

## 大気中フラーレンC<sub>60</sub>の測定

大貫 文，齋藤 育江，富士栄 聡子，保坂 三継，小縣 昭夫

### Determination of C<sub>60</sub> Fullerene in Air

Aya ONUKI, Ikue SAITO, Satoko FUJIE, Mitsugu HOSAKA and Akio OGATA

## 大気中フラーレン C<sub>60</sub> の測定

大貫 文<sup>a</sup>, 齋藤 育江<sup>a</sup>, 富士栄 聡子<sup>a</sup>, 保坂 三継<sup>a</sup>, 小縣 昭夫<sup>b</sup>

スポーツ用品や化粧品等, 一般消費者向けの製品に使用されているフラーレンC<sub>60</sub> (以下, C<sub>60</sub>) について, 大気中C<sub>60</sub>濃度の測定法を検討し, 実態調査を行った. 高速液体クロマトグラフ/質量分析計法で検討した結果, 導入液濃度の定量下限値が1 ng/mLの低濃度まで測定が可能になった. この方法を用いて, 2008年12月から2009年11月までの, 都内のビル屋上 (地上22 m) における大気中C<sub>60</sub>濃度を測定した結果, 各月とも2.3 pg/m<sup>3</sup>未満であった.

**キーワード:** フラーレン, C<sub>60</sub>, ナノマテリアル, 液体クロマトグラフ/質量分析計, 大気

### はじめに

近年, ナノテクノロジーの研究開発が進み, ナノマテリアルを使用した製品が数多く市販されるようになった. その用途は, 家電・電気電子製品, 化粧品, 塗料・インク, 家庭用品・スポーツ用品, 医薬品等の多岐に渡り, 生活の様々な場面で利用する機会が増えた<sup>1)</sup>.

ナノマテリアルは, 物質のサイズが小さいため, 従来の化学物質とは異なる特有の化学的, 力学的, 電気的及び磁気的性質を示すことが知られている<sup>1)</sup>. したがって, 人や環境への影響を正確に把握するためには, 環境中での存在実態と挙動, 暴露経路, 生体内動態, 生体影響等, 様々な調査研究を進める必要がある.

著者らは, 環境中ナノマテリアルの実態調査を目的とし, その中でも粒径が 1 nm と非常に小さいフラーレン C<sub>60</sub> (以下, C<sub>60</sub>) に着目した.

C<sub>60</sub>は, 炭素系ナノマテリアルの一つで, 炭素原子60個からなる20面体の球状分子である. 炭素-炭素の二重結合を多く持つため, 強い電子受容性, 効果的なラジカル補足能, 耐熱性, 抗酸化作用等の機能を持ち, さらに, 高い反応性を利用した様々な誘導体の合成・研究も進められている<sup>2)</sup>. C<sub>60</sub>は, すでに一般消費者向けの製品に実用されており, 主にスポーツ用品, 化粧品, 産業資材, オイル用品等が販売されている<sup>2)</sup>.

C<sub>60</sub>の大気への放出要因として, 製造工場からの放散, 工場での消耗品や製品の破砕処理, 化粧品やエンジンオイル等の使用等が考えられるが, 一般大気におけるC<sub>60</sub>の実態はほとんど報告されていない. そこで, 本報では, 空气中C<sub>60</sub>の測定法を検討し, 大気中濃度の実態を調査したので, その結果を報告する.

### 材料と方法

#### 1. 試薬

Fullerene-C<sub>60</sub>, sublimed, 99%は ALDRICH から, 20-30% C<sub>13</sub> enriched C<sub>60</sub> 99% (以下, C<sub>60</sub>-IS) は MTR から購入した.

トルエン (ダイオキシン用), アセトニトリル (高速液体クロマトグラフ用) 及びベンゼン (残留農薬試験用) は和光純薬から, 石英フィルター (47 mm) は東京ダイレックから, Mini-Uniprep (0.45 µm) は Whatman から購入した.

