

作業環境中 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニル メタン (MOCA) の新規測定法の開発

石井健太¹⁾, 西野入 修¹⁾, 竹内靖人¹⁾, 海福雄一郎²⁾,
山本 忍³⁾, 宮内博幸³⁾, 圓藤吟史¹⁾

Development of a new method for working environment measurement of
3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane (MOCA)

Kenta Ishii¹⁾, Osamu Nishinoiri¹⁾, Akito Takeuchi¹⁾, Yuichiro Kaifuku²⁾,
Shinobu Yamamoto³⁾, Hiroyuki Miyauchi³⁾, Ginji Endo¹⁾

1) Osaka Occupational Health Service Center, Japan Industrial Safety and Health Association, Japan

2) GASTEC Corporation, Japan

3) Department of Environmental Measurement and Control, School of Health Sciences,
University of Occupational and Environmental Health, Japan

Abstract

The aim of this research is to develop a more accurate method for working environment measurement of 3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane (4,4'-methylenebis(2-chloroaniline), MOCA). We have improved one of the general methods (Method No. 71) that uses a sulfuric acid-treated glass fiber filter according to the method reported by the Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, U.S. Department of Labor, (OSHA) (improved OSHA method). Moreover, we have made further simplification of the sample preparation procedure using a more convenient derivatization reagent (JISHA method). The two developed methods were evaluated by examining the followings: recovery, reproducibility, storage stability of the samples, and limit of quantification. The recoveries from spiked samplers by the improved OSHA method and the JISHA method were 91–98% and 91–104%, respectively, without significant difference. The relative standard deviations, which represent the overall reproducibility defined as the precision, were evaluated as 1.7–6.7% and 0.9–8.9% for the improved OSHA method and the JISHA method, respectively. The recovery after storage for 5 days in a refrigerator was observed to exceed 90% in both methods. The limit of quantification was calculated to 0.001µg/sample in both methods. Therefore, these methods are able to determine a concentration equaling 0.1µg/m³, 1/50 times the administrative level at a sampling air volume of 10 L (1 L/min, 10 min). Because the sample preparation procedure for analysis of the JISHA method is easier than that of the improved OSHA method, the JISHA

1) 中央労働災害防止協会 大阪労働衛生総合センター

2) 株式会社ガステック

3) 産業医科大学 産業保健学部 作業環境計測制御学講座

原稿受付 平成 31 年 2 月 8 日

method is concluded suitable for routine work environment measurement.

Keywords : 3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane, MOCA, Working environment measurement

本研究の目的は、作業環境中 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン (4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline), MOCA) をより精確に測定するための新しい測定方法の開発とした。我々は、米国労働安全衛生庁 (Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, U.S. OSHA) が示す硫酸含浸フィルターを用いた手法 (Method No. 71) の捕集の方法を改良し (改良 OSHA 法)、さらに、新たな誘導体化試薬を用いて前処理操作の簡便化 (JISHA 法) を検討した。開発した 2 つの方法について、添加回収率、再現性、保存安定性および定量下限を評価した。改良 OSHA 法と JISHA 法の添加回収率は、それぞれ 91—98%, 91—104% であり、有意な差は認められなかった。再現性 (相対標準偏差) は、1.7—6.7% (改良 OSHA 法) および 0.9—8.9% (JISHA 法) であった。保存安定性は、ともに冷蔵保存で 5 日目まで 90% 以上の含有量保持を示した。定量下限はともに 0.001 $\mu\text{g}/\text{sample}$ であり、10 L 採気時 (1 L/min, 10 分間) に、管理濃度の 1/50 (0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) の濃度まで決定可能であった。JISHA 法は改良 OSHA 法よりも前処理が簡便であり、通常の作業環境測定に適していると考えられる。

1. 緒 言

3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン (4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline), MOCA) (IUPAC 名 : 4,4'-Diamino-3,3'-dichloro-diphenylmethane, CAS 番号 : 101-14-4, 分子量 : 267.16, 沸点 : 202 $^{\circ}\text{C}$, 比重 : 1.44) は常温では無色結晶である。MOCA はウレタンエラストマー用硬化剤としてさまざまなウレタン製品に使用されており、2016 年度の日本における製造・輸入量は約 1 000 トンである¹⁾。

