

作業環境中カーボンブラック(告示番号 152)の高速液体クロマト
グラフ(HPLC)による測定・分析手法に関する検討結果報告書

1. はじめに

カーボンブラックの物理化学的性状を示す¹⁾ (表 1)。

表 1 カーボンブラック(カーボンブラック)の物理化学的性状

CAS No.	1333-86-4 (カーボンブラックとして)	
メーカー、種類、製法	<p>製法の相違によりファーネスブラック、チャンネルブラック、サーマルランプブラックに区別され、原料の相違でガスブラック、オイルブラック、アセチレンブラックなどがある。</p> <p>製造業者として旭カーボン、キャボットジャパン、デンカ、東海カーボン、三菱ケミカル、日鉄カーボンがある。</p> <p>(出典:16918の化学商品2018年版化学工業日報社)</p>	
用途	<ul style="list-style-type: none"> ・ ゴム補強材(ベルト、ホース等材料、タイヤ、自動車部品、電気部品) ・ 黒色着色剤(黒色インキ、印刷物、黒色塗料、構造体着色、樹脂混練物、電気製品ケース) ・ 導電付与材(I Cトレイ、電子部品、高温保温材) 	
構造式		
形状	<p>上層の黒鉛構造を有し、表面積が大きい。粒径は 300 nm 程度及びそれより小さい粒子でアグリゲートを最小単位とする構造体である。表面は炭素二重結合で発生するπ電子に覆われている。</p>	
純度	炭素 99%以上 (乱層黒鉛構造)	
外観、性状	黒色、固体 (粉～造粒体)	
比表面積	35～150 m ² /g	
物性	密度	粒子密度：1.7～1.9g/cm ³ かさ密度：0.02～0.18 g/cm ³
	沸点	-
	融点	-
	蒸気圧	-
許容濃度等 (カーボンブラック)	日本産業衛生学会	第2種粉塵 吸入性粉塵：1 mg/m ³ 、総粉塵：4 mg/m ³
	ACGIH	3 mg/m ³
	NIOSH	3.5 mg/m ³ 1 mg PAHs/ m ³ : PAH が存在する場合
	OSHA	3.5 mg/m ³
	UK	3.5 mg/m ³

2. 文献調査

1) IARC (1996). Printing processes and printing inks, carbon black and some nitro compounds. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 65:1-578.

2) 16918 の化学商品 2018 年版 化学工業日報社

3. 捕集および分析条件

1) 捕集条件

総粉塵の場合は捕集器の入口における流速を 50 ~ 80 cm/sec とし、捕集した粉塵を総粉塵(日本産業衛生学会)とし、吸入性粉塵は空気動学的粒子径 4.0 μ m(4.0 μ m50%カット) (ISO,ACGIH) で分粒し捕集した粉塵とする。なお、吸引性粉塵の場合は IOM サンプラー (2.0l/分) で捕集したカーボンブラック粒子とする。

捕集フィルターはメンブレンフィルターとし、試料採取後のフィルターはシャーレに入れ、デシケーター内で常温保存する。

2) 分析条件

環境気中濃度として、日本粉体工業技術協会:JIS試験用粉体(平均粒子径約80nm, 製法:サーマル法)を用いて日本産業衛生学会の勧告する吸入性粉じん1mg/m³を二次評価値 (E) として1/1000Eより2Eの範囲における濃度を満足する捕集および分析方法を目標として検討を開始したが液体高速クロマトグラフ分析法の蛍光分析を行うために高濃度試料の分析は機器の汚染等のために回避する必要がある。そのため、カーボンブラック検量線の範囲を0.2 μ g/ml~1.0 μ g/アセトニトリルmlとし、高濃度試料については希釈して検量線内で分析することを前提として分析条件を決定した。

① 測定機器

天秤 : ミクロ天秤(メトラー・トレドXP26V)

HPLC : Acquity UPLC system(日本ウォーターズ)

カラム : Acquity BEH C18(日本ウォーターズ) 1.7 μ m 100mm \times 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 水=75 : 20 : 5、流量 0.5mL/min

検出器 : ケイ光検出器(励起波長 294 nm、ケイ光波長 410 nm)

② カーボンブラック分析手順 (フィルターサンプリング試料)

