

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 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汚染の分析



著者

Danence Lee Ph.D
The Public Utilities Board,
Singapore

Siji Joseph, Chee Ping Wong,
Darren Robey, Chee Sian Gan
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

多くの水源でマイクロプラスチック汚染が、環境にとって重大な脅威となっています（1、2）。水中のマイクロプラスチック粒子は膨大な数に及ぶ可能性があり、マイクロプラスチックへの曝露がもたらしうる悪影響について、科学コミュニティ間で関心が高まっています。水中のマイクロプラスチック粒子の大きさや数の測定に、フーリエ変換赤外分光光度計（FTIR）などの従来のマニュアル分光分析や、目視による手法を使用するのは、困難なことが少なくありません。マイクロプラスチック分析の前処理に必要なサンプルのクリーンアップ手順については、非常に多くの文献に記載されています。しかし、これらの手順は通常、時間を要し、有害な化学物質が含まれており、小さなサイズのサンプルを扱うため、さらに困難なものとなります。FTIR は以前からマイクロプラスチック分析に用いられていますが、データ取得に非常に時間がかかり、多くの場合、数日を要します。また、FTIR の大型コヒーレント光源は、小さなマイクロプラスチック粒子に焦点を合わせるにはきわめて非効率的です。この研究では、さまざまな水マトリックス中からマイクロプラスチックを取り出し、Agilent 8700 Laser Direct Infrared (LDIR) ケミカルイメージングシステムを用いて同定する、よりシンプルな手法を評価します。

実験方法

試薬および調製

分光分析グレードのエタノール、ドデシル硫酸ナトリウム、およびその他のすべての化学薬品は、Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州、米国）から購入しました。ポリスチレン（PS）80 μm 微粒子サイズ標準は、Thermo Scientific（フリーモント、カリフォルニア州、米国）から購入しました。添加回収率の分析に使用する脱イオン化（DI）水は、Milli Q 純水製造システム（Millipore、米国）から採取しました。

水のサンプリングおよびラボの準備

シンガポールにおいて集水域から表流水を、排水施設から処理済み放流水を、ゼリー缶を使用して合計 10 L 採取しました。そのうち 1 L の水をマイクロプラスチック分析用にサンプリングしました。すべてのガラス容器は、0.3 g/L のドデシル硫酸ナトリウム溶液を用いて超音波洗浄で処理し、超純水（18 M Ω ）で洗い流した後に使用しました。

粒子採取のワークフロー

粒子採取の手順の概略を図 1 に示します。

吸引ろ過装置は、Johnson Scientific（ジョホール、マレーシア）から購入しました。Agilent 10 μm 、19 mm セミ分取フィルタディスク（製品番号：5022-2166、図 2）とこれに適合するハードウェアアセンブリ（部品番号：5022-2165）を使用して、水サンプルを吸引ろ過しました。フィルタディスクは簡単に取り外しができ、再利用可能なステンレスメッシュスクリーンです。粒子を捕捉するために、フリットアダプタ（製品番号：5062-8517）で接続された PTFE 溶媒チューブ（製品番号：5062-2483）を使用して、サンプルをフィルタディスクアセンブリに送りました。1 回のろ過にかかった時間は、サンプルによって異なり、約 7 ～ 10 分でした。表流水や処理済み放流水のような多成分を含むサンプルをろ過した後は、フィルタディスクに 50 mL の DI 水を通液し、捕捉した粒子を洗い流しました。ろ過間で生じるクロスコンタミネーションを防ぐために、フィルタディスクに順方向と逆方向の両方向に DI 水を通液しました。



図 2. マイクロプラスチック粒子の採取に使用した分取フィルタディスク

スチールフィルタディスクに捕集された粒子は、ビーカー内で超音波処理を使用して 2 mL のエタノール中に移しました。得られた粒子とエタノールの懸濁液は、70 $^{\circ}\text{C}$ に維持されたホットプレートの上にビーカーを置き、乾燥するまで蒸発させた後、200 μL のエタノールで再度懸濁しました。再懸濁させた最終エタノール層を、ピペットを使って 2 枚の赤外反射スライドガラス（7.5 $\times$ 2.5 cm, MirriIR, Kevley Technologies 社、オハイオ州、米国）に移しました。ピペットチップは先端を一部切断し開口部を広げて、最大 1000 μm サイズの粒子が通過できるようにしました。空気による汚染を低減するため、以上のマイクロプラスチック粒子の全準備工程はラミネーフロー式ドラフトの中で実施しました。スライドガラスは、LDIR による分析前にペトリ皿の中に密閉して保管しました。