MOCA は、特定化学物質障害予防規則の特定第 2 類物質、特別管理物質と指定されており、製造および取扱作業場には作業環境測定の実施が義務付けられている。現在、作業環境測定基準には、試料採取方法はろ過捕集法を、分析方法は吸光光度分析法、ガスクロマトグラフ (GC) 分析法または高速液体クロマトグラフ分析法を用いることとされている²⁾。また、管理濃度 (E) は、0.005 mg/m^3 と定められている³⁾。

近年、MOCA を取り扱う作業に従事していた複数の労働者等に膀胱がんの病歴または所見があることが判明したことから、厚生労働省は、より精度良く作業環境

中濃度を見積もるために、作業環境測定基準に基づく従来のろ過捕集法に加え、ガス状の MOCA も捕集できると考えられる米国労働安全衛生庁 (Occupational Safety and Health Administration, U.S. Department of Labor, OSHA) が示す硫酸含浸フィルターを用いた方法 (Method No. 71, OSHA 法) を併用するのが望ましいとの通達を出した⁴⁾。

そこで今回、10 分間のサンプリング時間で管理濃度の 1/10 の濃度の MOCA を測定できる方法として、OSHA 法を改良し (改良 OSHA 法)、さらに新たな誘導体化試薬を用いて前処理をより簡便にした新規測定法 (JISHA 法) の開発も行った。

2. 方 法

2.1 試 薬

MOCA および 3,3'-ジクロロベンジジン (DCB, 5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ メタノール溶液) は、それぞれ東京化成工業 (東京) および Supelco (USA) から購入した。ヘptaフルオロ酪酸無水物 (Heptafluorobutyric anhydride, HFBA) は、ガスクロマト (ECD) 分析用 (富士フイルム和光, 大阪) を用いた。N-メチルビス (トリフルオロアセトアミド) (N-methylbis (trifluoro-

acetamide), MBTFA) (98—100%) は, Thermo Scientific (USA) を用いた. トルエン, メタノール, 水酸化ナトリウムおよびリン酸二水素カリウムは, 特級試薬を用いた. 50%水酸化ナトリウム溶液は, 富士フイルム和光 (大阪) から購入した. 超純水は, 超純水装置 PURELAB flex-3 形 (ELGA LabWater 社製, UK) により精製した.

0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液は, 水酸化ナトリウム 20 g を秤量し, 超純水で 1 000 mL に定容した.

リン酸緩衝液は, リン酸二水素カリウム 136 g を秤量し, 超純水 900 mL 加え, 攪はんしながら 50%水酸化ナトリウム水溶液を約 60 mL 加え, pH 7.0 に調整後, 超純水で 1 000 mL に定容した.

抽出溶液は, DCB を内標準物質 (Internal Standard, I.S.) として用いることとし, DCB 溶液 (5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ メタノール溶液) をトルエンで希釈し, 12.5 ng/mL の溶液を調製した. 標準原液は, MOCA をメタノールに溶解させ, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液を調製した. DCB は構造が MOCA に類似しているため I.S. とした. なお, DCB は特定化学物質第 1 類物質に指定されており, 取り扱いには注意が必要である.

2.2 分析装置および分析条件

分析条件を表 1 に示した. 分析には GC-質量分析器 (MS) (Agilent, USA : GC7890A + 5975 C inert XL mSD) を用いて, 選択イオン検出/全イオン検出

(SIM/Scan) モードでデータを採集した. 定量には SIM データを用い, 定性には Scan データを用いた. カラムは VF-200ms (Agilent, USA) を用いた.

2.3 捕集および前処理

捕集および前処理は, OSHA 法に準じて行った⁴⁾. 前処理手順を図 1 に示す. MOCA の捕集には硫酸含浸フィルター (ガステック : No.303, 神奈川), カセット (SKC : 225-3LF, USA) およびポンプ (SKC, USA : Air check 2000) を用い, 捕集条件は, 1.0 L/min で 10 分間とした. 捕集後の硫酸含浸フィルターは, 超純水 (2 mL) および 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (1 mL) を加え, MOCA 硫酸塩を MOCA に遊離させ, さらに抽出用トルエン溶液 (2 mL) を加え, 振とう (2 分間) し, 遠心分離 (3 000 rpm, 10 分間) 後, トルエン層を分取した. 分取したトルエンを下記 2 つの誘導体化のために取り分けた.

