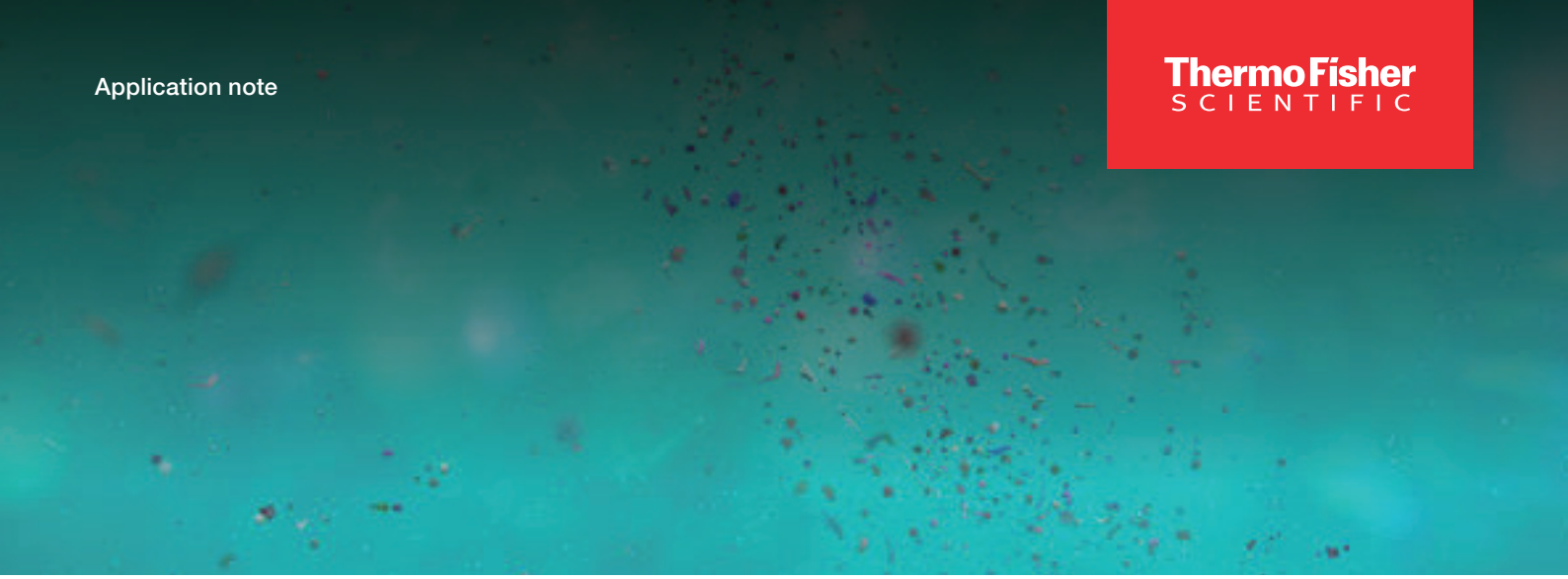
Application note



Nicolet RaptIR FT-IR顕微鏡を使用したマイクロプラスチックの識別

マイクロプラスチックは川や海だけでなく飲料水や大気中、深海などあらゆる場所で見つかっています。海洋生物の摂食による被害が報告されていますが、食物連鎖により生態系全体へ広がっていることが分かっています。人間も例外でなく健康への影響が懸念されています。

そのため世界中の政府や研究機関などでマイクロプラスチックの評価方法の確立やマイクロプラスチックの使用を制限する法規制を進めています[1]。

飲料水中のマイクロプラスチックについてカリフォルニア州水資源管理委員会 (SWRCB) が採用している現在の定義では、これらの粒子をサイズに基づいて、ラージ (100～5,000 µm) 、スモール (1～100 µm) 、サブミクロン (100～1,000 nm) 、およびナノ (1～100 nm) に分類しています。現在、標準化されたプロトコルを、カリフォルニアSWRCBおよび南カリフォルニア沿岸水研究プロジェクト (SCCWRP) から入手可能です。このプロトコルにおいて、FT-IRおよびラマンはマイクロプラスチック分析に用いる手法として指定されています。FT-IRおよびラマン分光装置はプラスチックの分析や品質管理に従来より使用されている信頼性の高い機器で、マイクロプラスチックを識別することができます。