#### 2. C<sub>60</sub>の測定方法

##### 1) 液体クロマトグラフ/質量分析計 (以下, LC/MS) の分析条件

久保田らの分析法<sup>3)</sup>を参考に, LC/MS分析条件は, 装置: Waters2690/ZMD (Waters/ Micromass), カラム: Develosil RPFULLERENE 4.6×250 mm, C30 (NOMURA CHEMICAL), 移動相: トルエン/アセトニトリル=70/30, 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 35°C, 試料導入量: 100 µL, イオン化法: 大気圧化学イオン化法ネガティブイオンモード, コーン電圧: 200 V, ソースブロック温度: 120°C, プローブ温度: 450°C, SIMモードとした. 定量用イオン及び確認用イオンは, C<sub>60</sub>はm/z=720及び721, 722を, 内部標準用のC<sub>60</sub>-ISは定量用にm/z=736を用いた (Fig.1).

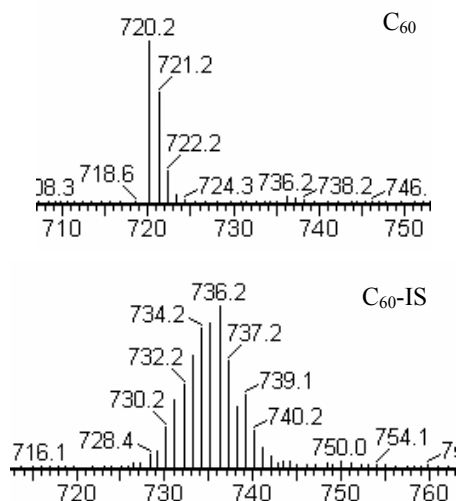


Fig.1. Mass Spectrum of C<sub>60</sub> and C<sub>60</sub>-IS

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター環境保健部環境衛生研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター環境保健部

## 2. 液体クロマトグラフ/紫外吸光度検出器（以下、HPLC/UV）の分析条件

JIS Z8981<sup>4)</sup>の方法に準じた HPLC/UV 法を検討し、LC/MS 法による  $C_{60}$  の定量下限値と比較した。HPLC/UV 分析条件は、装置：LC-10ATvp/SPD-10Avp（島津製作所）、カラム：L-column 2 ODS, 4.6×150 mm, 5  $\mu$ m（化学物質評価研究機構）、移動相：トルエン/メタノール=50/50、流速：0.8 mL/min、カラム温度：35°C、試料導入手量：5  $\mu$ L、検出波長：325 nm とした。

## 3. 添加回収試験

$C_{60}$  (5 ng) を添加した石英フィルター (F1) と、その下流に破過確認用の石英フィルター (F2) を重ね、室内空気を 10 L/min で 2 週間通気した（空気量：約 177~194 m<sup>3</sup>）。未通気フィルター (5 ng 添加, F0) 及び通気後のフィルター (F1, F2) を、下記の方法で抽出し、LC/MS 分析を行った。

## 4. 大気中 $C_{60}$ の測定

2008年12月から2009年11月まで、新宿区内の5階建てビル屋上（地上22 m）において、大気中 $C_{60}$ 濃度を測定した。大気中 $C_{60}$ の採取は、大気採取用ポンプ（YP-40VC, 安永）及び積算流量計（DC-2A, シナガワ）を用いて、石英フィルターに流速10 L/minで、大気を2週間通気した。採取後の石英フィルターは、下記の方法で抽出し、LC/MS 分析を行った。

## 5. 抽出方法

石英フィルターにベンゼン 10 mL を加えて、超音波によって 10 分間抽出した。抽出液 8 mL を窒素気流下で乾固させ、100 ng/mL の  $C_{60}$ -IS 含有溶液（トルエン/アセトニトリル=70/30）を 0.4~0.5 mL 加え、超音波で 10 分間再溶解した。再溶解液は、0.45  $\mu$ m のフィルターで粉じん等の浮遊物をろ過し、分析用試料とした。

