

イメージング顕微ラマンによるマイクロプラスチックの同定と特性評価

M. Rocchia¹, I. Ruff², A. Vianello³

¹Thermo Fisher Scientific, strada Rivoltana, I-20090 Milan, Italy; ²Thermo Fisher Scientific, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich, Germany;

³National Research Council – Institute for the Dynamics of Environmental Processes, Corso Stati Uniti 4, 35127 Padova, Italy

キーワード: DXR2xiイメージング顕微ラマン、マイクロプラスチック同定、ラマン、海洋環境、海洋生態系、プラスチック廃棄物、ゴールドフィルター、ラマン顕微分光法

はじめに

海洋環境のプラスチック汚染は極めて深刻で、今や世界中に広がっています。全世界で年間2億9900万トンもの大量のプラスチックが製造されています¹。これは使い捨て商品の使用増とポリマーの低分解性とが組み合わさり、自然環境にプラスチック廃棄物が蓄積する原因となっています²。合成ポリマーは耐久性に優れていますが、大きなプラスチック製品は断片化することがあります。これは、砂などの物質や波による摩耗に起因した機械的破壊の結果であり、紫外線B波による光化学的プロセスによって促進されます^{3,4,5}。直径が5 mm以下の小さなプラスチック断片はマイクロプラスチックに分類されます^{6,7}。マイクロプラスチックはさらに、大型マイクロプラスチック粒子 (L-MPP, 1~5 mm) と、直径が1 mm以下の小型マイクロプラスチック粒子 (S-MPP ≤ 1 mm) に分けられます⁸。

マイクロプラスチックは、水や底質から残留性有機汚染物質 (POPs) と重金属を吸収します。極小粒子は食物連鎖に入り込み^{9,10}、野生生物、そして最終的にはヒトに重大な健康リスクをもたらす可能性が指摘されています。

マイクロプラスチック分析において、成分の同定と定量は重要な課題であり、標準的分析法が存在しないため、さまざまな試験結果の比較が難しくなっています。今までに行われた研究試験のほとんどは、実体顕微鏡下で、粒子をマイクロプラスチックと思われるものと他の廃棄物に視覚的に選別することから始まります¹¹。

視覚的な選別では、粒子のサイズが第一の限界となります。サイズが小さいほどマイクロプラスチックと干渉粒子の区別が難しくなります^{12,13}。そのため、選別した粒子を、分光分析法や熱分解GC/MS (py-GC/MS) などのプラスチックを正しく同定できる技術を用いて分析することが強く推奨されます。しかしながら、このような方法は効率が悪く、視覚的選別で見逃したマイクロプラスチック粒子を見落としてしまうことがあります。

最近の試験¹⁴では、FT-IRやNIR、ラマンなどの分光分析法をマイクロプラスチックの同定と定量に適用すると、分析の精度が高くなることが示されていますが、迅速で信頼性の高い分析を行うことは実際のところ簡単ではありません。一般に、分光分析法はシングルポイント分析であり時間と労力がかかる手作業を伴います。MCT検出装置を搭載した赤外顕微鏡を用い、ケミカルマッピングを適用した半自動化のフィルター分析試験はごくわずかしが行われておらず^{15,16}、フィルター表面のいくつかの限定された部分のみを分析することが大半なのが実情です。しかしながら、最新の技術では焦点面アレイ (FPA) に基づくイメージング赤外顕微鏡を用いて、直径10 mm超の小フィルターの全表面をスキャンすることが可能となっています¹⁷。この方法では非常に優れた結果が得られ、空間分解能が比較的高く、20 μm程度までのサイズの粒子を検出できますが、FT-IRでは分析対象が10 μmを下回ると回折現象が生じるため、これより小さい微粒子やサブミクロンの微粒子は赤外顕微鏡では分析できません。もう一つの欠点は長い分析時間で、一回の分析に数十時間かかることもあります¹⁸。このような制限を克服するもっとも有望な技術はイメージング顕微ラマンです。この手法は、顕微ラマンの特徴である高い空間分解能と高度なイメージング技術による分析スピードを兼ね備えています。

