for Emerging Contaminants, School of Chemistry, Faculty of Science, The University of Melbourne, Victoria, Australia Wesam Alwan Agilent Technologies, Inc.

はじめに

マイクロプラスチックは、サイズが 1 µm ~ 5 mm の小さなプラスチック 粒子と定義されます。⁴ マイクロプラスチックは、魚介類、飲料水 (ボト ル飲料水と水道水)、果物、野菜、日常的に使用する調味料や飲料(蜂 蜜、砂糖、牛乳、ソフトドリンク)で検出されています。^{5.6} マイクロプラ スチックは乳児用調製粉乳からも検出されています。^{2.7} 2022 年に発表 された研究によると、乳児用調製粉乳 1 グラムあたり 17.3 個 (中央値) のマイクロプラスチックが検出され、検出されたマイクロプラスチックの 67 % がポリウレタンやポリアミドでした。⁸ 通常、乳児用調製粉乳はプラ スチックのふた付きのアルミ缶に入っています。容器の中にはよく、乳児 用調製粉乳の計量用にプラスチック製のスプーンが入っています。 最近の研究で、さまざまな消化用試薬を用いて乳児用調製粉乳やその他の乳製品からマイクロプラスチックを抽出するメソッドが明らかになってきました。^{7~9}

この研究では、Agilent Clarity ソフトウェアと 8700 LDIR ケミカルイメー ジングシステム (図 1) によるマイクロプラスチックの自動分析ワークフ ローを用いて、2 種類のブランドの市販の乳児用調製粉乳内に存在する マイクロプラスチックの特性解析を行いました。また、新たに開発した抽 出メソッドを用いて、乳児用調製粉乳からマイクロプラスチックを分離し ました。



図 1. Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステム。サンプルに含まれる粒子の数、サイズ、化学組成など、マイクロプラスチックのルーチン分析を高速で実行できます。

実験方法

サンプル

オーストラリアのメルボルンの地元スーパーで、2種類のブランド(ブラン ド A および B)の市販の乳児用調製粉乳を購入しました。

サンプル前処理

最初に、5gの乳児用調製粉乳を30mLの飽和塩化ナトリウム(sat. NaCl)で溶解しました。この混合物を振とうした後、3,000 rpm で30分間遠心分離しました。こうして上の白クリーム層と下の水性層に分離しました。

メソッドの開発中に、この混合物中でのマイクロプラスチック粒子の挙動 を理解するため、25 μL の緑のポリスチレンビーズを添加しました。大半 のビーズが上の層に入り、下の層に入ったビーズはごくわずかでした。こ うして、乳児用調製粉乳の両方の層が、LDIR による分析用に調製されま した。

下の層を静かに移して、2 つの層を 2 個の清潔なビーカーに分けました。 上の層を分解するため、0.1 M の水酸化ナトリウム (NaOH) 100 mL を 添加し、約 50 ~ 60 °Cで 20 分間加熱しました。⁹ この結果、白クリーム の色が少し変化し、黄色がかった液体になりました。この液体が冷めな いうちに、47 mm、14 μ m のポリカーボネートフィルタで混合物をろ過 しました。このポアサイズ (14 μ m) を選択したのは、フィルタを詰まら せず、ろ過しやすくするためです。乾燥してから、無水エタノール (EtOH) で 50 mL の清潔なチューブに粒子を流し込みました。 下の層は 47 mm、14 µm のポリカーボネートフィルタで直接ろ過し、乾燥してから、EtOH で 50 mL の清潔なチューブに粒子を流し込みました。

最後に両方の層で、Sterlitech ポリエステル (PETG) 金コーティングメ ンブレンフィルタ (0.8 μm、100/0 nm コーティング、25 mm) を用いて EtOH 懸濁液をろ過し、LDIR で直接分析しました (図 2)。

装置構成

本研究では、8700 LDIR ケミカルイメージングシステムを Clarity ソフト ウェアで制御して使用しました。各サンプル層のマイクロプラスチック粒 子が載ったポリエステル (PETG) 金コーティングメンブレンフィルタを、 LDIR と Clarity ソフトウェアの全自動粒子分析メソッドを用いて分析しま した。データ取り込みに使用したメソッドの設定パラメータを表 1 に示し ます。機器パラメータは、機器の初期設定を使用しました。

Clarity ソフトウェア粒子解析メソッドでは、LDIR スキャンモードとスイー プモードの両方を使用しました。まずスキャンモードを用いて、単一の波 数(1,442 cm⁻¹)でサンプルの選択領域を高速スキャンし、粒子の位置 の特定と各粒子の境界の測定を実行しました。粒子の位置が特定される と、LDIR は迅速かつ自動的に各粒子に移動し、波長範囲の全体で完全 なスペクトルを取得します(中赤外指紋領域を通るスイープモード)。次 にこれらのスペクトルを、Microplastics Starter 2.0 スペクトルライブラ リとリアルタイムで照合しました。^{10.11}各粒子について、スペクトル適合 性が最も高いものを特定して報告しました。



図 2. 乳児用調製粉乳からマイクロプラスチックを分離するワークフロー

表 1. Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムによるマイクロプラスチック の自動メソッド解析に使用したパラメータ

パラメータ	設定
メソッド	粒子解析
使用ライブラリ	Microplastics Starter 2.0
自動スキャン	オン
可視画像の収集	あり
粒子感度	自動
ヒットクオリティインデックス範囲	ヒットクオリティは、サンブルのスペクトルが参照ライブ ラリのスペクトルとどの程度一致しているかを表すもの です。この実験では、分類範囲(スペクトル照合のクオ リティの高、中、低による特徴付け)は次のように設定し ました。 - 低信頼度(0.65~0.75) - 中信頼度(0.75~0.85) - 高信頼度(0.85~0.99) この範囲外(つまり<0.65)の粒子は「未定義」として 分類しました。
サイズ分類範囲(µm)	20 ~ 100 100 ~ 200 200 ~ 300 > 300
スキャンスピード	デフォルト (8)
スイープスピード	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

結果と考察

レポート作成

マイクロプラスチックデータについて報告するため、マイクロプラスチック 以外のすべての粒子(天然ポリアミド、ステアリン酸塩、セルロース物質、 炭酸塩など)を除外しました。その他の主な種類のマイクロプラスチック についてはすべて、選択したヒットクオリティインデックス(HQI)基準(> 0.8)に基づいて報告しました。含まれていたマイクロプラスチックは、ア クリロニトリルブタジエンスチレン(ABS)、ポリアミド(PA)、ポリカーボ ネート(PC)、ポリエチレン(PE)、ポリエチレンテレフタレート(PET)、 ポリオキシメチレン(POM)、ポリプロピレン(PP)、ポリスチレン(PS)、 ポリウレタン(PU)、ポリ塩化ビニル(PVC)です。

試薬中のマイクロプラスチックの品質管理 (QC)

サンプル前処理中の乳児用調製粉乳の汚染を最小限に抑えるため、すべての試薬(Milli-Q 超純水、EtOH、sat. NaCl)について、LDIR を用いてマイクロプラスチックの有無を確認しました。この結果に基づいて、試薬を使用する前に複数回ろ過し、すべてのマイクロプラスチックを除去しました。すべてのガラス製品と遠心チューブは、使用前にろ過した超純水で洗浄し、アルミホイルで覆いました。

超純水のマイクロプラスチック含有量を評価するため、500 mL の水を 金コーティングフィルタで直接ろ過し、LDIR で分析しました。合計 184 個の粒子が検出されました。ただし、20 ~ 100 μm の範囲内でマイク ロプラスチックとして定量された粒子は 6 個 (PET と PU: いずれも n = 3) でした (図 3、上のフィルタ)。図 3C (上のフィルタ) のとおり、 Clarity ソフトウェアに付属しているライブラリで、超純水に含まれるマイ クロプラスチック (PET など)と非マイクロプラスチック (自然発生ポリ アミドなど)を同定できます。続いて水を、LDIR で再分析する前に複数 回ろ過しました。最後の QC では、水中にマイクロプラスチックは残って いませんでした。

