

R
008-8
4741

私立中山醫學院醫學研究所

碩士論文

指導教授： 陳 文 貴 教授

甲苯之生物檢測與在肝微粒體酵素系統中之代謝

THE BIOLOGICAL MONITORING OF TOLUENE AND ITS
METABOLISM IN LIVER MICROSOMAL ENZYME

研究生： 胡 超 群

中華民國八十三年七月



本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之
必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩
士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

清華大學原子科學研究所教授

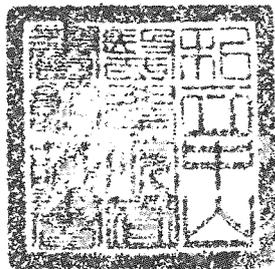
楊東雄

高雄醫學院醫事技術學系教授

楊德賢

中山醫學院研究所教授
(論文指導教授)

陳文貴



中華民國八十三年七月

中 文 摘 要

本研究測定以甲苯為主要溶劑之塗料工廠二十三位員工尿液中甲苯與另一使用溶劑二甲苯之代謝物，探討甲苯之生物檢測所得之數據與環境測定值之關係，發現甲苯代謝物中之馬尿酸，二甲苯代謝物中之甲基馬尿酸與員工個人採樣器所呈現之個人環境曝露量，呈正相關性。而臨床生化值中可作為初期腎傷害指標之乙醯葡萄糖胺酸酵素之活性，在甲苯高曝露組($> 1/10$ PEL) 員工尿液中亦明顯的高於低曝露組($P < 0.05$)，顯示甲苯之生物檢測雖然主要以尿液中代謝物之含量為依據，但由甲苯曝露所引起之臨床生化值改變亦可做為輔助性之數據，以評估環境中甲苯對個人健康之影響。

因為一般工廠所使用之甲苯中往往混有其他有機溶劑，如本研究採樣之工廠，其溶劑除甲苯外亦含有二甲苯及少量之乙基苯。為了進一步了解其他有機溶劑對甲苯代謝機制之影響，本研究以鼠肝微粒體酵素系統為模本，比較二甲苯、正丁醇對甲苯在此酵素系統中形成苯甲醇之效應，發現兩者均會抑制甲

苯之代謝，而且二甲苯以較高之比率降低苯甲醇之形成。如比較二甲苯及正丁醇對對硝基酚之代謝抑制作用發現兩者以相同的比率干擾對硝基酚之代謝物對硝基二酚之形成，顯示二甲苯較專一性的抑制甲苯之代謝。

本研究另外再探討甲苯曝露與微粒體中脂質過氧化形成之關聯。結果顯示甲苯代謝會引發微粒體脂質過氧化程度之上昇，而此機制可能與細胞色素P450 氧化酵素及其輔助因子NADPH 有關。

Abstract

Toluene, as one of the most abundant organic solvents in industrial usage, is thought to be an important environmental and occupational pollutant. This xenobiotics is mainly absorbed by respiratory inhalation and skin infiltration, then oxidized in liver cytochrome P450 monooxygenase. The final products of toluene in urinary excretion were the glycine conjugated benzoic acid termed hippuric acid and ring hydroxylated toluene like o-, m-, p-cresols. By comparing the environmental concentration of toluene in work place and urinary metabolite from exposed workers or biological parameter, this study estimates the value of biological monitoring for the assessment of human exposure to toluene.

The urinary metabolites of toluene and xylene from the exposed worker showed a proportional

correlation with time average concentration of solvent in the breath zone between the concentration of exposed solvent, and urinary metabolites.

It's interested to find that NAG value, which were used as an index of early kidney damage, has shown an significantly increasing on the high exposed worker, this data suggested that the biological monitoring of toluene no only reflect the environmental exposure but also provide some informations to evaluate the target organ damage and solvent detoxification.

The other aspect of this study is to investigate the in vitro metabolism of toluene in microsomal enzyme system. Xylene, as one of the structural analogue of toluene, showed a higher inhibition than n-butanol (xylene 40.2% , n-butanol 23.2%) ratio to benzyl alcohol formation, but comparing with the

metabolism of p-nitrophenol in microsomal enzyme system, xylene showed the some inhibition ratio with n-butanol to p-nitrocatechol formation.

The MDA concentration also elevated in microsomal portion with increasing the toluene exposure. This enhancement will be decreased by depleting the NADPH generating system from microsomal enzyme. This result suggested that the metabolism of toluene would be inhibited by the coexposure of other solvents in different ratio and the induce effect of toluene to microsomal lipid peroxidation mediated by cytochrome P450 metabolism can be used as a basis to evaluate the biological monitoring toxicity of toluene when coexposed to other solvents.

目 錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
誌 謝.....	VI
目 錄.....	VII
圖表目錄.....	VIII
緒 論.....	1
實驗設備及材料.....	8
1. 儀器設備.....	8
2. 消耗性材料.....	8
3. 藥品及試劑.....	9
實驗方法.....	10
一、甲苯之檢測.....	10
1-1 甲苯代謝物基本測定條件之建立.....	10
1-2 現場環境採樣及檢體測定.....	11
二、甲苯在肝微粒體酵素系統之代謝.....	14
2-1 肝微粒體之分離.....	14
2-2 蛋白質含量之測定.....	15
2-3 甲苯在肝微粒體之代謝反應.....	17
結果分析.....	22
討論.....	27
參考文獻.....	35

圖11：BCA 總蛋白質測定法之標準曲線圖.....	52
圖12：在肝微粒體中，正丁醇，二甲苯對甲苯代謝之抑制 作用.....	53
圖13：對硝基苯在不同濃度肝微粒體中之代謝效率.....	54
圖14：肝微粒體中正丁醇，二甲苯對 p-nitrophenol 代謝 效率之抑制作用.....	55
圖15：肝微粒體在不同濃度之甲苯下，脂質過氧化之程度.....	56
圖16：正常人尿液中添加三氯醋酸與甲苯、二甲苯代謝物 標準品之層析圖.....	57

圖 表 目 錄

序 號	頁 次
表 1：CS ₂ 對添加不同濃度之有機溶劑活性碳及被動式 採樣器之脫附效率.....	41
圖 1：甲苯與二甲苯在尿液中代謝物之紫外線吸收光譜.....	42
圖 2：甲苯與二甲苯在尿液中代謝物之紫外光吸收光譜(續).....	43
圖 3：甲苯與二甲苯在尿液中代謝物之 HPLC 層析圖.....	44
圖 4：採樣工廠空氣之氣相層析圖.....	45
圖 5：未知物質譜和質譜資料庫比對圖.....	46
圖 6：未知物質譜和質譜資料庫比對圖(續).....	47
圖 7：現場工作人員被動式採樣器所測得之甲苯曝露量 和尿液檢體中馬尿酸含量之相關圖.....	48
圖 8：被動式採樣器測定之二甲苯曝露量和尿液檢體中 甲基馬尿酸含量之相關分析圖.....	49
圖 9：現場工作人員中甲苯曝露值與低曝組尿液中 NAG 活性平均值比較圖.....	50
圖 10：現場工作人員中甲苯曝露值與低曝組尿液 PH 值 之比較圖.....	51

誌 謝

時光荏苒，三年研究生的日子匆匆已過，期間承蒙指導老師陳文貴教授悉心指導，使學生無論在實驗精神、待人處事及個人研究領域視野之開拓上多有啓發。僅此致上最誠摯的謝意。

本論文之完成，要特別感謝工業技術研究院工業安全衛生研究中心，余榮彬組長、施慧中小姐、胡安仁先生等在實驗設計及方法應用上之指導與建議，另外得感謝中山醫學院營養系主任陳肅霖教授在分析測定上之指導，使研究工作得以順利進行。謹於此誌謝。

最重要的是要感謝父母親多年來鼓勵及栽培，加上中山醫學院所提供之進修之機會，方能使個人得以安心並順利的完成學業。

最後，得感謝口試委員清華大學原子科學研究所楊末雄教授、高雄醫學院醫技系林德賢教授對本論文詳盡之指正，使個人獲益良多，謹表謝意。

緒 論

生物偵測 (biological monitoring 依 American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) 在所謂 Biological Exposure Index (BEI) 之定義如下，藉著收集及分析生物樣品中，各種污染物及代謝物的濃度，或其他生化值，甚至切下之任何組織，和參考值比對後，據以評估環境中的暴露量及暴露後對健康之影響，並藉以改善這種污染狀況 (1,2)，生物偵測固然其基本意涵在於早期偵測出環境中污染源之存在及是否超過環境容許濃度，但其另一重要之功能是由代謝濃度與外加曝露間的關係反應出對健康的影響 (3)。

臺灣目前有關勞工職業安全之意識及法規日漸建立，但因工廠型態主要為中小型規模，而且經常使用不知名之溶劑或臨時改用其他溶劑；不可能在各工廠中普遍設置環境採樣器，如此常造成環境採樣時技術上之困難，對許多未裝設現場採樣器或經常更換有機溶劑之作業環境，可能唯有靠定期的勞工體檢加上輔助性的生物檢測，才能幫助公衛人員或醫師在職業病防

洽咨詢或臨床診斷時了解污染物質及其曝露量，進而早期防止職業病之發生或惡化 (4,5)。

甲苯對大部份非極性物質均有極佳之溶解度，因而被廣泛使用於油漆，塗料，油墨印刷及表面處理之工業製程中，在化學合成及製藥工廠中甲苯亦被當作起始反應物，而汽油中亦含有一定成份之甲苯 (約 15-20%) (6,7) 在上述環境中之工作人員注注曝露在甲苯蒸氣中，雖然甲苯相對於其他有機溶劑而言具有較低之毒性 (1)，但短期間大量或長期曝露在低劑量之甲苯對人體神經系統，肝、腎所造成之傷害仍不容忽視。

文獻上指出急性甲苯曝露可能引發免疫反應造成大量免疫球蛋白堆積於腎絲球中而形成急性腎炎 (8,9,10)，另有報告指出曝露在 1000-4000 ppm 之甲苯下可造成大白鼠學習障礙及行為改變 (11)，長期曝露在 100 ppm 下 6-20 天亦可造成小白鼠轉輸能力之下降神經功能異常及記憶力降低 (13, 14)，雖然文獻上並無明顯的器官病變案例，但有些實驗指出甲苯之曝露會造成某些酵素濃度上昇例如胺基轉胺酶(ALT)，麩胺醯基轉移酶(GLT)、琥珀酸去氫酶(Succinate dehydrogenase)

細胞色素 P450，(Cytochrome P450)等，另外如長期曝露下肝細胞內之胞器（內質網，核醣體，粒線體）亦可觀察到形態上之改變（17）。

甲苯及其他具脂肪側鏈之芳香族化合物，因其具有脂溶性及揮發性，往往由呼吸系統或皮膚擴散吸收而進入現場工作人員體內，經循環系統運送至各器官（18）其在人體之代謝主要利用肝中之細胞色素P450單氧化酵素氧化將甲苯氧化成苯甲醇或苯甲醛最後氧化成苯甲酸，苯甲酸之酸根再和甘胺酸結合生成馬尿酸（Hippuric acid），最後由尿液中排出（19），但是在另一途徑中，甲苯則經由芳香環氫氧化酵素（aryl hydroxylase）將苯環上直接接上氫氧基或體內游離之氫氧自由基（OH \cdot ）直接攻擊在芳香環上，而形成 cresol, methyl cresol（甲基酚或二甲基酚），但相對於馬尿酸而言，則此類化合物僅佔甲苯代謝物中極低之比率（約 2% 左右）（19）。