フィルターにサンプリングしたカーボンブラック濃度分析手順を図1に示す。

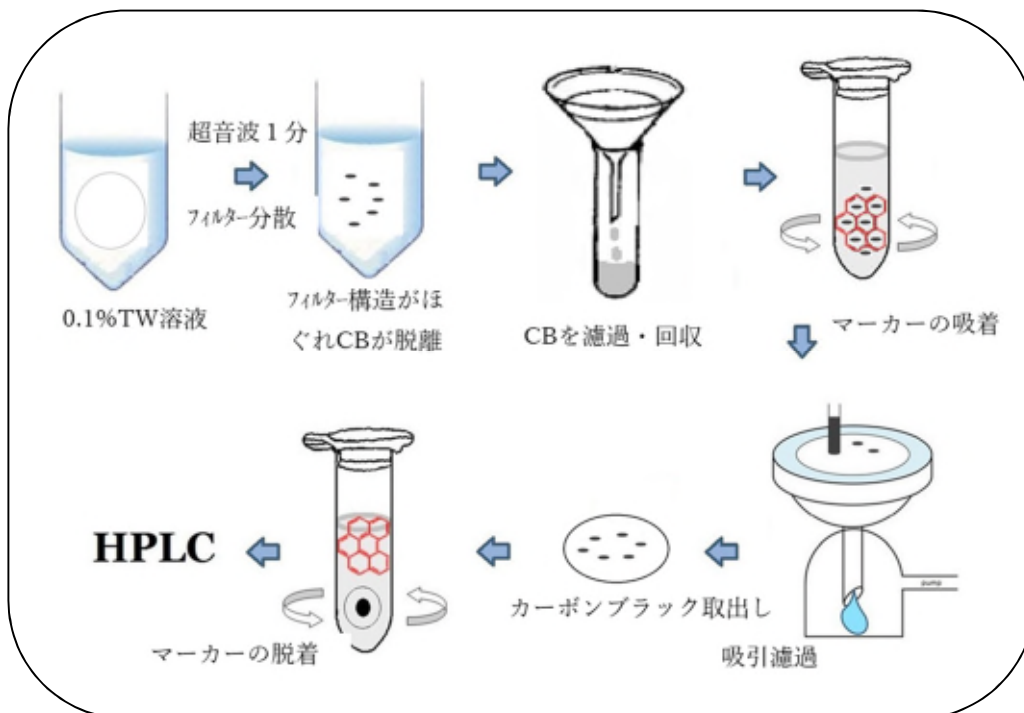


図1 カーボンブラック分析手順

〈分析手順〉

カーボンブラック捕集後のフィルターを試料がこぼれ落ちないように内側に折り込みポリプロピレン試験管(PP 試験管)に挿入する。

0.1%Tween 溶液を 3 mL 入れ、超音波振動(20 kHz, 300 W)を 1 分間×2 回行い、フィルターからカーボンブラックを脱離させる。

続いて超音波振動後の溶液をペーパー濾紙 No.5A で濾過し、フィルター残渣を除去してカーボンブラック濃縮懸濁液を得る。

濃縮液のカーボンブラック濃度が 0.2~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように 0.1%Tween 溶液で希釈する(カーボンブラックの 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液は、溶液からカーボンブラック特有の黒色が認められない濃度である)。

これにマーカである Benzo[ghi]perylene 溶液 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液) を 20 μL 添加し 15 分間攪拌した後、スポイト等でろ液を採取して pore size 0.2 μm のニュークリポアメンブレンフィルター上の一点に滴下してろ過する。

続いてろ過してマーカが吸着したニュークリポアメンブレンフィルターの範囲をポンチで打ち抜き、カーボンブラックが付着した打ち抜きろ紙をポリプロピレン試験管に回収する。

その後、回収カーボンブラック打ち抜きろ紙にアセトニトリル溶液 (1ml) を添加し、手で約 10 秒程度攪拌してマーカを脱着し、シリンジフィルターユニット Millex-GV(0.22 μm)ろ紙を用いてろ過したアセトニトリルろ液を最終試料液として HPLC 用のポリプロピレン容器に回収する。

回収した最終試料液は、HPLC によりカーボンブラックマーカの Benzo[ghi]perylene の面積値を求め、そこからカーボンブラック質量(絶対値)を求めて、採気量よりカーボンブラック質量濃度 (mg/m^3)とする。

なお、試料検体で検量線の範囲を超えた場合は、検量線範囲に希釈して濃度を求める。

4. 検量線

カーボンブラック標準試料として日本粉体工業技術協会 JIS 試験用粉体(平均粒子径約 80nm, 製法:サーマル法)を、マイクロ天秤(メトラー・トレド XP26V)を用いて 100 μg 秤量分取し、0.1%Tween 水溶液 10 mL にてメスアップ(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)し、超音波振動(20 kHz, 300 W)を 1 分間行ってカーボンブラックを 0.1%Tween 水溶液中に分散させて標準原液を調整する。

続いて、0.1%Tween 水溶液により希釈し、カーボンブラック 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 5 段階の標準系列を調製し、マーカである Benzo[ghi]perylene 溶液 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液) を各 20 μL 添加し 15 分間攪拌した後、カーボンブラック濃度と Benzo[ghi]perylene 面積の検量線を作成し直線性について確認を行った。

その結果、相関係数は 0.9995(傾き:394857、切片:82140)となり、検量線の直線性が認められた(図 2、表 2)。

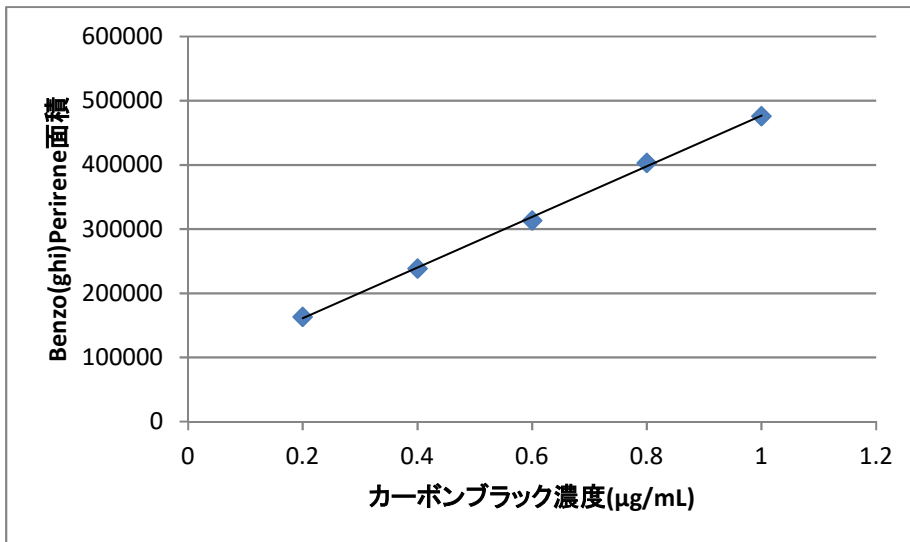


図2 検量線

表2 検量線の直線性

メーカー	形式	相関係数
日本粉体工業技術協会	JIS 試験用粉体	0.9995

また、Benzo[ghi]perylene クロマトグラムを図3に示す。

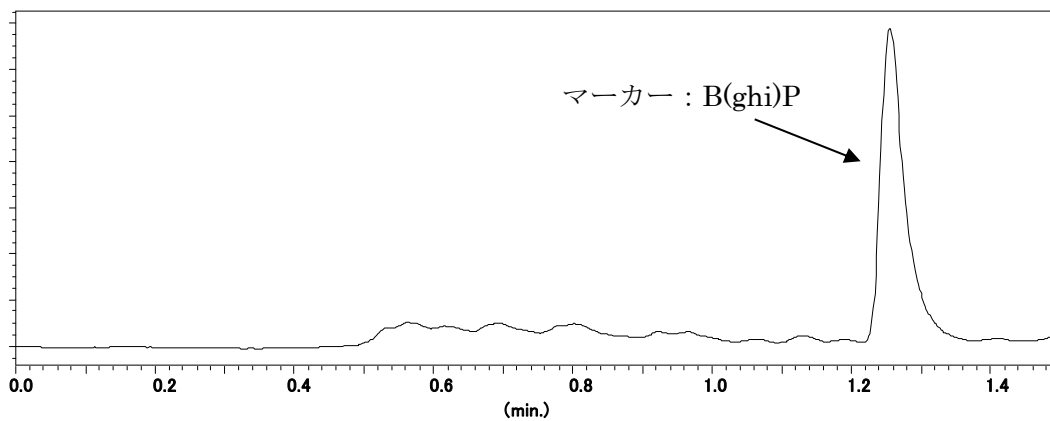


図3 マーカー (Benzo[ghi]perylene) のクロマトグラム

カーボンブラック 0.2 μg/ml に吸着したマーカー (Benzo[ghi]perylene) のクロマトグラムの例を示す。

5. 検出下限および定量下限値

検量線作成で調製したカーボンブラックの標準溶液の最低濃度 0.2 μg/mL を 5 サンプル分析し、その標準偏差 (SD) を算出し、SD の 3 倍を検出下限値、10 倍を定量下限値とした。