2.3.1 Heptafluorobutyryl (HFB) 誘導体化 (改良 OSHA 法)

HFB 誘導体化は, OSHA 法に準じて行った⁵⁾. HFBA の誘導体化機構を図 2 上段に示す. MOCA を抽出したトルエン溶液を分取 (1 mL) し, HFBA を添加 (25 μL) 後, 室温で静置 (10 分間) し HFB 誘導体化を行った. 余剰の HFBA を分解除去するために, リン酸緩衝液 (1 mL) を加え, 振とう (2 分間) した. 遠心分離 (3 000 rpm, 10 分間) 後, トルエン

表 1 分析条件

装置	Agilent GC7890A + Agilent 5975C inert XL MSD
カラム	VF-200ms 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm
カラム温度	100 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) - 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 300 $^{\circ}\text{C}$
キャリアーガス	He 1.0 mL/min
注入方法	パルスドスプリットレス パルス圧 25 psi (1 min)
注入量	1 μL
注入口温度	250 $^{\circ}\text{C}$
MSD トランスファーライン温度	300 $^{\circ}\text{C}$
四重極温度	150 $^{\circ}\text{C}$
MS イオン源温度	230 $^{\circ}\text{C}$
Scan (m/z)	40—700
SIM (m/z)	MOCA-HFB (623, 658) DCB-HFB (609, 644)
(定量イオン, 確認イオン)	MOCA-TFA (423, 458) DCB-TFA (409, 444)

