

# 炭素系ナノマテリアルのオフライン分析による環境測定

## — フラーレンと多層カーボンナノチューブ —

小野 真理子<sup>\*1</sup> 鷹屋 光俊<sup>\*1</sup> 芹田 富美雄<sup>\*3</sup>  
篠原 也寸志<sup>\*1</sup> 齊藤 宏之<sup>\*1</sup> 甲田 茂樹<sup>\*2</sup>

作業環境中に浮遊するナノマテリアルの濃度評価法については確立した方法はなく、現状では幾つかの測定法を組み合わせ、使用している製品や取り扱い方法に適した方法を採用するのが通常である。発生源を特定したり発生量や発生する粒子のサイズを見積もるために、リアルタイム計測法は有効である。しかしながら、環境濃度を把握し、曝露量を評価するためには、より定量的な測定法が必要となる。ナノマテリアルは微小で、1個あたりの質量が小さく、質量測定が難しいことから、成分分析が定量的な測定法として期待されている。しかしながら、炭素系のナノマテリアルのフルーレンやカーボンナノチューブは成分が炭素であるために、元素分析による高感度分析が困難な物質である。そこで、本研究では、フルーレンと多層カーボンナノチューブの定量的な測定法を開発することを目的として、それぞれ、分級し捕集を行った粒子について、液体クロマトグラフ/紫外分光法と炭素分析法とを利用して、十分に実用可能な方法を確立し、現場の試料に応用した。

キーワード: フルーレン, ナノチューブ, 環境測定, CNT, EC, 元素状炭素, 炭素分析,

### 1 はじめに

フルーレンおよびカーボンナノチューブ (CNT) は日本が量産を可能にした炭素系ナノマテリアルであり、前者はその抗酸化力と電気的特性により、化粧品や非導電性物質の改質に用いられており、後者はその硬度、堅牢性、電気的特性などにより、二次電池へ応用することによる電池寿命の改善、プラスチックや紙、繊維などに混合することによる非導電性材料の電気的性質の改善など、将来が期待されるナノマテリアルである。

これまで環境に関わる規制の多くは何らかの影響が出た後に、対策を講ずるものであったが、非意図的な生成物では無い場合、近年では新規物質が市場に投入される前に、予防原則の立場から予め毒性評価を行い、何らかの管理方策を準備することが求められている。日本では2009年3月31日に通達の改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第0331013号)が発出された。

工業用ナノ材料を使用する職場の環境測定を行う方法としては、鷹屋らが本誌の研究において使用したりリアルタイム測定装置を使用して粒子を物理的に計測する方法や、電子顕微鏡を用いて観察する方法がある。しかしながら、物理的計測法は空気中に浮遊するどのような粒子にも、形状や化学的性質にかかわらず応答を示すために、一般の空気中に存在する自動車からの排気粒子や光化学反応で生成する粒子と工業用ナノ粒子とを分離して測定することは難しい。電子顕微鏡観察を行えば目的とする工業用ナノ粒子の存在を確認することはできるが、定量的な評価をすることは難しい。そこで、目的とする工業用ナノ粒子に特異的な元素や物質の化学分析を行えば、一般大気中の粒子と分離定量することが可能となる。

化学分析は個数濃度ではなく、質量分析に対応するため個数濃度が一定であれば、粒径が小さくなればなるほど感度は低下するが、同定と定量が同時にできる方法は現状ではオフラインの化学分析しかない。金属系のナノマテリアルについては、比較的高感度な金属分析が使用できるが、炭素系のナノマテリアルについては、炭素分析自体の感度があまり高くないことから高感度分析が困難である。また、大気中に存在するバックグラウンドのナノサイズ粒子は炭素を含有しているために、単純に炭素を分析するだけでは目的とするナノマテリアルを同定できない。そこで、単純な元素分析以外の測定法を導入する必要がある。

フルーレンは有機溶媒に良く溶けることが知られており、例えばC<sub>60</sub>はトルエンに2.9 g/L、ベンゼンに1.5 g/L程度溶解することから、適切な有機溶媒とカラムを選択すれば液体クロマトグラフで炭素数の異なるフルーレンや酸化フルーレンが分離できることが知られており、製品の同定や精製<sup>1)</sup>、フルーレンの曝露実験試料の分析<sup>2)</sup>等に使用されている。同様の方法はフルーレンを取り扱う作業場においても応用可能である。