得られた SD から検量線を用い、次式より定量下限を求めた。なお、検出下限値、定量下限値はカーボンブラック抽出溶液 3mL 中の 1mL を分析に用いるため、3 倍して絶対量を求めた。

続いてカーボンブラック気中濃度として、個人ばく露測定として吸入性粉じんとして4時間サンプリングした場合と作業環境測定として10分間サンプリングした場合の検出下限値、定量下限値を求めた。

① 装置の検出下限値、定量下限値

検出下限 ($\mu\text{g/mL}$) = $3\text{SD}/a$, 定量下限 ($\mu\text{g/mL}$) = $10\text{SD}/a$ (a は検量線の傾き) として検出下限値、定量下限値を求めた結果を表3に示した。

表3 カーボンブラックの検出下限、定量下限

	溶液濃度($\mu\text{g/ml}$)	絶対量 (μg)
検出下限 (3SD)	0.100*	0.300
定量下限 (10SD)	0.332	0.996 \div 1

*検出下限は、マーカのバックグラウンドを超えている($0.2\mu\text{g}$)ため、参考値とした。

② 気中濃度の検出下限値、定量下限値

カーボンブラック気中濃度の検出下限値、定量下限値を表4に示した。

- ・個人ばく露の場合：サイクロンGS-3 サンプラーを用いて2.75L/minで240分間サンプリングした場合を想定
- ・作業環境測定の場合：多段平行板式分粒装置とローボリュームエアサンプラー(9.6l/分)で10分間サンプリングした場合を想定

表4 カーボンブラック気中濃度の検出下限、定量下限 (mg/m^3)

	検出下限	定量下限 (mg/m^3)
個人ばく露測定 (採気量 660l)	0.0005	0.0015
作業環境測定 (採気量 96l)	0.0031	0.0104

6. ブランク

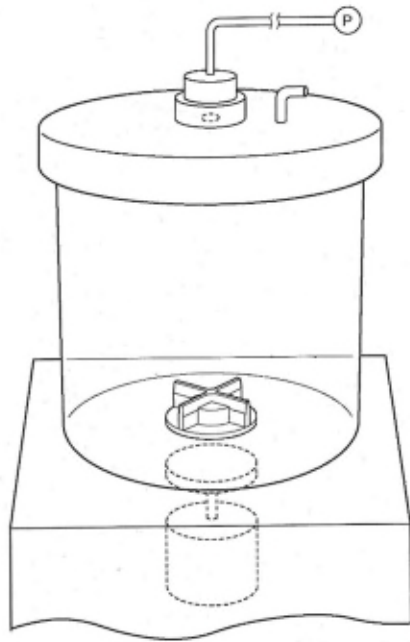
脱着溶媒および捕集フィルターのブランク中のマーカの確認を行ったところ、多環芳香族炭化水素(PAH)13成分(ナフタレン,フルオレン,フェナントレン,フルオランテン,ピレン,ベンゾ[a]アントラセン,クリセン,ベンゾ[b]フルオランテン,ベンゾ[k]フルオランテン,ベンゾ[a]ピレン,ジベンゾ[a, h]アントラセン,ジベンゾ[g, h, i]ペリレン,インデノ[1,2,3-cd]ピレン) およびマーカである Benzo[ghi]perylene のピークは認められなかった。

7. 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。

8. 添加回収率

フィルターへ捕集されたカーボンブラック回収率の検討は、日本粉体工業技術協会:JIS 試験用粉体(平均粒子径約80nm, 製法:サーマル法)を約0.1g 秤量し、図4の浮遊特性測定装置(特許第6362669号)へ投入し、1400rpmでファンを回し、吸入性粉じんを分粒子して捕集するためにPM4サンプラーのGS-3Respirable Dust Cyslone(SKC製)を用いて2.75 mL/minで10分間採気し、テフロンバインダーフィルター(37mmφ)に吸入性粉じん粒子径のカーボンブラックを捕集した(n=5)。



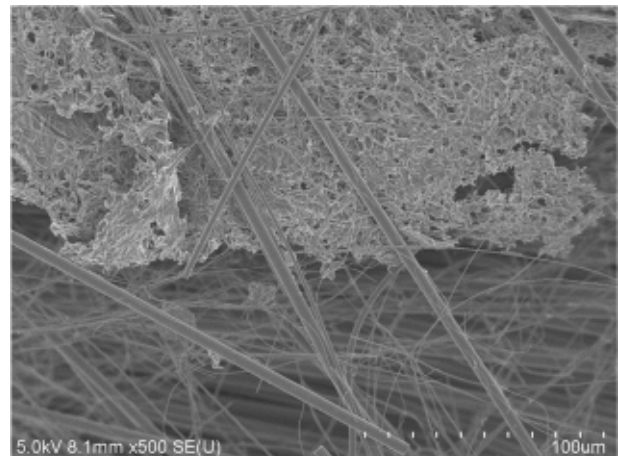
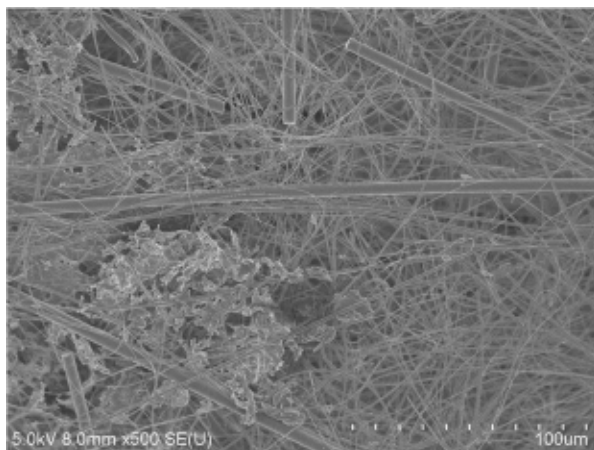
浮遊特性測定装置