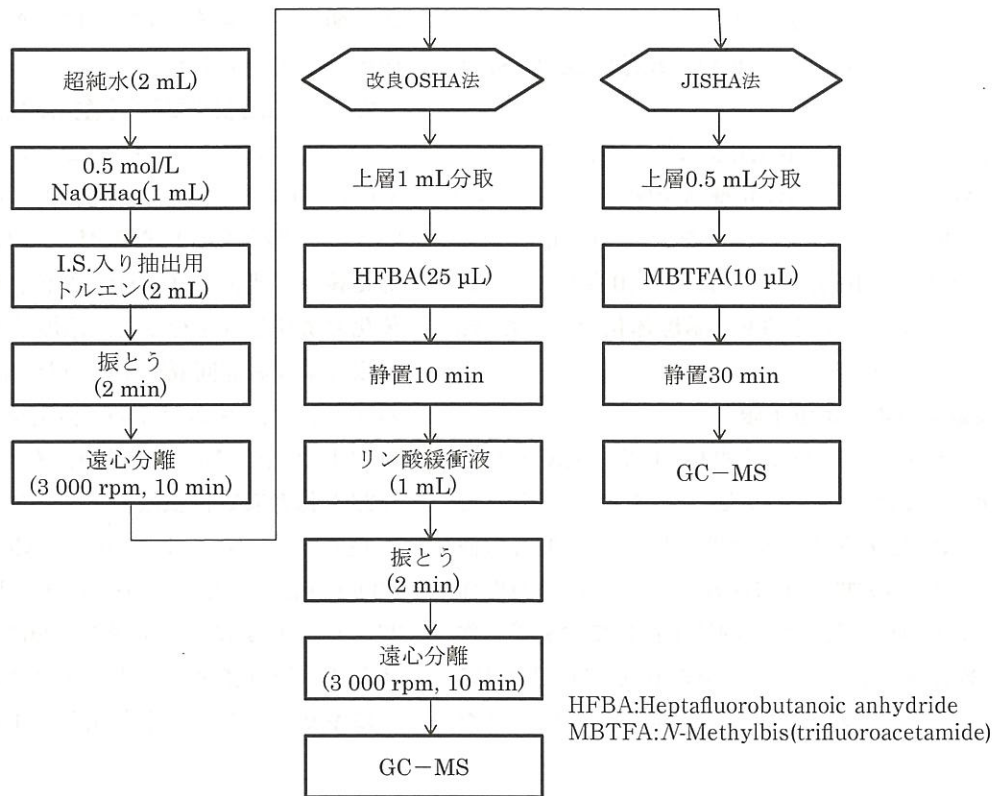


図1 前処理方法

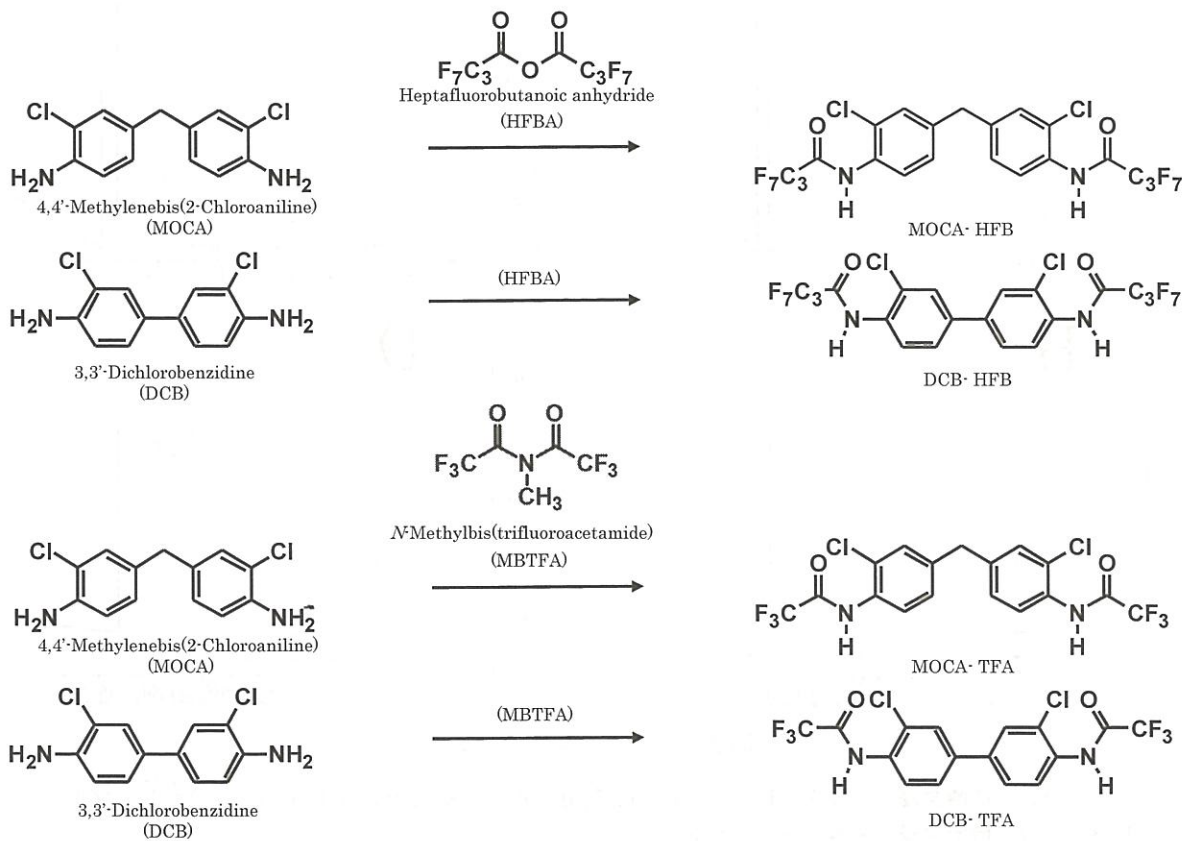


図2 HFBA と MBTFA による誘導体化機構

層をGC-MSに注入(1 μ L)した。

2.3.2 Trifluoroacetyl (TFA) 誘導体化 (JISHA 法)

TFA 誘導体化は、Takeuchiら⁶⁾の方法に準じて行った。MBTFAの誘導体化機構を図2下段に示す。MOCAを抽出したトルエン溶液を分取(0.5 mL)し、MBTFAを添加(10 μ L)し攪はん(10秒間)した。室温で静置(30分間)しTFA誘導体化を行った後、GC-MSに注入(1 μ L)した。

2.4 検量線および定量下限

標準原液をメタノールで希釈し、0.25—5 μ g/mLの範囲の標準溶液を調製した。超純水(2 mL)と0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液(1 mL)の混合溶液に各標準溶液を添加(10—50 μ L)し、その後の操作はサンプルと同様に行った。内標準法にて検量線を作成し、直線性を確認した。検量線の最低濃度(0.00125 μ g/mL)を5サンプル分析し、検量線から得られた

測定値の標準偏差(SD)の10倍を分析装置の定量下限値(LOQ)とした。

2.5 添加回収率試験(通気試験)

