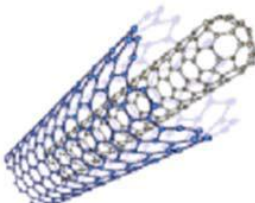


カーボンナノチューブ（多層カーボンナノチューブ：MWCNT）
の測定・分析手法に関する検討結果報告書

1. はじめに

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の物理化学的性状を示した¹⁾ (表 1)。

表 1 MWCNT の物理化学的性状

CAS No.	308068-56-6 (カーボンナノチューブとして)	
メーカー、型式	保土谷化学工業 (株)、MWNT-7	
用途	・半導体用導電性樹脂 ・HDD 搬送用ポリカーボネイトトレイ(MWCNT を含有) ・航空機、車両の補強材料 ・高級車のアンテナ部(MWCNT を配合したシリコーンゴム製コネクタ部品) ・ハイブリッド車や電気自動車のリチウムイオン二次電池の電極添加剤	
構造式		
形状	炭素による六員環ネットワーク構造を持ち、多層の同軸管状の繊維状型 (ストレートタイプ) を呈する。	
純度	99.8 %(保土谷化学工業 (株) 検査成績データ)	
外観、性状	黒色、固体	
比表面積	23.0 m ² /g	
物性	比重	真比重 : 2.1 g/cm ³ かさ比重 : 0.005-0.01 g/cm ³
	沸点	-
	融点	-
	蒸気圧	-
許容濃度等	NIOSH	2010年11月にカーボンナノチューブとカーボンナノファイバーについて 8 時間時間加重平均(TWA)の Recommended Exposure Limit (REL)を 0.007mg/m ³ (炭素として)と提案し、パブリックコメントを求めているが、2013 年 3 月にこの REL を 0.001mg/m ³ (炭素として)と修正する提案を行い、その改訂として以下の文書を発表した。
	AIST	0.03mg/m ³

気中濃度として、NIOSH の 0.001mg/m³ の 1/3 からその 5 倍の範囲における捕集および分析方法について検討を行った。

2. 文献調査

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Method 5040 Issue 3 (Interim)

Elemental Carbon (Diesel Exhaust). In: NIOSH Manual of Analytical Methods. Cincinnati: NIOSH, 1999.

鷹屋光俊, 芹田富美雄, 小野真理子, 篠原也寸志, 齊藤宏之, 甲田茂樹, 多層カーボンナノチューブ製造工場における気中粒子の測定及び炭素分析 一袋詰め作業一、産業衛生学雑誌 2010, 52, 182

3. 捕集および分析条件

動物用の大型チャンバー(10m³)を使用し、2.0 mg/m³の濃度で MWCNT (保土谷化学工業 (株) の MWNT-7) を発生させたチャンバー内のエアロゾルを、セルロース混合エステル製メンブレンフィルターを保持したホルダー及びサイクロンアダプター(導電性プラスチック: SKC 社製及びアルミ材質: 柴田科学社製)を用いてダイレクト捕集(全粒子を捕集)とサイクロン捕集(4 μm 50%カット捕集)でそれぞれ 2.75L/min で 5 分間ずつサンプリングしたフィルターを用いて脱着率の検討を行った(n=5)。また、同様の方法で発生させた 0.2 mg/m³の濃度については、導電性プラスチックホルダーでのみ MWCNT の捕集を行い検討した。MWCNT を採取したフィルターは超音波下 Clean 99-K200^Rにより抽出し、遠心分離して上澄み液を除去し、0.1% Tween 80 と 9.6% PBS の混合溶液(TW-mixture)で洗浄後、濃硫酸によりフィルター残渣を分解した。その試料に TW-mixture を加え、マーカのアセトニトリル溶液を添加し 15 分間攪拌した。その溶液を 0.8 μm Nuclepore フィルターでろ過し、アセトニトリルを加え攪拌し、さらに 0.45 μm Millex フィルターでろ過して HPLC で測定した。HPLC の分析条件は、機器: Acquity UPLC system(日本ウオータース)、カラム: Acquity BEH C18 1.7 μm 100mm × 2.1 mm I.D.、移動相組成: アセトニトリル: メタノール: ミリ Q=75:20:5、流量 0.5mL/min、検出器: ケイ光検出器(励起 294 nm、ケイ光 410 nm)