- ・内容積 10L の容器内に乾燥粉体を投入し、サイクロンの原理を用いて、エアロゾルを分級する。
- ・フィルターホルダー、吸引ポンプを使用して、分級したエアロゾルをフィルター濾紙へ捕集する。
- ・この装置を用いることにより、作業現場でフィルターに捕集された試料と同類の試料が得られる。

図4 浮遊特性測定装置の外観

カーボンブラック捕集後のフィルターは、マイクロ天秤で 0.001mg の単位まで秤量し、PP 試験管に挿入後、0.1%Tween 溶液を 3 mL 入れ、超音波振動(20 kHz, 300 W)を 2 分間行い、フィルターからカーボンブラックを脱離した。

カーボンブラックが脱離したテフロンバインダーフィルター残渣には、次の電子顕微鏡写真に示すようにカーボンブラックの付着は認められなかった。



続いて超音波振動後の溶液をペーパー濾紙 No.5A で濾過し、フィルター残渣を除去してカーボンブラック濃縮懸濁液を得た。この濃縮液はカーボンブラックの濃度が 0.2~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように 0.1%Tween 溶液で希釈し (カーボンブラックの 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液は、溶液からカーボンブラック特有の黒色が認められない濃度)、マーカーである Benzo[ghi]perylene 溶液 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液) を 20 μL 添加して 15 分間攪拌、pore size 0.2 μm のニュークリポアメンブレンフィルターにてろ過して、マーカーが吸着したカーボンブラックを PP 試験管に回収した。

その後、アセトニトリル溶液 (1ml) を添加・攪拌し、マーカーを脱着・回収し、HPLC によりカーボンブラックに吸着したマーカーの Benzo[ghi]perylene の面積値からカーボンブラック濃度を求めた。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) の分析条件は、機器：Acquity UPLC system(日本ウォーターズ)、カラム：Acquity BEH C18(日本ウォーターズ) 1.7 μ m 100mm \times 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 水=75：20：5、流量 0.5mL/min、検出器：ケイ光検出器(励起波長 294 nm、ケイ光波長 410 nm)とした。

5 フィルターを用いたカーボンブラックの回収率は、既知量のカーボンブラックを直接 PP 試験管に入れてマーカを添加して求めた濃度との比較により回収率を求め、検体 1 個当たりの最終的な総回収率は、ばらつきがなく良好な回収率の結果を得た (表 5)。

表 5 添加回収率

設定量 (μ g)	測定量 (μ g)	回収率 (%)	変動係数 (%)
20.8	19.7	94.9	7.94

(n=5)

9. 保存性

保存性：「安全データシート」により、カーボンブラックは安定であることが保証されているため、カーボンブラックを捕集したフィルターの保存性については検討していない。

10. Benzo[ghi]perylene をマーカとした HPLC 分析のまとめ

フィルターに捕集したカーボンブラックを芳香族炭化水素である Benzo[ghi]perylene をマーカとして定量する本手法では、カーボンブラック回収率が良好な結果となり、HPLC を用いて定量できることが認められた。

ただし、カーボンブラックの表面に樹脂等をコーティングした場合には、炭素分子へのマーカ結合が阻害されるために表面加工の無い状態である必要がある。

さらに同報告書では標準試薬として日本粉体工業技術協会：JIS 試験用粉体(平均粒子径約 80nm, 製法：サーマル法)を用いたが、カーボンブラックの製造方法や粒子の大きさにより Benzo[ghi]perylene のマーカ量が違う可能性もあることより、同手法でのカーボンブラック濃度の定量においては、取り扱いカーボンブラックを入手して検量線を作成することが必要と考えられる。

11. HPLC カーボンブラック分析法と熱-光学補正法カーボンブラック分析法の比較検証について

【はじめに】 厚生労働省は産業現場でのカーボンブラックばく露調査におけるカーボンブラック測定分析法として「元素状炭素を含む粉じんの作業環境における測定法について 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) とカーボンブラック」を公表している。(https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyoku-Soumuka/youugaisei28_2_sankou4-2_1.pdf)

同手法における測定分析法は、NIOSH 分析マニュアル No.5040 を参考にして、石英ろ紙にカーボンブラックをサンプリングし Sunset Laboratory 社の炭素分析装置を用いて定量している。炭素分析の原理は、粒子を捕集したフィルターを試料オープンに入れ、ヘリウム気流下で加熱、続いて酸素共存下で加熱し、気化あるいは燃焼して生成する炭素成分を酸化触媒により二酸化炭素に酸化した後、還元触媒であるメタネータで還元して得られるメタンを水素炎イオン化検出器 (FID) により測定するも

のである。同定量法は熱-光学補正法と呼ばれ、炭素を含む粉じん等の分析手法として精度の確保されている方法であるが、一方で炭素分析装置での分析は特定分野でのみ行われている手法のため、作業環境測定機関において炭素分析装置が普及しているとは言い難い。

したがって分析装置として汎用されている液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてカーボンブラック定量分析が可能か検討した HPLC カーボンブラック測定分析法と熱-光学補正法で得られた濃度に差異が生じないかを検証した。

【方法】検証方法は、製造作業現場 2 社において同時に同時間サンプリングした石英ろ紙サンプリング試料とテフロンバインダーフィルターT60A20 試料を用いて濃度を比較することで行った。

1. 分析測定法および分析機関

①熱-光学補正法

サンプリングろ紙：石英ろ紙 (90℃による焼きだし処理済フィルター)

分析機関：東芝ナノアナリシス株式会社 化学分析技術センター 環境化学分析技術ラボ

使用装置：カーボンエアロゾル分析装置 Sunset laboratory 社製

②HPLC 法

サンプリングろ紙：テフロンバインダーフィルターろ紙 T60A20

HPLC：Acquity UPLC system(日本ウォーターズ)、カラム：Acquity BEH C18(日本ウォーターズ)

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 水 =75：20：5、流量 0.5mL/min、検出器：ケイ光検出器(励起波長 294 nm、ケイ光波長 410 nm)

2. カーボンブラック測定事業場

カーボンブラック製造事業場 2 事業場の個人ばく露測定、スポット測定結果を比較検討試料とした。

取り扱いカーボンブラックは、どちらもファーンエス法、一次粒子径は 20~40nm、比表面積 49~143m²/g であり、A 社 4 商品、B 社 2 製品の取り扱いであった。