通常、プラスチックの識別には劣化していないプラスチックのデータベースを使用しますがマイクロプラスチックは環境中で劣化していることが多く、劣化していないプラスチックのデータベースでは識別が難しい場合があります。これは水や日光などによるプラスチックの酸化や劣化によりスペクトルが変化するためです。

100 µm以下のマイクロプラスチックを測定する場合、顕微ATR測定が好まれます。ただし、顕微ATR測定を用いた自動分析は、多数の粒子測定が必要となるマイクロプラスチック分析にはあまり有効ではありません。それは、複数のマイクロプラスチックに接触すると、顕微ATRクリスタルにクロスコンタミネーションや付着が起こる可能性があるためです。マイクロプラスチック分析には非接触で測定できる顕微反射測定の使用が推奨されます。ただし、ほとんどの市販ライブラリーは、透過測定またはATR測定により得られたスペクトルで構成されています。サンプルスペクトルが反射測定で得られる場合、スペクトルの一致を最適化するために反射ライブラリーを利用することが理想的です。このアプリケーションノートでは、反射測定で得られたプラスチックのライブラリーを使用することの有用性について説明します。
現在、さまざまなラボがマイクロプラスチックのFT-IR (およびラマン) データ収集と分析の自動化に取り組んでいます。この分析の自動化の課題を解決するには、マイクロプラスチックの粒子を見つけ、その座標情報を得る必要があります。
サーモフィッシャーサイエンティフィックは、長く電子顕微鏡事業にて目的サンプルの位置情報を得るための技術を開発してきました。この技術は、Thermo Scientific™ Nicolet™ RaptIR™ FT-IR顕微鏡と共に発売されたThermo Scientific™ OMNIC™ Paradigmソフトウエアにより FT-IR顕微鏡で使用できるようになりました。FT-IR顕微鏡システムには、各粒子の画像キャプチャーと各粒子のフォームファクター (形状とサイズ) の情報を得る機能が搭載されています。各粒子のアパーチャーサイズはフォームファクターによって決定され、分析全体のデータ品質を最適化します。次に、これをFT-IR検索機能と組み合わせて、粒子のIDナンバーを生成します。測定により得られたあらゆる解析結果が自動的にレポートにまとめられ、一連の分析が完了します。

thermo scientific

方法

サンプル作成方法

水または廃水中のマイクロプラスチックは、SCCWRP/California SWRCBプロトコルに従って処理されました。最終ろ液（1～50 µm）は、シリコン、金でコーティングされたポリカーボネート、Al_2O_3、またはステンレス鋼などの適切なフィルターを使用してろ過しました。図1は、マイクロプラスチックの分離と分析に関連するステップをまとめたものです。

フィルター／スライドを屋外環境に長時間さらしたままにして、空気中の粒子を収集しました。

図1. マイクロプラスチックの分離と分析に関連するステップの要約。

FT-IR分析

このアプリケーションノートでは、2種類のデータ測定機能について説明します。最初のアプローチは粒子分析を利用し、フィルター全体に分散された粒子のみのデータを測定します（最初に粒子を見つけてから測定し解析します）。2番目のアプローチでは、フィルター全体のケミカルマップ（ケミカルイメージ）を測定します（FT-IRスペクトルを使用して粒子を見つけます）。ここで行った両方のアプローチでは、分解能8 cm^{-1}でのデータ測定にシングルポイントMCT検出器を使用しました。各スペクトルは、8回または16回の積算により得られたものです。

粒子分析メソッドでは、フィルターの可視画像に対して画像解析を行い、フィルター自体とのコントラストに基づいて粒子を特定します。ソフトウエアは自動的に顕微鏡ステージをこれら全ての位置に移動し、スペクトルが測定され、適切なライブラリーのセットを用いて解析します。表面上の数百または数千の粒子の測定が完了すると、同定成分、サイズ、形状、およびサイズの分布を含む粒子分析レポートが生成されます。

マッピング測定メソッドでは、フィルターの全領域を画像として分析できます。このタイプの分析は、プラスチックとフィルターのコントラストがあまり明瞭でない場合に有効です。欠点は、測定時間とデータ容量を増加させる要因となる多数の「空の」データピクセル（粒子のないポイント）が作成されることです。大きな粒子については粒子内の複数の領域も分析できます。データが取得されると、相関、多変量カーブ分解（MCR）、または主成分分析（PCA）アルゴリズムをマップに適用して、粒子を見つけて識別することができます。