当ホワイトペーパーでは、標準物質を用いてマイクロプラスチック粒子分析のシミュレーションを行い、実際の環境サンプルの理想的な分析モデルを示します。

実験

材料と方法

3種類の標準物質（74ミクロンでふるい分けした不規則な形状のポリエチレン粒子（Sigma-Aldrich S.r.l.）、37~74ミクロンでふるい分けしたポリスチレン-ジビニルベンゼンPS-DVB（2% DVB - Sigma-Aldrich）、サイズ範囲27~45ミクロンのポリエチレン-二酸化チタンPE-TiO₂マイクロスフェア（白色ポリエチレン、不透明ポリマーマイクロスフェアビーズ：密度1.25 g/cm³ - Cospheric LLC）を用いて、各種粒子サイズのマイクロプラスチック廃棄物をシミュレーションしました。数ミリグラムの各タイプの粒子を水0.5 Lと混合し、直径13 mm、孔径0.8 μmの金被覆ポリカーボネート膜（Whatman™ Nuclepore™ Track-Etched Membrane 800195）でろ過しました。ろ過後、レーザー照射下でフィルターが収縮しないように、ラマン顕微鏡測定前に60℃の炉で2時間乾燥させました。その後、フィルターを2枚の薄いカバーガラス（厚さ180ミクロン）で挟んでさらに平らにし、Thermo Scientific™ DXR™2xiイメージング顕微ラマンを用いて共焦点モードで測定しました。ゴールドフィルターは、ラマンだけでなく赤外顕微鏡測定にも使用できる多用途性があることから選択しました。

ラマン分析

ラマンのデータは、DXR2xiイメージング顕微ラマンと、Thermo Scientific OMNIC™xiラマンイメージングソフトウェアを用いて収集しました。DXR2xiラマン顕微鏡は最大600スペクトル/秒を収集することができ、フィルターの全表面の分析が可能です。この方法では、マイクロサイズにとどまらず、サブミクロン領域での分析を可能とし、さらに分析時間を大幅に短縮できます。イメージング顕微ラマンはこの迅速なイメージング能力によって、大きなエリアの分析を可能にするだけでなく、日々のルーチン分析に実用性と簡便性をもたらします。イメージング用に特化してデザインされたOMNICxiソフトウェアは直観的に使用することができ、多くの解析方法を備えた便利で使いやすいグラフィカルインターフェイスが利用できます。このソフトウェアには強力な分析アルゴリズムも含まれており、膨大なスペクトルデータを説得力のあるイメージング情報にリアルタイムで処理することができます。データ収集時、多変量曲線分解（MCR）技術により、事前情報のない未知の混合物の成分の数、相対濃度、分布を計算します。

ラマンイメージング結果

13 mmのゴールドフィルターには直径10 mmの有効エリアがあり、DXR2xiラマン顕微鏡で容易に撮像することができます。図1Aの赤枠に示すように、10 mm x 10 mmのエリアを選択し、10x対物レンズを用いて有効表面全体をスキャンしました。収集スピードは400 Hz（400スペクトル/秒）、532 nmレーザー、サンプルで測定したレーザー出力10 mW、ピンホールアパーチャ25 μmで、各ポイントで13回露光して収集しました。画像のピクセルサイズは10 μmで、600,000スペクトル以上を収集しました。図1B、C、Dはそれぞれ、ラマンスペクトル画像収集後のフィルター表面上のマイクロプラスチック粒子PE、PS-DVB、PE-TiO₂の分布を示したものです。粒子の同定は、OMNICxiソフトウェア内のライブラリ検索ツールを用いて行いました。

OMNICxiソフトウェアの収集モードでは、関心領域全体に対して1回の露光でデータを収集できるため、画像全体の化学情報を素早く可視化することができます。画質は、同じ収集モードの最初の画像に同一ポイントのスペクトル積算をすることで改善できます。このような特徴により、ユーザーは、データ収集の途中でもピーク高さやピーク面積、ピーク位置、ピーク面積比、ピーク高さ比、MCRなどのさまざまな化学情報を見ることができ、欲しい情報が得られ次第実験を終了することができます。