甲苯在環境中之偵測可經由數種方式來進行：(1) 利用主動式幫浦吸入作業環境之空氣經由活性碳吸附管（activated charcoal tube）吸附其中之揮發性物質，再以適當溶劑溶出後，注射入氣相色層分析儀（Gas chromatography）經層析管

分離後由燃燒離子偵測器 (Flame ionization detector FID) 測定，(2) 可由幫浦將環境空氣打入 PE 塑膠袋中收集。(3) 最後亦可將填充有活性炭之被動式採樣器 (passive monitor) 配帶於作業勞工之領口附近經一段時間後，再由氣相色層分析儀測出其中甲苯之吸附量，所得數值乘以甲苯對活性炭之擴散比率及曝露時間，計算出甲苯之環境濃度 (20,21,22)。

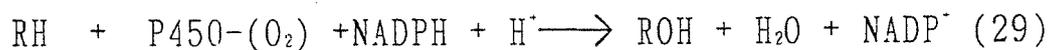
雖然目前已有許多方法可有效的偵測環境中甲苯的濃度，但因甲苯所具有之高度脂溶性，故除了經由肺部吸入外，亦可能在工作人員以甲苯為溶劑擦拭或洗滌時接觸皮膚表面而進入人體，另外有報告指出，在相同的甲苯曝露量下 (100 ppm) 靜止實驗者及運動實驗者 (50 W)，其曝露後呼出之甲苯蒸氣前者為 18 ppm，而後者昇至 31 ppm，顯示即使在同一作業環境下或環境測定出曝露在相同濃度之有機溶劑下對甲苯亦可能有不同之吸收量 (23)，所以為了管制甲苯對作業環境中人員之危害，除了環境偵測外，亦應引介入適當的生物偵測技術，以期能有效評估甲苯之曝露量及吸收量。

甲苯之生物偵測主要在測定尿液中代謝物如馬尿酸 (Hippuric acid) 或鄰甲基酚(o-cresol) 類化合物，其中尤以馬尿酸為主，因現有之前處理方式多先以有機溶劑萃取尿液中之代謝物經氮氣吹乾後，重新加入 HPLC 之移動相稀釋，注射入高液相色層分析儀中測定 (24)，雖然如此可大量減少基質之干擾，但有些揮發性代謝物如 o, m, p- cresol 類化合物則可能不易測出(尤其其含量又特別低) 所以為了防止揮發性代謝物之散失，本研究不經由萃取揮發之前處理過程，直接將尿液經濾膜過濾後打入 HPLC 中，利用不同之移動相，將甲苯及二甲苯之各種代謝物分離，希望能找出一較好之移動相及有效之前處理方式，才能將生物檢測實際應用在勞工人員之檢查。

在現場採樣方面，本研究先選取一典型之表面塗料工廠，其工作流程主要在以有機溶劑溶解之膠膜覆貼於紙面上，後再熱壓固定之，故在溶劑攪拌區與熱壓機附近均有甲苯蒸氣之發散採樣前已先了解其使用之溶劑主要為甲苯，現場採樣分為二部份，一為架設主動式採樣器於主要工作曝露區，採集定點之空氣，另一部份為配掛式被動式採樣器於工作人員領口，以模

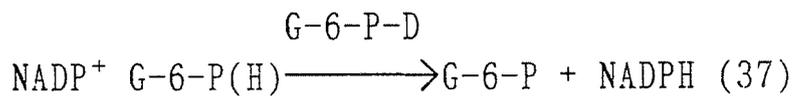
擬吸附其呼吸區之環境空氣。而本研究中甲苯之生物檢測則主要在測定尿液中甲苯及二甲苯之氧化代謝物。

為了甲苯之代謝過程及影響代謝因子有進一步之了解，有必要選取適當之模式來探討甲苯之暴露量和酵素代謝之機制。尤其和其主要代謝酵素細胞色素 P450 單氧化酶之關聯。細胞色素 P450 酵素單氧化酶為一族含血基質 (heme) 之酵素，大部存在於細胞之內質網或粒線體膜上 (26,27)，隨著不同的同功 (isozyme) 作用下，可對不同的受質進行各種氧化作用 (28)，其對單氧化反應之催化作用可以如下方程式表示：



甲苯在生物體中即利用此反應先被代謝成苯甲醇或甲基酚 (cresol)。雖然體內大部份組織及器官均含有 P450 單氧化系統，但因肝中此類酵素之含量較高，而且大部份之 P450 酵素系統及電子傳遞鏈 (此系統大都存於粒線體中，可提供電子活化反應後去活性之 P450 酵素)，均包括在肝微粒體酵素系統中 (live microsomal enzyme system) (30)，所以一般有關毒物或藥物之研究大都利用此種系統做體外之代謝研究 (31-

34) ，但因此單氧化反應所需之 輔助因子 NADPH 為水溶性，在分離微粒體之過程中會大量喪失，故在進行體外微粒體代謝時必需另外添加適量之 NADPH (35,36)。此系統如要正常運作另外還需要一種機制來還原消耗掉之 NADPH



本研究除了探討甲苯在生物檢測和環境曝露之相關性外，並以動物體或人類肝所分離出之微粒體酵素系統，探討甲苯之代謝機制。

實 驗 設 備 及 材 料

儀器設備

1. 高效液相色層分析儀 (High performance liquid chromatography, PERKIN-ELMER)
2. 氣相層析質譜儀 (Gas Chromatography/Mass Spectra, PERKIN-ELMER)
3. 環境採樣幫浦 (Sampling Pump, SKC)
4. 恆溫水浴槽 (Water bath)
5. 紫外光/可見光分光光度計 (Ultra-Violet/Visible spectrophotometer, Hitachi U-2000)
6. 離心機 (Centrifuge, Hitachi)

消耗性材料

- | | |
|-----------|---|
| 1. 液相層析管柱 | HPLC C ₁₈ Column Merck Zobox 250mm |
| 2. 前過濾管 | Guard Column |
| 3. 被動式採樣器 | SKC Passive Monitor 50244 |
| 4. 氣相層析管柱 | Gas Chromatography Column |

藥品及試劑

1. 甲苯及二甲苯之代謝物標準品均購自 Aldrich 分析級
2. 蛋白質標準品及酵素則購自 Sigma (for cell culture)
3. 氫甲烷等色層分析用溶劑則購自 Merck (pro HPLC grade)

實 驗 方 法

一、甲苯之生物檢測

1. 甲苯代謝物基本測定條件之建立

a. 最佳 UV 波長選擇

將甲苯，二甲苯之代謝物馬尿酸 (Hippuric acid)、鄰位，間位，對位甲基酚 (o-, m-, p-cresol)、methyl-hippuric acid、2,5-, 3,4,-dimethyl phenol 等及肌酸 (creatinine) 配製成 1 mM 之氫甲烷/磷酸鈉 (acetonitrile/phosphate) 溶液 (30:70) (PH-2.0)，個別測出其 190 nm 至 350 nm 之 UV 吸收光譜，以軟體將上述圖譜資料合併，找出不同之代謝物具有中等以上吸收度之波長，以此波長做為測定尿液檢體中各代謝物之檢測器波長。

b. HPLC 標準方法測定 (38)

先將各代謝物逐次加入 HPLC 移動相中，記錄各代謝物波峰出現之滯留時間 (RT:Retention time) 並隨時



調整移動相之溶液比例，以得到較好之分離效率。

c. 尿液之前處理及 HPLC 條件之修正

將添加代謝物標準品之正常人尿液 2 毫升，加入 1 毫升之 acetonitrile 振盪 2 分鐘後，以 0.45 μ m 之 nylon filter 過濾，濾液再打入 HPLC，比較發現在代謝物標準品濃度 0.1-1 mg/dl 時，其濾膜吸附率為 23.2 \pm 4%。

2. 現場環境採樣及檢體測定

採樣之工廠為一小型之塗料工廠，事先以電話連絡了解其主要以甲苯為稀釋溶劑。

a. 定點採樣：

以前端接活性碳吸附管之吸氣幫浦置放於溶劑攪拌區及作業員工作區內，打開幫浦，以定量之流速 100 ml/min 抽取環境空氣，經 2 小時後停止採樣，取下吸附管密閉儲存。

b. 個人採樣：

作業員工均發給被動式採樣器，別在領口呼吸區

(breath zone)，在下班時收回，並記錄起始及結束時間。利用中午休息時間以問卷調查其工作史及是否有抽煙及飲酒習慣。

c. 檢體運送及儲存：

活性炭吸附管及被動式採樣器於取下後立刻蓋上配屬之封蓋，註明採集地點，個人編號及採樣時間間隔，以 parafilm 封好放於 4 °C 之冰桶中。

尿液檢體亦以 parafilm 封存於冰桶中，於實驗室中再分裝為兩組，一組直接送往中山附設醫院生化科，測定臨床生化值。另一組則儲存在 -70 °C 冷凍櫃中。

d. 現場空氣品質分析

以 GC-MS 分析工廠定點採樣之空氣品質，發現其中主要含有 Toluene，Xylene (O,P) 及少量之 Ethyl benzene，配製各溶劑 1 PEL 0.5 PEL，0.25 PEL，0.1 PEL，0.05 PEL，0.01 PEL 之標準溶液 (39) (所有溶劑之 PLE均為 100 ppm)。

活性炭吸附管於切開後將活性炭倒入 2 毫升 vials

中，加入 1 毫升之二硫化碳 (CS_2) 封蓋，振盪 30 分鐘脫附，另外切開空白之活性碳管注入溶劑標準品測定其脫附效率 (表一)。〔平均為 Toluene $93.8 \pm 4.3\%$ (1-100ppm) Xylene : $96.4 \pm 5.2\%$ ，ethyl benzene $87.8 \pm 3.2\%$ 〕。另以 GC-FID，作出檢量線，以算出被動式採樣及定點採樣之環境曝露值。

被動式採樣器之處理，則為切開採樣器背面之引流管，亦注入 1 cc 之 CS_2 ，蓋上封套，置於振盪平板上振動 30 分鐘脫附，再將採樣器內之溶液倒入 2 毫升之 vial 中封存。被動式採樣器之脫附效率如前述方法測定 (Toluene $96.2 \pm 4.3\%$ ，Xylene $97.2 \pm 3.5\%$ ，Ethyl benzene $90.8 \pm 2.5\%$)。

e. 有機溶劑代謝物之分析

依前建立之 HPLC 標準方法，偵測尿液中各種代謝物之含量，比較甲苯，二甲苯環境測定值與其代謝物之相關性，並參考附設醫院測定尿液中之各種臨床生化值，探討生化值與環境有機溶劑曝露量及尿中各代謝物含