## 結果及び考察

### 1. LC/MS分析条件

#### 1) 試料導入手量及び試料溶解液組成

トルエン 100%で溶解した  $C_{60}$  標準溶液（100 ng/mL）を、20~100  $\mu$ L 導入した時の LC/MS クロマトグラム（ $m/z=720$ ）を Fig.2 に示す。溶出時間と半値幅から理論段数を求めた結果、導入量の増加に伴い、理論段数は約 7,700、約 2,000、約 600、約 380 と減少し、ピーク形状は悪くなった。

そこで、試料溶解液の組成をトルエン/アセトニトリルの混合溶液に変更し、その混合割合を変化させて  $C_{60}$  標準溶液（100 ng/mL）を 100  $\mu$ L 導入した結果を Fig.3 に示す。アセトニトリル 10%での理論段数は約 1,200、20%では約 3,400、30%では約 8,000、50%では約 6,000、80%では約 7,500 で、移動相と同じ組成条件において最も高い理論段

数を得ることができた。これは、移動相と試料溶媒の  $C_{60}$  溶解度が同じであるため、導入時の試料拡散が抑制され、高い理論段数を得ることができたと考えられた。アセトニトリルに  $C_{60}$  はほとんど溶解しないため<sup>5,6)</sup>、アセトニトリルの割合が増加すると  $C_{60}$  の溶解度が低下する。しかし、一般大気中  $C_{60}$  の抽出溶液濃度は低いことが予想されたため、トルエンが 70%含有されていれば  $C_{60}$  の溶解には問題ないと考え、移動相と同じ組成のトルエン/アセトニトリル=70/30 溶液を試料溶解液に用いることとした。

なお、理論段数（N）は、 $N=5.55 \times (\text{溶出時間}/\text{半値幅})^2$  から求めた<sup>7)</sup>。

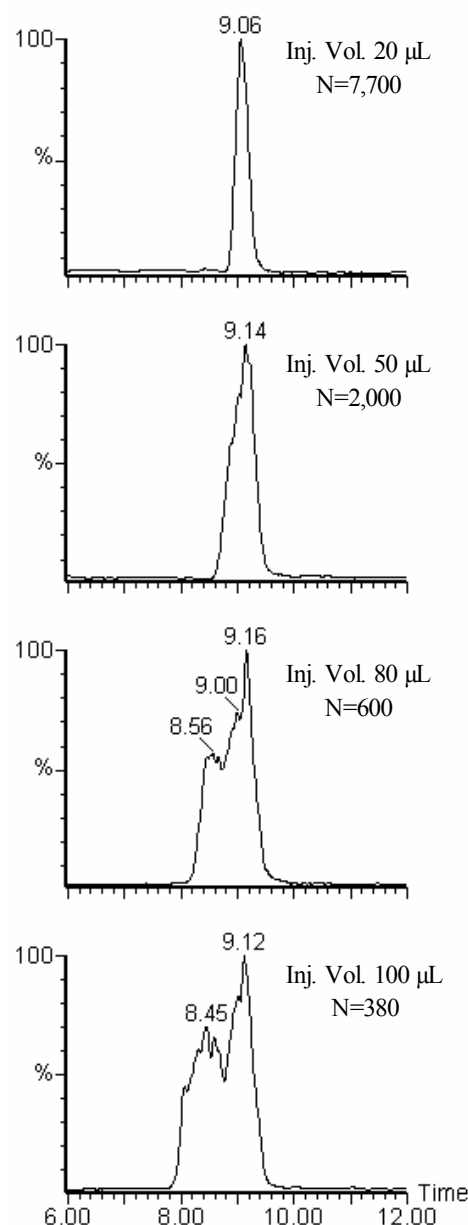


Fig.2. LC/MS Chromatograms ( $m/z=720$ ) obtained with Different Injection Volume  
Sample:  $C_{60}$  Dissolved in Toluene  
N=Number of Theoretical Plates