マイクロプラスチック反射ライブラリー

マイクロプラスチックリファレンスライブラリーは、ハワイパシフィック大学（HPU）[4]のCMDRポリマーキット1.0、Polysciencesマイクロビーズ標準、およびSigma-Aldrichのポリマー標準を使用して作成されました。

小さなサイズの粒子は、ラボグラインダーまたは金属スクレーパーを使用して作成されました。少なくとも3つの粒子について、分解能8 cm^{-1}、32回積算でのスペクトル測定を実施しました。マイクロプラスチックリファレンスライブラリーリストを表1に示します。ライブラリーには、ラボで見つかった30種類の一般的なプラスチックと5種類のコンタミ物質が含まれています。

表1. 粒子の識別に使用されるマイクロプラスチックリファレンスライブラリーに収載の材料一覧

ラボで見つかった材料についてはソースの欄に「ラボ」と記載。

	名前	ソース
1	ULDPE（超低密度ポリエチレン）	HPU
2	LDPE（低密度ポリエチレン）	HPU
3	LLDPE（リニア低密度ポリエチレン）	HPU
4	MDPE（中密度ポリエチレン）	HPU
5	高密度ポリエチレン	HPU
6	PP（ポリプロピレン）	HPU
7	PEST（ポリエステルポプリン生地）	HPU
8	PET1（ポリエチレンテレフタレート）	HPU
9	PET2（リサイクルポリエチレンテレフタレート）	HPU
10	EVA（20%エチレン酢酸ビニル）	HPU
11	ABS（アクリロニトリル、ブタジエン、スチレン）	HPU
12	EPS（発泡スチロール）	HPU
13	PS（ポリスチレン）	HPU
14	PA6（ナイロン6）	HPU
15	PA66（ナイロン6,6）	HPU
16	PVC 1（ポリ塩化ビニル）	HPU
17	PVC 2（フタル酸エステルを含むポリ塩化ビニル）	HPU
18	CR（中古タイヤのクラムゴム）	HPU
19	CA（酢酸セルロース）	HPU
20	PBS（ポリスチレン-ブロック-ポリブタジエン-ブロック-ポリスチレン）	Sigma-Aldrich
21	皮膚細胞	ラボ
22	セルロース繊維	ラボ
23	土壌／シリカ	ラボ
24	ニトリル手袋（青）	ラボ
25	髪	ラボ
26	PE（ポリエチレン）	ポリサイエンス
27	PE（添加剤入りポリエチレン）	ポリサイエンス
28	PMMA（ポリ[スチレン-co-メチル]アクリル酸メチル）	Sigma-Aldrich
29	PET（ポリエチレンテレフタレート）	Sigma-Aldrich
30	PC（ポリカーボネート）	Sigma-Aldrich
31	PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）	Sigma-Aldrich
32	PVDF（ポリフッ化ビニリデン）	Sigma-Aldrich
33	シリコン	Sigma-Aldrich
34	エポキシ樹脂	Sigma-Aldrich
35	PU（ポリウレタン）	Sigma-Aldrich

結果と考察

粒子分析メソッド：可視画像による粒子の分析

OMNIC Paradigm ソフトウエアを搭載したNicolet RaptIR FT-IR顕微鏡を使用すると、マイクロプラスチックの分析を3つの簡単なステップで完了できます。ステップ1で、分析対象の領域を選択します。図2は、さまざまなサイズの粒子が捕集された10x10 mmシリコンフィルターを示しています。測定ポイントとして自動的に選択された箇所が赤色で表示されています。これらはユーザー編集も可能です。