一方、CNTは水にも溶媒にも溶解しないため、粉体のままで測定できる方法が必要である。ディーゼル排出粒子の指標測定に使用されている炭素分析法は、加熱温度を変えて試料を燃焼させることにより、炭素を結晶構造に応じて大まかに分離することが可能な方法である。炭素分析を用いて多層CNT (MWCNT) の測定を行うことは既に試みられており、主として黒鉛様の炭素からなる元素状炭素 (EC) を用いて動物曝露試験ガスの分析<sup>3)</sup>やMWCNTを取り扱う実験室の環境管理<sup>4)</sup>に使用された例がある。炭素分析法としては労働環境で用いられるNIOSH法<sup>5,6)</sup>と一般環境で用いられるIMPROVE法<sup>7)</sup>の両方が用いられているが、系統的な研究はなされていない。

\*1 環境測定管理研究グループ。

\*2 有害性評価研究グループ。

\*3 (社)日本業環境測定協会 (元 当研究所研究員)

表1 炭素分析に使用した炭素系マテリアル

略称	販売者・提供者等	直径 (nm)	長さ (μm)
MW1	Sigma-Aldrich 659258	110-170	5-9
MW2	東京化成	<20	5-15
MW3	東京化成	20-40	5-15
MW4	東京化成	60-100	5-15
SW	Sigma-Aldrich		
CB	Sigma-Aldrich		
DEP1	NIST SRM 2975*		
DEP2	NIST SRM 1650*		
APM	道路近傍で捕集		

\*SRM2975：フォークリフト，SRM1650：重量車

本研究では、フラーレンには高速液体クロマトグラフ/紫外分光法 (HPLC/UV) を用い、MWCNTには炭素分析法を用いて作業環境分析を行うための基礎的なデータを取得し、作業環境に応用可能な方法を準備した。また、開発した方法を用いて、現場試料への応用も試みたので報告する。

## 2 実験方法

### 1) 試薬

試薬のフラーレン C<sub>60</sub> (純度 99.5%) と C<sub>70</sub> (純度 99%) を精秤し、トルエンに超音波を用いて溶解、ろ過して 1000μg/mL の標準原液を調製した。分析には標準原液を適宜希釈して用いた。フラーレンは酸化しやすいので、標準溶液は酸素に触れにくいよう注意し、調製後ただちに使用した。

炭素分析に用いる炭素系材料を表1にまとめる。市販の試薬・標準品を使用した。MW1はシグマ・アルドリッチ製の試薬である。MW2-4は東京化成製の試薬である。試薬のSWCNT (SW1) とカーボンブラック (CB) はどちらも Sigma-Aldrich 製である。一般大気中に存在して、MWCNT 分析を妨害する可能性のある炭素を含有する粒子の代表として、ディーゼル排出粒子 (DEP) の標準品として市販されている2種を使用した。DEP1はフォークリフトからの排出粒子 (NIST SRM 2975) であり、DEP2は重量車の排出粒子 (NIST SRM 1650) である。また大気中の粒子 (APM) の代表としては、ディーゼル車輛の通行量の多い川崎市池上交差点付近で2004年8月に捕集した試料を用いた。微小粒子 (50% カットオフ空気動力学径が250nm以下) として捕集された粒子である。

### 2) 測定法

(1) フラーレン HPLCの装置はHP1050システム (ヒューレットパッカー社製) を用い、逆相系のカラム Develosil RPFULLERENE (4 mm × 150 mm) (野村化学株式会社)、ガードカラムは Develosil C30-UG-5 (4 mm × 10 mm) (野村化学株式会社) をカラム温度 30℃ で使用した。溶離液はトルエン/アセトニトリル = 70/30 で、流速は 1.0 mL/min とした。検出には UV 検

表2 IMPROVE 920 プロトコル

	Time (sec)	Temperature (°C)	Atmospheric gas
OC1	180	120	He
OC2	180	250	He
OC3	300	450	He
OC4	300	550	He
EC1	360	550	2% O <sub>2</sub> /He
EC2	360	700	2% O <sub>2</sub> /He
EC3	600	920	2% O <sub>2</sub> /He