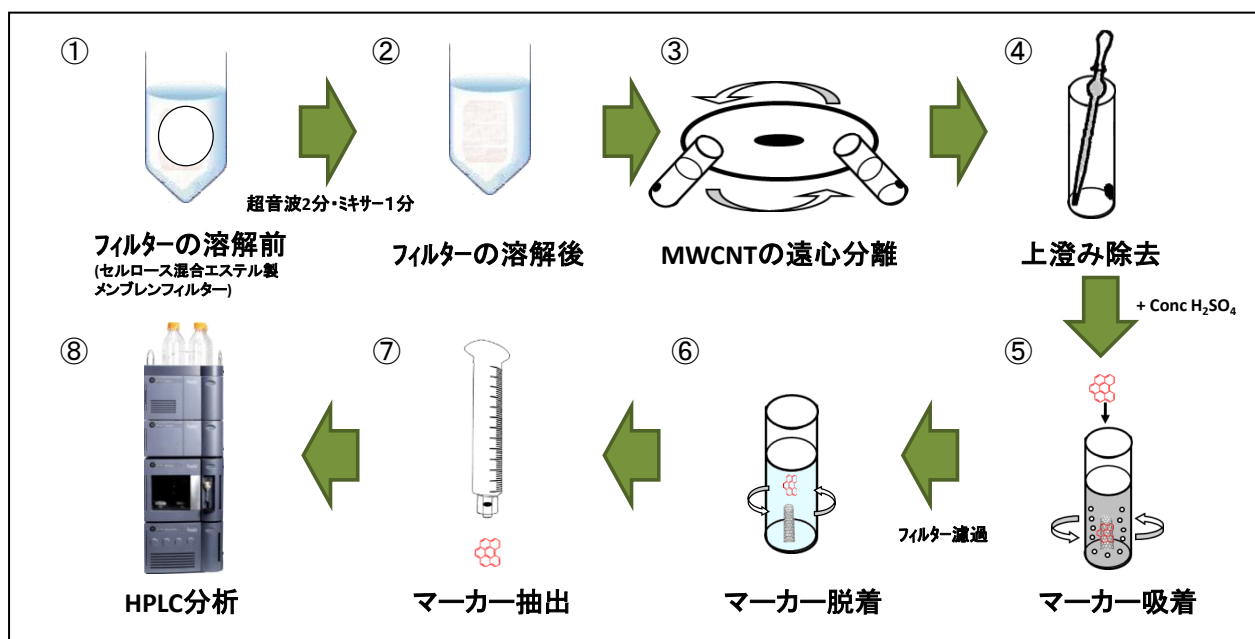


図1 MWCNT の分析手順

4. ブランク

脱着溶媒および捕集フィルターのブランク中のマーカの確認を行ったところ、Benzo[ghi]Perylene (B(ghi)P)のピークは認められなかった。

5. 破過

フィルターを用いて捕集するため、「破過」の評価は行わなかった。

6. 脱着率

脱着率は、MWCNT の 2.0 mg/m^3 の濃度を 5 分間捕集した結果、導電性プラスチックホルダーのダイレクト捕集では 2.04 mg/m^3 (脱着率：102%)、導電性プラスチック製のホルダー＋サイクロンアダプター捕集では、 1.03 mg/m^3 、アルミ製ホルダーのダイレクト捕集では、 2.02 mg/m^3 (脱着率：102%)、アルミ製のサイクロン捕集では 1.06 mg/m^3 であった (表 2 参照)。また、導電性材質のサンプラーで MWCNT の 0.2 mg/m^3 の濃度を 5 分間捕集した結果、ダイレクト捕集では 0.20 mg/m^3 (脱着率：100%)、サイクロン捕集では、 0.11 mg/m^3 であった (表 3 参照)。以上のことより、分粒特性が $4 \mu\text{m}$ 50%カットでのサイクロン捕集は、全粒子を捕集するダイレクト捕集の約半分の捕集濃度となった。従って、ダイレクト捕集では、チャンバー内の MWCNT の設定濃度を反映した結果であり、捕集フィルターから MWCNT の脱着率はほぼ 100%であった。

表 2 MWCNT の定量結果：重量法によるチャンバー内濃度： 2.0 mg/m^3

導電性プラスチック製 (n=5)	アルミ製(n=5)
ダイレクト捕集： 2.04 mg/m^3 (脱着率=102%)	ダイレクト捕集： 2.02 mg/m^3 (脱着率=101%)
サイクロン捕集： 1.03 mg/m^3	サイクロン捕集： 1.06 mg/m^3

表 3 MWCNT の定量結果：重量法によるチャンバー内濃度： 0.2 mg/m^3

導電性プラスチック製 (n=5)
ダイレクト捕集： 0.20 mg/m^3 (脱着率=100%)
サイクロン捕集： 0.11 mg/m^3

7. クロマトグラム

標準液のクロマトグラムの例を図 2 に示す。

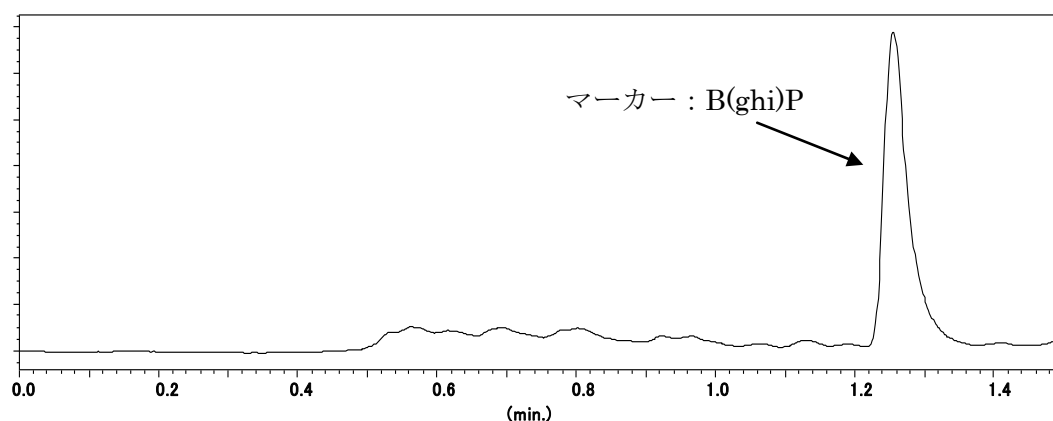


図 2 MWCNT に吸脱着を行ったマーカーである B(ghi)P のクロマトグラム

8. 検量線

標準試料を C99 で希釈、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 $1.0 \mu\text{g/mL}$ の 5 段階の標準系列を調製し、検量線の直線性について確認を行った。その結果、良好な直線性が得られた (図 3)。

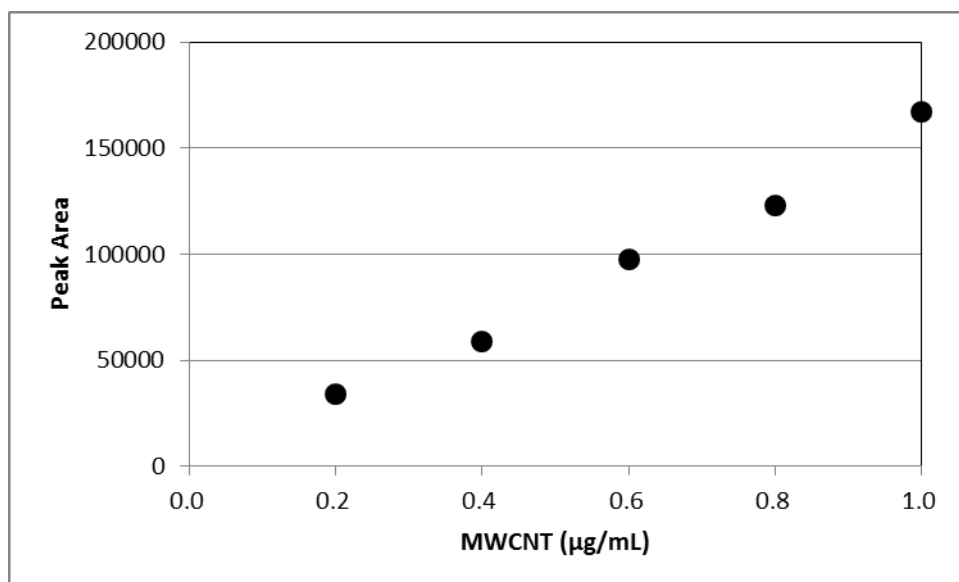


図3 MWCNT の検量線

9. 定量下限

検量線作成で調製した標準溶液の最低濃度 $0.2 \mu\text{g/mL}$ (2.75L/min で 4 時間測定した場合 ; 気中濃度 0.0003mg/m^3 、NIOSH の 0.001mg/m^3 の 1/3 に相当) を 5 サンプル分析し、その標準偏差 (SD) を算出(2890)した。得られた標準偏差から検量線を用い、次式より定量下限を求めた。

$$\text{定量下限} (\mu\text{g/mL}) = 10\text{SD} / a$$

※ a は検量線の傾き(165000)

その結果、定量下限は表 4 に示すとおりとなった。定量下限値より求められる気中濃度は 660L 採気で 0.0003mg/m^3 となり、NIOSH : 0.001mg/m^3 の 1/3 となる。

表 4 定量下限

	定量下限(10SD)
溶液濃度($\mu\text{g/mL}$)	0.18
660L 採気時の気中濃度(mg/m^3)	0.0003

10. 添加回収率

6. の脱着率の実験操作と同様に、フィルターに標準溶液を $1 \mu\text{g}$ の添加量となるように添加し、4mL の C99 を加え 1 分間超音波(強度 5)を行った。1mL を 12000rpm で遠心分離し、溶液部分をすべて除去した。0.1% Tween 80 と 9.6% PBS の混合溶液(TW-mixture)で洗浄後、濃硫酸によりフィルター残渣を分解した。その試料に TW-mixture を加え、マーカのアセトニトリル溶液を添加し 15 分間攪拌した。その溶液を $0.8 \mu\text{m}$ Nuclepore フィルターでろ過し、アセトニトリルを加え攪拌し、さらに $0.45 \mu\text{m}$ Millex フィルターでろ過して HPLC で測定を行い、フィルターを入れないものとの比較により MWCNT の回収率を求めた。検体 1 個当たりの最終的な総回収率にはばらつきがなく良好な回収率を得た (表 5)。

表 5 添加回収率

設定濃度	測定濃度	回収率(%)	変動係数(%)
1.0 μ g/mL	0.96 μ g/mL	96%	4.3%

(n=5)

1 1. 保存性

メーカーの「安全データシート」により、安定であることが保証されており、保存性についての確認は特に行わなかった。

1 2. まとめ

本検討の結果、MWCNT を低濃度まで良好に測定・分析できることが確認できた。また、カーボンブラック、都市大気粉塵（北京）との共存においてもそれらの影響を受けることなくMWCNTの分析が可能であった。ただし、MWCNTの表面コーティングや樹脂等への加工の無い状態である必要がある。また、本年度検討した以外のMWCNTについて、継続して検討を行う。

以上の検討結果をMWCNTの標準測定分析法として別紙にまとめた。

1 3. 参考文献

Makoto Ohnishi, Hirofumi Yajima, Tatsuya Kasai, Yumi Umeda, Masahiro Yamamoto, Seigo Yamamoto, Hirokazu Okuda, Masaaki Suzuki, Tomoshi Nishizawa, Shoji Fukushima. Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. Journal of Occupational Medicine and Toxicology, 2013, 8: 30

Tatsuya Kasai, Kaoru Gotoh, Tomoshi Nishizawa, Toshiaki Sasaki, Taku Katagiri, Yumi Umeda, Tadao Toya, Shoji Fukushima. Development of a new multi-walled carbon nanotube (MWCNT) aerosol generation and exposure system and confirmation of suitability for conducting a single-exposure inhalation study of MWCNT in rats. Nanotoxicology, 2014, 8: 169-178