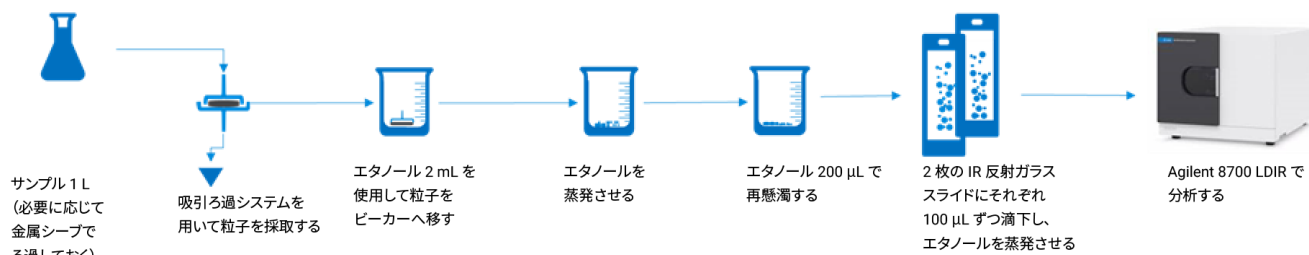


図 1. マイクロプラスチック粒子の採取ワークフロー

ポジティブコントロールとしての添加済み DI 水サンプル

20 ～ 1000 μm の広範囲の粒子サイズを分析する際の課題は、サンプル前処理手順における粒子の損失です。サンプルの処理効率を検証し、前処理工程で発生する粒子損失を評価するために、ポジティブコントロールを用いた回収率分析を実験計画に含めました。約 100 個の微粒子形状の 80 μm PS 粒子を 1 L の DI 水に添加して、6 回のテクニカルレプリケート用のポジティブコントロールを準備しました。各ポジティブコントロールから回収された 80 μm PS ビーズの割合を計算し、平均値を回収率 (%) で示しました。6 回のテクニカルレプリケートから、回収率の相対標準偏差 (RSD) を計算して手順の再現性を評価しました。

水源からの粒子の採取

図 1 に概略を示したワークフローを使用して、表流水および処理済み放流水サンプルからマイクロプラスチック粒子を採取しました。ワークフローの手順前に、表流水および処理済み放流水サンプルを 1000 μm の金属シーブでろ過することで、より大きな粒子を除去しました。各水源を使用したサンプル前処理ワークフローをそれぞれ 2 回実行し、粒子の平均化された情報を比較目的で使用しました。

ポジティブコントロールサンプルと同様に、既知の数の 80 μm PS ビーズを 1 L の表流水と処理済み放流水それぞれに添加して、回収率を推定しました。1000 μm の金属シーブでろ過する際のあらゆる損失に対応するために、ろ過の前に添加を実施しました。

装置構成

この研究では、Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムを、Agilent Clarity ソフトウェア（バージョン：1.2.19）で制御して使用しました。Clarity ソフトウェアに標準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ことで、各サンプルから採取した粒子を分散させた赤外反射スライドガラスを 8700 LDIR で分析できました。8700 LDIR システムは、選択した領域に高速 IR スキャンデータ取り込みを実行する量子カスケードレーザー (QCL) 光源を使用して、選択した面積範囲内の粒子すべてを特定します。8700 LDIR システムが各粒子の高品質のスペクトルイメージングデータを採取し、Clarity ソフトウェアが自動的にライブラリ検索を実行して粒子の同定を確認します。図 3 に、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示します。

Clarity ソフトウェアは各粒子を 10 秒以内に同定できるため、水サンプル中のマイクロプラスチックの高速分析が可能になります。このソフトウェアは、同定された粒子の合計数、各粒子のサイズ測定値（幅、高さ、直径、周囲の長さなど）、リファレンスライブラリとのヒットオリディティが記載されたレポートを自動的に作成します。