3. 熱-光学補正法と HPLC 法カーボンブラック濃度結果

3-1. 個人ばく露濃度

所属	熱-光学補正法 (石英ろ紙)				HPLC 法 (テフロンバインダーろ紙)			
	ろ紙 No.	採気量	カーボンブラック量	カーボンブラック濃度	ろ紙 No.	採気量	カーボンブラック量	カーボンブラック濃度
		(L)	(μg)	(mg/m ³)		(L)	(μg)	(mg/m ³)
KM	301	528	180	0.34	1	22	2.5	0.114
	308	577.5	13	0.02	8	577.5	13	0.023
SD	302	517	80	0.16	2	517	83.5	0.162
	312	577.5	12	0.02	12	577.5	12	0.021
BH	303	522.5	120	0.23	3	522.5	79.4	0.152
	311	574.75	140	0.24	11	574.75	161	0.28
KB	304	492.25	-	5.9	4	478.5	2819	5.891
	307	569.25	35	0.06	7	569.25	37	0.065
SY	330	720.5	<2	<0.003	30	126.5	16.7	0.132
	331	220	6.9	0.03	31	220	30	0.136
WN	332	800.25	110	0.14	32	800.25	143	0.179
	333	1067	8.8	0.01	33	1067	9.2	0.009
NM	334	800.25	120	0.15	34	805.75	107	0.133
	335	16.5	2.5	0.15	35	16.5	4.9	0.297
KM	336	321.75	280	0.87	36	486.75	278	0.571

	337	924	110	0.12	37	921.25	120	0.13
NM	340	495	96	0.19	40	462	100	0.216
	341	481.25	45	0.09	41	863.5	55	0.0637

3-2 スポット測定濃度

作業場所	熱-光学補正法 (石英ろ紙)				HPLC 法 (テフロンバインダーろ紙)			
	ろ紙 No.	採気量	カーボンブラック量	カーボンブラック濃度	ろ紙 No.	採気量	カーボンブラック量	カーボンブラック濃度
		(L)	(μg)	(mg/m^3)		(L)	(μg)	(mg/m^3)
フレコン作業場	316	40.5	<2	<0.05	6	41.25	2	0.048
	320	40.5	<2	<0.05	15	41.25	1.9	0.046
紙袋充填作業場	317	40.5	<2	<0.05	14	41.25	1.8	0.044
	318	40.5	<2	<0.05	13	41.25	2.9	0.07
フレコン作業場	313	1163.7	19	0.016	10	1201.75	28	0.023
紙袋充填作業場	314	1220.4	<2	<0.002	9	1243	6.7	0.005
汚水処理場横	315	885.6	<2	<0.003	5	902	3	0.003
BG	327	330	<2	<0.006	19	330	1.1	0.003
モニター紙袋	324	926.75	56	0.06	24	926.75	26	0.028
モニターフレコン	323	1014.8	6.1	0.006	23	1014.75	9.8	0.01
スポットフレコン	325	41.25	<2	<0.05	25	41.25	<1	<0.025
スポット紙袋	326	41.25	<2	<0.05	26	41.25	1.7	0.041

4. 熱-光学補正法濃度と HPLC 濃度の比較

調査結果より、熱-光学補正法測定絶対量と HPLC 測定絶対量の関係について、定量下限値以上の全データ (n=20) を用いて相関を求めた。
全データの相関図は次の様になった。

相関係数 (0.9952)

各単位を μg で示した熱-光学補正法濃度と HPLC 濃度の間には正の相関 ($R^2=0.9952$, $P<0.01$) が認められ、回帰直線は $Y=0.9678X$ ($R^2=0.9952$) となった。

また、各単位を mg/m^3 で示した熱-光学補正法濃度と HPLC 濃度の間には正の相関 ($R^2=0.9943$, $P<0.01$) が認められ、回帰直線は $Y=0.9898X$ ($R^2=0.9943$) となった。

相関係数 (0.9943)

以上より、熱-光学補正法測定絶対量と HPLC 測定絶対量の間には正の相関 ($R^2=0.9952$, $P<0.01$) が認められ、回帰直線は $Y=0.9678X$ ($R^2=0.9952$) となった。

しかしながら、KB 作業者の高値データ及び採気量が極端に少なかった KM 作業者を削除した $n=18$ データでは、下図のように $Y=0.10031X$ ($R^2=0.9409$) となり、HPLC 濃度が熱-光学補正法より若干高めの濃度となる可能性が高いことが示唆された。

相関係数 (0.9409)

また、各単位を mg/m^3 で示した熱-光学補正法濃度と HPLC 濃度の間には正の相関 ($R^2=0.7081$, $P<0.01$) が認められ、回帰直線は $Y=0.7244X$ ($R^2=0.7081$) となった。

相関係数 (0.7081)