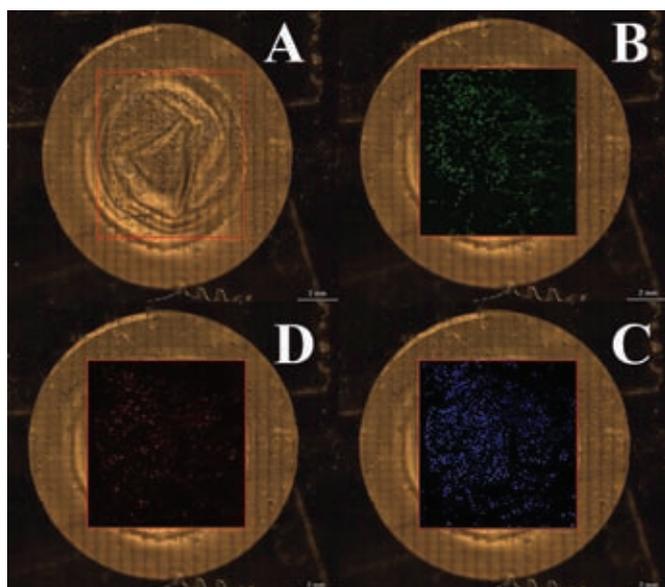


図1: A: ゴールドフィルターの光学画像、B: 緑色で強調した不規則な形状のPE粒子の分布、C: 青色で強調したPS-DVBの分布、D: 赤色で強調したPE-TiO₂マイクロスフェアの分布

3種類の標準マイクロプラスチック粒子物質のスペクトルを図2に示します。これを使用してライブラリを作製しました。内蔵ライブラリを使用して粒子を同定できる、OMNICxiラマンイメージングソフトウェアのライブラリ検索能力を図3に示します。

顕微ラマンには赤外顕微鏡では得られないいくつかのを優位性が備わっています。顕微ラマンは、赤外顕微鏡に比べ空間分解能に優れているだけでなく、50 cm⁻¹までの低波数領域を測定することが可能です。このことは、たとえばプラスチック添加剤の酸化チタン (TiO₂) を同定する上で大変有利です。TiO₂の同定と定量は重要です。近年、TiO₂は複数の試験で毒性の可能性

が示されている上¹⁸、包装材料や、スクラブクリームなどの化粧品、練り歯磨き、その他一般的に広く用いられている製品に多く使用されているからです。赤外顕微鏡に一般的に搭載されている検出器は900 cm⁻¹がカットオフ値であるため、TiO₂の測定には適していません。

MCRアルゴリズムを用いるイメージング分析は、3種類の標準粒子の分布とサイズを計算し、各標準材料を色分けにより見やすくしています。図1は、同定した粒子物質とフィルターの全体像です。図4Bは特定の部分の拡大像で、ラマン分析により微小粒子をどのように同定できるのかを示しています。

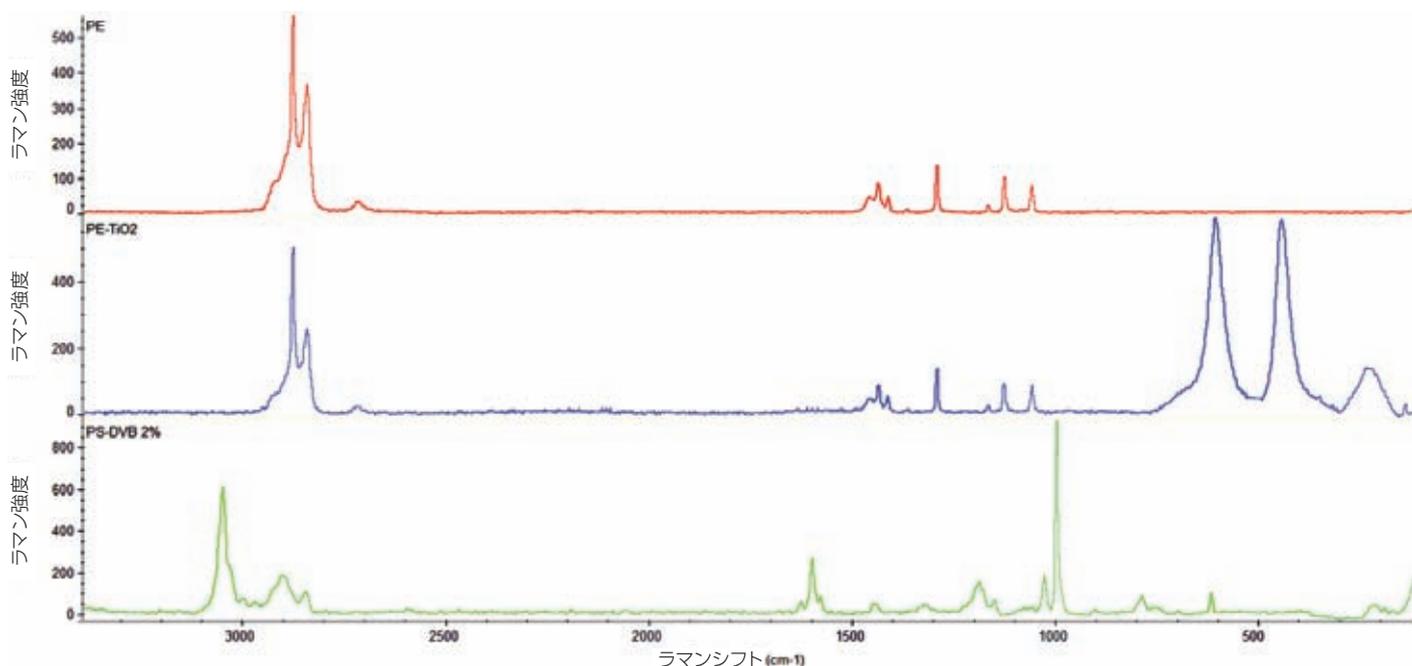


図2: マイクロプラスチック標準のラマンスペクトル: PE - ポリエチレン、PE-TiO₂ ポリエチレン-二酸化チタン、PS-DVB -ポリエチレン-ジビニルベンゼン

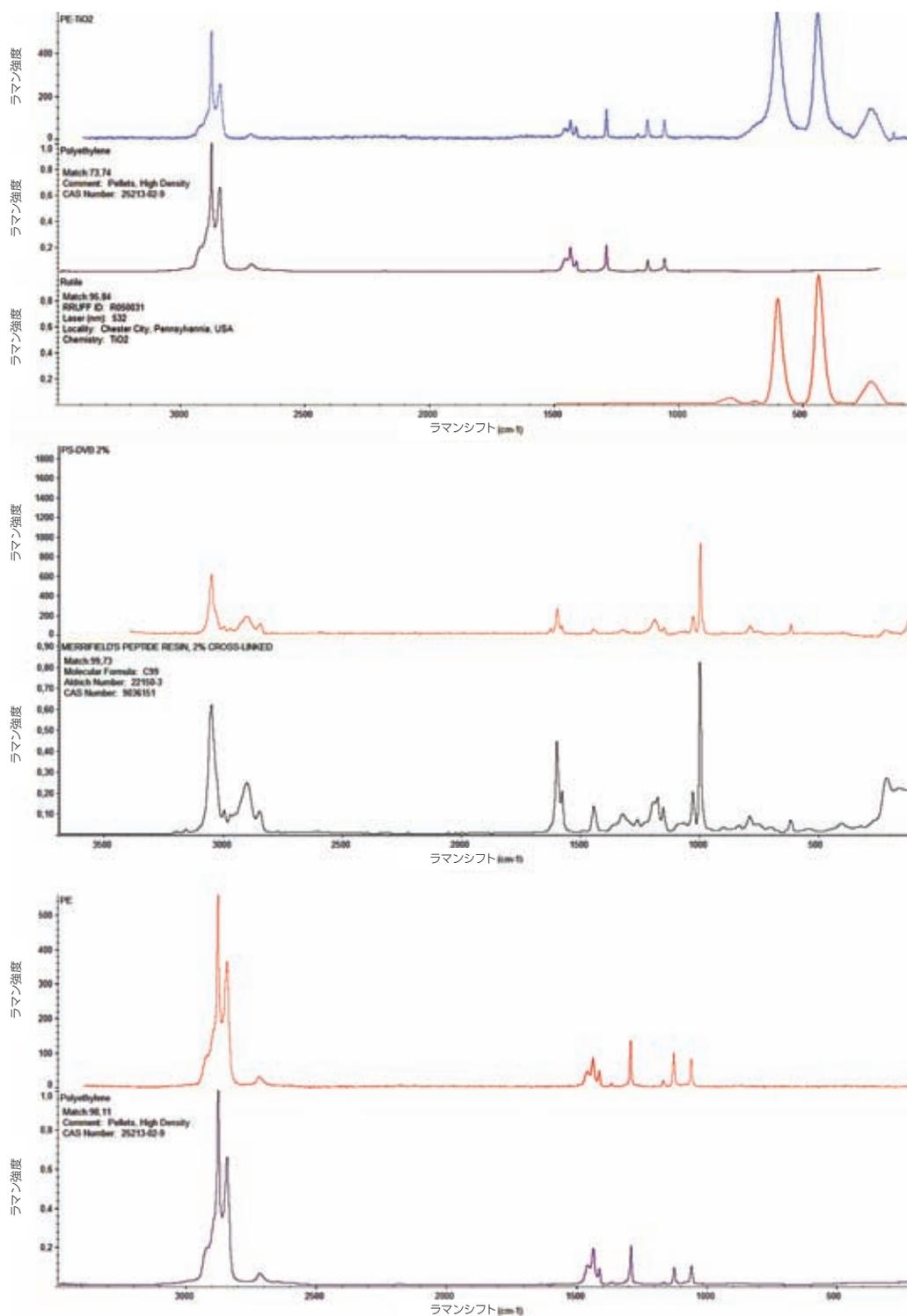


図3: マイクロプラスチック標準のライブラリ検索による未知の粒子の同定



図4: B: 不規則な形状のPE粒子の分布、C: PS-DVBの分布、D: PE-TiO₂微粒子の分布図1の特定の部分を拡大し、10ミクロンピクセルで得られたケミカルイメージの解像度を強調したもの

図5は、3ミクロンというさらに小さなピクセル数で50xの長作動距離の対物レンズを用いて撮影した約1.5 mm×2 mmのイメージング結果です。同じ撮像パラメーターを使用し、各ポイントに対して3回露光し、400,000スペクトル以上を収集しました。画像のピクセル数が小さいと解像度が向上し、図5Dに示すように最小標準PE-TiO₂の最小粒子の円形形状を正確に構築することができます。以前のマッピング技術ではこの粒子はうまく構築することはできませんでした。OMNICxiソフトウェアを使用すると、ユーザーは、ケミカルイメージを光学的画像に重ね合わせて見ることができ、その透明性をコントロールして、画像と化学情報を直接関連付けることができます。

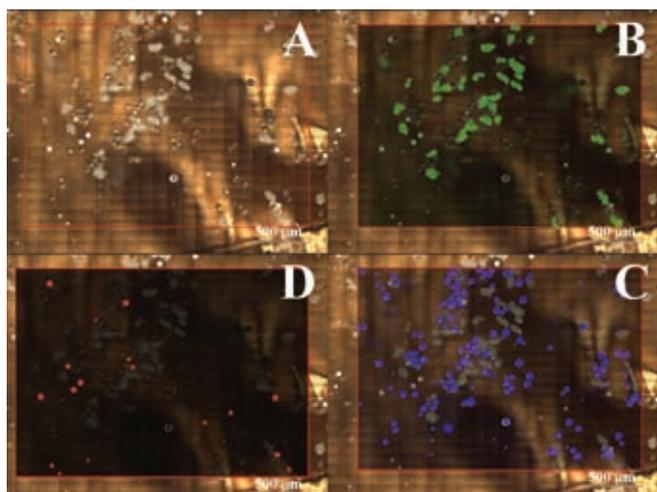


図5：**A**：ゴールドフィルターの光学的イメージ、**B**：緑色で強調した不規則な形状のPE粒子の分布、**C**：青色で強調したPS-DVBの分布、**D**：赤色で強調したPE-TiO₂微粒子の分布。サンプル画像と化学情報を直接関連付けた光学的画像とケミカルイメージ

結論

本ホワイトペーパーでは、イメージング顕微ラマンを用いて微小・極微小のマイクロプラスチック粒子の分析や同定が可能であることを示しました。イメージング顕微ラマンは顕微赤外イメージングの有効な代替法であり、場合によってはさらに多くの情報を提供します。事実、顕微ラマン分光は1 μm以下の粒子を分析することができ、プラスチック物質だけでなく、添加剤として用いられる酸化チタンなどの無機物質も正確に同定することができます。

謝辞

マイクロ粒子標準物質のご提供と充実した化学的議論に対して、National Research Council, Padova Unit (CNR-IDPA, Venice) に謝意を表します。

参考文献

1. PlasticsEurope. Plastics – The Facts 2014/2015. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. http://www.plasticseurope.org/documents/document/20150227150049-final_plastics_the_facts_2014_2015_260215.pdf (accessed July 26, 2015).
2. Barnes, D.K.; Galgani, F.; Thompson, R.C.; Barlaz, M. Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.* **2009**, 364 (1526), 1985-1998.
3. Andrady, A.L. Microplastics in the Marine Environment. *Mar. Pollut. Bull.* **2011**, 62 (8), 1596-1605.
4. Cooper, D.; Corcoran, P.L. Effects of Mechanical and Chemical Processes on the Degradation of Plastic Beach Debris on the Island of Kauai, Hawaii. *Mar. Pollut. Bull.* **2010**, 60 (5), 650-654.
5. Corcoran, P.L.; Biesinger, M.C.; Grifi, M. Plastics and Beaches: A Degrading Relationship. *Mar. Pollut. Bull.* **2009**, 58 (1), 80-84.
6. Moore, C.J. Synthetic Polymers in the Marine Environment: A Rapidly Increasing, Long-Term Threat. *Environ. Res.* **2008**, 108 (2), 131-139.
7. Thompson, R.C.; Olsen, Y.; Mitchell, R.P.; Davis, A.; Rowland, S.J.; John, A.W.G.; McGonigle, D.; Russell, A.E. Lost at Sea: Where is All the Plastic? *Science.* **2004**, 304 (5672), 838.
8. Imhof, H.K.; Schmid, J.; Niessner, R.; Ileva, N.P.; Laforsch, C. A Novel, Highly Efficient Method for the Separation and Quantification of Plastic Particles in Sediments of Aquatic Environments. *Limnol. Oceanogr.: Methods.* **2012**, 10 (7), 524-537.
9. Farrell, P.; Nelson, K. Trophic Level Transfer of Microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environ. Pollut.* **2013**, 177, 1-3.
10. Setälä, O.; Fleming-Lehtinen, V.; Lehtiniemi, M. Ingestion and Transfer of Microplastics in the Planktonic Food Web. *Environ. Pollut.* **2014**, 185, 77-83.
11. Hidalgo-Ruz, V.; Gutow, L.; Thompson, R.C.; Thiel, M. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46 (6), 3060-3075.
12. Dekiff, J.H.; Remy, D.; Klasmeier, J.; Fries, E. Occurrence and Spatial Distribution of Microplastics in Sediments from Norderney. *Environ. Pollut.* **2014**, 186, 248-256.
13. Fries, E.; Dekiff, J.H.; Willmeyer, J.; Nuelle, M.-T.; Ebert, M.; Remy, D.; Identification of Polymer Types and Additives in Marine Microplastic Particles using Pyrolysis-GC/MS and Scanning Electron Microscopy. *Environ. Sci.: Processes Impacts.* **2013**, 15 (10), 1949-1956.
14. Song, Y.K.; Hong, S.H.; Jang, M.; Han, G.M.; Rani, M.; Lee, J.; Shim, W.J. A Comparison of Microscopic and Spectroscopic Identification Methods for Analysis of Microplastics in Environmental Samples. *Mar. Pollut. Bull.* **2015**, 93 (1-2), 202-209.
15. Harrison, J.P.; Ojeda, J.J.; Romero-González, M.E. The Applicability of Reflectance Micro-Fourier-Transform Infrared Spectroscopy for the Detection of Synthetic Microplastics in Marine Sediments. *Sci. Total Environ.* **2012**, 416, 455-463.
16. Vianello, A.; Boldrin, A.; Guerriero, P.; Moschino, V.; Rella, R.; Sturaro, A.; Da Ros, L. Microplastic Particles in Sediments of Lagoon of Venice, Italy: First Observations on Occurrence, Spatial Patterns and Identification. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* **2013**, 130, 54-61.
17. Löder, M.G.J.; Kuczera, M.; Lorenz, C.; Gerdts, G. Focal Plane Array Detector-Based Micro-Fourier-Transform Infrared Imaging for the Analysis of Microplastics in Environmental Samples. *Environ. Chem.* **2015**, 12 (5), 563-581.
18. Shi, H.; Magaye, R.; Castranova, V.; Zhao, J. Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review of Current Toxicological Data. *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, 10 (15), 1-33.

© 2019 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転写を禁じます。 FTIR088_A19020B
ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
ここに記載されている内容は予告なく変更することがあります。
ここに記載されている製品は研究用機器であり、医療機器ではありません。

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

ThermoFisher
SCIENTIFIC