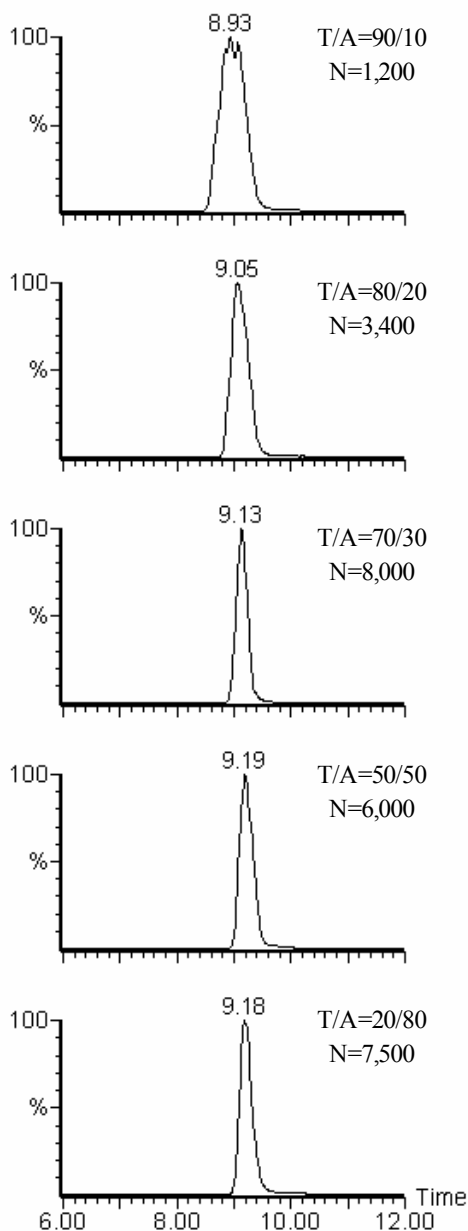


Fig.3. LC/MS Chromatograms ( $m/z=720$ ) obtained with Different Injection Solvent

Sample:  $C_{60}$ , Inj. Vol: 100  $\mu$ L,

T: Toluene, A: Acetonitrile

N=Number of Theoretical Plates

## 2) 変動係数

$C_{60}$  標準溶液 (1 ng/mL) を繰り返し導入し、変動係数を求めた ( $n=5$ )。  $C_{60}$  の面積を用いて算出した変動係数は 15.7%,  $C_{60}$ -IS に対する  $C_{60}$  の面積比を用いた場合は 5.5%であった。したがって、以降の濃度算出には、ばらつきの少ない面積比を用いた。

## 3) 検量線

$C_{60}$  標準溶液 (1~100 ng/mL) について、面積比をプロットした検量線を Fig.4 に示す。相関係数は  $r=0.998$  で、良好な直線性を示した。

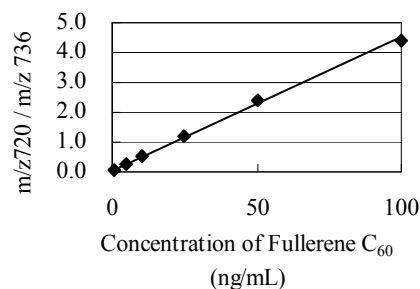


Fig.4. LC/MS Calibration Curve Plotted of Ratio of Peak Area against Concentration of  $C_{60}$

## 4) 定量下限値

$C_{60}$  標準溶液 (1 ng/mL) を繰り返し測定し ( $n=5$ )、標準偏差の 10 倍を定量下限値とした結果、導入液濃度の定量下限値は 1 ng/mL であった。

## 2. HPLC/UV分析条件

$C_{60}$  の溶出時間は 5.4 分、0.1~10  $\mu$ g/mL の間で直線性が見られたが、0.01  $\mu$ g/mL ではピークが検出されなかった。そこで、LC/MS 分析条件と同様に、試料溶解液を移動相と同じ組成にし、導入量を 50  $\mu$ L に増加した。その結果、0.01~10  $\mu$ g/mL の間で直線性が見られ、定量下限値は 40 ng/mL となった。HPLC/UV 法の変動係数は 1.1%で ( $n=5$ )、LC/MS 法の 5.5%と比べ良好であったが、一般大気中の  $C_{60}$  濃度は非常に低いことが予想されたため、環境中の  $C_{60}$  分析には、1 ng/mL まで測定可能な LC/MS 法を用いることとした。