量之相關性。一般人尿液中各成份之濃度，常因體液中水份之散失及補充，但已知正常人其一天排出之 Creatinine 總量為一定值 (male = 25mg/Kg, female = 21mg/Kg)，如果將各尿液中各成份之濃度除以 Creatinine，則可排除上述之變因，故本研究以 creatinine 為基準，所有尿液生化值及代謝物濃度，均以其測定值和 Creatinine 之比值表示，以呈現其真實濃度。

f. 正常人尿液中， Hippuric acid 含量基本值之建立

因加工食品中所添加苯甲酸鈉(防腐用食品添加劑)，在一般人尿液中亦含有少量的馬尿酸，故本計畫亦分析 50 位健康成年人之尿液，以 HPLC 測定其中肌酸 (Creatinine) 和馬尿酸 (Hippuric acid) 之比值。
(Male=0.1355 ± 0.0732 g/g creatinine, Female=0.14570 ± 0.0907 g/g creatinine, Total= 0.1388 ± 0.07841 g/g creatinine)。

二、甲苯在肝微粒體酵素系統之代謝

1. 肝微粒體之分離 (40)

取新鮮之鼠肝 0.5g 以 4 °C 之 1.15% KCl 水溶液清洗，加入 3 倍之 KCl 水溶液，以均質機在 1000 rpm 下，在冰浴中研磨 2-3 分鐘，取得之均質液，放入超高速冷凍離心機中先以 10000g 在 4 °C 下離心 10 分鐘，此時破碎之細胞膜及細胞核均被離心沉澱於底層，取上清液再以 105000g 離心 60 分鐘，此時內質網及粒線體等胞器之微粒體即被拉至底部沉澱，倒去上清液，以 4 °C 之二次水 2 cc 將離心管內之蛋白質沖洗成懸浮液，立即進行代謝實驗或冰凍儲存於 -70 °C 之冰櫃中。

2. 蛋白質含量之測定

a. 總蛋白質測定 (41)

BCA 蛋白質濃度分析法

蛋白質中之硫氫基 (-SH) 在鹼性狀態下可將 Cu(II) 還原成 Cu(I)，而 Biocinchoninic acid (BCA) 可專一性的和 Cu(I) 形成藍色之錯化合物，在 UV 波長 562 nm 下有強吸收度，故和標準蛋白溶液

BSA (Bovine serum albumin) 比對可換算出待測物中之總蛋白質含量。

試劑 A: 1 升之 0.1N 氫氧化鈉鹼性溶液中含 10g 之 Biocinchoninic acid (BCA), 20g 碳酸鈉 (Na_2CO_3), 9.5g 碳酸氫鈉 (NaHCO_3) 及 1.6 g 之檸檬酸鈉 (sodium citrate)。

試劑 B: 4% 之硫酸銅 (CuSO_4) 溶液

將試劑 A.B 以 50:1 之比例混合即為 BCA 蛋白質濃度測定試劑，取 2 毫升之 BCA reagent 和不同濃度 (10, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g/ml}$) 之 Bovine serum albumin (BSA) 蛋白質標準溶液 2 毫升混合後，在 37°C 水浴下作用 30 分鐘，於 UV 光譜儀中測定波長 562 nm 之吸光度，以吸光度和蛋白質標準濃度作一檢量線，接著以稀釋之未知濃度蛋白溶液，如同上法測定其在 562 nm 之吸光值，對照標準曲線公式，以內插法算出其濃度，本方法另需作一個空白試管以減去淨吸收值 (net asorbance)，因 BCA 形成之錯化合物易沾附於玻璃或石英之 Cuvett 表面

，可能會影響下一組吸光值之測定，故本實驗以多組

可丟棄式之 plastic cuvet 替換。

b. P450 酵素系統之活性測定 (42)

P450 3A 在 P450 酵素族羣中佔有一定之比例，
而 p-nitrophenol 為 P450 3A 酵素之特殊受質
(Specific substrate) 故本實驗加 0.05 mM 之
p-nitrophenol 於不同濃度之微粒體酵素系統中，於
37% 水浴後測定其代謝物 p-nitrocatechol 之濃度
，以換算出 P450 酵素之活性。

3. 甲苯在肝微粒體之代謝反應 (43,44)

a. 甲苯和其他有機溶劑代謝之交互作用

微粒體酵素系統因在分離過程中喪失大部份之水
溶性輔助因子，故必須另外添加 NADPH 循環再生系統
才能進行代謝。

總代謝反應試劑之體積為 1 毫升其中含有：

① 0.2ml 之微粒體酵素 (以含 0.9mg 之蛋白質為

基準，依實驗活性要求可含 0.2mg-2.2mg)

②0.2 ml 之 1.15 % KCl

③0.4 ml 之 0.2 M 磷酸鉀緩衝溶液 (Potassium buffer PH=7.4) 其中含有 NADPH 循環再生系統——2 μ mole 葡萄糖-6-磷酸 (G-6-PD) 0.2 μ mole NADPH, 1 μ mol $MgCl_2$ 0.2 unites 葡萄糖-6-磷酸去氫酶(G-6-PD)(1 unit =在 37°C, PH=7.8, 在 NADP 存在下, 每分鐘可將 1 μ mole之葡萄糖-6-磷酸氧化成葡萄糖-6-磷酸根之酵素量)

將上述試劑混合後注入 2 ml 之 vials 中立即封蓋。

為防止有機溶劑之揮發, 此時才將 0.2ml 中含不同濃度的有機溶劑的 KCl 水溶液(1.15%) 以微量注射筒注入 vial 中, 在 37°C 下水浴。在不同時間下取出 vials 加入 0.25ml 之 $ZnSO_4$ 及 $Ba(OH)_2$ (15%) 振盪 15 min 使蛋白質沉澱, 中止酵素之反應。

c. 微粒體代謝物之測定

代謝後之反應試劑以 3000 rpm 離心 10 分鐘,

取上清液經 0.45 μm 之 nylon filter 過濾，以 HPLC 測定其中代謝物之含量。

HPLC 測定條件如下：

Column : Merck C_{18} 250mm

流速 : 1 ml/min

移動相(mobile phase) : 60% Potassium phosphate
buffer (PH=4.7)
acetonitrile

d. 微粒體中脂質過氧化之測定

細胞膜或細胞中之脂肪在自由基或雙氧陰離子之攻擊下可將其烯類即碳雙鍵部份裂解而產生 malodialdehyde (MDA) 而 Thiobarbituric acid (TBA) 可和 malodialdehyde 在高溫下反應形成一種複雜之產物，此種產物在 532-535nm 及 265-290nm 有最大吸收峰，所以利用此種反應後產物之吸光值可間接的由 malodialdehyde (MDA) 之濃度評估微粒體中脂質過氧化之程度。

TBA 反應 (45) :

反應後之微粒體離心後取上清液(將蛋白質濃度調節在
0.1-2.0mg 間)

Thiobarbituric acid (0.67% W/V) 溶解在 50%
(W/V) 的冰醋酸中

磷鎢酸 (Phosphotungstic acid) 10% W/V

1/12N 硫酸

n-butanol

離心後之上清液取 0.5 毫升加入 4 毫升之 1/12 N
硫酸水溶液和 0.5 毫升磷鎢酸。振盪 5 分鐘後離心
，以滴管吸出上清液，再加入 2.0 毫升之硫酸水溶
液 (1/12N) 及 0.3 毫升之磷鎢酸，振盪混合均勻，再
重新離心，此時蛋白質及脂質均被酸性之磷鎢酸所沉
澱，而能和 thiobarbituric acid 反應之水溶性雜
質則在二次離心中移至上清液中被洗去，二次離心後
之沉澱物以 4 毫升之二次水沖開，振盪混合加入 1
毫升之 TBA 醋酸溶液，密封後在 95℃ 下水浴 60 分
鐘，反應後之溶液再以 2 毫升之正丁醇 (n-

butanol) 將 TBA-MDA 反應產物萃取出來，3000 rpm 下離心 10 min，以滴管將上層溶有 TBA-MDA 反應產物之正丁醇層吸出 1 毫升，在抽氣櫥中以氮氣吹乾，俟正丁醇揮發後，放入 10 cc 之試管中，再加入 2 毫升之高液相色層分析之移動相(詳下)。離心後取上清液 10 μ l，以 HPLC 測定 TBA-MDA 之含量，在進行 TBA 反應前即以高純度之 malondialdehyde 配製成不同濃度之標準溶液和待測之試劑同時進行 Thio-barbituric acid (TBA) 反應，由 UV 偵測出之波峰面積比上標準溶液之濃度，即可做出檢量線，依此檢量線即可計算出待測物中 malodialdehyde 之含量。

HPLC 之測定條件 (for TBA-MDA adduct)

管柱 Merck C₁₈ 250mm

前過濾管柱 guard column Merck RP-18

移動相(mobile phase) acetonitrile/water (20/80)

流速 (flow rate) 1.2 ml/min

UV 偵測波長 280 nm

滯留時間 (Retention time) 7.2 min

結果分析

甲苯及二甲苯在尿液中之代謝物加上做為標準校正之肌酸酐 (creatinine) 共有 9 種之多，各有不同之紫外光譜及最大吸收波長，如單取某種代謝物之最大吸收波長做為高液相色層分析儀之紫外線偵測波長，則可能喪失對其它代謝物之靈敏度(其他代謝物可能在此波長下只有極低之吸光值)，所以本實驗將各代謝物在紫外光波長 190-280 nm 之光譜每隔 5 nm 之吸光度數值輸入電腦以 Sigma plot 4.1 軟體將其轉換為平滑之光譜圖，再將各光譜圖合併呈現，計算各光譜在同一波長下各代謝物之吸光值，發現在 215 nm 紫外線照射下，同濃度之各代謝物吸光值最接近 (SD \pm 15.23%) (見 Fig 1.2) 故選取 215 nm 為高液相色層分析儀中紫外線偵測器 (UV detector) 之波長。

文獻中有關甲苯及二甲苯代謝物之高效液相色層分析法中均主要以甲醇/磷酸鈉緩衝液 (Methanol/sodium phosphate buffer) 為移動相，其最大滯留時間則達 16 min (38)，本實驗改以氮甲烷 acetonitrile/sodium phosphate buffer

PH=1.95 為移動相，在流速 1.0 ml/min 下，最大滯留時間可縮短至 7 分鐘，而且可同時測出 7 種代謝物 (Fig 3)。但在現場測定時因甲基酚 (cresol) 及二甲基酚 (Dimethyl phenol) 佔有之比率過低(約只有馬尿酸之百分之二) 已在偵測極限 (detection limit) 下，故無法有效測出此類之代謝物。

採樣工廠所使用之溶劑並非純粹之單一溶劑，故將現場定點採點採集之空氣樣本，先以氣體色層分析儀/質譜儀 (gas chromatography/mass) 分析，分別測出以氣相層析分離之各化合物之質譜圖 (Fig 4, Fig 5, Fig 6) 再由電腦比對質譜資料庫 (mass spectrum library) 所儲存之化合物質譜圖 (Fig 5,6,8) 決定現場所採集之空氣中含有甲苯，二甲苯，及少量之乙基苯，確定現場曝露之有機蒸氣種類後，則對各溶劑作檢量線另外再分別以標準濃度之有機溶劑加入之活性炭吸附管及被動式採樣器中做脫附劑二硫化碳之脫附效率 (deabsorption efficiency) (Table 1)。