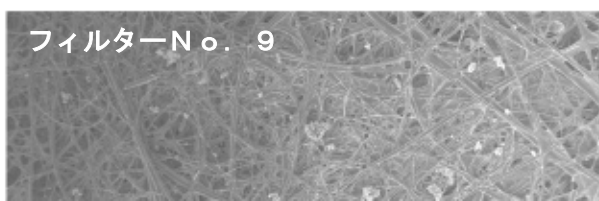
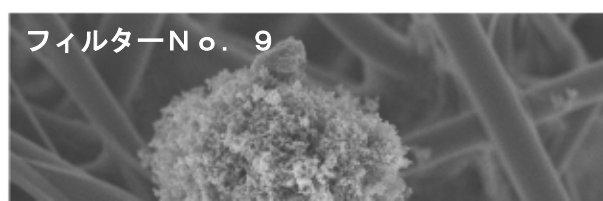
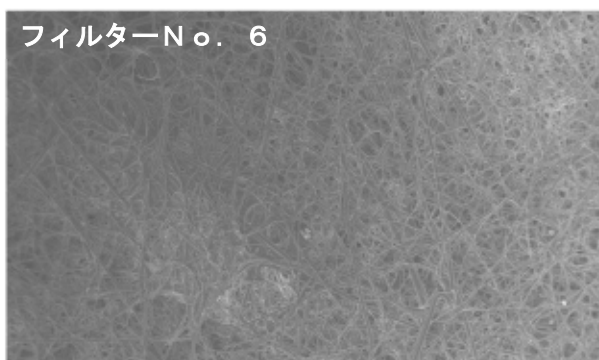
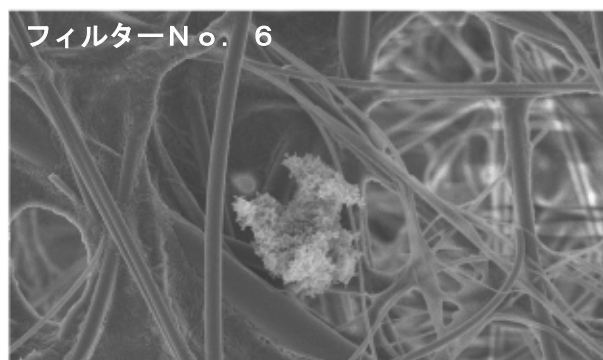
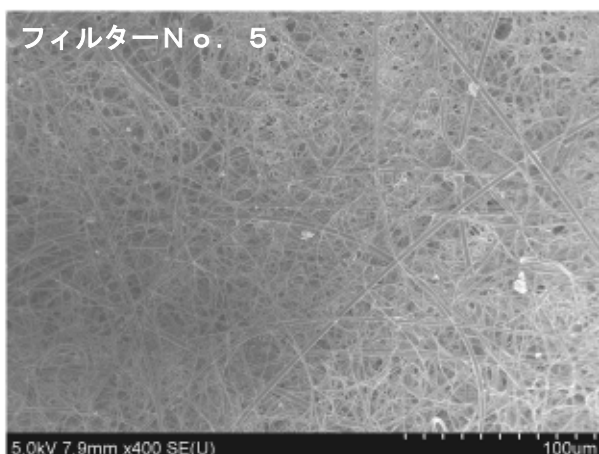
以上より、熱-光学補正法測定絶対量と HPLC 測定絶対量の間には正の相関 ($R^2=0.9409$, $P<0.01$)が認められ、回帰直線は $Y=1.0031 \times (R^2=0.9409)$ となった。

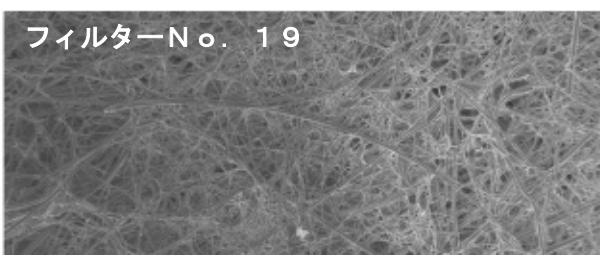
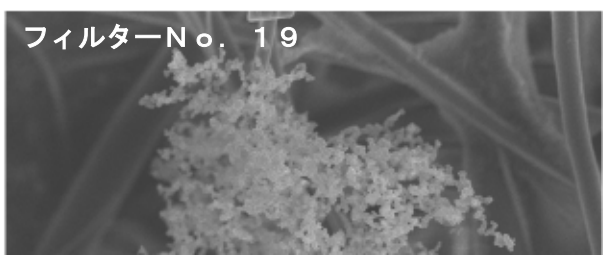
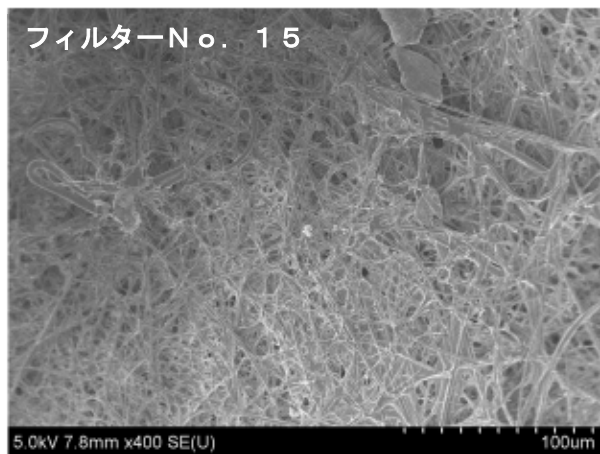
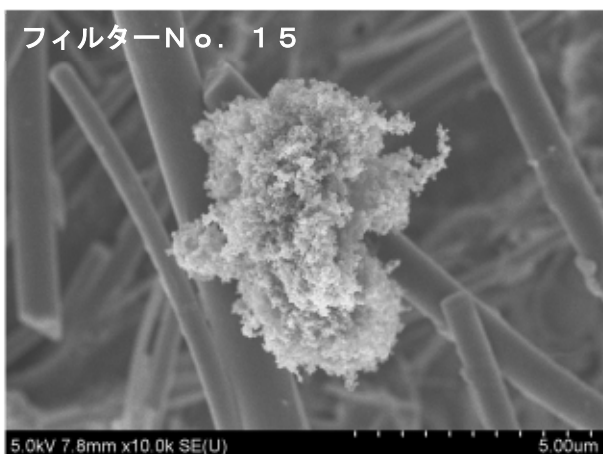
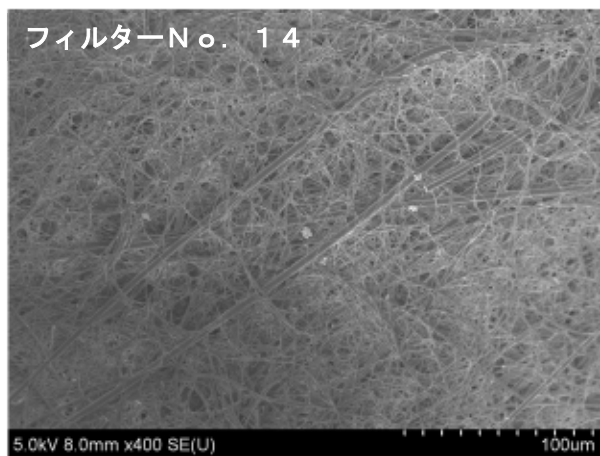
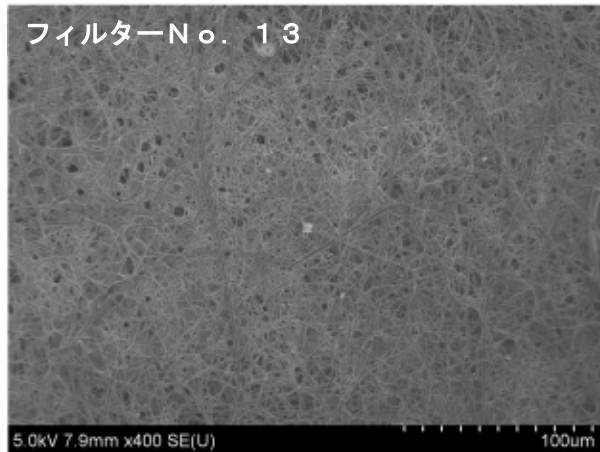
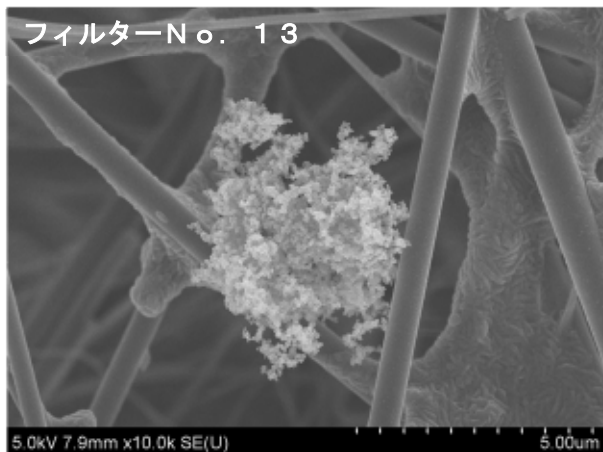
5.カーボンブラックの電子顕微鏡写真による確認