## 3. 抽出溶媒

フラーレンの溶解度が高いベンゼン及びトルエンを用い<sup>5,6)</sup>、 $C_{60}$  を 25 ng 添加した石英フィルターを超音波で抽出した。その結果、回収率はベンゼンが 91.5%, トルエンが 98.4%といずれも良好であった ( $n=1$ )。したがって、比較的揮発性が高く短時間で濃縮可能なベンゼンを抽出溶媒とした。

## 4. 抽出処理工程

抽出処理による回収率への影響について検討するため、 $C_{60}$  をトルエン/アセトニトリル=70/30 に溶解したもの (50 ng/mL) を STD とし、これを回収率 100%として、各処理工程における回収率を求めた。超音波、乾固、フィルターろ過の各処理及び石英フィルターへの再吸着の影響を検討した結果、STD を 10 分間超音波処理した場合の回収率は 95.1%,  $C_{60}$  をベンゼンに溶解、窒素気流下で乾固し、超音波で再溶解した場合は 105.3%, STD を 0.45  $\mu$ m フィルターでろ過した場合は 88.3%, STD に石英フィルターを浸漬、超音波後、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過した場合は 93.1%で、いずれの処理工程も回収率に影響しないことが分かった。

## 5. 添加回収

F0 を 100%とした場合の F1 の回収率は平均 67.5% (61.3~76.4%), F2 は 0%で、破過は認められなかった (n=3). 前述の各処理工程での添加回収率が 88.3~105.3%であった一方、石英フィルターに通気した後の回収率は 67.5%で、20%以上低下した。

フラーレンは反応性が高いため、通気中に酸化され、回収率が低下した可能性が考えられたため、C<sub>60</sub> を添加した石英フィルターに、酸素、窒素及び室内空気各気体を通気させ、反応性の違いによる差の有無を実験した。その結果、回収率はそれぞれ 87%, 91%及び 75%で、室内空気を通気した場合が最も低いことが分かった (実験結果は示していない)。酸素及び窒素は乾燥気体、室内空気の相対湿度は 78%であったことから、空気中の水分が回収率に影響を与えた可能性が推測された。水分により抽出が妨害されるような場合は、捕集後の石英フィルターをデシケータ等で十分に乾燥させることで回収率の改善が期待されるが、水酸化フラーレン等の誘導体が生成されるような場合は、誘導体の測定を検討する必要があると考えられる。

今回、示唆された水分の影響については、確認実験で明らかにするとともに、その反応経路を解明し、回収率の改善を進める予定である。

## 6. 大気中C<sub>60</sub>濃度

採取日、採取空気量及び採取粉じん量を Table 1 に示す。12 ヶ月の間、大気中 C<sub>60</sub>を測定した結果、全て定量下限値未満であった。

Table 1. Sampling Date, Collected Volume of Air and Weight of Particulate Matter (PM)

| Sampling Date    | Air (m <sup>3</sup> ) | PM (mg) |
|------------------|-----------------------|---------|
| 2008/12/10-12/24 | 189.3                 | 7.718   |
| 2009/1/15-1/29   | 194.5                 | 6.298   |
| 2009/2/16-3/2    | 181.5                 | 6.763   |
| 2009/3/17-3/31   | 183.9                 | 7.739   |
| 2009/4/16-4/30   | 185.7                 | 5.315   |
| 2009/5/18-6/1    | 180.0                 | 6.382   |
| 2009/6/15-6/29   | 190.0                 | 5.421   |
| 2009/7/14-7/28   | 186.3                 | 3.661   |
| 2009/8/13-8/27   | 186.9                 | 5.533   |
| 2009/9/15-9/29   | 184.2                 | 6.236   |
| 2009/10/15-10/29 | 182.0                 | 6.422   |
| 2009/11/16-11/30 | 177.4                 | 5.289   |