出器を用い、吸収波長は C<sub>60</sub> のトルエン溶液での最大吸収波長である 335 nm とした。

(2) MWCNT 装置はカーボンモニター (Sunset Laboratory 社製) を使用した。この装置の概略を図1に示す。石英繊維ろ紙に粉体を捕集した試料を 1 × 1 cm 角に切り抜いたものを加熱オープンにセットする。オープンをヘリウム気流下で昇温し試料の有機性炭素 (OC) を揮発させる。次にヘリウムと酸素との混合気流下で昇温し EC を燃焼させる。揮発した有機炭素系ガスは試料オープンの下流にある酸化オープンにおいて触媒により二酸化炭素に酸化される。生成した二酸化炭素は更に下流のメタネーターにおいて触媒によりメタンに還元され、水素炎イオン化検出器 (FID) で炭素量を測定する。通常の本装置の使用方法ではレーザー光による試料の炭化の補正を行うが、本研究では補正が必要な結晶構造が緩い炭素の測定は行わないため、光学補正は行わなかった。昇温と雰囲気ガスを制御するプログラムであるプロトコルは、労働環境でディーゼル排出粒子の環境への寄与を算出する際に用いられる NIOSH 法<sup>5,6)</sup> と、一般環境試料に用いられる IMPROVE 法<sup>7)</sup> を一部変更したものを使用した。実試料の分析に使用したプロトコルを表2に示す。高温でなければ燃焼しない MWCNT があるため、通常は 850℃ の最終ステップを 920℃ まで昇温することとした。

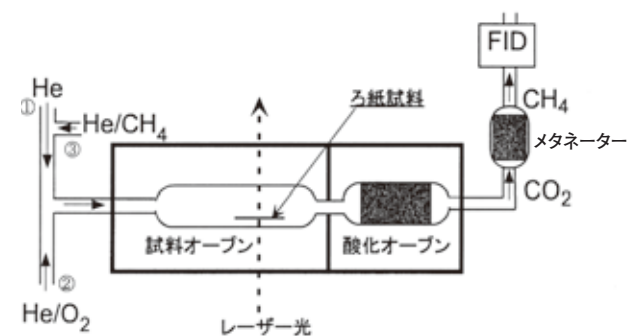


図1 カーボンモニター

### 3) 実試料の捕集

#### (1) フラーレン

フラーレンの捕集は鷹屋らが記述したイデアルスター

社の粉体フラーレン C<sub>60</sub> の処理装置の近傍で行った。捕集には PM<sub>2.5</sub> を、0.25μm 以下、0.25, 0.50, 1.0, 2.5μm 以上（空気動力学相当径、50% カットオフ径）に分級する Sioutas カスケードインパクト（SKC 社製）<sup>8)</sup> を使用し、石英繊維ろ紙（QAT-UP 2500, Pall 社製）に衝突捕集した。流量は 9 L/min である。ブランクの OC を低減するために、ろ紙をあらかじめ 400℃ で 3 時間加熱処理してから使用した。粒子を捕集した石英繊維ろ紙の一部を切り抜き、トルエン 1 mL に投入して超音波処理後、ろ過して試料溶液を調製し、HPLC 分析に供した。

## (2) MWCNT

MWCNT も同じく鷹屋らが記述した作業場と同じ場所で捕集した。捕集にはフラーレンと同様に SCI と石英繊維ろ紙を使用した。炭素分析は前処理を必要としないので、分析の際には捕集試料から一部を切り抜いて使用した。

## 3 結果と考察

### 1) フラーレン

図 2 は注入量 0.02 mg の標準試料を分析した時のクロマトグラムである。HPLC 分析の結果、C<sub>60</sub> は約 5.8 分で、C<sub>70</sub> は約 8.0 分で溶出し、十分な分離が得られた。C<sub>60</sub> の検量線は 0.003-2μg まで良好な直線性を示した。C<sub>60</sub> の定量下限は HPLC への注入量として 0.0023μg であったことから、1m<sup>3</sup> 捕集、1 mL 抽出、10 mL 注入と仮定すると、環境濃度としての定量下限は 0.2μg/m<sup>3</sup> に相当する。

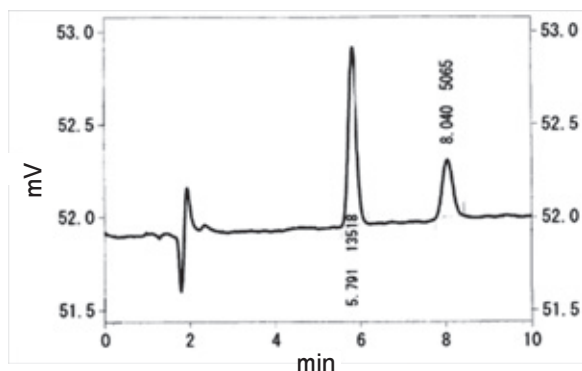


図 2 C<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のクロマトグラム

粒子の捕集に使用するろ紙としては、電子顕微鏡観察用のポリカーボネート、炭素分析にも使用できる石英繊維ろ紙の使用が想定されるが、いずれのろ紙からもトルエンによる回収率はほぼ 100% であり、定量的に回収できる。従って、ろ紙の種類はトルエンに溶けない石英やテフロン製のものが使用できる。