(別紙) カーボンナノチューブ (多層カーボンナノチューブ) 標準測定分析法

化学式:— 分子量:— CASNo.: 308068-56-6	
許容濃度等: 2010 年 11 月にカーボンナノチューブとカーボンナノファイバーについて 8 時間時間加重平均 (TWA) の Recommended Exposure Limit (REL) を $7\mu\text{g}/\text{m}^3$ (炭素として) と提案し、パブリックコメントを求めているが、2013 年 3 月にこの REL を $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ (炭素として) と修正する提案を行い、その改訂として以下の文書を発表した。	物性等 沸点:—、融点:—、蒸気圧:— 形状: 炭素による六員環ネットワーク構造を持ち、多層の同軸管状の繊維状型 (ストレートタイプ) を呈する。
別名: MWCNT	
サンプリング	分析
サンプラー: 導電性サイクロンサンプラー 分粒特性: $4\mu\text{m}$ 50%カットでのサイクロン捕集 フィルターはセルロース混合エステル製メンブレ ンフィルターを用いる。 サンプリング流量: $2.75\text{L}/\text{min}$ サンプリング時間: 4 時間 (660L) 保存性: メーカーの「安全データシート」により、 安定であることが保証されている。	分析方法: HPLC 分析法 機器: 日本ウォーターズ [®] Acquity UPLC system 分析条件: 検出器: ケイ光検出器 (励起 294 nm、蛍光 410 nm)、カラム: Acquity BEH C18 $1.7\mu\text{m}$ 100mm $\times$ 2.1 mm I.D.、移動相: アセトニトリル: メタノール: ミリ Q=75:20:5、流量: $0.5\text{mL}/\text{min}$ 検量線: $0.20\text{--}1.00\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で直線性が得られている。 定量法: マーカー添加法 フィルターに 4mL の Clean 99-K200R を加 え 1 分間超音波 (強度 5) を行った。フィルタ ーがほぼ溶解した溶液を攪拌後、1mL を 12000rpm で遠心分離し、溶液部分をすべ て除去し、0.1% Tween 80 と 9.6% PBS の 混合溶液 (TW-mixture) で洗浄後、濃硫酸に よりフィルター残渣を分解した。その試料 に TW-mixture を加え、マーカーのアセト ニトリル溶液を添加し 15 分間攪拌した。そ の溶液を $0.8\mu\text{m}$ Nuclepore フィルターで ろ過し、アセトニトリルを加え攪拌し、さ らに $0.45\mu\text{m}$ Millex フィルターでろ過して HPLC で測定を行った。
精度	
脱着率; 設定濃度: $2\text{mg}/\text{m}^3$ - 導電性プラスチック製 (5 分間捕集) ダイレクト捕集: $2.04\text{mg}/\text{m}^3$ (脱着率=102%) サイクロン捕集: $1.03\text{mg}/\text{m}^3$ - アルミ製 (5 分間捕集) ダイレクト捕集: $2.02\text{mg}/\text{m}^3$ (脱着率=101%) サイクロン捕集: $1.06\text{mg}/\text{m}^3$ 設定濃度: $0.2\text{mg}/\text{m}^3$ - 導電性プラスチック製 (5 分間捕集) ダイレクト捕集: $0.20\text{mg}/\text{m}^3$ (脱着率=100%) サイクロン捕集: $0.11\text{mg}/\text{m}^3$ 回収率; 添加量: $1.0\mu\text{g}$ (溶液 1mL 当り) 測定濃度: $0.96\mu\text{g}/\text{mL}$ 回収率: 96% 定量下限 (10σ) $0.18\mu\text{g}/\text{mL}$ $0.0003\text{mg}/\text{m}^3$ (採気量; 660L) (検出下限はマーカーを用いるため算出しなかった)	
適用: 保土谷化学工業 (株) の MWNT-7 について捕集/分析法を確認した。この他の MWCNT については、予め対象の MWCNT を入手して分析可能かの検討をする必要がある。なお、本手法が適用となる MWCNT は、表面コーティングや樹脂等への加工の無い状態の MWCNT である。	
妨害: カーボンブラック、都市大気粉塵 (北京) との共存においてもそれらの影響を受けることなく分析が可能であった。	

Makoto Ohnishi, Hirofumi Yajima, Tatsuya Kasai, Yumi Umeda, Masahiro Yamamoto, Seigo Yamamoto, Hirokazu Okuda, Masaaki Suzuki, Tomoshi Nishizawa, Shoji Fukushima. Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. Journal of Occupational Medicine and Toxicology, 2013, 8: 30

Tatsuya Kasai, Kaoru Gotoh, Tomoshi Nishizawa, Toshiaki Sasaki, Taku Katagiri, Yumi Umeda, Tadao Toya, Shoji Fukushima. Development of a new multi-walled carbon nanotube (MWCNT) aerosol generation and exposure system and confirmation of suitability for conducting a single-exposure inhalation study of MWCNT in rats. Nanotoxicology, 2014, 8: 169-178