LC/MS 法の定量下限値 (1 ng/mL) と、採取空気量 (177~194 m<sup>3</sup>)、再溶解液量 0.4 mL から、各月の大気中 C<sub>60</sub>濃度は 2.1~2.3 pg/m<sup>3</sup>未満であった。

C<sub>60</sub>は、密度 1.725 g/cm<sup>3</sup> (5 k)、融点 1,180°C<sup>2)</sup>の昇華性物質であるため、大気中では、気体状態ではなく粉じん等に付着した状態で浮遊していることが予想された。大気捕集後の石英フィルターには、毎月 3.7~7.7 mg の粉じんが捕集されたが、C<sub>60</sub>は検出されなかった。今回測定を行った施設の周辺に、フラーレン関連工場や廃棄物等処理施設

がなかったためと考えられた。

しかし、他の発生源として、自動車の排ガス<sup>8)</sup>及びC<sub>60</sub>添加エンジンオイル・エアコンオイル等の自動車由来の放散や、化粧品等からの放散が考えられ、環境中C<sub>60</sub>の実態を把握するためには、大気及び室内空気における調査を進める必要がある。

## 7. フラーレンC<sub>70</sub> (以下、C<sub>70</sub>) の測定

フラーレンの代表的なものは C<sub>60</sub> であるが、その他にも、炭素数 70 個の C<sub>70</sub> や、それ以上の高次フラーレンも市販されている<sup>2)</sup>。本報に示した LC/MS 法による C<sub>70</sub> の測定を検討したので、その結果を以下に示す。C<sub>70</sub> の定量用イオンは m/z=840、確認用イオンは m/z=841, 842 とし分析した結果、C<sub>60</sub>、C<sub>60</sub>-IS 及び C<sub>70</sub> の同時分析が可能な分析条件であることを確認した (Fig.5)。

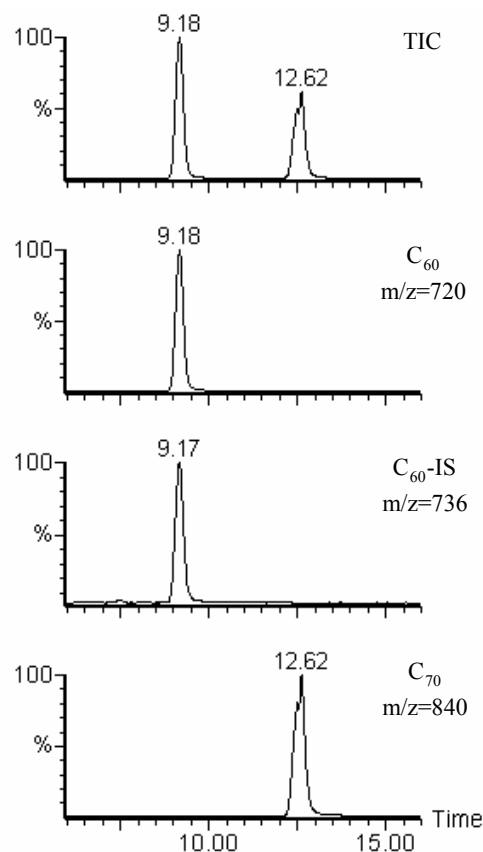


Fig.5. LC/MS Chromatograms of C<sub>60</sub>, C<sub>60</sub>-IS and C<sub>70</sub>  
TIC: Total of m/z=720,721,722,736,840,841,842

濃度の算出等は面積法 (m/z=840) を利用し、分析精度を確認した結果、検量線の相関係数は r=0.993、変動係数は 28.9%, LC/MS 導入液濃度の定量下限値は 4.8 ng/mL、添加回収試験結果は平均 52.3% (43.9~63.5%) であった。

C<sub>60</sub> と比べ、特に変動係数が高く、それにより定量下限値も高くなることが分かった。検出装置に MS を用いると、1 回の測定中に感度変動が生じる場合があり、これに対応するためには内部標準物質を使用する方法がある。C<sub>70</sub> に