依下列公式計算出現場空氣中有機溶劑之濃度 (C)(ppm)

$$C = \frac{(SW) (24.45 \times 10^6)(PT)}{(DE) (MW) (SR) (MIN)}$$

SW: 計算出之化合物重量 (毫克)

PT: 壓力/溫度之相關係數

DE: 脫附效率 (desorption efficiency)

MW: 化合物之分子量

MIN: 採樣時間

SR: Sampling rate 採樣速率 (ml/min)

註: 表所含之活性碳對不同化合物之吸附速率

甲苯為 14.5 min/ml, xylene 為 12.5 min/ml

乙基苯則為 12.9 min/ml

PT 之計算公式則為 $(T_1/T_2)^{1.5} (P_1/P_2)$

P_1 為採樣位置之平均氣壓 (mmHg)

P_2 為 760 mmHg

因採樣時位置之溫度及氣壓時有差異, 故以定點

採樣處之數值為準。

依前面建立之 HPLC 標準分析方法, 偵測尿液中各種代謝

物之含量 (為修正檢體之濃度差異故以 g/g creatinine 來表示)。以作業人員配帶於領口之被動採樣器所計算出之溶劑濃度，作為該人員在工作時間內時量平均曝露濃度，比較現場之環境偵測值，與尿液中相關之代謝物含量後發現，甲苯之曝露量和尿液中馬尿酸 (Hippuric acid) 之含量，呈現正相關 ($r=0.844$) (Fig 7)，而由個人被動式採樣器偵測出之二甲苯曝露量亦和作業人員尿液中之甲基馬尿酸 (methyl-hippuric acid) 有正相關 (Fig 8) ($r=0.867$)。

另外再比較甲苯，二甲苯之環境曝露量和臨床生化值，其間並無相關性，但如依曝露量將作業人員分為高曝露組 (High exposure $> 1/10$ PEL) 及低曝露組 (low exposure $< 1/10$ PEL) 則發現前一組之 N-乙酰葡萄糖苷酶 (N-Acetyl glucosaminidase, NAG) 活性明顯高於後一組 (Fig 9)。而高曝露組尿液之PH 值亦明顯低於低曝露組 (Fig 10) ($P<0.05$)。

本研究另以體外鼠肝微粒體代謝系統為模本，比較甲苯在不同的有機溶劑共存下，對甲苯代謝之影響，以苯甲醇作為甲苯在肝微粒體代謝之指標，發現二甲苯之添加可抑制苯甲醇在

體外代謝系統之形成 (Fig 12)，正丁醇亦同樣可抑制甲苯在微粒體中之代謝，但其效率比二甲苯要輕微 (Fig 12)，但如果將甲苯改換為對硝基酚 (p-nitrophenol)，則二甲苯和正丁醇對 p-nitrophenol 代謝物 p-nitrocatechol 之形成則具有相近之抑制效率 (Fig 14)。

最後在測定曝露於甲苯中肝微粒體之過氧化程度時發現隨者甲苯曝露量之增加，脂質過氧化之產物指標，Malodialdehyde Thiobarbuturic acid adduct 之量亦隨之升高，但當甲苯之濃度增加之高度時，其脂質過氧化產物之程度即不再增加，而如果將 NADPH 再生系統除去，則甲苯曝露量對微粒體脂質過氧化升高則較無影響 (Fig 15)。

綜合甲苯在肝微粒體中之代謝結果分析，可知甲苯之代謝可受二甲苯之干擾，而相對來說正丁醇則較不易抑制甲苯之代謝，另外由結果顯示，甲苯之代謝過程可能激發肝微粒體脂質過氧化之產生。而其間又可受到 NADPH 循環再生系統之調控。

討 論

隨著近代工業之進展，有機溶劑中之甲苯因具有安定，低毒性及對低極性物質如塑膠，塗料等具有高度之溶解度故被廣泛應用於塗料、油漆、印刷等工業製程或流程中 (6)。

雖然甲苯被列為屬於低毒性之有機溶劑，但作業人員如果長期曝露在含有過量甲苯之環境下，仍會有神經官能異常，賀爾蒙分泌失調，肝、腎功能傷害等職業病之徵候產生。所以對甲苯此種被廣泛使用之溶劑，應有效控制個人之曝露量，以防止職業病之產生。

早期之工業衛生管制，往往偏重於環境空氣中有害物質之濃度測定，雖然此類測定值較明確且不具爭異性，但其對曝露量之評估只考慮由呼吸道之吸收途徑，忽略了像甲苯這種高脂溶性之有害物質，亦可經由皮膚進入。而個人對空氣中有機溶劑之吸收，亦可能因運動量及呼吸深淺而有差異。為了更有效的評估有機溶劑進入人體之真實劑量，近年來隨著職業安全衛生現代對甲苯曝露量之測量已由早期之作業環境測定，推展到生物檢測之領域。

生物檢測在先天上即較環境測定之數值不穩定，其數值常隨個人不同之體質或飲食習慣而變動，但因其所測定之檢體來自工作人員之體液或組織中，所以比環境測定更能反映體內來自不同途徑之總吸收量。

甲苯之生物檢測事實上尚包括測定工作後呼出之氣體中甲苯濃度（進入人體之甲苯在體液中循環，未被代謝之部份甲苯，最後仍可由肺部排出），或是血液，尿液中殘存之氣體或代謝物，因為測定員工呼出之氣體，在工作地點分散之工廠，不易實施，而且在工廠之高溫下（38-42℃）呼出氣體之吸附率及儲存不易集中採集。而血液樣品之採集，不易為作業人員所接受，所以利用尿液檢體來做生物檢測似乎是目前為止較實際而可行之方式，以尿液檢體來做甲苯之生物檢測又可區分為二種，一種是測定尿液中之甲苯蒸氣，另一種則是測定甲苯之代謝物，前者之測定需要員工配合在採集完尿液後立即封蓋以防止甲苯蒸氣之散失。常常因時間及封蓋不全導致甲苯之逸失，而後者所測定之代謝物則較不具揮發性故可做為一較可行之生物檢測方式。

雖然馬尿酸已早被 ACGIH 列入 Biological exposure

index (BEI) 做為甲苯之曝露指標，也有許多之測定尿液中馬尿酸之方法 (26)，但多只探討之曝露在甲苯中之測定，而事實上正如本實驗所採樣之工廠所使用之溶劑大多混合二種以上之有機溶劑，有關環境測定方面目前雖可用氣相色層析配合質譜儀分析判定作業環境中之有機溶劑，但有關生物檢測部份，則缺乏較周密之方法及條件，可在短時間內同時偵測尿液中來自不同溶劑之代謝物。

近年雖有 Otaga 氏對甲苯及二甲苯之代謝物建立了數種高液相色層分析的鑑定方法 (38)，但對於揮發性之代謝物如甲基酚 (cresol) 類則仍需靠氣相色層分析才能鑑定，本研究在 Fig 3 所設定之液相色層分析條件，雖然可分出 9 種代謝物，但實際應用在甲苯曝露之生物偵測時，只有 2 位環境測定曝露值超過 0.4 PEL 之工作人員才在尿液中測出甲基酚 (cresol) 之存在，而其他工作人員之尿液檢體中，則只測出馬尿酸 (Hippuric acid) 或甲基馬尿酸 (methyl-hippuric acid) 顯示在低曝露量下，不易由液相色層分析中檢出尿液中之甲基酚 cresols 或二甲基酚 xylenols，其原因可能是在甲苯或二甲苯之代謝物中 cresols 或 Xylenols 約

只佔 2% 左右，除非在高劑量下，其濃度大都落在 HPLC 之偵測極限外，所以如欲測定尿液檢體中 cresols 或 xylenols 之含量，仍需配合氣相色層分析儀之使用。

有許多文獻指出，曝露在甲苯之作業環境中之工作人員，某些臨床生化值，明顯高於未曝露之正常勞工，如 β -microglobulin 免疫球蛋白，retinol binding protein (RBP) 甚至尿中之總蛋白 (Total protein)，本研究則另外發現高曝露組員工之 N-乙酰葡萄糖苷酶之活性 (NAG activity) 明顯高於低曝露組，NAG 為一種代謝酵素，可將氫氧基接上葡萄糖甘酸 (46)，而 NAG 之活性往往在組織受傷後之修補過程中大幅上昇，尿液中 NAG 之活性異常昇高，往往意味著初期腎組織受到傷害，另外，高曝露組尿液之 PH 值明顯低於低曝露組 ($P < 0.05$)，雖然尿液之 PH 值因影響之因素太多，但有些文獻指出個人之氫化效價 (oxidative stress) 高時，其尿液之 PH 值偏酸性 (47)。

雖然甲苯之曝露可改變某些臨床生化值，但如上述 β -microglobulin 免疫球蛋白，在發炎或肺部受外來異物刺激會有增加之現象，而 Retinol binding protein 之濃度在組織

再生時亦會有上昇之趨向，所以這些臨床生化值只能間接的反應外來毒物之侵入，不具專一性，只能做為生物檢測之輔助資料或早期警示職業病發生之依據。

本研究另外發現在建立之標準分析條件下，亦可同時分出 Trichloroacetic acid 三氯醋酸 (Fig 16) (已知三氯醋酸為 1,1,1- trichloroethane 之代謝物)。希望將來能建立更靈敏及周延之分析方法條件，能同時測出更多種尿液中有機溶劑之代謝物，方能實際運用於職業安全之監控及臨床上對職業病之診斷。

甲苯及大部份之有機毒物，在生物體中大都被一族稱為細胞色素 P450 之單氧化酵素 (cytochrome P450 monooxygenase) 所氧化代謝。

目前為止有關人類之 P450 酵素已被找出 30 種以上，老鼠則有 40 種左右，隨著其酵素活性基附近之立體構形及活化官能機之不同，可對不同之受質進行相異的氧化反應 (43)，而這結構式相似之有機化合物，可能因為被同一種 P450 單氧化酵素所代謝，而在共同存在時其代謝速率會被另一物質所干擾而降低代謝物之產率，這種現象往往在對環境中存在有多種有

機溶劑做生物檢測時造成重大之變異因素，也就是說我們做為有機溶劑之生物檢測，我們不能單只量尿液中之代謝物，還必須將環境中其他有害物對代謝物形成之抑制程度列入考量。

由肝組織中分離出之微粒體層，因為包含了大部份之氧化代謝及電子傳遞鏈之酵素，故被普遍採用來探討環境毒物及藥物之代謝機轉，故本研究以大白鼠肝中所分離之微粒體層，加上進行氧化反應必須之 NADPH 循環再生系統曝露在含甲苯，二甲苯，正丁醇之環境中，探討其他有機溶劑對甲苯代謝物 Benzyl alcohol 產率之抑制，由結果顯示結構和甲苯相近之二甲苯，比正丁醇有較高的抑制效果 (Fig 14)。為了排除二甲苯先天上即對所有之 P450 酵素均有較大的抑制效果之可能性。我們亦在肝微粒體酵素系統中加入對硝基酚 p-nitrophenol (為 P450 酵素族羣中 P450 3A1 之專屬受質，可被 P450 3A1 氧化酵素在苯環上接上氫氧基 (aryl ring hydroxylation) 而形成 p-nitrocatechol (42))。比較二甲苯及正丁醇對 p-nitrophenol 在肝微粒體酵素系統抑制效率，發現其抑制效果大致相近 (Fig 14)，表示甲苯之代謝專一性

的受到二甲苯曝露之抑制，意味著甲苯，可能和二甲苯以同一種酵素代謝，本實驗雖初步的顯示甲苯和二甲苯共同曝露時之對其體外代謝之相互作用，但對於抑制之比率常數及其他更多有機溶劑抑制作用之探討，則有待進一步的深入研究，以作為對多種污染物共存時，生物檢測值修正之參考。

當組織或細胞膜之脂質部份，在受到自由基或過氧化物攻擊時，往往會在碳雙鍵處斷裂而破壞組織構造成細胞膜流動性，通道功能喪失，進一步造成組織及細胞之傷害及壞死 (46)。

近年來對 P450 酵素之研究指出，P450 酵素在代謝外來毒物過程中，往往附帶的產生不同的自由基及含氧活性物質。

(47) 這些附帶產生之自由基可能進一步的攻擊細胞膜，在脂質過氧化之作用，對細胞造成傷害 (47)。本研究亦以曝露在甲苯之微粒體系統為模本探討脂質過氧化之形成，結果發現在完整的微粒體酵素系統下隨著甲苯曝露量之上升，其微粒體脂質過氧化之程度亦相對的增加 (Fig 19)，但是如果除去NADPH循環再生系統，停止供給 P450 催化所需之輔助因子，則脂質過氧化之程度即不隨著甲苯曝露量而變動，顯示甲苯之曝露，可造成細胞脂質過氧化之升高，而此種現象可能來自於 P450

單氧化代謝過程中所產生之氫氧自由基及雙氧陰離子 (46)。

而有關甲苯曝露量之細胞傷害機轉，仍有待進一步探討， (1)

除了經由 Cytochrome P450 外是否有其他途徑可使甲苯引發

脂質過氧化(2)其他去毒化機轉 (如 glutathione, GSH) 是否

可抑制此脂質過氧化之產生，(因此類化合物多為水溶性，不

存在於微粒體層) (3) 其他有機溶劑之存在下， 是否會增加

甲苯曝露下脂質過氧化之程度。

甲苯雖然和其他溶劑比較下具有較低之毒性，但是因甲苯

被廣泛之使用，其和其他溶劑間在生物體中代謝之相互作用機

制及毒性傷害之共同效應則仍待更深入及完整之探討。

参 考 文 献

1. ACGIH. TLV's Threshold Limit Value and Biological Exposure Indexs for 1992-1993. 1993. American Conference of Governmental Industrial Hygienists Cincinnati, Ohio.
2. Angerer J., and Schaller K. H. , editors. 1985. Analysis of Hazard Substance in Biological Materials: Methods for Biological Monitoring, Vol. I, VCH Publishers, New York, N.Y.
3. Abgererm J. , Schaller K. H., Seiler H. The Pre-Analytical Phase of Toxicological Monitoring Examinations in Occupational Medicine. Trends in Anal. Chem. 2: 257-261, 1983.
4. Angerer J., PrivDoz K. Biological Monitoring of Workers Exposed to Organic Solvents-Past and Present Scand. J. Work. Environ Health. 11: Suppl 1, 45-52, 1985.
5. Robert R., Lauwerys A. B. Early Detection of the Nephrotoxic Effects of Industrial Chemicals. State of the Art and Future Prospects. Am. J. Ind. Med. 11: 275-285, 1987.
6. Cohr K. H., Stokholm J. Toluene: A Toxicological Review Scand J. Work. Environ. Health. 5: 71-90, 1979.
7. Elofsson S.A., Gamberale F., Hindmarsh T., Iregren A., Isaksson A., Johnsson I., Knave B., Lydahl E., Mindus P., Persson H.E., Philipson B., Lydahl E., Struwe G., Soderman E., Wennberg A., Widen L. Exposure to Organic Sovents. Scand J. Work Environ. Health 6: 239-273, 1980.

8. Ravnsliipi V. Possible Mechanisms of Hydrocarbon - associated Glomerulonephritis. Clin. Nephrol. 23:294-298, 1985.
9. Tahti H., Karkkainen S., Pyykko K., Rintala E., Kataja M., Vapa H. Chronic Occupational Exposure to Toluene. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 48: 61-69, 1981.
10. Nancy A.N., Thomas G.R., Friedrich K.P. Solvent Nephrotoxicity in Humans and Experimental Animals. Am. J. Nephrol. 10:10-20, 1990.
11. Yamawaki S., Segawa T., Sarai K. Effects of Acute and Chronic Toluene Inhalation on Behavior and (³H)-serotonin Binding in Rat. Life Sci. 30:1997-2002, 1981.
12. Tardif R., Lapare S., Krishnan K., Brodeur J. Physiologically Based Modeling of the Toxicokinetic Interactions between Toluene and p,m-Xylene in the Rat. Toxicol. Appl. Pharm. 120:266-273, 1993.
13. Juntunen J., Matikainen E., Antti-Poika M., Suoranta H., Valle M., Nervous System Effects of Long-term Occupational Exposure to toluene. Acta. Neurol. Scand. 72:512-517, 1985.
14. Gregersen P., Angelso B., Nielsen T.E., Norgaard B., Uldal C. Neurotoxic Effects of Organic Solvents in Exposed Workers: An Occupational, Neuropsychological, and Neurological Investigation. Am. J. Ind. Med. 5:201-225, 1984.
15. Siojima S., Hasegawa K., Ishihara N. Subclinical Increases in Serum Transaminase Activities among Female Workers Exposed to Toluene at Sub-OEL Levels. Ind. Health. 21:123-126, 1983.

16. Ungvary G., Manya S., Tatra E., Szebereny S., Cseh R.J., Molnar J., Folly G. Effects of Toluene Inhalation on the Liver of Rat Dependence of Sex, Dose and Exposure Time. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 24(3):243-252, 1980.
17. Ungvary G., Hudak A., Bors Z., Folly G. The Effect of Toluene on the Liver Assayed by Quantitative Morphological Methods. *Exp. Mol. Pathol.* 25:49-59, 1976.
18. Sato A., Nakajima T. Differences Following Skins or Inhalation Exposure in the Absorption Excretion Kinetics of Trichloroethylene and Toluene. *Br. J. Ind. Med.* 35:43-49. 1978.
19. Carlsson A. Exposure to Toluene Uptake, Distribution and Elimination in Man. *Scand. J. Work Environ. Health.* 8:43-55, 1982.
20. NIOSH eds. *NIOSH Manual of Analytical Methods* 3rd. Cincinnati, Ohio. 1993.
21. Cochrane, W.G. *Sampling Methods.* 2d ed. Wiley, Interscience, 1963. p164.
22. NIOSH. ed. *Criteria for a Recommended Standard.* Cincinnati, Ohio. 1975.
23. Astrand I., Ehrner-Samuel H., Kilbom A., Ovrum P. Toluene Exposure. I. Concentration in Alveolar Air and Blood at Rest and During Exercise. *J. Work. Environ. Health.* 9:119-130, 1972.
24. Kneip. T.J., Crable J. V. eds. *Methods for Biological Monitoring: A Manual for Assessing Human Exposure to Hazardous Substances.* Am. Public Health Association. Washington. DC. 1988.

25. Tardif R., Brodeur J. Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Hippuric Acid and ortho-, meta, and para-Methylhippuric Acids in Urine. *J. Anal. Toxicol.* 13:313-316, 1989.
26. Cheng K.C., Schenkman J.B. Purification and Characterization of two constitutive forms of Rat Liver Microsomal Cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* 257:2378-2385, 1983.
27. Black S.D. Coon M.J. P450 Cytochromes: Structure and Function. *Adv. Enzymol. Result. Areas. Mol. Biol.* 60:35-87, 1987.
28. Born G.V. R., Cuatrecasas P., Herken H. eds. Cytochrome P450. *Handbook of Experimental Pharmacology*:15. p145-154, 1993.
29. White R.E. Active Site Mechanisms of Liver-microsomal Cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* 246:19-32, 1986.
30. Taniguchi H., Imae Y., Sato R. Protein-Protein and Lipid-Protein interactions in a Reconstituted Cytochrome P450 Dependent Microsomal Monooxygenase *Biochemistry.* 26:7084-7090, 1987.
31. Thomas P.E., Reik L.M., Ryan D.E., Levin W. Regulation of Three Forms of Cytochrome P450 and Epoxide Hydroxylase in Rat Liver. *Biochem. Pharmacol.* 37(2):237-244, 1988.
32. Nakajima T., Wang R. S., E lovaara E., Park S. S., Gelvbain H.V., Vainio H.V., Cytochrome P450-Related Differences between Rats and Mice in the Metabolism of Benzen, Toluene and Trichloroethylene in Liver Microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 45:1079-1085, 1993

33. Seffen L., Vicatoria S.O., Lennard M. S., Tucker G.T., Poulsen H. K. Characterization of Metroniazole Metabolism by Human Liver Microsome Biochem .Pharm.41:1127-1134,1991.
34. Robson R. A., Miners J. O., Matthews A. P., Stupan I., Meller D., Mcmanus M. E., Birkett D. J. Characterization of Theophylline Metabolism by Human Liver Microsomes. Biochem. Pharmacol.37(9):1651-1659,1988.
35. Baggot J.P., Reker-backes C.E. The Effect of NADPH Concentration on the Reduction of Cytochrom P450 LM2. J.Miol. Chem. 263:247-253, 1988.
36. Ekstrom G., Ingelmen-Sundberg M. Rat Liver Microsomal NADPH-Supported Oxidase Activity and Lipid Peroxidation Dependent on Ethanol - Inducible Cytochrom P450 (P450IIE1). Biochem. Pharmacol. 38:1313-1319,1989.
37. Dottun D.R., Reed G.A., Parkinson A. Redox Cycling of Resofin Catalyzed by Rat Liver Microsomal NADPH -Cytochrom P450 Reductase. Arch. Biochem. Biophys. 268:605-616, 1989.
38. Ogata M., Taguchi T. Simultaneously Determination of Urinary Creatinine and Metabolites of Toluene, Xylene, Styrene, Ethylbenzene and Phenol by Automated High Performance Liquid Chromatography. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 61; 131-140, 1988.
39. NIOSH: Occupational Exposure Sampling Strategy Manual (DHEW/NIOSH No. 77-13). Cincinnati, Ohio: NIOSH, 1977.

40. Wang R.S., Nakajima T. Kinetic Studies on Toluene Metabolism in Ethanol and Phenobarbital-induced Rat Liver Microsomes, in Vitro. Arch. Toxicol. 65:39-44, 1991.
41. Christra M.S., Quantiation of Protein Method Enzymol. 182:50-62, 1990.
42. Namkung M.J., Yang J.E., Juchau R. On the Substrate Specificity of Cytochrome P450 IIIA1: Mol. Pharmacol. 34:628-637, 1988.
43. Nakajuma T., Wang R.S., Elovaara E., Sang S.P., Harry V.G., Harri V. A Comparative Study on The Contrubution of Cytochrome P450 Isozymes to Metabolism of Benzene, Toluene and Trichloroethylene in Rat Liver. Biochem. Pharmacol. 43:251-257, 1992.
44. Cara J.M., James D.A., Stephen C.B. Free Radical Induction in the Brain and Liver by Products of Toluene Catabolism. Biochem. Pharmacol. 46:103-110, 1993.
45. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. (eds) . Techniques in Free Radical Research Elsevier (Publ)p232-248, 1991.
46. Hunberg B., Ravnskov U. The Excretion of N-acetyl- β -glucosaminidase in Glomerulophrisis. Chlin. Nephrol. 15:33-38, 1981.
47. Baud L., Fouquery B., Philip C., Ardaillou R. Reactive Oxygen Species as Glomerular Autacoids. J. Am. Soc. Nephrol. 2:S132-S138, 1992.

Table 1. CS₂ 對添加不同濃度之有機溶劑活性碳管 (Choachol tube) 及被動式採樣器 (Passive Monitor) 之脫附效率 (desorption efficiency: DE)

Solvent	Concentration (ppm)	DE of Choachol Tube (%)	DE of Passive Monitor (%)
Toluene	1	92.3	93.2
	10	92.8	94.8
	50	93.4	96.7
	100	95.6	98.5
Xylene	1	92.9	94.5
	10	95.2	96.2
	50	96.9	97.3
	100	98.2	98.7
Ethyl benzene	1	82.3	85.3
	10	85.6	90.2
	50	88.2	92.3
	100	89.5	93.4