実際の作業環境の試料を分析すると、標準試料の分析時とほぼ同じ保持時間のところにピークが出るため、そのピークをフラーレンとリチウム内包フラーレンと考え、フラーレンの検量線の数値を用いて定量した。質量

分析による同定は行っていない。結果を図 3 に示す。フラーレン濃度はミクロンサイズ粒子において高い濃度となった。電子顕微鏡観察においてもミクロンサイズの粒子が多く観察されていることから、納得の行く結果であると考えられる。金属板に蒸着されたりリチウム内包フラーレンをかき取る作業が主たる発生源であると考え、ミクロンサイズ粒子が中心であることは容易に理解でき、また個数濃度測定の結果とも対応している。フラーレン濃度は SCI 全段の数値から計算すると、2μg/m<sup>3</sup> であった。かき取り作業は約 30 分程度行われたが、作業台近傍でその作業を含む 6 時間の捕集を行った平均値である。作業の行われない時はほぼバックグラウンドの数値で 0 に近い値であると考え、作業時間は捕集時間のほぼ 1 割であるので、作業時の濃度は平均濃度の 10 倍の 20μg/m<sup>3</sup> と推測される。

現状ではフラーレンの曝露限界値は設定されていない。今回の測定値は、例えば炭素系のカーボンブラックで提案されている日本産業衛生学会の許容濃度 4mg/m<sup>3</sup> に比べると低い値ではあるが、フラーレンが作業により発生しているのは明らかであったので、現在では対策がとられている。またフラーレンばかりでなく金属内包フラーレンや酸化フラーレンの毒性評価も定まっていないため、より精密な分離分析が必要であるかどうかは、毒性評価を見て検討することになる。

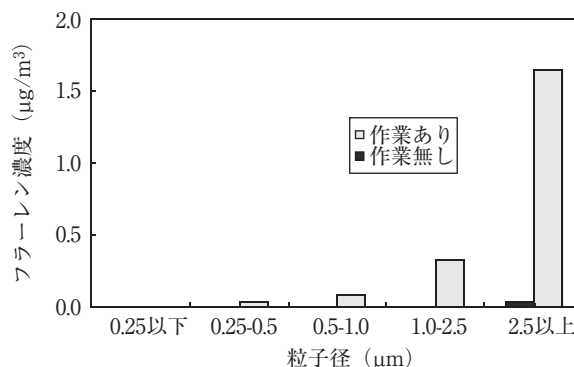


図 3 作業場のフラーレンのHPLC/UVによる測定結果

### 2) MWCNT

(1) 定性の可能性：最初に NIOSH 法により分析を試みた。MWCNT、2 種の DEP、APM は大まかに分類できた。SWCNT は酸素の添加と共に燃焼してしまい、APM や DEP との分離は難しく、NIOSH 法は応用できないと考えられる。次に、APM との分離をより詳細に検討するために、IMPROVE 法により分析した。図 4 に APM、CB、MWCNT を同じ条件で分析した時のサーモグラムを示す。炭素分析の結果を示すチャートをサーモグラムと呼び、加熱オープンの温度と FID 出力を分析開始時からの時間の関数として示している。酸素を添加するまでは OC が検出され、酸素を添加してからは 550℃ で結晶化度の低い炭素（EC1 と呼ぶ）が検出され、700℃ ではグラファイト構造をとる炭素が燃焼する

(EC2) .更に高温で緻密なグラファイト構造からなる炭素が燃焼する (EC3) とされている<sup>9)</sup>. 従って, 緻密なグラファイト構造を持つグラフェンシートが巻いた形になっている MWCNT は EC3 で検出されることが期待される. 図4では, MWCNT のほぼ全てが EC3 で検出され, CB も類似したパターンを示した. 道路端の捕集粒子, APM, では多くの OC と EC2 が検出され, EC3 は微量であった.

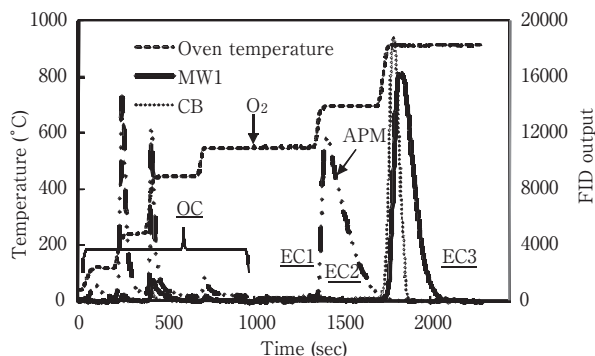


図4 MWCNTと大気中の浮遊粒子状物質のサーモグラム

本研究の目的は大気中の粒子と MWCNT とを分離することであるが, 表2の条件を用いれば, この図のように APM と MWCNT とを分離することができ, EC3 の量を測定することにより MWCNT の定量が可能である. 図には示していないが, 同様に DEP も分離することが可能である. CB (図中点線) は燃焼パターンが MWCNT と似ており, MWCNT と完全な分離はできず, 共存する場合には分別測定が困難である.

(2) MWCNT の定量: 定量的な測定が可能かどうか, 検量線を作成して検討した. MWCNT をジクロロメタンに超音波処理して分散した溶液を, 石英繊維ろ紙上に一定量滴下して乾燥した試料については, EC の検量線の範囲は 80  $\mu\text{g}$  程度まで直線であり, 検量線の傾きは 0.6 程度であった. MWCNT は溶液に分散しにくいので, 単純に有機溶媒に添加しただけでは沈降しやすいので, 回収率が低かったと考えられる. 次に MW1 を精秤してアルミホイルに載せた試料を分析して作成した検量線は炭素濃度が 60  $\mu\text{g}$  程度までの範囲において直線性を示した. 直線の傾きは 1.03 であり, MW1 の純度が 90%であることを考慮すると, EC3 は MWCNT を多めに見積もっているが, 10% 程度の誤差で定量的に分析できていると言える.

以上のことからこの種類の MWCNT は主に EC3 により定量できることが明らかとなった. 標準物質ならば, IMPROVE 法でも, ピークの分離が余り良くない NIOSH 法でも定量できることは既に確認済みである. 本測定の実検出下限は, 1回の測定について, すなわち 1  $\text{cm}^2$  の試料中の EC3 として 0.5  $\mu\text{g}$  であり, 定量下限としては 1  $\mu\text{g}$  程度と言える.

MWCNT の種類によって EC2 と EC3 に出現するピークの比率が異なる. 主として結晶構造が燃焼パターンに

影響を及ぼすものと考えられる. 表1中の MW2-4 について IMPROVE 法で分析したところ, 直径が 10 nm 以下の MW2 は EC2 で燃焼する割合が高く, それよりも太い MW3 と MW4 では殆どが EC3 で観察された. 長さによる影響は無かった. MWCNT については直径の差が層の数に相当するが, SWCNT が極めて燃焼しやすかったことも考慮すると, 主として層の数が燃焼パターンに影響するものと思われるが, 更なる構造解析が必要である.

(3) 実試料の分析: この方法により実際の袋詰め作業を行う作業場で測定した<sup>10)</sup>. ここでの MWCNT は 90% 以上が EC3 として検出されたので, EC3 濃度を MWCNT 濃度と置き換えた. SCI で捕集すると, フラワーレンの時に同様に多くの MWCNT はミクロンサイズ粒子に観察された. この結果は電子顕微鏡観察からも明らかであるが, ミクロンサイズには集合体, サブミクロン粒子には数本の集合体あるいは単独の MWCNT 繊維が観察された. 2.5  $\mu\text{m}$  以上の粒子は吸入性粉じんよりやや大きい, SCI 全段の石英繊維ろ紙に捕集された粒子について EC3 濃度を求めた. 定量下限値はサンプリング時間に依存するが, おおよそ 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  である. 屋外のバックグラウンド濃度は 1-3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  と定量下限以下であった.

手動工程の袋詰め作業場では, 作業が無い時に環境濃度が 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  であり, 微量の MWCNT が定常的に浮遊していることが観察された. 自動袋詰め装置がある作業場の MWCNT 濃度は, 作業が無ければ屋外濃度と同じ 1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  程度であり, 自動化と囲い込みにより施設が清浄化されたと言える.