硫酸含浸フィルターに、MOCA標準液(0.1—5.0 μ g/mL)を添加(20—50 μ L)し、室内空気(室温22.3 $^{\circ}$ C,湿度29%)を吸引(1.0 L/min,10分間)させた後(管理濃度の1/10—2倍に相当)、抽出・誘導体化および分析を行った。添加量とフィルターからの回収量より添加回収率を求めた。両方法の添加回収率の比較には、対応のないt検定を用いた。解析には、JMP 11(SAS, USA)を用い、有意水準は5%とした。

2.6 保存安定性試験

硫酸含浸フィルターに、MOCA標準液(0.1—5.0 μ g/mL)を添加(20—50 μ L)し、室内空気(室温22.0 $^{\circ}$ C,湿度33%)を吸引(1.0 L/min,10分間)させた後(管理濃度の1/10—2倍に相当)、速やかに両端にキャップをし、冷蔵保存(4 $^{\circ}$ C)した。0日目の

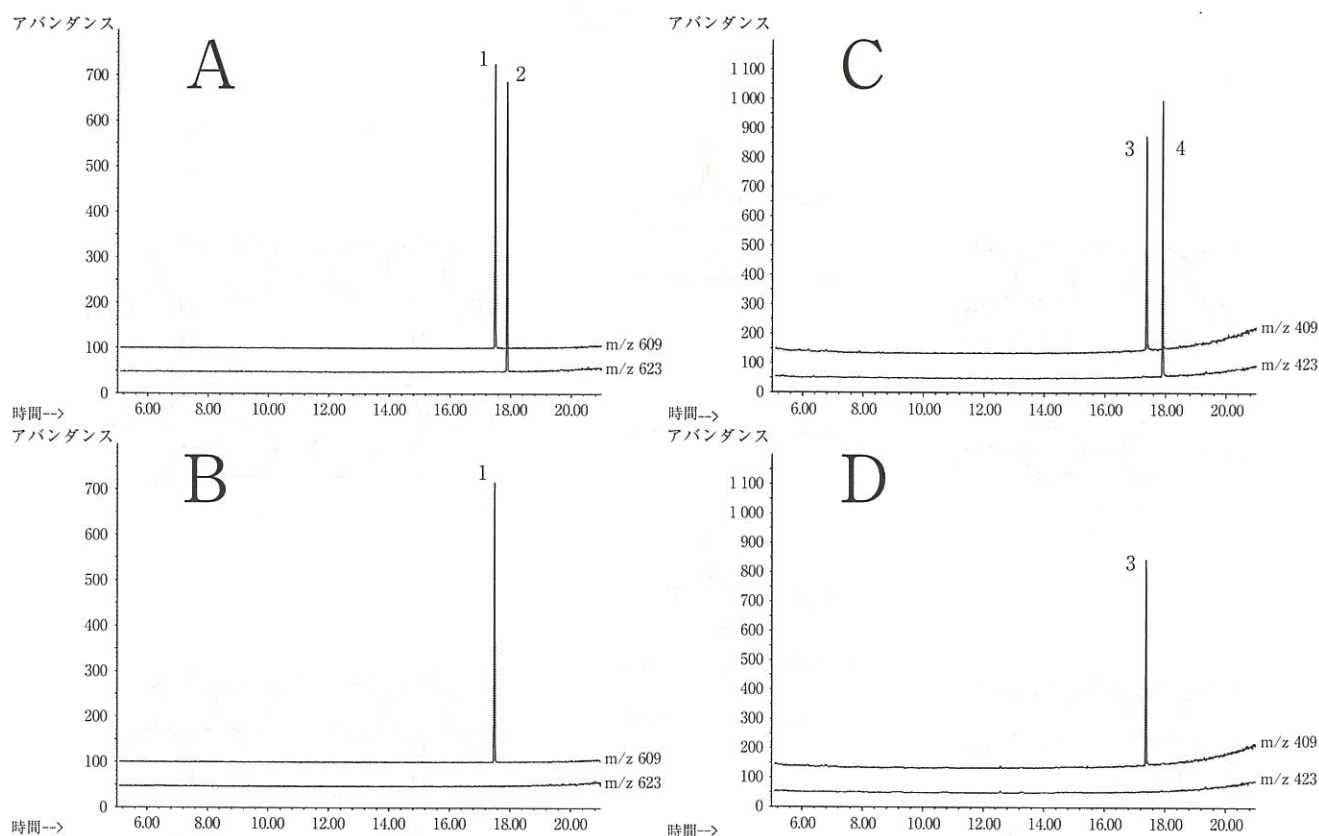


図3 SIMクロマトグラム

AおよびC：硫酸含浸フィルターにMOCAを0.05 μ g添加し、室内空気10Lを通気させたサンプル

BおよびD：硫酸含浸フィルターのブランク

Peak1.DCB-HFB, Peak2.MOCA-HFB, Peak3.DCB-TFA, Peak4.MOCA-TFA

添加回収率を基準として、1, 3, 5 および 7 日後の添加回収率との比較により、捕集後の MOCA の保存安定性を確認した。

3. 結 果

3.1 誘導体の同定およびクロマトグラム

硫酸含浸フィルターに MOCA を添加 (0.05 μg) し、室内空気を通気 (10 L) させたサンプルおよびブランクの SIM クロマトグラムを図 3 に示した。今回の検討に用いた硫酸含浸フィルターからは、MOCA は検出されなかった。DCB および MOCA の HFB 誘導体および TFA 誘導体のマススペクトルを図 4 に示した。各誘導体から塩化物イオンが 1 個脱離したイオンおよび分子イオンが検出され、それぞれを定量イオンおよび確認イオンに用いた。いくつかのカラムを検討した結果、ピーク形状およびピーク高さが最も良好であった VF-200 ms を分析用カラムとして用いるこ

ととした。

3.2 添加回収率

添加回収率試験の結果を表 2 に示す。改良 OSHA 法および JISHA 法の添加回収率は、それぞれ 91—98% および 91—104% と良好であり、両者間に有意な差は認められなかった (p 値: 0.0706—0.8420)。再現性 (相対標準偏差: RSD) も、1.7—6.7% (改良 OSHA 法) および 0.9—8.9% (JISHA 法) であり、いずれの添加量でも 10% 以下と良好であった。

3.3 保存安定性

保存安定性試験の結果を表 3 に示す。改良 OSHA 法および JISHA 法ともに、全ての添加量において 5 日間は保存率が 90% 以上であり保存可能であることが確認された。管理濃度以下の添加量においては、7 日目以降は保存率が 90% 未満を示し、減衰が見られた。

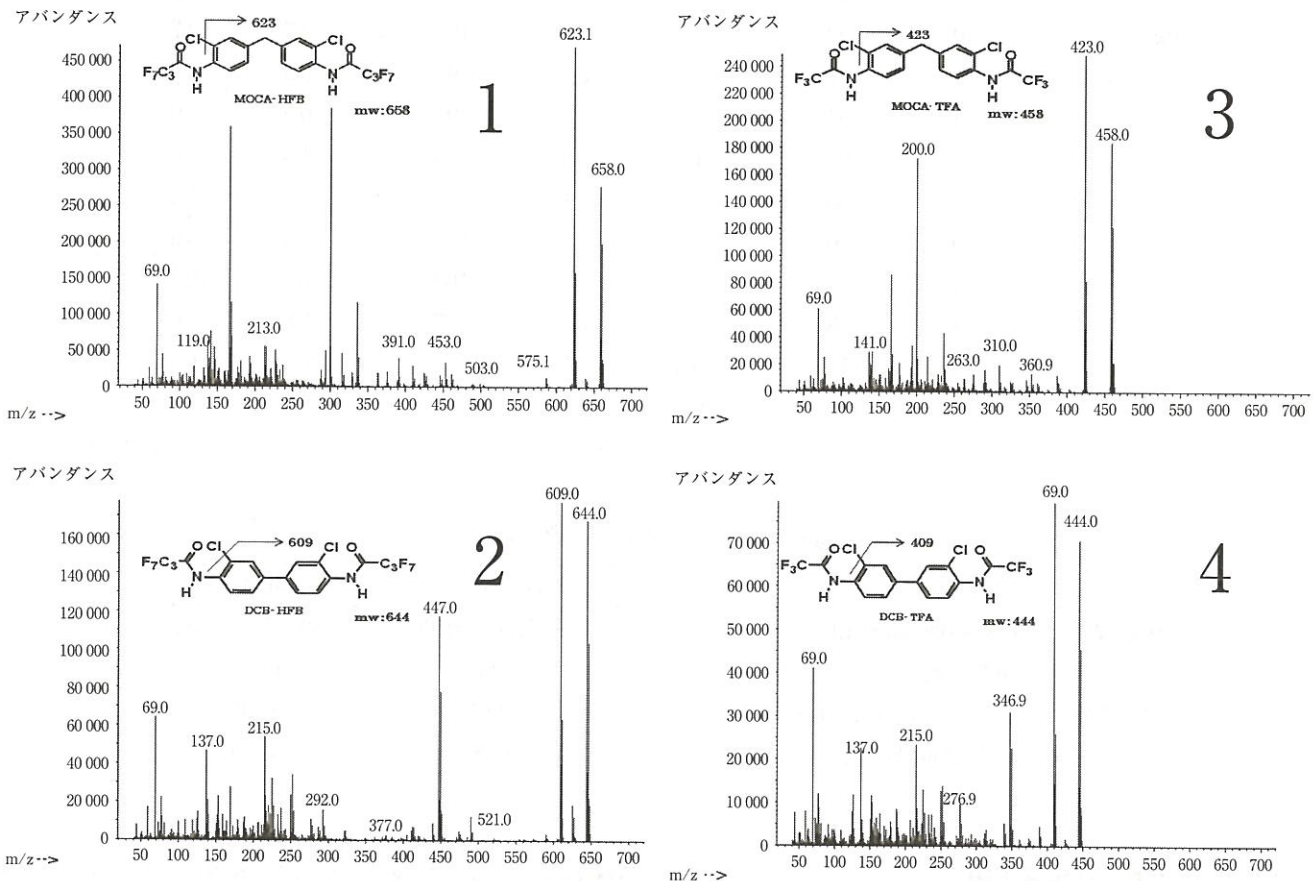


図 4 DCB および MOCA の HFB 誘導体および TFA 誘導体のマススペクトル

1: MOCA-HFB のマススペクトル, 2: DCB-HFB のマススペクトル, 3: MOCA-TFA のマススペクトル, 4: DCB-TFA のマススペクトル

表2 添加回収率

添加量 (μg)	改良 OSHA 法				JISHA 法			
	回収率 (%)		RSD (%)		回収率 (%)		RSD (%)	
	Mean	SD			Mean	SD		
0.005 (E/10 相当)	93	\pm 6.3	6.7		104	\pm 9.2	8.9	
0.025 (E/5 相当)	98	\pm 4.6	4.9		95	\pm 0.8	0.9	
0.05 (E 相当)	91	\pm 1.6	1.7		91	\pm 2.1	2.3	
0.1 (2E 相当)	96	\pm 3.7	3.8		98	\pm 6.1	6.2	

n=5

表3 保存安定性

添加量 (μg)	保存日数	改良 OSHA 法				JISHA 法			
		保存率 (%)		RSD		保存率 (%)		RSD	
		Mean	SD	(%)	(%)	Mean	SD	(%)	(%)
0.005 (E/10 相当)	0	100	\pm 5.0	5.0		100	\pm 8.9	8.9	
	1	96	\pm 3.9	4.0		104	\pm 1.0	1.0	
	3	99	\pm 6.5	6.6		102	\pm 3.1	3.1	
	5	96	\pm 10.4	10.9		105	\pm 7.0	6.7	
	7	85	\pm 5.7	6.7		89	\pm 4.6	5.2	
0.05 (E 相当)	0	100	\pm 2.8	2.8		100	\pm 2.7	2.7	
	1	91	\pm 1.3	1.4		97	\pm 3.5	3.5	
	3	94	\pm 2.3	2.4		91	\pm 0.9	1.0	
	5	94	\pm 1.3	1.3		96	\pm 1.8	1.8	
	7	88	\pm 2.1	2.4		85	\pm 4.6	5.3	
0.1 (2E 相当)	0	100	\pm 4.0	4.3		100	\pm 3.5	3.6	
	1	113	\pm 8.1	7.7		100	\pm 10.4	10.8	
	3	98	\pm 6.9	7.6		93	\pm 9.8	11.0	
	5	112	\pm 5.5	5.3		111	\pm 6.7	6.3	
	7	110	\pm 0.5	0.5		103	\pm 5.2	5.3	

n=3

表4 検量線および定量下限

		改良 OSHA 法	JISHA 法
検量線	直線範囲 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.00125—0.0500	0.00125—0.0500
	相関係数	1.000	1.000
定量下限	捕集量 ($\mu\text{g}/\text{sample}$)	0.001	0.001
	10 L 採取時の気中濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.100	0.100

