

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

作業環境中二鄰氯苯胺甲烷之採樣分析方法研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-039-015-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中國醫藥大學風險管理學系

計畫主持人：郭錦堂

計畫參與人員：陸瑞璽

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 7 月 6 日

摘要

2002 年在我國因二鄰氯苯胺甲烷(4,4' -Methylene bis(2-chloro aniline, MOCA), 造成疑似職業性膀胱癌案例，亦是全世界首例。因此建立穩定和精確的採樣分析方法有其急迫性需求。

本研究針對二鄰氯苯胺甲烷做採樣及分析方法改進之研究，以改進現行法規中各種採樣建議方法，使其更能精確評估作業環中勞工暴露濃度，並同時探討較簡易的萃取和採樣方法之可行性。

研究以玻璃纖維濾紙進行採樣，並以甲醇萃取樣品，使用高效液相層析儀和紫外-可見光偵測器進行樣品的分析。經實驗評估，檢量線線性相關係數高於 0.999 以上，偵測極限可達 16.63 pg，再現性之變異係數低於 6%，在三種 PEL 濃度之回收率可介於 100.5%至 101.2%之間，濃度變異係數 (CV%) 及分析變異係數 (CVa%) 分別在 0.70 和 0.60%以下。玻璃纖維濾紙樣品置於室溫，儲存穩定性可維持 28 天以上，QC 樣本之變異係數低於 4%，短時間二重複分析之相對差異百分比可在 0.5%以內，在 MOCA 的捕集上，玻璃纖維濾紙具有良好的效果。將此方法應用於職場也獲得良好的結果。

關鍵字：二鄰氯苯胺甲烷、膀胱癌、玻璃纖維濾紙

Abstract

Background. A worker was diagnosed to have bladder cancer in Taiwan (2002). With a suspicion of exposure to 4,4'-Methylene bis(2-chloroaniline, MOCA) at work as the cause of the disease, we are anxious to establish a sampling and analytical method to measure the chemical with adequate reliability and accuracy.

Methods. We used glass fiber filters to collect MOCA particles followed by extraction with methanol and measurement with HPLC-UV detector.

Results. We obtained an excellent calibration result with a relative linear correlation greater than 0.999, a detect limit of 16.63 pg, and an average correlation variation of 6% in reproducibility. The recovery rates obtained for three different levels of permissible exposure limit(PEL) ranged from 100.5 to 101.2% with the coefficients in variations of concentrations(CV%) and analyses(CVa%) to be 0.70 and 0.60%, respectively. Samples stored with glass fiber filters would sustain for 28 days with a coefficient of variation for quality control samples lower than 4%. The relative percent difference for the short-term duplication analyses was lower than 0.5%. This method can get good outcome at work place.

Conclusion. Glass fiber filter is an adequate tool to collect MOCA samples with good outcome.

Key words : MOCA, bladder cancer, glass fiber

緒 言

二鄰氯苯胺甲烷 (4,4'-methylene bis(2-chloroaniline), 簡稱 MOCA), 在室溫下為鵝黃色、半球粒或是片狀的固體, 密度 1.44g/mL@24°C, 沸點 204°C, 熔點 99-107°C, 蒸氣壓 3.7×10^{-6} mmHg@20°C, 蒸氣壓在 20°C 下為 3.7×10^{-6} mmHg。MOCA 在水中溶解性極差, 但易溶於醇、醚及酮類。MOCA 在硬化劑的產品具有高硬度, 高彈性系數、耐磨、耐油、耐拉裂及耐低溫等特性, 廣泛應用於各種橡膠產業。

MOCA 在大小白鼠及倉鼠的肝臟活體細胞上, 均會產生 DNA 的損傷及修復情形⁽¹⁾。在培養基中, 人體和犬隻的膀胱組織和 MOCA 的鍵結均會因 MOCA 濃度的上升而增加, 而和犬隻相比, 人體鱗狀上皮細胞 DNA 的鍵結能力要比狗來的強, 而對於犬隻而言, MOCA 已知是會對犬隻的膀胱鱗狀上皮細胞造成癌症⁽²⁾。

在 1976 年, 一位從事 MOCA 相關作業的工人, 因作業疏失以致受到高濃度液態 MOCA 噴於臉部, 事後就醫發現在結膜發炎及眼部和顏面的灼熱感⁽³⁾。在研究皮膚吸收 MOCA 的文獻中指出, MOCA 和新生兒包皮在乾燥的接觸下, 經放射線攝影術、TLC 都指出 MOCA 在皮膚有經過代謝的情況下會快速且逐步地穿過皮膚⁽⁴⁾。人體的 AHH-1 細胞暴露於 MOCA 或是 N-OH-MOCA 會導致 6 倍的突變率, 並造成 A 和 T 鹼基對的取代發生, A:T 鹼基對上由 N-OH-MOCA 所造成的突變誘導, 一直是由 MOCA 所產生的 DNA 損傷⁽⁵⁾。

根據 IARC 的資料, MOCA 是一種已知的人類致癌物, 目前歸為 Group 2A (probably carcinogenic in humans)^(6,7)。美國職業安全衛生署 (OSHA) 於 1989 年前曾列入致職業癌症之化合物之一, 且加有 skin 的註記⁽⁸⁾。美國政府工業衛生師協會 (ACGIH) 之 2001 年版之 TLV-TWA 值為 0.01ppm, 且註有 skin 及分類為 A2-疑似人類致癌物 (A2-Suspected Human Carcinogen) 在作業環境中, MOCA 進入人體的途徑有皮膚及黏膜的吸收和呼吸的攝入^(6,9-12)。

在 1979 年 Stephen 等的研究⁽¹³⁾ 為利用矽膠管做為 MOCA 的採樣介質。之後美國職業安全衛生署 (OSHA) 也針對方法加以探討, 目前建議的採樣及分析方法有兩種: 1. OSHA Method No. 24, 1981 年主要是利用衝擊瓶, 內裝 15ml 0.1N 的 HCl 當作吸收液, 於採樣完畢

後，用飽合的 NaOH 溶液將吸收液調至中性後，再利用 HPLC 進行分析⁽⁸⁾。這個分析方法的缺點主要為：(1) 衝擊瓶內裝有強酸吸收液，背負在作業勞工身上有相當程度的危險性和不方便性。(2) 樣品在吸收液中會被稀釋，偵測極限不易壓低。(3) 樣品酸鹼值的調整是一個相當繁鎖的步驟。(4) 相同的濃度下會因酸鹼值的調整不一時，其分析的再現性變化大。(5) 這個採樣方法並未有成熟地被測試過。此外，分析方法中的樣品基質和標準溶液基質不同，對樣品濃度的定量不宜。

2. OSHA Method No. 71, 1989，所採用的採樣介質，是 37 mm 的玻璃纖維濾紙經硫酸處理過。樣本萃取後再經 Heptafluorobutyric acid anhydride (HFAA) 的衍生反應，以 GC/ECD 進行分析，在實際的運用上有其不便性⁽¹⁴⁾。

目前我國勞委會所公告的採樣建議方法中^(8,14,15)，採樣的介質有玻璃纖維濾紙加矽膠管及衝擊瓶等方式。前者之方法編號 2326 (C)，此一採樣方法目前為 C 等級，亦尚未經過驗證。介質中的玻璃纖維濾紙直徑為 13mm 之特殊規格，價格較昂貴。

本研究針對 MOCA 的物理化學的特性，利用玻璃纖維濾紙具有補集微粒子能力佳的特性，此方法除了具有 OSHA 採樣方法編號 24 的優點，包括樣本不需要作任何酸鹼值的調整和做衍生的反應。而在實際作業採樣方面，勞工也不需配帶衝擊瓶，於勞工作業現況中個人暴露的採樣上會更加的安全及方便。同時，重量輕且使用方便，成本低廉等特性之採樣及分析方法。

結 果

1、分析方法的再現性

MOCA 以甲醇配製成標準儲存液，五點濃度以 892 至 0.015 $\mu\text{g/ml}$ 為最佳線性範圍，並均能達到 0.9995 以上的良好線性關係。利用重複分析檢量線全距之高、中、低濃度，892、3.67、0.015 $\mu\text{g/ml}$ ，以確認分析方法的再現性，結果除了低濃度之面積變異係數為 5.81% 外，中及高濃度之面積變異係數個別為 0.46%、0.42% 以下，顯示本分析方法具有良好的再現性。另外，偵測極限是採 ASTM 之定義，其偵測極限為 16.63 pg ，比 OSHA Method No. 24 (480 pg) 為佳。

2、儲存及定性測試

MOCA 以甲醇為儲存基質，不論是在室溫或是 4℃ 冷藏儲存，其穩定性在 28 天內皆可在 90~110% 以內，而以 0.1N HCl 為儲存基質，在冷藏儲存的第 14 天以後，其穩定性已超過 90~110% 之範圍。另外，MOCA 在玻璃纖維濾紙中儲存，其穩定性皆可在 2% 以內。由結果顯示，MOCA 在濾紙上亦具有良好的穩定性。

3、各種纖維濾紙捕集效率比較

評估各種纖維濾紙對捕集之差異，選擇 3 種濾紙以 Gelman Sciences Type A/E、Whatman Type GF/A 兩種為玻璃纖維濾紙，另外 Pallflex Type 2500QAT-UP 石英濾紙做比較評估。各採樣組使用個人採樣泵，皆以 1 L/min 的流率採集。結果顯示以 Gelman Sciences Type A/E 玻璃纖維濾紙相比，石英濾紙之相對變異介於 84.2~95.7%；而 Whatman Type GF/A 玻璃纖維濾紙之相對變異介於 97.6~101.7% 之間，顯示在 MOCA 的捕集上 Gelman Sciences Type A/E 和 Whatman Type GF/A 玻璃纖維濾紙具有相同的良好效果。

4、玻璃纖維濾紙對 MOCA 的添加回收率

Gelman Sciences Type A/E 的玻璃纖維濾紙上添加 0.5、1 及 2 個 PEL 的添加回收率均介於 100.5% 至 101.2% 之間，三者濃度的變異係數 (CV%) 均在 0.70% 以下，分析變異係數 (CVa%) 也可在 0.59% 以下。

5、玻璃纖維濾紙搭配矽膠管之採樣組合

在本研究共進行 12 組採樣，每組皆使用個人採樣泵以 1 L/min 的流率採集 120 分鐘，經分析結果顯示，MOCA 經加熱成蒸氣後，經過暴露槽到採樣介質，在玻璃纖維濾紙之後的矽膠管 (200/100 mg) 的前後段，皆沒有任何 MOCA 成份被檢出。顯示此結果與文獻所陳述亦同⁽¹³⁾。

6、濾紙破出實驗

是利用濾紙所採集到的濃度，再以秤重的方式及比較前後段濾紙之濃度，各採樣組使用個人採樣泵，皆以 1 L/min 的流率採集。共採集 12 組並秤種各前段所採集之 MOCA 重量介於 0.36~20.23 mg。各組後段濾紙經分析之濃度，其破出率皆在 0.12% 以下。顯示 MOCA 於室溫下皆以固態存在，故利用玻璃纖維濾紙亦能達到有效的捕集。

7、分析品質管制

在本研究和 OSHA Method No. 24 方法之品質管制比較上，本研究在滯留時間、波峰面積及波峰高度之變異係數為 0.44%、1.05%、3.75% 以下，而 OSHA Method No. 24 方法

之波峰高度和面積之變異係數分別為 3.31 和 4.09%。

在短時間二重複分析中，相對差異百分比均在 0.5% 以內，顯示本研究之分析數均具有良好之代表性。

另外。無論在 0.1N HCl 為基質，或甲醇為基質的當日線性迴歸 (r) 都小於 0.998 以上，但在 0.1N HCl 為基質的不同日（五條檢量線）在斜率和截距上皆有少許的變化。而以甲醇為基質之多重檢量線的斜率相同，只有在截距項上有少許差異，顯示以甲醇為基質在分析上可達到較良好的準確性。

結 論

本研究利用高效率液相層析儀及紫外光偵測器 (HPLC/UV) 進行 MOCA 的採樣分析，經實驗證實在採樣方面，以玻璃纖維濾紙對 MOCA 具有極佳捕集效果，是一種有效的採樣介質，以及具有不會破出，與文獻吻合，儲存？定性佳和簡易萃取的優點。樣品處理所使用的有機溶劑少量，萃取時間短，在萃取後可直接進行 HPLC 分析。分析方面，採用的分析方法靈敏度高、再現性良好，單一樣本分析時間只需要 10 分鐘即可結束。與 OSHA Method No. 24 中的衝擊瓶相比較，玻璃纖維濾紙的重量很輕，不論是定點採樣或是勞工個人採樣，皆比 0.1N 的 HCl 來的安全和方便。樣本處理上不需要做 pH 值的調整，以甲醇為萃取液，利用超音波振盪萃取和離心後可直接進行 HPLC 分析。與 OSHA Method No.71 相比較，玻璃纖維濾紙之前處理不需要進行任何的衍生反應，樣本處理快速，廢液產生的量少。

在本研究中，樣品最後的溶劑和標準品配製所使用的溶劑均為甲醇，於相同基質的條件下，對於樣品的定量，更能夠獲得精確的結果。

謝 辭

本研究承蒙行政院國科會 (NSC 93-2320-B-039-015) 中國醫藥大學學術發展委員會提

供研究經費 (CMU92-RM-01), 及行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所部分經費贊助下
得以順利完成, 謹此致謝。

參考文獻

1. McQueen CA, Maslansky CJ, Crescenzi SB, and Williams GM.; “ The Genotoxicity of 4,4’-Methylenebis-2-chloroaniline in Rat, Mouse, and Hamster Hepatocytes, TAAP 1981;58:231-235.
2. Shivapurkar N, Lehman TA, Schut HAJ and Stoner GD. DNA Binding of 4,4’-M-(2-)(MOCA) in Explant Cultures of Human and Dog Bladder, *carlet* 1987;38:41-48.
3. Hosien HR, and VAN Roosmalen PB; Acute Exposure to Methylene-bis-ortho chloroaniline(MOCA). *AIHA* 1978;(39):496-497.
4. Bruce Chin, Tobes MC, and Han SS. Absorption of 4,4’-Methylenebis [2-chloroaniline] by Human Skin. *ER* 1983;32:167-178.
5. Reid TM, Gayle DeBord D, Cheever KL, Savage Jr RE. Mutagenicity of N-OH-MOCA (4-amino-4’-hydroxylamino-bis-3,3’-dichlorodiphenylmethane) and PBQ (2-phenyl-1,4-benzoquinone) in Human Lymphoblastoid cells. *TL*. 1998;95:205-210.
6. Ichikawa Y, Yoshida M, Okayama A, Hara I, and Morimoto K. Biological Monitoring for Workers Exposed to 4,4’-Methylenebis(2-chloroaniline). *AIHA* 1990;51(1): 5-7.
7. Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. *IARC* 1993: 57:271-303.
8. 4,4’-Methylenebis-(2-chloroaniline)[MOCA]. Occupational safety &health administration U.S. Department of Labor, Sampling & Analytical Method, Method no. 24, 1981.
9. Gristwood W, Robertson SM, and Wilson HK. The Determination of 4,4’-Methylenebis(2-Chloroaniline) in Urine by Electron Capture Gas Chromatography. *JAT* 1984;8:101-105.
10. McKerrel PJ, Saunders G A and Geyer R.; Determination of

- 4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) in Urine by High-Performance Liquid Chromatography. *jchromb* 1987;408:339-401.
11. Vaughan GT, Kenyon RS,; "Monitoring for Occupational Exposure to 4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) by Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Haemoglobin Adducts, Blood, Plasma and Urine," *jchromb* 1996;678:197-204.
 12. Linch AL, O'Connor GB, Barnes JR, Stanley Killian A, JR., and Neeld WE. Methylene-bis-ortho-chloroaniline(MOCA) : Evaluation of Hazards and Exposure Control. *AIHA* 1971; 32:802.
 13. Rappaport SM, and Morales R. Air-Sampling and Analytical Method for 4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline). *Anal. Chem.* 1979;15(1):19-23.
 14. -dianisidine, 4,4'-methylenebis-(2-chloroaniline), -tolidine. Occupational safety & health administration U.S. Department of Labor, Sampling & Analytical Method, Method no. 71, 1988.
 15. 3,3'-二氯-4,4'-二胺基苯化甲烷 (3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenyl-methane) .行政院勞工委員會採樣分析建議方法;方法編號 : 2326 (等級 C) .

計劃成果自評

研討會

郭錦堂、許惠悰、汪禧年，2005/4/20-25；Study of the sampling and analyzing method of the 4,4'-Methylene bis(2-chloroaniline) in the working place，第 78 屆日本產業衛生學會總會，日本東京；F102, p.387

郭錦堂、汪禧年、彭琬瑜、林靜君、范乾華，2005 年 4 月；作業環境中二鄰氯苯胺甲烷之採樣分析，2005 年工業衛生暨環境職業醫學學術研討會；C1-5, p.121

論文

Journal of Occupational and Environmental Hygiene 投稿中

行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所季刊投稿中

2002 年在我國因二鄰氯苯胺甲烷(4,4'-Methylene bis(2-chloro aniline, MOCA), 造成疑似職業性膀胱癌案例，亦是全世界首例。因此建立? 定和精確的採樣分析方法來評估勞工受到暴露程度有其急迫性需求。

本篇在日本發表後，勞動衛生相關研究所之公家機構立即與本人交換意見，希望我方能提供更詳細資料，以供修法依據。反觀我國也應加緊重視此問題的存在。