についても  $C_{60}$  の場合と同様に、溶出時間が近い内部標準物質を用いることで、より高精度の分析が可能になると考えられた。

### ま と め

研究開発の推進が著しいナノマテリアルの一つである  $C_{60}$  について、大気中濃度の測定法を確立した。大気中  $C_{60}$  を石英フィルターに捕集し、抽出、乾固、再溶解後、LC/MSで分析する方法で、流速10 L/minで2週間通気した場合、添加回収率は67.5%、空气中濃度の定量下限値は2.0 pg/m<sup>3</sup>であった。この方法を用い、2008年12月から2009年11月まで、都内のビル屋上における大気中  $C_{60}$  濃度を測定した結果、各月とも、定量下限値未満であった。これは測定場所周辺に  $C_{60}$  関連の製造工場や処理施設がなかったためと考えられたが、ナノマテリアルの環境への放出は、製品を使用する時にも生じる可能性がある。化粧品など、特に室内において使用する製品から放散する場合、空气中濃度が高くなる可能性があることから、今後も様々な環境における実態調査を続けていく予定である。

### 文 献

- 1) ナノマテリアルの安全対策に関する検討会：ナノマテリアルの安全対策に関する検討会報告書，平成21年3月，厚生労働省医薬品食品局。
- 2) 株式会社三菱総合研究所：ナノマテリアル安全対策調査・支援業務報告書，平成21年3月。
- 3) 久保田領志，田原麻衣子，清水久美子，他：国立衛研報，**127**, 65-68, 2009。
- 4) 日本工業規格：JIS Z8981 高速液体クロマトグラフィーによるフラーレン  $C_{60}$  及び  $C_{70}$  の分析方法，2010年5月20日，日本規格協会。
- 5) Ruoff R.S., Tse D.S., Malhotra R., *et al* : *J. Phys. Chem.*, **97**, 3379-3383, 1993。
- 6) Semenov K.N., Charykov N.A., Keskinov V.A., *et al* : *J. Chem. Eng. Data*, **55**(1), 13-36, 2010。
- 7) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2010，第1刷版，p3，2010年2月，金原出版株式会社，東京。
- 8) 瀬戸 博，大久保智子，竹内正博：東京衛研年報，**49**, 181-185, 1998。

### Determination of C<sub>60</sub> Fullerene in Air

Aya ONUKI<sup>a</sup>, Ikue SAITO<sup>a</sup>, Satoko FUJIE<sup>a</sup>, Mitsugu HOSAKA<sup>a</sup> and Akio OGATA<sup>a</sup>

Engineered nanomaterials (ENMs) such as titanium oxide, carbon nanotubes and fullerene are used in many products. There is a possibility that ENMs are released into the environment when these products are produced, used and discarded. In this study, we were interested in carbon<sub>60</sub> fullerene (C<sub>60</sub>) used in products such as sporting goods and cosmetics. Hence, we developed a method for measuring the concentration of C<sub>60</sub> in air. In this method, target air was passed through a fiber filter at a flow-rate of 10 L/min for 2 weeks. C<sub>60</sub> collected in the filter was extracted with benzene, concentrated by nitrogen gas, and redissolved using toluene/acetonitrile. Next, the solution was analyzed by liquid chromatography/mass spectrometry to quantify the concentrations of C<sub>60</sub> as low as 1 ng/mL. C<sub>60</sub> recovery from the spiked filters was 67.5% (n = 3) for an air-sampling time of 2 weeks, and the limit of quantitation (LOQ) for air sampling with an air volume of 200 m<sup>3</sup> was 2.0 pg/m<sup>3</sup>. Ambient air on the roof of a 5-story building in Tokyo was monitored between December 2008 and November 2009. The concentration of C<sub>60</sub> in each month was below the LOQ.

**Keywords:** fullerene, carbon<sub>60</sub>, engineered nanomaterial, liquid chromatography/mass spectrometry, ambient air

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan