

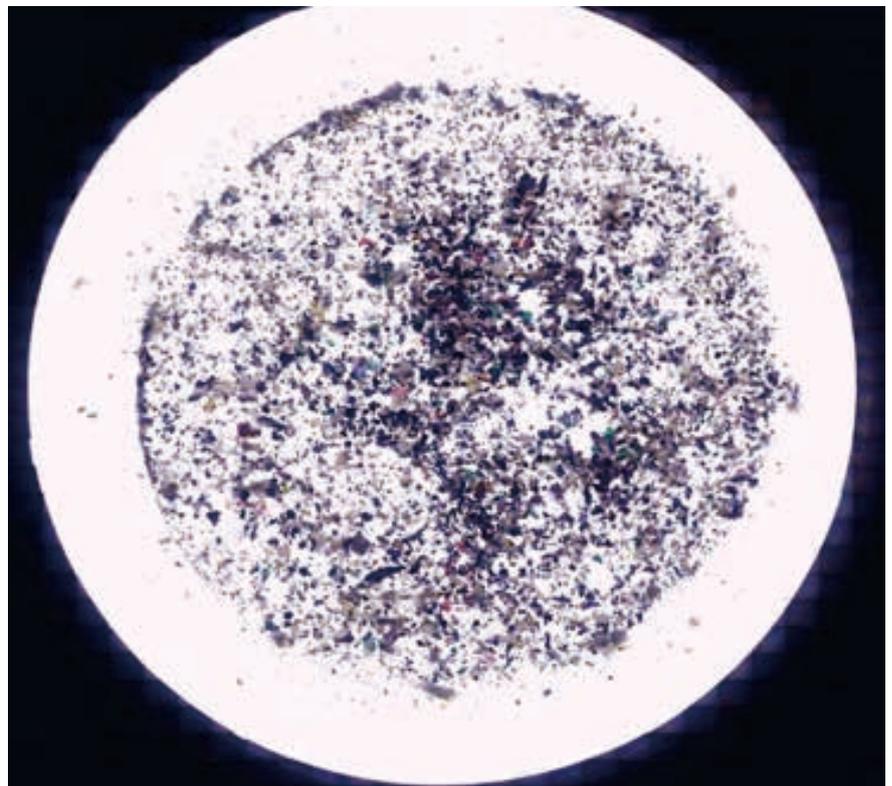
FTIR イメージングによる マイクロプラスチックの分析

アプリケーションノート
環境分析

著者

Kristina Borg Olesen, Nikki van Alst, Marta Simon, Alvise Vianello, Fan Liu and Jes Vollertsen

Department of Civil Engineering,
Aalborg University, Denmark



はじめに

近年は、研究者、政治家、一般の人々の間でプラスチック汚染への関心が高まっています。マイクロプラスチック (<5 mm) は、環境や水生生物への蓄積が疑われているため、特に懸念されています [1]。

マイクロプラスチックの発生源にはさまざまなものがあり、最終的に分解されるまでに数百年間にわたり環境に留まることもあります。しかし、環境と水生生物への蓄積レベルや影響は十分に理解されていません。その原因としては、標準的分析プロトコルがないことや、現行の分析技術が非常に時間がかかるため実用的でないことなどがあります。



Agilent Technologies

これまでに発表された研究では、サンプル中のプラスチックの視覚識別によってマイクロプラスチックを定量化していました [2]。今回の研究では、環境サンプルからマイクロプラスチックを抽出するための信頼性の高いメソッドを開発しました。マイクロプラスチックのタイプを同定し定量するために、フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光イメージングを用いました [3、4]。

分析方法

サンプル

サンプルは、デンマークのヴィボーにある水が滞留した池で一定期間採取し、堆積物、水、3つの棘突起を持つトゲウオ、ヒルが含まれます。水性動物は、詳細に分析しませんでした。動物相マトリックス中のマイクロプラスチックの検出を評価するためにのみ使用しました。

池には、雨水流出水が流れ込み、道路由来の汚染物質が蓄積するため、マイクロプラスチックが高濃度で含まれていることもあります。

総量 50 L の水を池から採取しました。10 L の水の各サンプリングバッチを、テフロン加工のスクリュウキャップ付きの 2 x 5 L の保管ボトルに採取しました。図 1 にサンプリング場所を示します。

ガラス製の直径 5 cm の柱状採泥器を用いて、池の端から 1 ~ 2 m の場所で堆積物のサンプルを採取しました (サンプリング場所は図 1 を参照)。各堆積サンプルの最上層をガラス製保存容器に移しました。

魚のサンプルは、図 1 に示すように、池を横切るように配置した網で捕獲しました。他の動物サンプルは、玉網を用いて捕獲した後、高純度エタノールが入ったガラス製ボトル内に入れました。その後、氷の上に置き、-20 °C でラボ内で保管しました。

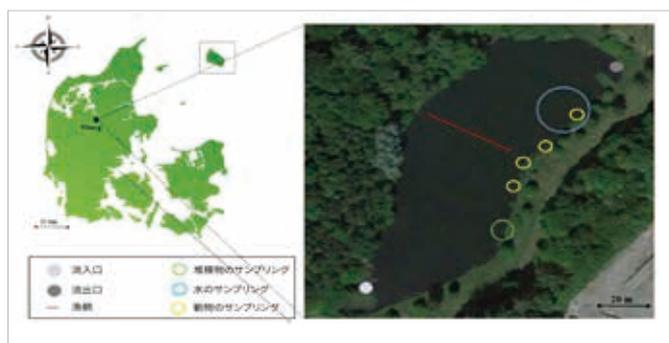


図 1. デンマークのヴィボーにある水が滞留した池のサンプリング場所。水のサンプリング領域は青の円で、堆積物のサンプリング領域は緑の円で、動物のサンプリング領域は黄色の円で示しています。赤色の線は魚を捕獲する網を配置した場所を示しています。薄い灰色と濃い灰色の点は、それぞれ流入口と流出口の場所を示しています。

サンプル前処理

すべてのガラス容器は使用前に 3 回すすぎ、すべての装置、サンプルなどは空気中のマイクロプラスチックで汚染されるのを防ぐためにカバーをつけて保管しました。

環境サンプルのマイクロプラスチック分析の主な課題は、有機/生物物質の除去です。多くのプラスチックは疎水性であるため、その表面に有機物質が凝集し、マイクロプラスチックを分光分析する前に有機物質を取り除く必要があります。H₂O₂ による酸化を主な前処理として選択しました。この処理では、有機物質を除去しながらもプラスチックを保護することができます。

水サンプル中のプラスチックは、ふるいにかけて、エタノールが蒸発する前にエタノールで洗浄して濃縮しました。

堆積物サンプルは、有機物質を除去するために H₂O₂ で酸化する前に、ふるいにかけて凍結乾燥させました。その後、重力分離を使用して、無機および有機フラクションを分離しました。

動物サンプルを前処理するために、乾燥重量 1 g のフリーズドライサンプルあたり 60 mL の 5 M KOH を加えました。その後、この溶液を 48 時間 45 °C で攪拌しました。サンプルをふるいにかける前に超純水を加えました。

3 種類のサンプルのそれぞれから最終的に濃縮されたプラスチック粒子サンプルをエタノールで懸濁させました。粒子サイズが 80 μm を超えるサンプルは、赤外反射ガラスのスライド (Kevley Technologies 社の MirrIR) に沈着させ、反射モードの FTIR イメージング解析を行いました。粒子サイズが 80 μm 未満のサンプルは、セレン化亜鉛 (ZnSe) の赤外透過窓に沈着させて、次の透過モードでの分析のために乾燥させました。これにより、マイクロプラスチック粒子がスライドに付着して残り、FTIR イメージングでの分析の準備が整いました。

このメソッドを評価するために、いくつかの複製サンプルに 30 ~ 36 個の赤い 100 μm ポリスチレンビーズをスパイクしました。

装置構成

マイクロプラスチックを同定し定量するために、フーリエ変換赤外 (FTIR) イメージングシステムを使用しました。このシステムは、Agilent Cary 620 FTIR 顕微鏡と Agilent Cary 670 FTIR 分光計を組み合わせたものです。顕微鏡には 128 x 128 ピクセルの焦点面アレイ (FPA) 検出器が搭載され、15 倍拡大を使用してタイルごとに 700 x 700 ミクロンの領域全体で、16,384 の空間分解能スペクトルを同時に収集することが可能です。システムは反射および透過モードで動作させることができます。設定値を表 1 に示します。

表 1. 分析に用いた FTIR イメージングの設定値

反射および透過モードでの設定値	
焦点面アレイサイズ	128 x 128
対物レンズ	15 x
IR ピクセルサイズ	5.5 μm
タイルあたりのスキャン数	30
モザイクタイルの数	16 x 16
総測定範囲	9.8 x 9.8 mm
スペクトル分解能	8 cm ⁻¹

結果と考察

サンプルの FTIR イメージングを分析して、存在するプラスチックの同定と定量を実施しました。この分析では、調査対象物質以外のほとんどの物質を除去する必要があります。サンプル前処理メソッドを、水、堆積物、魚など、サンプルの種類ごとに最適化しました。

最初に粗分析し、3000 ~ 2800 cm⁻¹ の間に C-H 伸縮 IR 吸収のない物質を取り除きました。これにより、存在する粒子のほとんどが除去されました。最も一般的なプラスチック (表 2 を参照) のスペクトル比較を使用して、残りの粒子を分析しました [5, 6]。プラスチックが検出されると、その粒子の材質を寸法とともに記録しました。

表 2. 廃水中で見つかる一般的なプラスチック

ポリエチレン (PE)
ポリプロピレン (PP)
ポリ塩化ビニル (PVC)
ステアリン酸亜鉛
ポリスチレン (PS)
スチレンブタジエンゴム
ポリウレタン (PUR)
ポリアミド/ナイロン (PAM)

IR スペクトルのピークを個別に割り当てることによって、スペクトル分析を行いました。これにより、偽陽性と偽陰性の両方のプラスチック粒子のリスクを低減しました [4, 7]。分析に必要な時間を短縮するために、サンプルスライド/窓のほぼ中央部分の 1 つのタイル列のみを分析しました (図 2 を参照)。

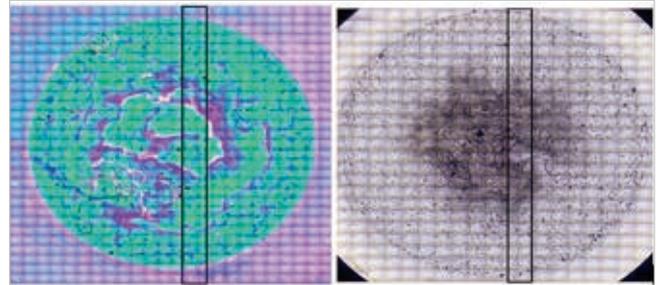


図 2. 水サンプルを沈着させたスライド (左) とセレン化亜鉛透過窓 (右) の FTIR イメージ。黒枠内は、分析対象となった 10 x 10 mm の測定領域の一部分を示しています。

プラスチックとして割り当てられたすべてのスペクトルをプラスチックの種類とともに記録しました。プラスチックを拡大表示させ、ピークを割り当てて、イメージ全体を IR イメージと比較することによって、タイルを 1 つずつ分析しました。最初のスクリーニングでは、タイルに残った粒状物質のほとんどがプラスチックではなく鉱物粒子などの他の物質に由来するものでした (図 3 に表示)。

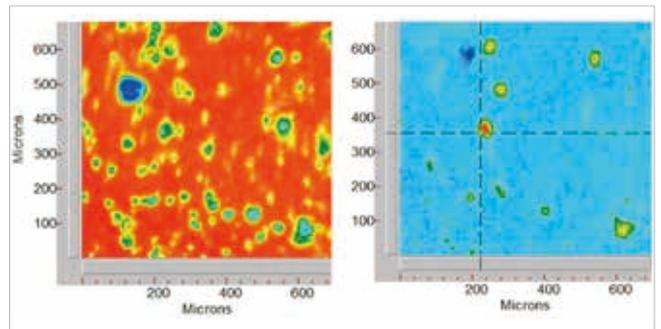


図 3. 20 ~ 80 μm の水サンプルからのタイルイメージ。左は、最初のスクリーニングを適用する前の赤外画像で、2200 cm⁻¹ までの絶対ピーク高をもとに、散乱を、つまりすべての粒子を強調したものです。右は、最初のスクリーニング後の赤外画像で、3000 ~ 2800 cm⁻¹ のピーク面積をもとにプラスチック粒子を強調したものです。最初のスクリーニングでは、タイルに残っているほとんどの粒状物質はプラスチック以外のものに由来することが示されました。

スクリーニングにより、いくつかのカラフルな球状粒子が取り除かれました。この問題については別の研究 [4] でも取り上げられており、物質の形状が不規則な場合の使用に適さない IR スペクトルについて報告されています。

プラスチック内容物の定量

プラスチックのスペクトルは、スペクトル同定の信頼性をもとに、「高」または「可能性が高い」という 2 つのカテゴリのいずれか 1 つに割り当てました。「高」はスペクトルが基準スペクトルと完全に一致することを示し、「可能性が高い」はほとんどのピークが基準スペクトルに存在するスペクトルであることを示します。図 4 と図 5 は、得られたスペクトルの例を示しています。また、プラスチックであると同定されたすべての粒子について、図 6 に示します。

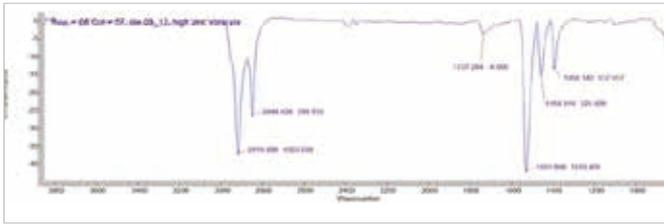


図 4. 魚サンプル中で「高」と指定されたステアリン酸亜鉛の IR スペクトル

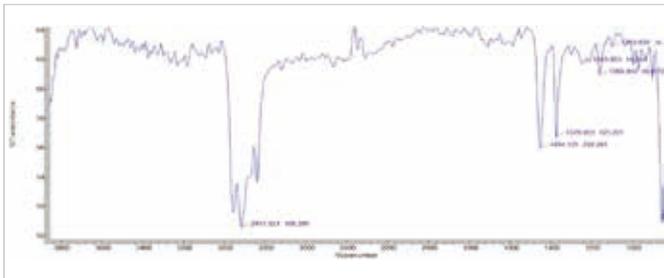


図 5. 堆積物サンプル中で「可能性が高い」と指定されたポリプロピレンの IR スペクトル

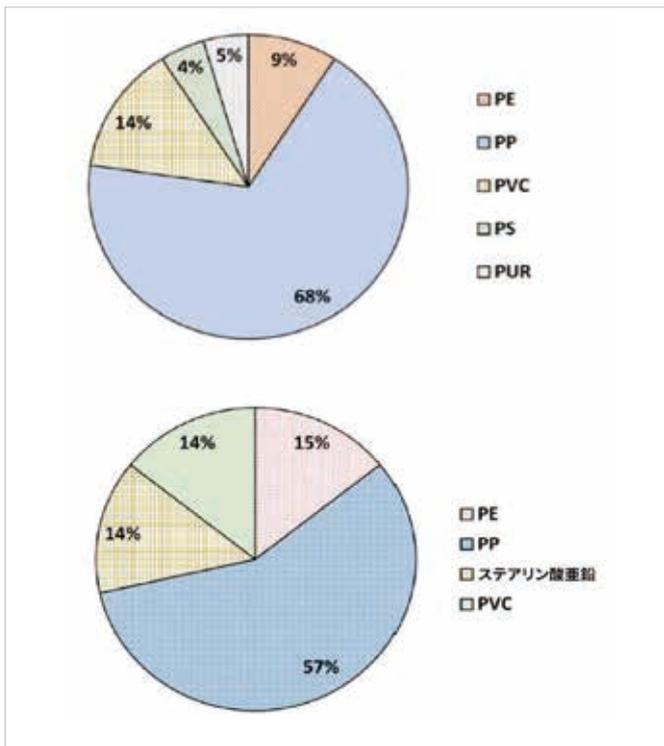


図 6. 堆積物 (上) と水 (下) で見つかったプラスチック粒子の組成。
頭文字の説明については、表 2 を参照してください。

池の中で最も大量にあったプラスチックは、ポリプロピレンと PVC でした。堆積物サンプルには、水サンプルよりも多くの種類のプラスチックが含まれていることがわかりました。

魚サンプルでは、1 個のステアリン酸亜鉛粒子が検出されました。トゲウオ 1 匹の 7.3 % に相当する量が分析され、この方法でマイクロプラスチックの検出が可能であることが示されましたが、濃度は計算されませんでした。

水域環境に存在するプラスチックの数は、水性動物相に与えるマイクロプラスチックの影響において重要な役割を果たす可能性があります [7]。今回の研究では、分析したサンプル量に存在するプラスチック粒子の数を求めることによって、プラスチックを定量しました。プラスチック粒子を定量する場合、超音波処理、機械攪拌、掻き寄せなどの処理によって大きい粒子が砕けて小さい粒子となって、粒子の数が増加する可能性があるものとして、サンプル前処理方法を考慮する必要があります。

FTIR 分析をもとに、堆積物内のプラスチック濃度は、 5.2×10^5 粒子/kg 乾燥堆積物で 26 mg/kg 乾燥堆積物相当であることが明らかになりました。水サンプル中のプラスチック濃度は、 1.1×10^2 粒子/L で $4.5 \mu\text{g/L}$ 相当であることが判明しました。ヒルサンプル中にはプラスチック粒子は見つかりませんでしたが、この結果はプラスチックが存在しなかったことを意味するものではなく、単に $20 \mu\text{m}$ よりも小さい (今回の分析ではフラクション下限よりも小さいサイズ) ために検出できなかったことであり、動物組織には別のサンプル前処理技術が必要な可能性があります。

メソッドバリデーション

分析プロトコルは、既知の量のポリスチレン粒子をサンプルにスパイクして評価しました。サンプル前処理後に粒子を定量して、FTIR 定量方法を適用しました。図 7 に示すように、ほとんどのサンプルで高い回収率を示し、水サンプルでの 97 % から堆積物サンプルでの 64 % までの範囲でした。

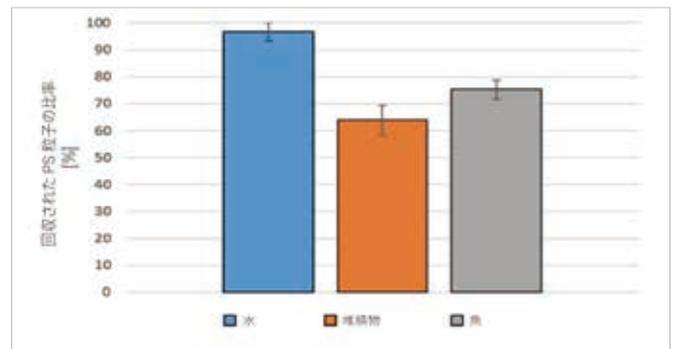


図 7. スパイクされたサンプルから回収されたポリスチレン (PS) ビーズの比率。回収率は、水サンプルでは 97 %、堆積物サンプルでは 64 %、2 つの魚サンプルでは 75 % でした。青色と橙色の棒上にあるエラーバーは、回収された粒子を含むフィルタ上の物質の量に起因するカウントミスの可能性として計算しました。魚サンプルのエラーバーは、標準偏差として計算しました。

堆積物サンプルの低い回収率は、土壌および堆積物の分析でプラスチック濃度を過小評価するリスクがあることを示しています。堆積物サンプルは今回の分析でプラスチック濃度が最も高く、前処理済みサンプルには視認できるカラフルなプラスチック粒子が含まれていました。赤色のポリスチレン粒子と形状や色が類似した粒子が存在していたため、回収されたポリスチレンのカウントが複雑になった可能性があります。

結論

本研究メソッドでは、堆積物、水、魚など、有機物が豊富なサンプルに含まれるマイクロプラスチックの回収、同定、定量を適切に実行することができました。

研究の結果から、サンプルを採取した滞留した池にマイクロプラスチックが存在することが結論づけられました。

FTIR イメージングが、マイクロプラスチックの検出と定量の適切な手段であることが証明されました。H₂O₂ 酸化と組み合わせることにより、FTIR イメージングは、マイクロプラスチック分析において標準メソッドとなる有力な候補であり、環境中のマイクロプラスチックのより詳細な研究および理解が可能になります。

参考文献

1. Wagner, M., Scherer C., Alvarez-Muñoz D., Brennholt N., Bourrain X., Buchinger S., Fries E., Grosbois C., Klasmeier J., Marti T., Rodriguez-Mozaz S., Urbatzka R., Vethaak A. D., Winther-Nielsen M., and Reifferscheid G. (2014). Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe* 26(1), 12
2. Hidalgo-Ruz, V., Gutow L., Thompson R. C., and Thiel M. (2012). Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental science & technology* 46(6), 3060–3075
3. Löder, M. G. J. and Gerdtz G. (2015). *Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics—A Critical Appraisal*. Springer International Publishing
4. Tagg, A. S., Sapp M., Harrison J. P., and Ojeda J. J. (2015). Identification and Quantification of Microplastics in Wastewater Using Focal Plane Array-Based Reflectance Micro-FTIR Imaging. *Analytical chemistry* 87(12), 6032–6040
5. Lassen, C., Hansen S. F., Magnusson K., Hartmann N. B., Rehne Jensen P., Nielsen T.G., and Brinch A. (2015). Microplastics: occurrence, effects and sources of releases to the environment in Denmark. Technical report, Danish Environmental Protection Agency
6. PlasticsEurope (2015). *Plastics - the facts 2015: An analysis of European plastics production, demand and waste data*
7. Vollertsen, J. and Hansen A. A., (2016, November). Microplastic in Danish wastewater: Sources, occurrences and fate. In press, Danish Environmental Protection Agency

このアプリケーションノートは、2017年5月に開催された Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) 会議で、デンマークのオールボー大学土木工学部の Kristina B Olesen 氏、Diana A Stephansen 氏、Nikki van Alst 氏、Marta Simon 氏、Alvise Vianello 氏、Fan Liu 氏、Jes Vollertsen 氏が発表した研究「Microplastic in Water, Sediment, Invertebrates, and Fish of a Stormwater Retention Pond」(雨水滞留池の水、堆積物、無脊椎動物、および魚に含まれるマイクロプラスチック) から抜粋したものです。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, August 15, 2017

5991-8271JAJP



Agilent Technologies