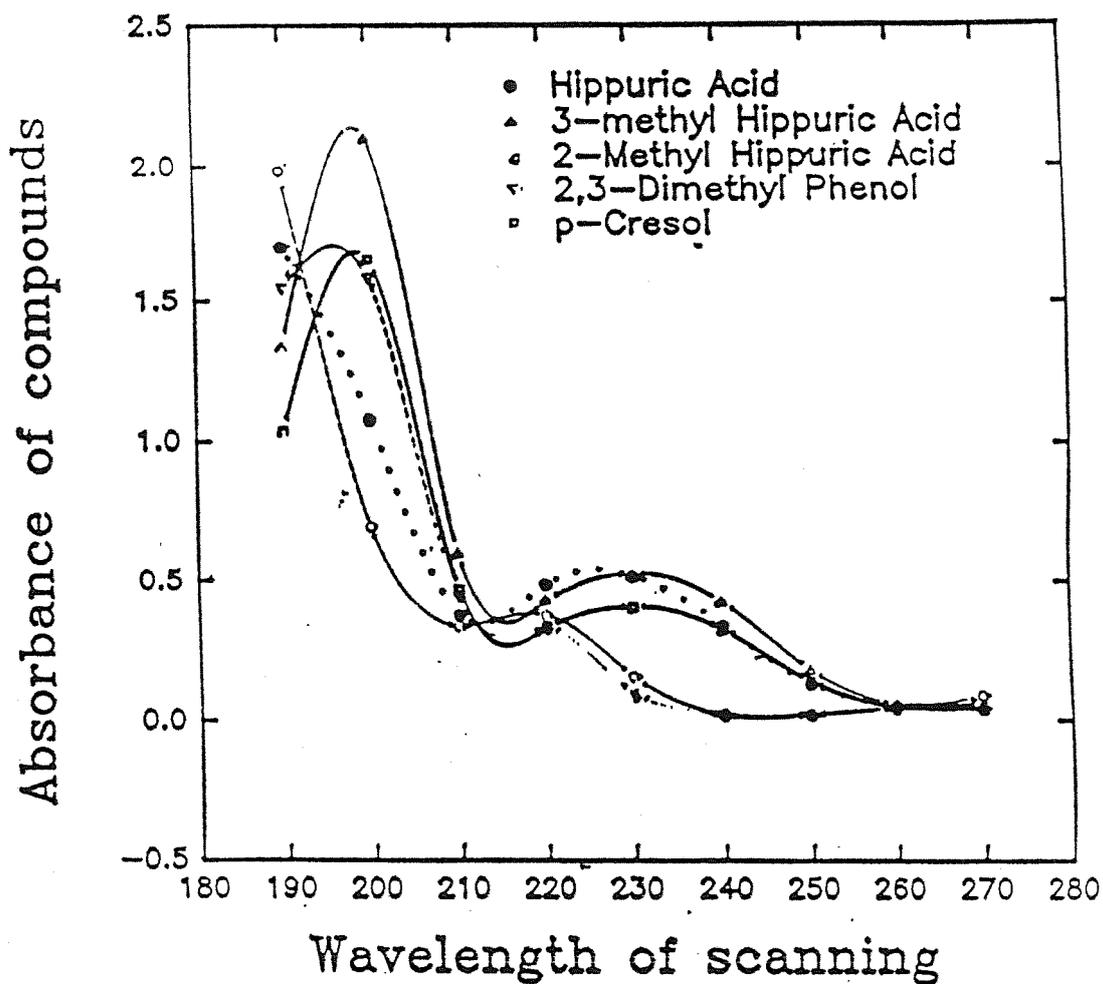


Fig 1. 甲苯與二甲苯在尿液中代謝物之紫外線吸收光譜。

以電腦軟體 (Sigmaplot 4.1) 將各光譜合併後，計算在各波長下吸光度之差異，求得吸光度差異最小之波長。

Hippuric acid: 馬尿酸

3-methyl hippuric acid: 3-甲基馬尿酸

2-methyl hippuric acid: 2-甲基馬尿酸

2,3-Dimethyl phenol: 2,3-二甲基酚

p-cresol: 對甲基酚

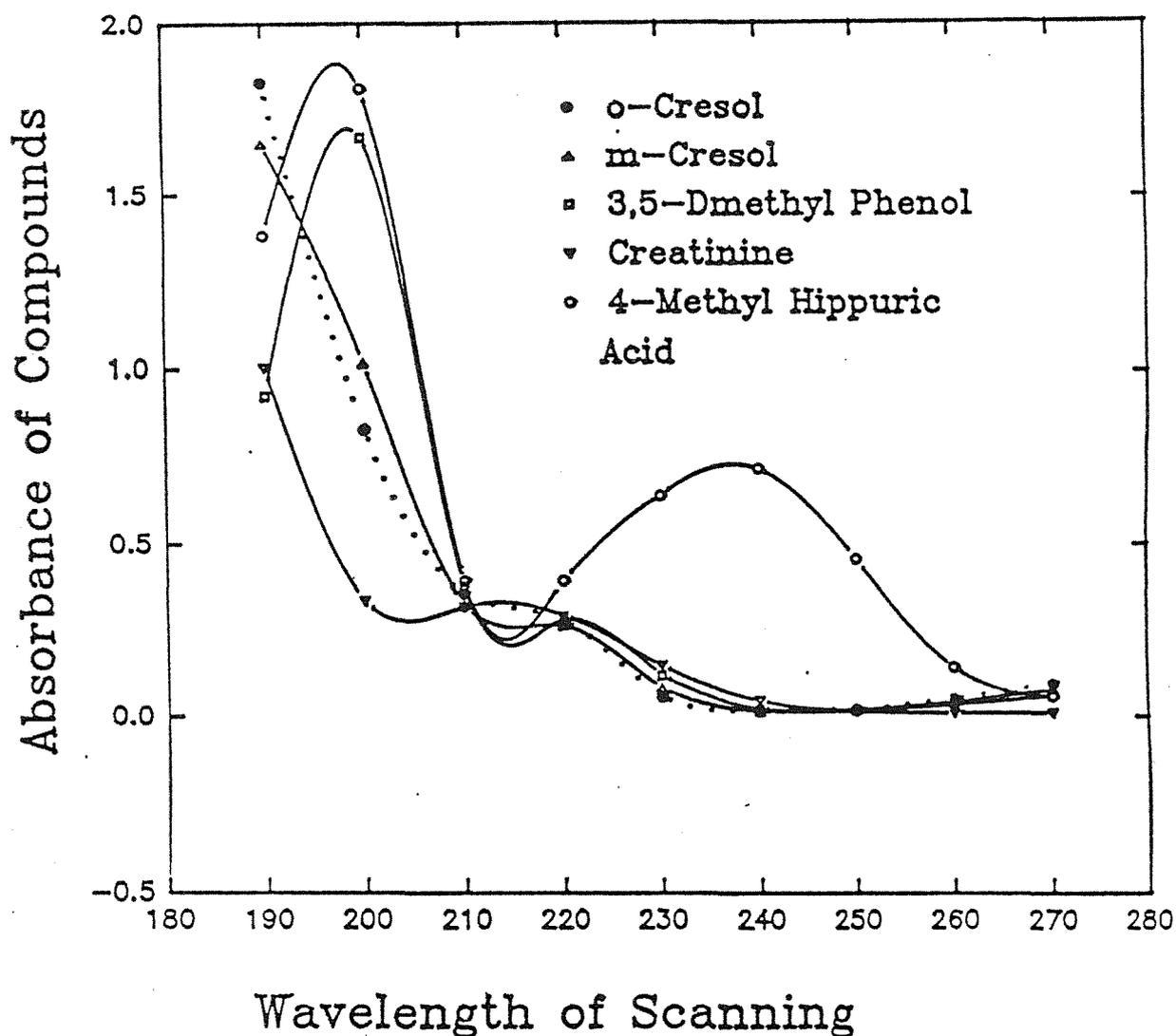


Fig 2. 甲苯及二甲苯尿液中代謝物之紫外光吸收光譜
除代謝物光譜外，尚包括肌酸酐之吸收光譜

o-cresol: 鄰甲基酚

m-cresol: 間甲基酚

3,5-Dimethyl phenol: 3,5-二甲基酚

creatinine: 肌酸酐

4-methyl hippuric acid: 4-甲基馬尿酸

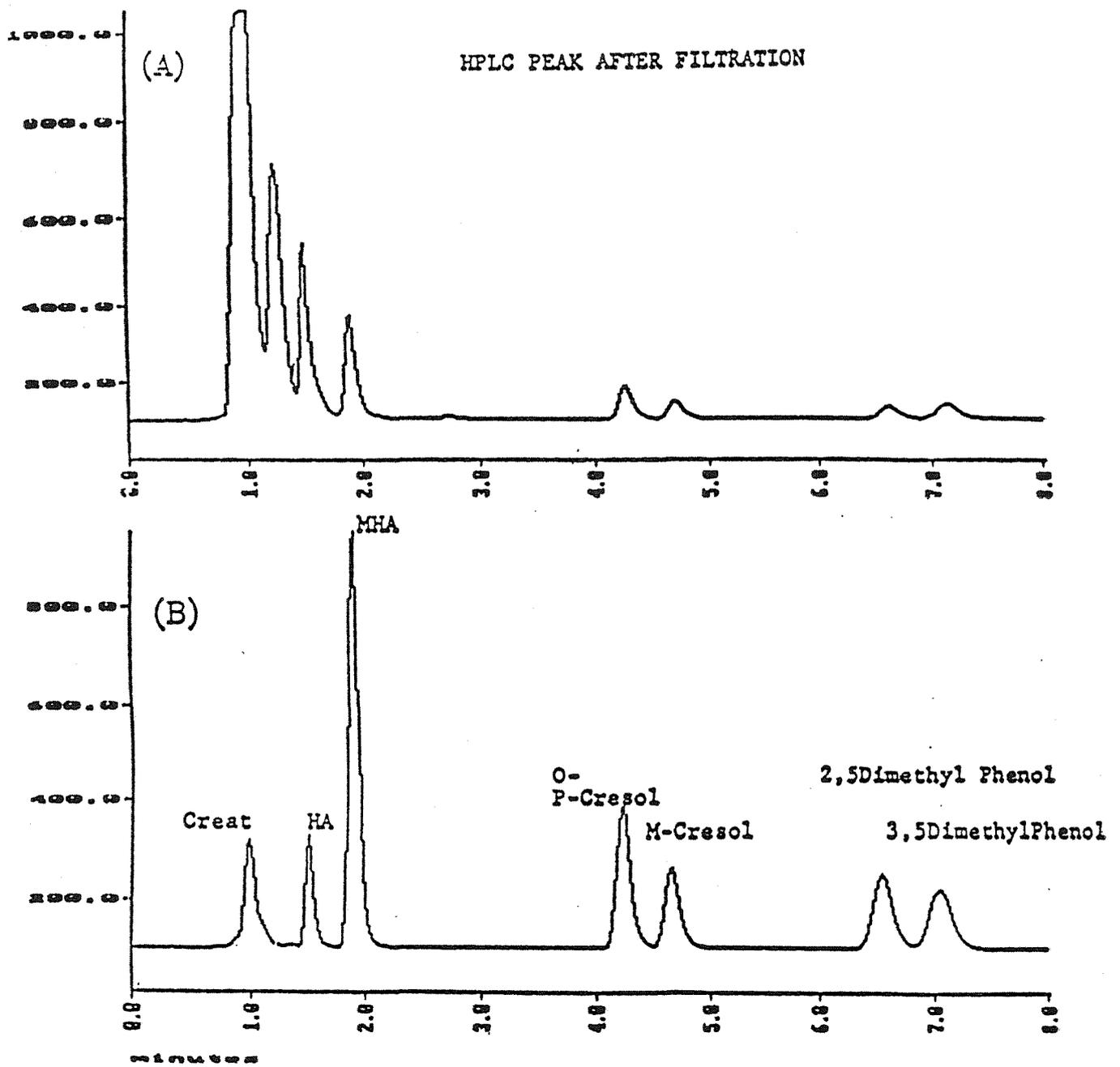


Fig 3. 甲苯及二甲苯尿液中代謝物之 HPLC 層析圖

(A) 為將代謝物標準品添加於正常人尿液中，再經建立之標準前處理後所得之層析圖

(B) 各代謝物標準品水溶液之層析圖

HA: 馬尿酸, MHA: 甲基馬尿酸, Creat: 肌酸酐

Total Ion Chromatogram

Retention Time	Area	Area %	Ratio %
4.173	47525315	78.727	100.000
6.083	2224858	3.686	4.681
6.302	7778869	12.886	16.368
6.849	2837948	4.701	5.971

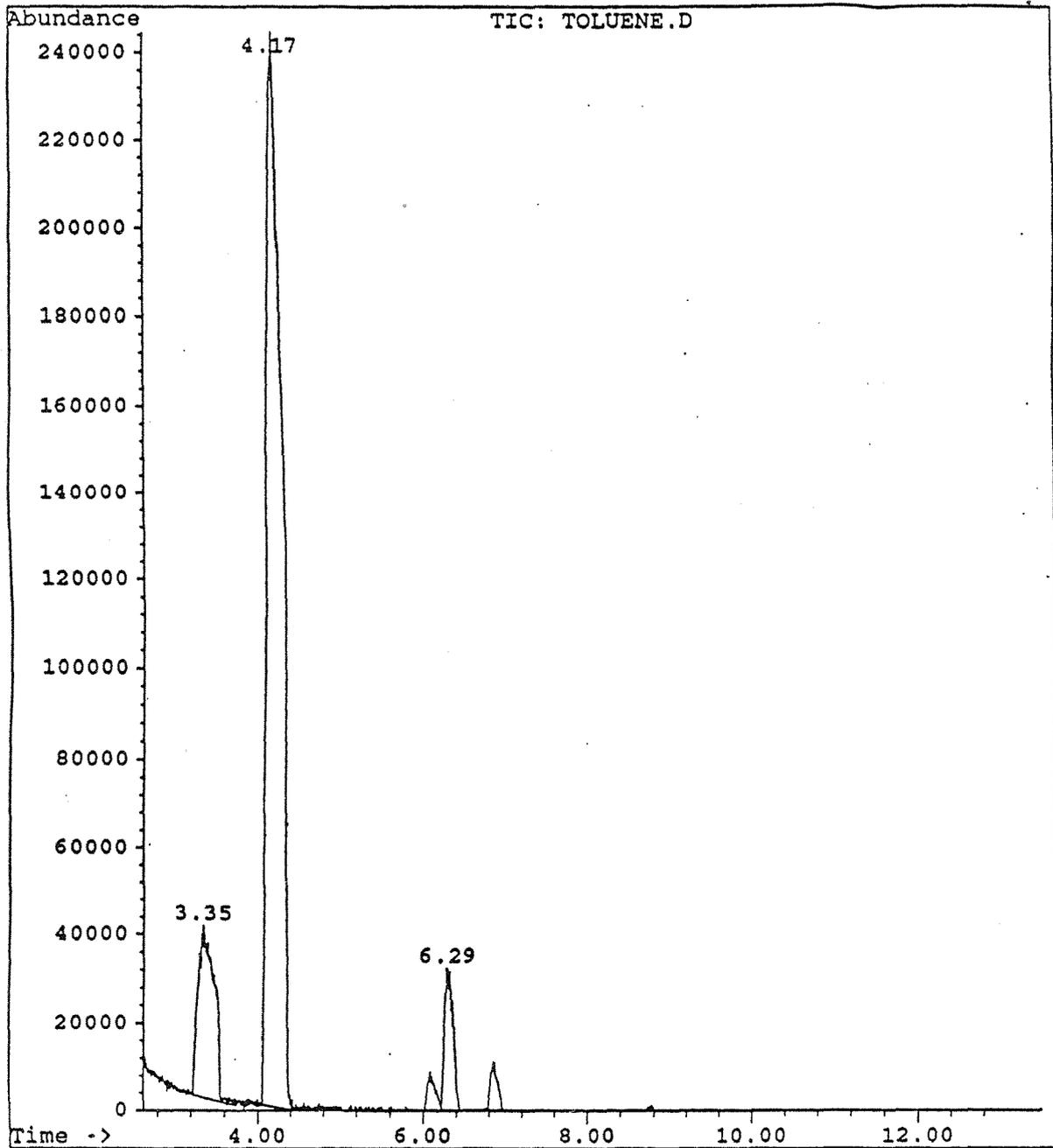
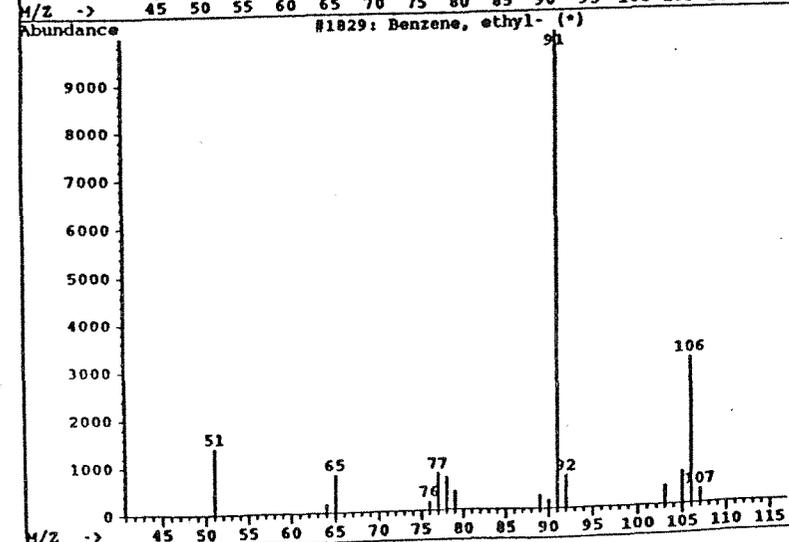
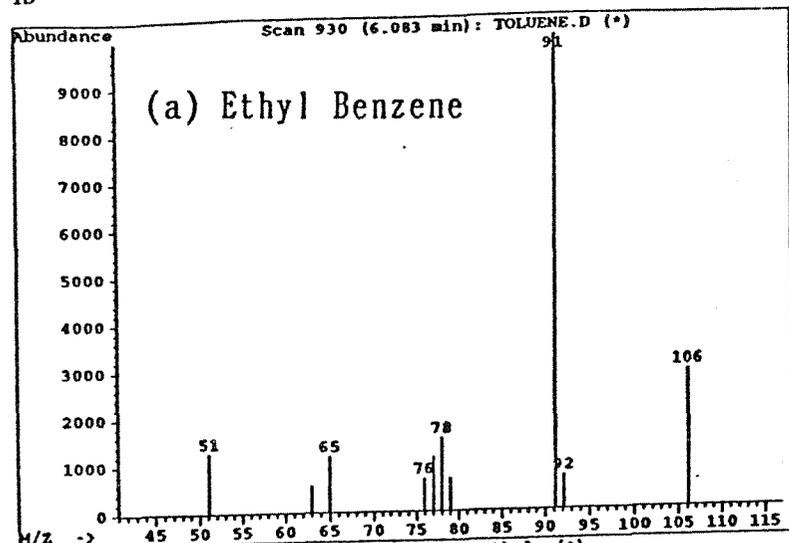