3.4 検量線および定量下限

改良 OSHA 法および JISHA 法の検量線および定量下限を表4に示す。両手法ともに、検量線は実験濃度範囲で直線性を示し、分析装置の LOQ は、それぞれ

0.001 $\mu\text{g}/\text{sample}$ であった。作業環境測定における 10 分間サンプリング時 (10 L 採気) の定量下限値は、0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (E/50) となった。

4. 考 察

本研究の目的は、MOCA について管理濃度の 1/10 の濃度まで測定可能な作業環境測定方法の開発であった。しかし、MOCA は揮発しにくいため誘導体化し揮発性を持たせなければガスクロマト分析はできない。そのために、我々はまず、OSHA 法の適用について検討した。OSHA 法では、ガスクロマト分析に電子捕獲型検出器 (ECD) が用いられており、100 L 採気時の定量下限は、 440 ng/m^3 (44 ng/sample) と報告されている⁵⁾。採気量がその 1/10 となる作業環境測定に適用可能とさせるためには、分析法の高感度化が求められた。そこで、OSHA 法の前処理方法および分析方法の改良を行った。まず、検出器を ECD に代えて一般的に普及している四重極 MS を用いることにより、検出感度および選択性を向上させた。前処理方法について検討した結果、硫酸含浸フィルターからの抽出 (振とう) 時間は、10 分間から 2 分間に短縮可能であった。また、OSHA 法では捕集後の硫酸含浸フィルターは、10 時間以内に脱イオン水の入った試験管に入れて保存するとされている⁵⁾が、この操作がなくても 5 日までは安定であることが明らかになった。添加回収率および保存安定性は、良好な結果を示し、管理濃度の 1/50 の濃度まで測定可能で、より実用的な方法に改良できた。

しかしながら、OSHA 法は、余剰な HFBA の分解、副生成物のヘプタフルオロ酪酸の除去を行う必要があるため、前処理が煩雑で時間を要する問題がある。これを解決するために、HFBA に替えて、我々が尿中 MOCA の分析で使用している MBTFA による誘導体化⁶⁾を用いることを検討した。MBTFA による誘導体化は、それ自体および誘導体化反応の主な副生成物 (*N*-メチルトリフルオロアセタミド) が安定かつ揮発性であるため⁷⁾、分解除去操作を行う必要がなく、GC-MS に直接注入することが可能となる。同一サン

プルを改良 OSHA 法と JISHA 法で分析し、比較した結果、添加回収率、保存安定性および定量下限ともに、両者に有意な差は認められなかった。改良 OSHA 法と比較して、JISHA 法は、前処理操作が大幅に簡便と判断できる。

5. 結 論

我々は、作業環境中 MOCA を精度良く測定できる方法を開発した。改良 OSHA 法および JISHA 法は測定感度が向上し、管理濃度の 1/50 の濃度まで測定することが可能である。さらに、新たに開発した JISHA 法は、OSHA 法よりも前処理操作が簡略化され、分析業務の効率化に寄与するものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) 経済産業省. 一般化学物質等の製造・輸入数量 (28 年度実績) について (公表).
https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/information/H28jisiseki-matome.html
- 2) 作業環境測定基準. 平成 30 年 4 月 20 日 厚生労働省告示第 213 号.
- 3) 作業環境評価基準. 平成 29 年 4 月 27 日 厚生労働省告示第 186 号.
- 4) 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MOCA) の測定方法について. 平成 30 年 10 月 19 日 基安化発 1019 第 3 号.
- 5) U. S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. Sampling and Analytical Methods. No.71, 1989.
- 6) Takeuchi A, Namera A, et al. A Method for Routine Analysis of Urinary 4,4'-Methylenebis (2-Chloroaniline) by Gas Chromatography-Electron Capture Detection. J Occup Health 2014; 56 (5) : 347-350.
- 7) Karl Blau, John Halket, (監訳) 中村洋. 分離分析のための誘導体化ハンドブック. 丸善株式会社, 1996 : 37.