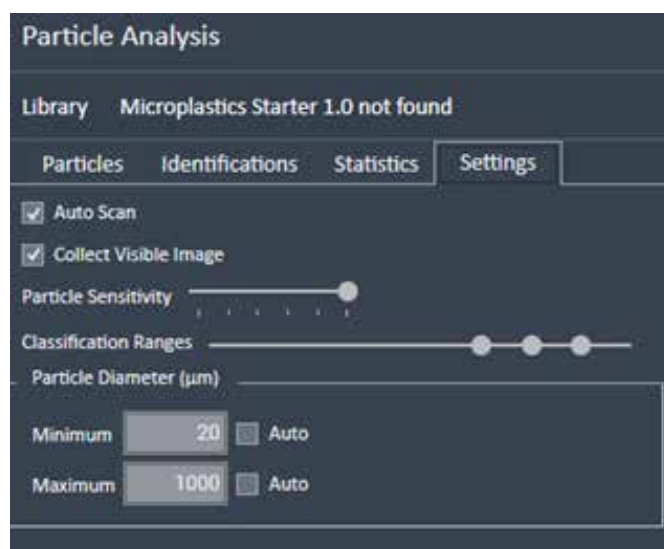


図 3. マイクロプラスチック分析メソッドのパラメータ

次のようなヒントも分析の参考になる場合があります。

- Kevley 赤外反射スライドガラスの右側面は油性マーカーで黒色に塗られており、スライドガラスに側面方向から入射する光を制限し、LDIR のサンプルプロファイリングステップを正確に実行します。
- 最終の再懸濁済みエタノールの一部のみを Kevley 赤外反射スライドガラスに分散させると、分析するマイクロプラスチック粒子量を調整することができます。ただし、スライドガラスに分散させた量に合わせて、回収された粒子のカウントやろ過効率を計算する必要があります。
- サンプル中に含まれる無機塩類（カルシウム塩およびマグネシウム塩由来）の干渉は、ろ過前に 250 g/L EDTA 溶液を用いた超音波処理を 15 分行うことで低減することができます。
- 参考文献 (2) に記載されている有機および無機分解ステップによって、複雑な水サンプル中のマイクロプラスチック同定の信頼性と品質をさらに向上できます。

結果と考察

Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムは、化学的特異性があり、非破壊分析が可能です。LDIR システムは、測定サンプル中のマイクロプラスチックの形状とサイズを同定しました。Clarity ソフトウェアは、統計データを自動的に生成し、高速で粒子の組成評価を実行します。同定された粒子のうち、ライブラリヒットオリティインデックス (HQI) が 0.8 を超えるものは、さらなるマトリックススペースの統計解析が考慮されました。

サンプル前処理の信頼性

サンプル前処理手順の信頼性を評価するため、ポジティブコントロールサンプルの 6 回の繰り返し測定結果を基に、80 μm PS ビーズの測定の回収率と再現性を計算しました。観察された平均回収率は 73 % で、再現性は < 10 % RSD でした。このように回収率と % RSD の値は良好で、粒子抽出メソッドの効率が裏付けられました。

実サンプル中のマイクロプラスチック

8700 LDIR ケミカルイメージングシステムを使用すると、マトリックス由来の有機物または無機物の干渉が存在する場合でも粒子を同定できます。QCL 赤外光源技術、検出器、高速スキャン光学系により、各微粒子の IR スペクトルを採取でき、数秒以内での高速粒子同定が可能です。

表流水サンプルでは、1 L のサンプル中で、6 種類の既知の成分が混合された 25 個のマイクロプラスチック粒子が測定されました。塩素化ポリエチレン (PEC)、ポリプロピレン (PP)、およびラバーが特に多い粒子で、粒子の > 90 % を占めました。エチレン酢酸ビニル (EVA)、ポリエチレン (PE)、ポリエチレンテレフタート (PET) も、表流水サンプルから少数検出されました。1 L の処理済み放流水中からは 22 個のマイクロプラスチック粒子が観察されました。PEC、ポリ塩化ビニル (PVC)、PP、およびポリビニルアルコール (PVA) が多く検出されました。残りの粒子は、EVA、PE、PET、ポリメタクリル酸メチル (PMMA)、ラバーと同定されました。図 4 に、表流水および放流水で観察された粒子の概要を示します。

Clarity ソフトウェアは、必要に応じて個々の粒子を拡大表示して確認することができます。例として、HQI > 0.8 のラバー粒子 (表流水中) と PVC 粒子 (処理済み放流水中) の拡大イメージを図 5 に示します。

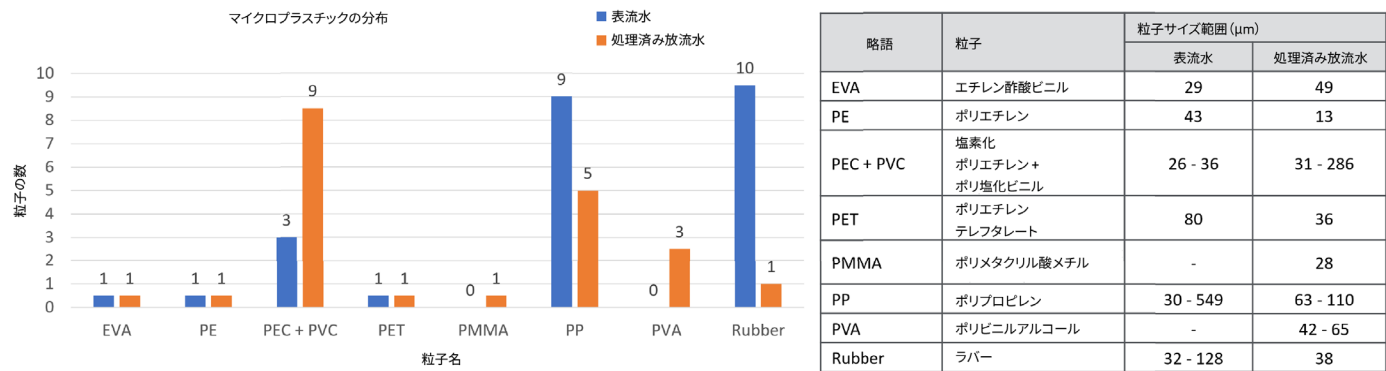


図 4. 表流水および処理済み放流水サンプル中の粒子の概要

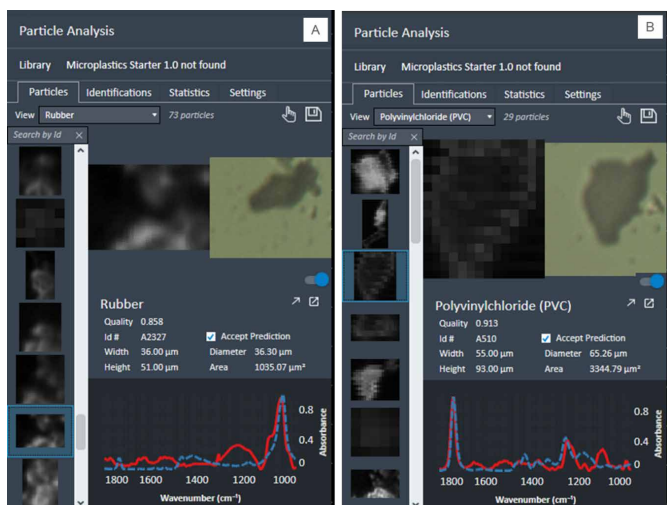


図 5. 表流水中のラバー粒子 (A) と処理済み放流水中の PVC 粒子 (B) の同定結果

添加回収率の結果

表流水および処理済み放流水サンプル中に添加した 80 µm PS ビーズの回収率分析も > 73 % でした。堅牢な LDIR スペクトル品質とライブラリ照合の結果により、高マトリックスバックグラウンドを持つことが多い表流水や処理済み放流水などの複雑なマトリックス中であっても、PS ビーズを確実に同定することができました。

図 6 に、DI 水、表流水、処理済み放流水中の添加済みポリスチレン粒子の同定結果を示します (ヒットクオリティインデックス > 0.895)。高解像度カメライメージでは、表流水および処理済み放流水サンプルのマトリックスバックグラウンドが、DI 水と比較して高いことが明確に分かります (図 6)。

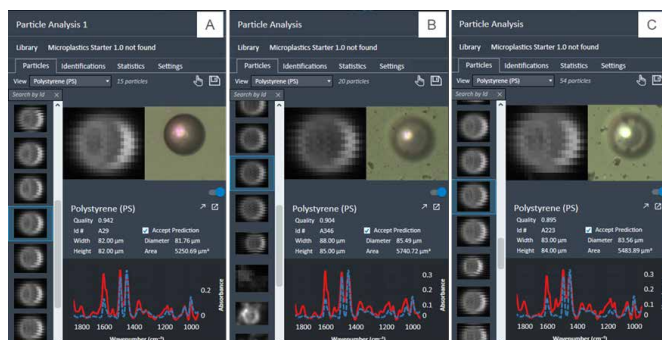


図 6. さまざまな水源での PS ビーズの回収率。A：DI 水、B：表流水、C：処理済み放流水

粒子サイズ分布の自動統計

Clarity ソフトウェアのレポート機能を使用して、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を作成しました。図 7 は、サンプルごとに観察された粒子の割合をプロットした粒子サイズ範囲の分布の概要です。このグラフから、表流水および処理済み放流水サンプル中の大部分の粒子が 20 ~ 200 µm の範囲にあることが分かります。

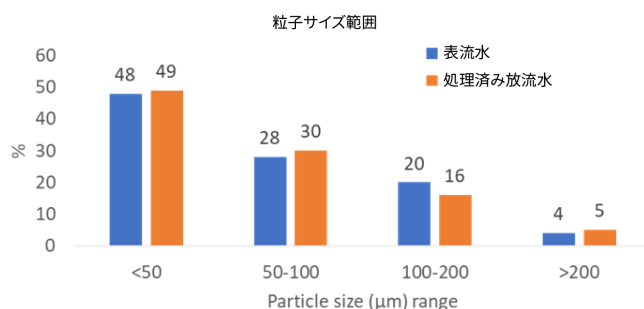


図 7. 表流水および処理済み放流水サンプル中の粒子サイズ (µm) の分布

結論

この研究では、迅速でシンプルなサンプル前処理手順と、環境水中のマイクロプラスチック粒子の特性解析における Agilent 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムの有効性を示しました。

Agilent 10 µm フィルタディスクを用いた吸引ろ過システムを使用して、水サンプル中の粒子を採取しました。この手順はわずか数分で完了し、従来の FTIR での 1 日がかりのプロセスと比較して、生産性が向上しました。既知の数の 80 µm ポリスチレンビーズが添加された DI 水サンプルを使用して、この手順の良好な粒子分離効率（73 % の回収率）と再現性（<10 % RSD）が確認されました。

標準搭載されたマイクロプラスチック分析用のメソッドを使用することで、メソッドと機器の多くの設定が Clarity ソフトウェアから自動的にロードされるため、経験が浅い分析者であっても操作を大幅に簡素化できます。8700 LDIR の集束レーザー光源により、10 µm という小さな粒子の高速データ取り込みと信頼性の高い特性解析が、最小限の機器操作で可能になりました。1 L あたり 20 以上のマイクロ粒子（主に PEC+PVE、PP、ラバー）が表流水および処理済み放流水中で確認され、大部分の粒子のサイズは 20 ~ 200 µm の範囲内でした。

リファレンスライブラリとの交差マッチングにより、粒子を自動的に同定できました。また、個々の粒子を拡大する機能により、8700 LDIR の光学系を変更しなくても、必要に応じてデータをさらに調査することができます。

参考文献

1. N.P. Ivleva et al, Microplastic in Aquatic Ecosystems. *Angewandte Chemie Int Ed*, **2017**, 56(7): 1720-1739.
2. Philip J. Anderson et al. Microplastic contamination in Lake Winnipeg, Canada, *Enviro Poll.* 225, **2017**, 223e231.

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, September 13, 2021

5994-3932JAJP

DE44447.0223842593