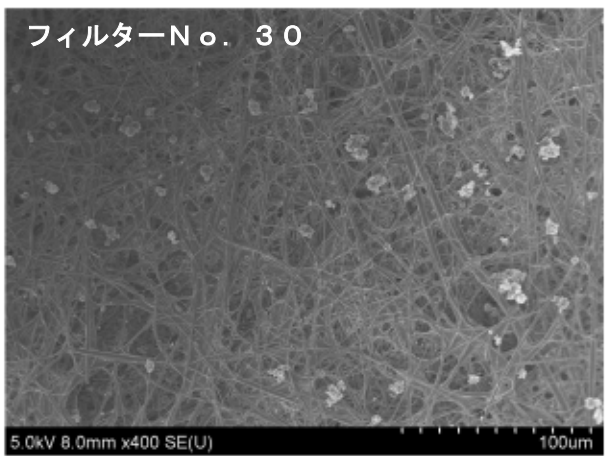
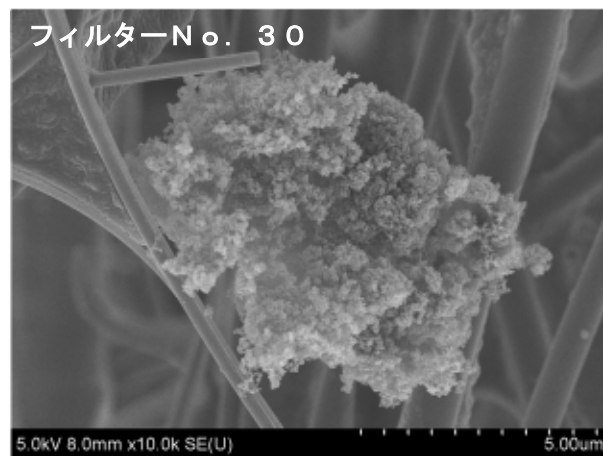
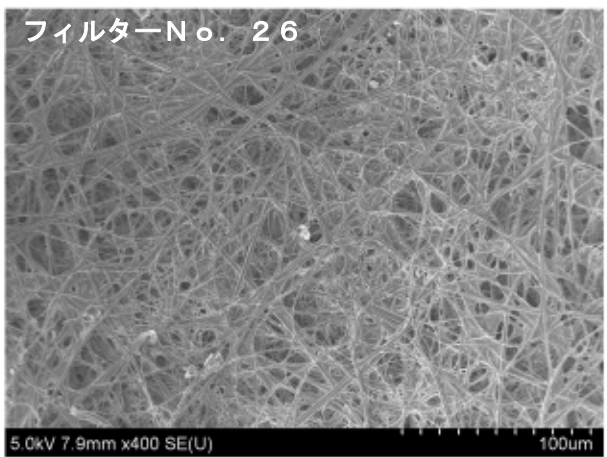
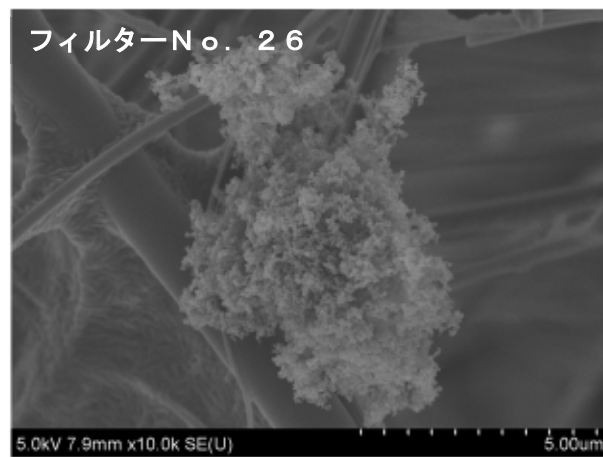
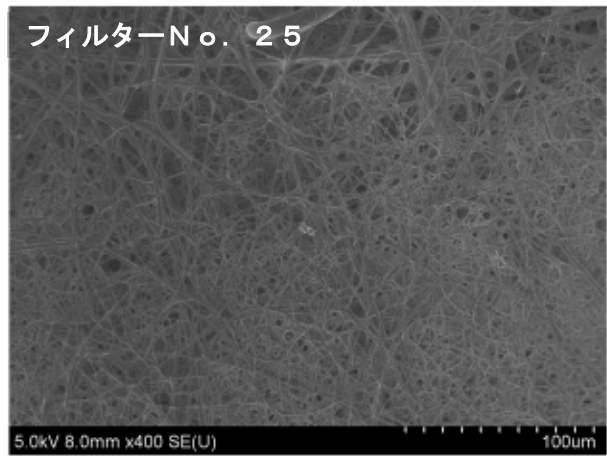
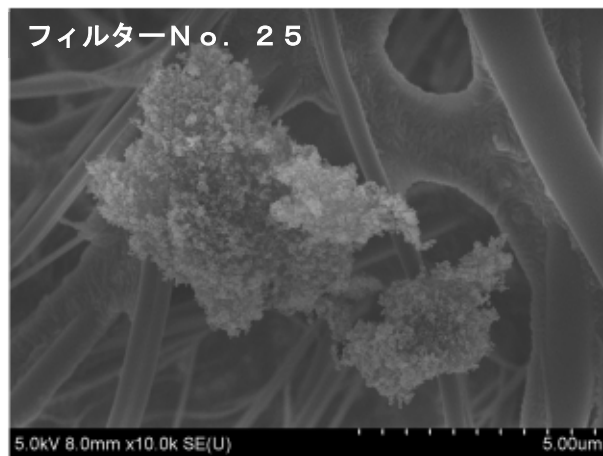
熱-光学補正法濃度にて定量下限値未満とされたろ紙フィルターに捕集されたカーボンブラックを電子顕微鏡で確認することで、カーボンブラックが捕集されているかを確認した。

その結果、定量下限値未満とされた場合でもカーボンブラックは捕集されており、分析感度として HPLC 法の方が感度が上回っていると思われた。

濃度が低いフィルター(No.5、6、9、13、14、15、19、25、26、30)の走査電顕写真







【所見】

これ等のフィルターの画像から、少ないながらもカーボンブラックの存在が認められた。特に No.9 と No.30 では他のフィルターよりもカーボンブラックが明確に認められた。

以上より、同 HPLC 分析法は化学物質リスクアセスメントでの測定分析法として十分に精度が確立された手法と判断できた。

以上より、検討結果をカーボンブラックの標準測定分析法として別紙にまとめた。

1 2. 検討機関

労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター

1 3. 参考文献及び資料

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

Makoto Ohnishi¹, Masaaki Suzuki, Masahiro Yamamoto, Tatsuya Kasai, Hirokazu Kano, Hideki Senoh, Ichiro Higashikubo, Akihiro Araki, Shoji Fukushima. Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2016, 11: 44

(別紙) カーボンブラック中の多環芳香族炭化水素の標準測定分析法

化学式:-	分子量:-	CASNo.: 1333-86-4 (カーボンブラックとして)
許容濃度等: 日本産業衛生学会:吸入性粉塵 1mg/m ³ 総粉塵: 4mg/m ³ NIOSH : 3.5 mg/m ³ ACGIH : 3 mg/ m ³ OSHA : 3.5 mg/m ³ UK : 3.5 mg/m ³	物性等 沸点:-, 融点:-,密度 1.7~1.9g/cm ³ 構造:カーボンブラックの分解できない最小単位がアグリゲートである。その一部分を粒子と通称し、構成するのは、炭素6員環及び5員環である。表面には、水素官能基及び少量の酸素系官能基がある。アグリゲートは、ファン・デルワールス力の物理的な力により2次凝集体(アグロメレート)を構成する。	

別名:アセチレンブラック

サンプリング 分析

サンプリング: 総粉塵は捕集器の入口における流速を 50~80cm/sec として捕集した粉塵を総粉塵(日本産業衛生学会)とし、吸入性粉塵は空気動学的粒子径 4.0µm(4.0µm50%カット) (ISO,ACGIH) で分粒し捕集した粉塵とする。個人ばく露サンプラーは導電性ダイレクトサンプラー, PM4.0 サンプラー(導電性材質が望ましい)を粒子径に合わせて選択する。 サンプリング流量: 総粉じん流量 1~2l/分(NIOSH 法 0500), 吸入性粉じん流量 (SKC 製 GS-3 の場合 2.75L/min) フィルター: テフロンバインダーフィルター等捕集効率 95%以上のフィルター サンプリング時間: 240 分間 (個人ばく露) 10 分間 (作業環境測定) 保存性: 各メーカーにより、安定であることが保証されている。	分析方法: HPLC 分析法 検量線の作成: カーボンブラック JIS 試験用粉体 0.20~1.00µg/mL の範囲で直線性が得られた。相関係数(r): 0.9995 抽出操作: カーボンブラックを捕集したフィルターは、マイクロ天秤で 0.001mg の単位まで秤量し、ポリプロピレン試験管に挿入後、0.1%Tween 溶液を 3 mL 入れ、超音波振動(20 kHz, 300 W)によりフィルターからカーボンブラックを脱離。その溶液をペーパー濾紙 No.5A で濾過し、フィルター残渣を除去しカーボンブラックの濃縮懸濁液を得る。これにマーカである Benzo[ghi]perylene(マーカ)溶液を添加し 15 分間攪拌し、0.2 µm のニュークリポアメンブレンフィルターにマーカの吸着したカーボンブラックを回収。その後、アセトニトリルによりマーカを脱着・回収し、HPLC によりマーカ量を測定した。								
精度	機器: Acquity UPLC system(日本ウォーターズ) カラム: Acquity BEH C18 1.7 µm (100mm × 2.1 mm I.D.)(日本ウォーターズ) カラム温度: 40°C、 移動相: アセトニトリル: メタノール: ミリ Q=75:20:5 流速: 0.5 mL/min 検出器: ケイ光検出器 (励起 294 nm、ケイ光 410 nm) 試料注入量: 5 µL 検量線: 0.2~1.0 µg/mL (相関係数: 0.9995) 定量法: 絶対検量線法								
<回収率>(n=5)									
<table border="1"> <thead> <tr> <th>設定量 (µg)</th> <th>測定量 (µg)</th> <th>回収率(%)</th> <th>変動係数(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>20.8</td> <td>19.7</td> <td>94.9</td> <td>7.94</td> </tr> </tbody> </table>	設定量 (µg)	測定量 (µg)	回収率(%)	変動係数(%)	20.8	19.7	94.9	7.94	
設定量 (µg)	測定量 (µg)	回収率(%)	変動係数(%)						
20.8	19.7	94.9	7.94						
<検出下限(3SD) 定量下限(10SD)>									
溶液濃度(µg/mL) 0.300*(参考値) 1									
気中濃度(mg/m ³)									
660L 採気時 0.0005*(参考値) 0.0015									
96L 採気時 0.0031*(参考値) 0.0104									

適用: 個人ばく露測定、作業環境測定
カーボンブラックの高速液体クロマトグラフ分析法として、捕集フィルターから付着したカーボンブラックを超音波抽出により脱離・濾過させ、Benzo[ghi]perylene マーカを用いて定量するカーボンブラックの回収率は良好であった。また測定にあたっては予めカーボンブラックを入手して、検量線を作成しての分析検討が必要と思われる。なお、カーボンブラックについては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。

参考文献
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
Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. Journal of Occupational Medicine and Toxicology, 2016, 11: 44