同様に、sat. NaCl 溶液 500 mL を金コーティングフィルタ (図 3、下の フィルタ) で直接ろ過して LDIR で分析し、マイクロプラスチックによる汚 染の有無を確認しました。合計 392 個の粒子が検出されました。20 ~ 100 µm の範囲内で、81 個の粒子がマイクロプラスチックでした(ABS: n = 2、PE:n = 42、PP:n = 27、PET:n = 5、PS:n = 3、PC と PU:n = 1、図 3C に例示)。そのため、最終確認前に sat. NaCl 溶液を さらに 8 回ろ過したところ、マイクロプラスチックによる汚染を最小限に 減らすことができました。

このような超純水と sat. NaCl 溶液での結果は、サンプル抽出で試薬を 使用する前に、マイクロプラスチックの有無を確認することの重要性を示 しています。EtOH も、使用前に品質を確認しました。試薬の QC 試験を 実行することで、検出されたマイクロプラスチックが乳児用調製粉乳サン プルに由来すると明言できます。



図 3. Milli-Q 超純水(上)と sat. NaCl(下)に含まれるマイクロプラスチックの同定および分類データ。Agilent 8700 LDIR を用いて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。(A) 両フィルタの可視画像。(B) 両フィルタに対して 1,442 cm⁻¹ でスキャンした IR 画像。(C) 各フィルタで同定されたマイクロプラスチックと 非マイクロプラスチックの例

乳児用調製粉乳に含まれるマイクロプラスチック

乳児用調製粉乳ブランドの2層サンプルを、それぞれ8700 LDIR を用い て直接オンフィルタで分析しました。特別に設計されたフィルタホルダ上 に2つのサンプルを配置することで、サンプルを連続して自動的に特性 解析し、各サンプルの結果を個別に報告できました。ただし必要に応じて、 2つの位置の結果を1つのサンプルとして報告することもできます。

Clarity ソフトウェアでは、対象領域を円形または長方形で定義できます。 この研究では、フィルタごとに直径約 16 mm の円形領域を使用しまし た。このため、粒子が含まれるフィルタ領域全体を分析に含めることがで きました。8700 LDIR の高速な自動化機能により、オペレータの操作な しで、各フィルタの分析を迅速に完了できました。

直接的なオンフィルタ分析メソッドは分析前に水/溶媒を蒸発させる必要 がないため、他のサンプル前処理手法よりもワークフローがシンプルで す。また、サンプルの汚染源を減らすこともできます。

どちらのブランドの乳児用調製粉乳でも、試薬分析の QC セクションに記載されている方法に従って、マイクロプラスチックデータの分析と報告を実施しました。

ブランド A の乳児用調製粉乳では、いずれの層でも多くの粒子(合計 4,472 個)が検出されましたが、そのほとんどが自然発生ポリアミドであ ることが同定されました。この結果は、抽出メソッドで完全に分解されな かった乳児用調製粉乳中にタンパク質が存在するということで説明がつ きます。 マイクロプラスチックと同定された粒子は合計 97 個(上の層に 63 個、下の層に 34 個)で、ほとんどのマイクロプラスチックのサイズが 20 \sim 100 µm でした。いずれの層でも、検出された主なポリマーの種類は PE と PP でした(表 2)。

ブランド B の乳児用調製粉乳では、両方の層で検出された粒子の数が A より少なくなりました (合計 1,078 個)。上の層では合計 712 個の粒子 が検出され、マイクロプラスチックと同定 (HQI > 0.8) されたのはわずか 9 個でした。下の層では 366 個の粒子が検出され、マイクロプラスチック と同定 (HQI > 0.8) されたのは 13 個でした。ブランド B で同定された 主なマイクロプラスチックは PC、PE、PP であり、すべて 20 ~ 100 μ m のサイズ範囲に分類されました (表 2)。

いずれのブランドの乳児用調製粉乳でも、残りの粒子はマイクロプラス チックではなく、自然発生ポリアミドやセルロース物質、または HQI < 0.8 の同定できない原材料(ライブラリに存在しない乳児用調製粉乳成分な ど)でした。

2 種類の乳児用調製粉乳サンプルで示したサンプル前処理法により、マイ クロプラスチックを効果的に抽出できました。ただし、分析ニーズに応じ て、抽出メソッドをさらに最適化することが必要な場合があります。例え ば、酵素分解による追加のマトリックスクリーンアップや加熱時間の延長 により、両方の層に含まれる非マイクロプラスチックの数を減らせる可能 性があります。フィルタ上の非マイクロプラスチックの数を減らせば、分 析時間が短縮されます。



表 2. ブランド A および B の乳児用調製粉乳のマイクロプラスチックの特性解析結果の概要

8700 LDIR ケミカルイメージングシステムと Clarity ソフトウェアの自動 ワークフローを組み合わせることで、いずれのブランドの乳児用調製粉乳 でも、含まれるマイクロプラスチックを正確かつ迅速に特性解析できまし た。LDIR には非マイクロプラスチックの同定機能があるため、図 4 およ び図 5 のとおり、合成ポリマーと天然材料(セルロースや自然発生ポリ アミドなど)を区別できました。



図 4. 両ブランドの乳児用調製粉乳で同定されたマイクロプラスチックの例。(A) ブランド A の上の層。(B) ブランド A の下の層。(C) ブランド B の上の層。 (D) ブランド B の下の層。LDIR では、検出される粒子ごとに、粒子の IR 画像と可視画像、原材料の同定結果、サイズ情報、スペクトル(赤の線)と一致する ライブラリスペクトル(青または緑の点線)の重ね描きを提供



図 5. 両ブランドで同定された非マイクロプラスチックの例。(A) ブランド A の上の層。(B) ブランド A の下の層。(C) ブランド B の上の層。(D) ブランド B の下の層。 LDIR では、検出される粒子ごとに、粒子の IR 画像と可視画像、原材料の同定結果、サイズ情報、スペクトル(赤の線)と一致するライブラリスペクトル(青または紫の点線) の重ね描きを提供

ブランド A の乳児用調製粉乳の上の層では、繊維状粒子はほとんど検出 されませんでした(表 2、IR 画像)。マイクロプラスチックの抽出中にア ナリストが着用していた実験用白衣の合成繊維が、サンプルに混入した 可能性があります。¹²図6のとおり、LDIRでは、これらの繊維状粒子を セルロース物質と同定できました(HQI > 0.8)。



図 6. ブランド A の乳児用調製粉乳の上の層に含まれる、セルロース物質と同定された繊維状粒子の例

結論

Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムのオンフィルタ分析 機能により、2 種類のブランドの乳児用調製粉乳でマイクロプラスチッ ク粒子が検出されました。ブランド A では合計 97 個、ブランド B で は合計 22 個のマイクロプラスチック粒子が、0.80 を上回るヒットク オリティで検出されました。PC、PE、PP が、両ブランドで最も頻繁に 検出されたポリマーでした。金コーティングされたフィルタ上のマイク ロプラスチック/非マイクロプラスチック粒子で、高い同定精度と信頼度を 達成できました。

今回の実験では、マイクロプラスチック分析の主要要素と、試薬の使用 前の品質管理試験の重要性が明らかになりました。すべての試薬にマイ クロプラスチックが含まれることが判明したため、各試薬を使用前にろ過 して、混入遺物の有無を再確認しました。また、すべてのガラス製品を、 マイクロプラスチックが含まれない超純水で洗浄しました。 乳児用調製粉乳などの複雑なマトリックスからマイクロプラスチックを分離することは、困難な場合があります。ただし、8700 LDIR と Clarity ソフトウェアを組み合わせることで、マイクロプラスチックの特性解析を迅速かつ正確に実行できました。

直接フィルタ LDIR メソッドは、他の手法よりも必要なサンプル処理が少ないため、サンプル汚染の可能性が低下し、サンプルスループットが向上します。真空フィルタのサンプル調製手順と LDIR メソッドを使用することで、マイクロプラスチック分析を効率化し、分析時間を大幅に短縮できます。

8700 LDIR の自動ワークフローは、さまざまなマトリックス中のマイクロ プラスチックの正確な特性解析に最適です。多くのサンプルを高速なサン プルスループットで処理できるため、ルーチンアプリケーションや大規模 なモニタリング研究に最適です。

参考文献

- Campanale, C. *et al.* A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *Int. J. Environ. Res.Public Health* **2020**, *13*, *17(4)*, 1212. doi: 10.3390/ijerph17041212
- Li, D. et al. Microplastic Release from the Degradation of Polypropylene Feeding Bottles During Infant Formula Preparation. *Nat. Food 1* **2020**, 746–754. https://doi. org/10.1038/s43016-020-00171-y
- Diaz-Basantes, M. F.; Conesa, J. A.; Fullana, A. Microplastics in Honey, Beer, Milk and Refreshments in Ecuador as Emerging Contaminants. *Sustainability* **2020**, *12*, 5514. https://doi. org/10.3390/su12145514
- SAPEA. Science Advice for Policy by European Academies A Scientific Perspective on Microplastics in Nature and Society (SAPEA, 2019).
- Sewwandi, M. *et al.* Microplastics and Plastics-Associated Contaminants in Food And Beverages; Global Trends, Concentrations, and Human Exposure. *Environ.Pollut.*2022, 317, 120747.10.1016/j.envpol.2022.120747
- Samandra, S. *et al.* Assessing Exposure of the Australian Population to Microplastics through Bottled Water Consumption. *Sci. Total Environ.* **2022**, *1(837)*, 155329. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155329
- Zhang, Q. *et al.* Microplastics in Infant Milk Powder. *Environ.Pollut.* **2023**, *15(323)*, 121225. doi: 10.1016/ j.envpol.2023.121225
- Liu, S. *et al.* Detection of Various Microplastics in Placentas, Meconium, Infant Feces, Breastmilk and Infant Formula: A Pilot Prospective Study. *Sci.Total Environ.* **2022** *13*(854), 158699. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.158699

- Kutralam-Muniasamy, G. *et al.* Branded Milks Are They Immune From Microplastics Contamination? *Sci. Total Environ.***2020**, *20*(714), 136823. doi: 10.1016/ j.scitotenv.2020.136823
- Primpke, S. et al.Reference Database Design for the Automated Analysis of Microplastic Samples Based on Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy.*Anal.Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 5131–5141. doi: 10.1007/s00216-018-1156-x
- De Frond, H.; Rubinovitz, R.; Rochman, C. M. μATR FTIR Spectral Libraries of Plastic Particles (FLOPP and FLOPP-e) for the Analysis of Microplastics. *Anal.Chem.*, **2021** *93*(*48*), 15878–15885. doi: 10.1021/acs.analchem.1c02549
- 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.* **2021**, *413*, 5969–5994. https://doi.org/10.1007/s00216-021-03498-y

詳細情報

- Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステム
- Agilent Clarity ソフトウェア
- マイクロプラスチック技術の FAQ
- 水中のマイクロプラスチック分析

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ

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。

DE64629627

アジレント・テクノロジー株式会社 © Agilent Technologies, Inc. 2023 Printed in Japan, May 10, 2023 5994-5928JAJP