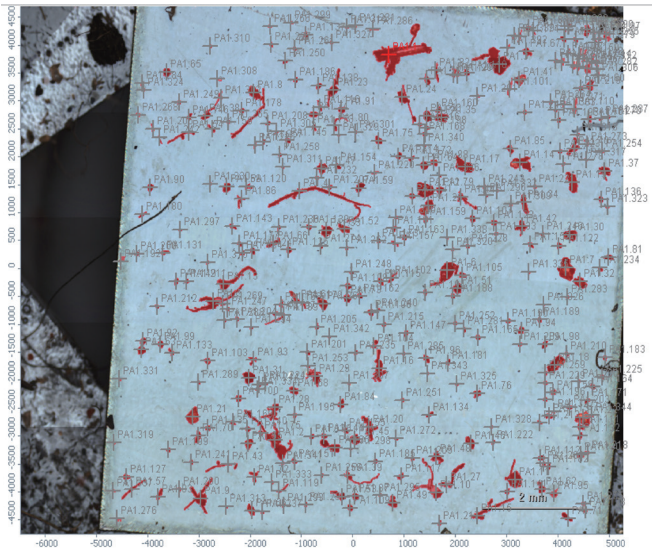


図2. マイクロプラスチックが大気沈着したシリコンフィルター。25 µm～1 mmのサイズの粒子が選択されています。

ステップ2は、全ての粒子のFT-IRスペクトルを自動測定します。ソフトウエアは、必要なアパーチャーサイズを選択し、バックグラウンド測定をしてから、最適と思われる経路をたどって各粒子のスペクトルを測定します。この測定にかかる時間は選択した粒子の数と積算回数に依存します。図3は、この粒子分析メソッドで測定された代表的なスペクトルを示しています。

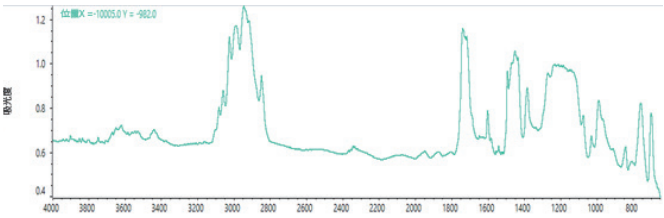


図3. フィルター上の粒子のシングルスキャンスペクトル。8cm^{-1}、16回積算、反射測定を行いました。

ステップ3は、測定が完了した後に実行されます。粒子分析は、選択したライブラリーを使用して実行されます。この例では、表1にリストされているマイクロプラスチックリファレンスライブラリーを使用しました。

図4 (a) は、粒子の成分、サイズと粒子自体の拡大図を含むレポートを示しています。図4 (b) は、識別された各粒子成分の粒子サイズ分布を示しています。プラスチックの識別に使用されるライブラリーは、ユーザーライブラリーとして、カスタマイズして使用できます。

ソフトウエアがまとめるレポートは、検出された各成分の個数や、その形状から導き出される環境の力 (摩耗など) が粒子に対して与えるある種の影響の兆候を全粒子に対する洞察として与えてくれます。この顕微鏡の速度、シンプルさ、自動化により、無駄な時間が最小限に抑えられ、初心者でもこのアプリケーションノートで説明されているものと同じ結果を得ることができます。

(a)

Rank	Component Name	Area %	Count	Library	Color
1	PE with Additives	18.15	182	test micropl	
2	Acrylate	30.14	110	test micropl	
3	Methylacrylate	17.72	88	test micropl	
4	PE only	12.80	58	wizard_poly	
5	acrlate	7.49	13	test micropl	
6	poly-bead-withadditive	2.41	4	wizard_poly	
7	skin -protein	0.68	4	wizard_poly	
8	cellulose fiber	0.29	2	wizard_poly	

スペクトル一致　Columns

(b)

#	Component Name	Match %	X (µm)	Y (µm)	Area (µm²)	Library	Particle thumbnail
PA1.6	Methylacrylate	97.09	-4220	-3228	14775	test micropl	
PA1.1	Methylacrylate	96.60	-10005	-982	7994	test micropl	

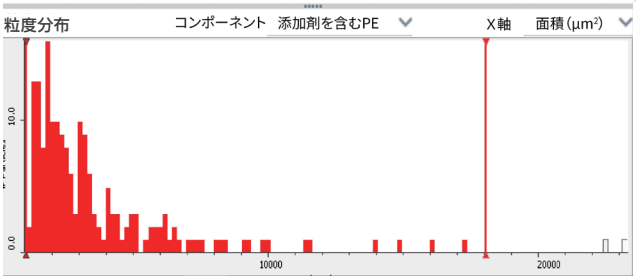


図4. (a) 全体像、同定結果 (成分) 、粒子サイズと粒子拡大画像のレポート。(b) プラスチック種類ごとのサイズ分布。

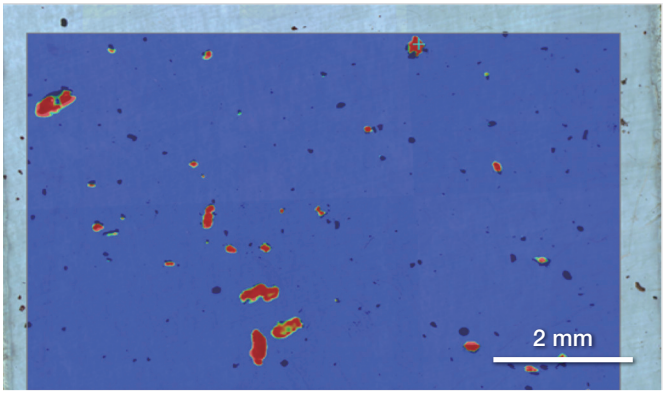


図5. エリアマッピングで分析されたマイクロプラスチック捕集シリコンフィルター。赤い領域は、相関により解析されたPE粒子を表す。

マッピング測定メソッド：フィルター全体の分析

マッピング測定メソッドでは、選択した測定領域全体に対して測定を行い、全てのピクセルに赤外スペクトルが含まれます。フィルター全体を選択して完全にマッピングすることもでき、またユーザーが選択した測定領域をいくつか設定して、それらの領域を個別に測定して分析することもできます。図5は、10x10 mmの領域全体をマッピング測定したシリコンフィルターの例を示しています。赤で強調表示されている領域は、ポリエチレンスペクトルとの高い相関関係を示しています。図6は、金蒸着スライド上の複数領域選択によるマッピングの例を示しています。示されている相関は、ポリエチレン (PE) に対するものです。

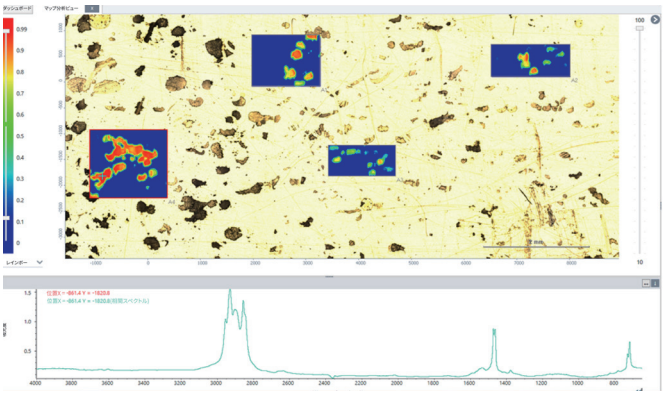


図6. マイクロプラスチック粒子の載った金蒸着スライド表面。分析用に4つの領域が選択されています。各領域が強調表示されています。

このマッピング測定メソッドは、粒子の集団が非常に密集しているフィルター、もしくはその表面において可視コントラストが非常に弱いマイクロプラスチックが存在する懸念がある場合に有用です。フィルターに集められた繊維やフィルムのマッピング分析を行うことも可能です。環境にさらされたマイクロプラスチックの劣化分析にも、マッピング測定メソッドを利用することができます。

結論

マイクロプラスチックの分析は、Nicolet RaptIR FT-IR顕微鏡とOMNIC Paradigmソフトウエアにより、大幅に簡素化されました。自動化および高感度の粒子検出ツールは、優れた可視観察およびIR光学系と組み合わせられており、初心者から専門家まで、どのような方でも優れた結果を得られます。形状とサイズのファクター (因子) を抽出することで、粒子の発生源と環境中での影響を調べることができます。信頼性の高いソリューションとしてご活用いただけることと期待いたします。

参考文献

1. Rochman, C.& Hoellein, T.2020 Science, 368, 1184-1185.
2. De Frond, H. et al. 2021 Anal.Chem. 93, 48, 15878–15885.
3. Cowger W. et al. 2020 Anal.Chem. 93, 21, 7543–7548.
4. https://www.hpu.edu/cncs/cmdr/

詳細については、**thermofisher.com/raptir** をご覧ください。

研究用にのみ使用できます。診断用には使用いただけません。
© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
Sigma and Aldrich are trademarks of Merck KGaA.
実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc **FTIR174-A2207OB**

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL：0120-753-670　FAX：0120-753-671
Analyze.jp@thermofisher.com
facebook.com/ThermoFisherJapan　@ThermoFisherJP
thermofisher.com