手動工程の作業時では, 環境濃度は 68  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , 個人ばく露濃度は 63  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  と, ほぼ同程度で, 作業がないときの6倍程度だった. 自動袋詰め装置による作業では, 作業者は普段装置のある部屋には立ち入らない. 手動工程との比較のために自動袋詰め装置近傍の環境濃度を測定したところ, 27  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  で, 手動工程作業場の4割程度まで濃度が低下した. 囲い込んではいないが, 必要に応じて開放されるためと考えられる. 作業者は装置の清浄な隣室で作業をしていたため, 個人ばく露濃度は 9  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  と定量下限程度であった.

本法は MWCNT の環境中の濃度測定に使用できること, 作業環境管理の改善の程度を定量的に評価するために使用できること, が明らかとなった.

#### 4 今後の課題

現状の課題としては, フラワーレンについては, 酸化フラワーレンや他の処理したフラワーレンとをどの程度分けて評価していくかと言うところに課題がある. MWCNT については細かいもの, 結晶構造が緩いものは EC2 で燃焼するが, 大気に多い EC2 とどのように分離するかを検討する必要がある.

今後は毒性研究の進展に合わせて, 必要に応じて分析方法を改良することが重要になる.

また、製造現場とナノ粒子製品を取り扱う現場では共存する物質が異なるため、分析法はその都度最適となる様に検討する必要があるが、より多くの現場測定を行うことより、本測定法の応用範囲を広くすることが可能となる。

## 5 まとめ

炭素系ナノマテリアルの測定法を開発し、実用レベルの方法であることを確認した。現在のところナノマテリアル管理に関しては毒性研究に基づく曝露限界濃度が示されていないために、管理の程度を設定できない難しさはあるが、本法を用いて管理方策の効果を評価することが可能である。酸化チタンでは米国 NIOSH により、ナノマテリアルに関しては曝露限界濃度はミクロンサイズの 1/15 が提案されており、他のナノマテリアルについても例えば MWCNT で数百  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  が提案される可能性がある<sup>11)</sup>。本研究のフルラーレンと MWCNT の測定方法はいずれも 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  の定量は可能であり、その 1/10 まで十分に定量できることを明らかにした。

## 参 考 文 献

- Heymann D, Chibante LPF and Smally RE. Determination of C60 and C70 fullerenes in geologic materials by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1995; **689**: 157-163.
- Xia XR, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Trace analysis of fullerenes in biological samples by simplified liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography. *J chromatogr A*. 2006; **1129**: 216-222.
- Myojo T, Oyabu T, Nishi K, Kadoya C, Tanaka I, Ono-Ogasawara M, et al. Aerosol generation and measurement of multi-wall carbon nanotubes. *J Nanoparticle Res*. 2009; **11**: 91-99.
- Han JH, Lee EJ, Lee JH, So KP, Lee YH, Bae GN, et al., Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. *Inhal Toxicol* .2008; **20**: 741-749.
- Birch ME, Cary RA. Elemental carbon-based method for monitoring occupational exposures to particulate diesel exhaust. *Aerosol. Sci. Technol*. 1996; **25**: 221-241.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) Schlecht, PC and O'Connor, PF (eds) (1994) Method 5040. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM) , 4th ed., U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention , Cincinnati, Ohio - DHHS (NIOSH) Pub. 94-113.
- Chow JC, Watson JG, Pritchett LC et al. The DRI thermal/optical reflectance carbon analysis system. *Atmos. Environ*. 1993; **27A**:1185-1201.
- Misra C, Singh M, Shen S, Sioutas C and Hall PM. Development and evaluation of a personal cascade impactor sampler (PCIS) . *J. Aerosol Sci*. 2002; **33**: 1027-47.
- Han YM, Cao JJ, Lee SC, Ho KF and An ZS. Different characteristics of char and soot in the atmosphere and their ratio as an indicator for source identification in Xi'an, China. *Atmos Chem Phys*. 2010; **10**: 595-607.
- Takaya M, Serita F, Ono-Ogasawara M, Shinohara Y, Saito H and Koda S. Airborne particles in a multi-wall carbon nanotube production plant: Observation of particle emission and personal exposure 1: Measurement in the packing Process. *Sangyo Eiseigaku Zasshi*, 2010; **52**: 182-188. (in Japanese)
- Kobayashi N, Ogura I, Gamo M, Kishimoto A. and Nakanishi J. Executive summaries of interim reports on risk assessments of three manufactured nanomaterials: Carbon nanotubes (CNTs) , (issued on October 16, 2009) : The Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) , Tsukuba.

(平成 22 年 9 月 16 日受理)