Fig 4. 採樣工廠空氣之氣相層析圖

Library Searched : C:\DATABASE\NBS54K.L
 Quality : 78
 ID : Benzene, ethyl-



Library Searched : C:\DATABASE\NBS54K.L
 Quality : 91
 ID : Toluene

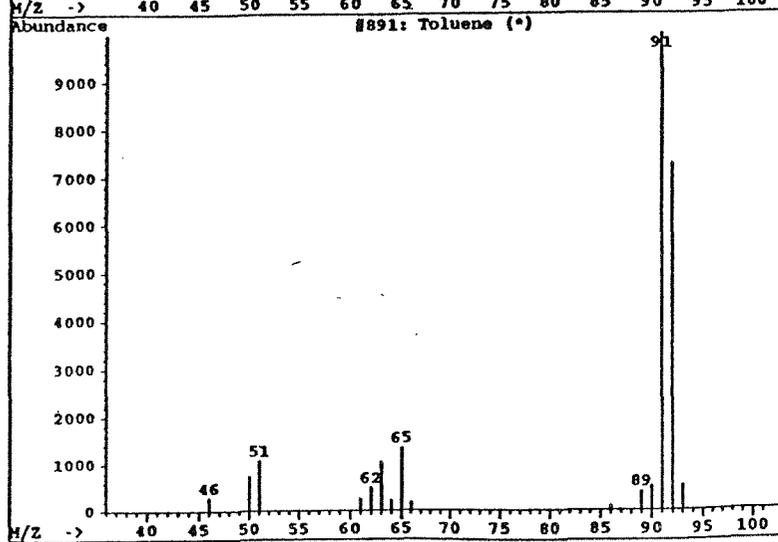
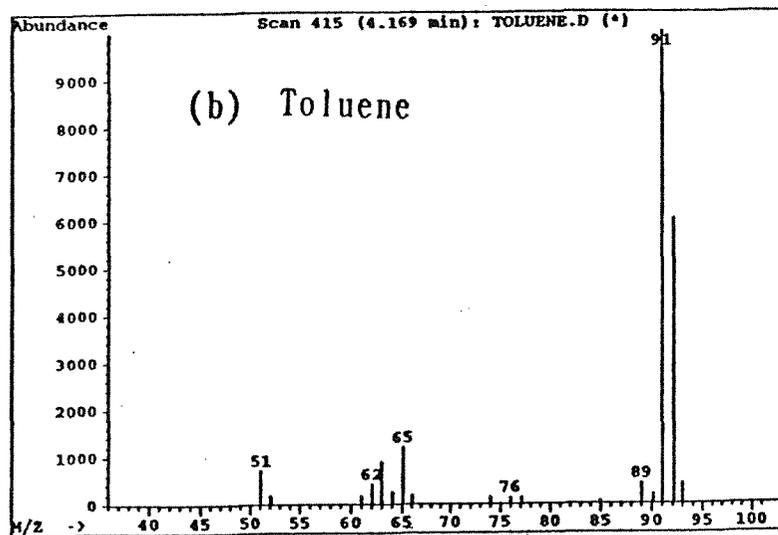
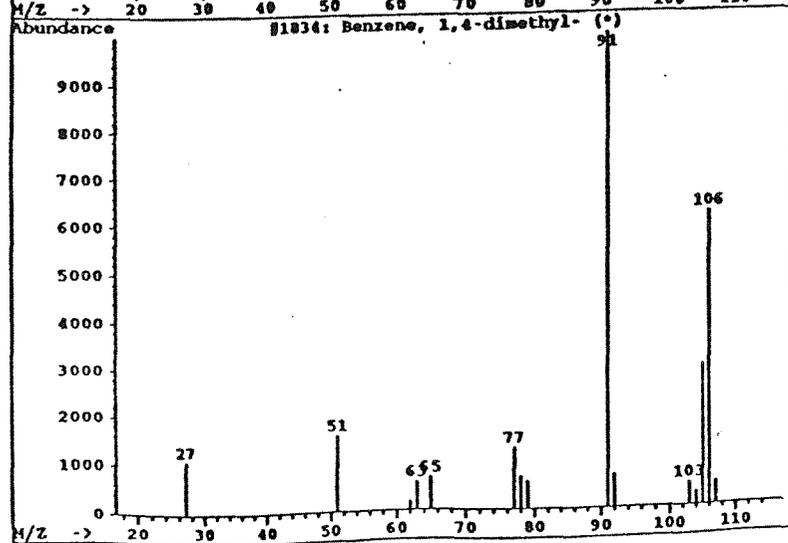
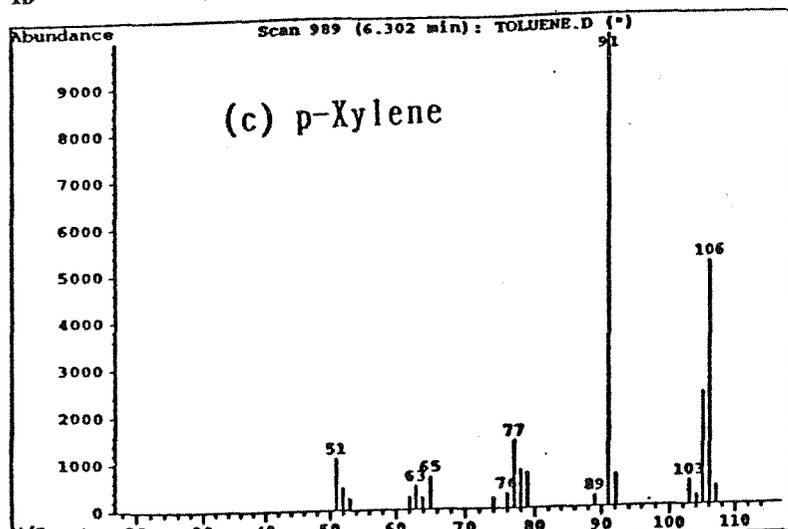


Fig 5. 將未知物質譜儀和質譜資料庫比對後得知 (a)為乙基苯 (b)為甲苯

Library Searched : C:\DATABASE\MS54K.L
Quality : 94
ID : Benzene, 1,4-dimethyl-



Library Searched : C:\DATABASE\MS54K.L
Quality : 83
ID : Benzene, 1,2-dimethyl-

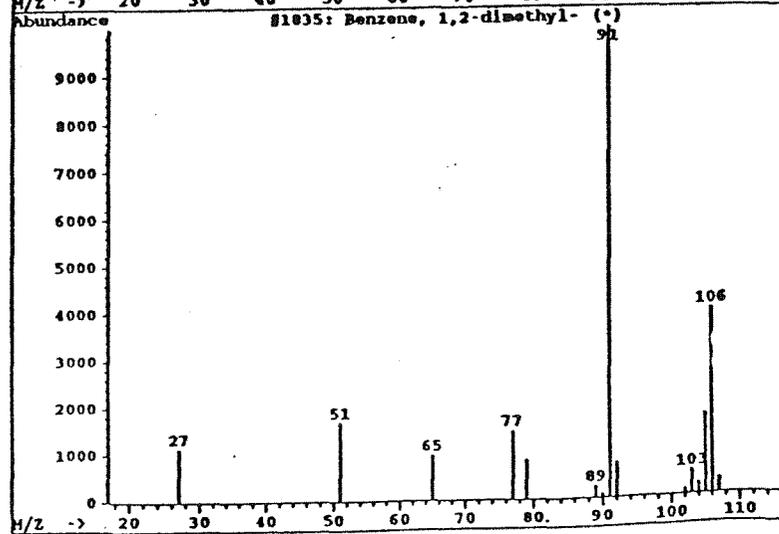
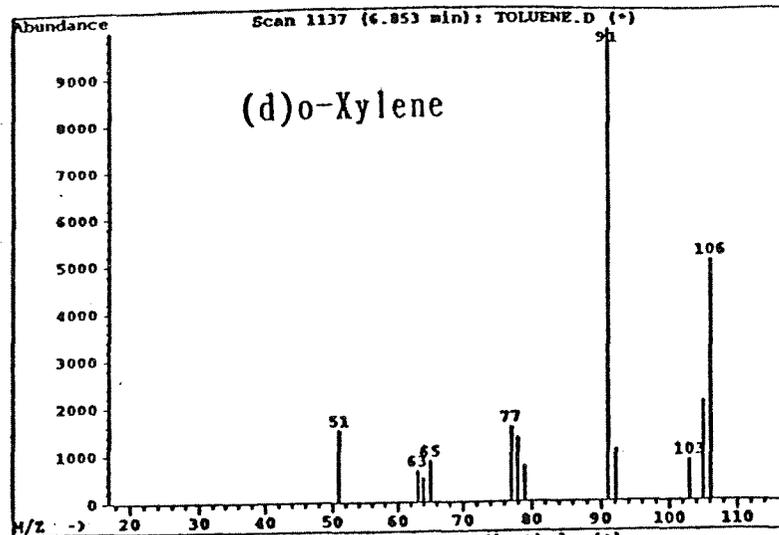


Fig 6. 採樣工廠中所分離之各未知物質譜儀和質譜資料庫之比對，
得知 (c) 為對二甲苯 (d) 為鄰二甲苯

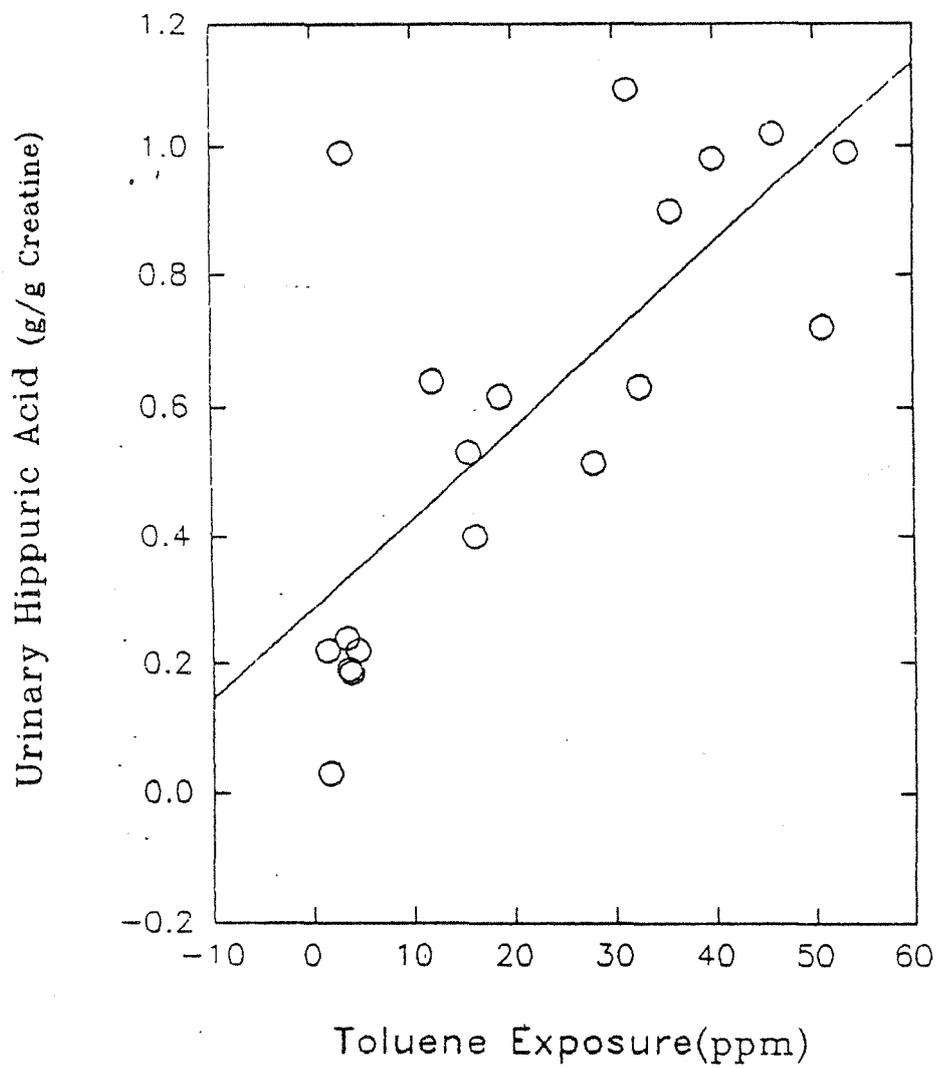


Fig 7. 現場工作人員被動式採樣器所測得之甲苯曝露量 (Toluene Exposure) 和尿液檢體中馬尿酸含量之相關圖形 (呈正相關 $r=0.844$)

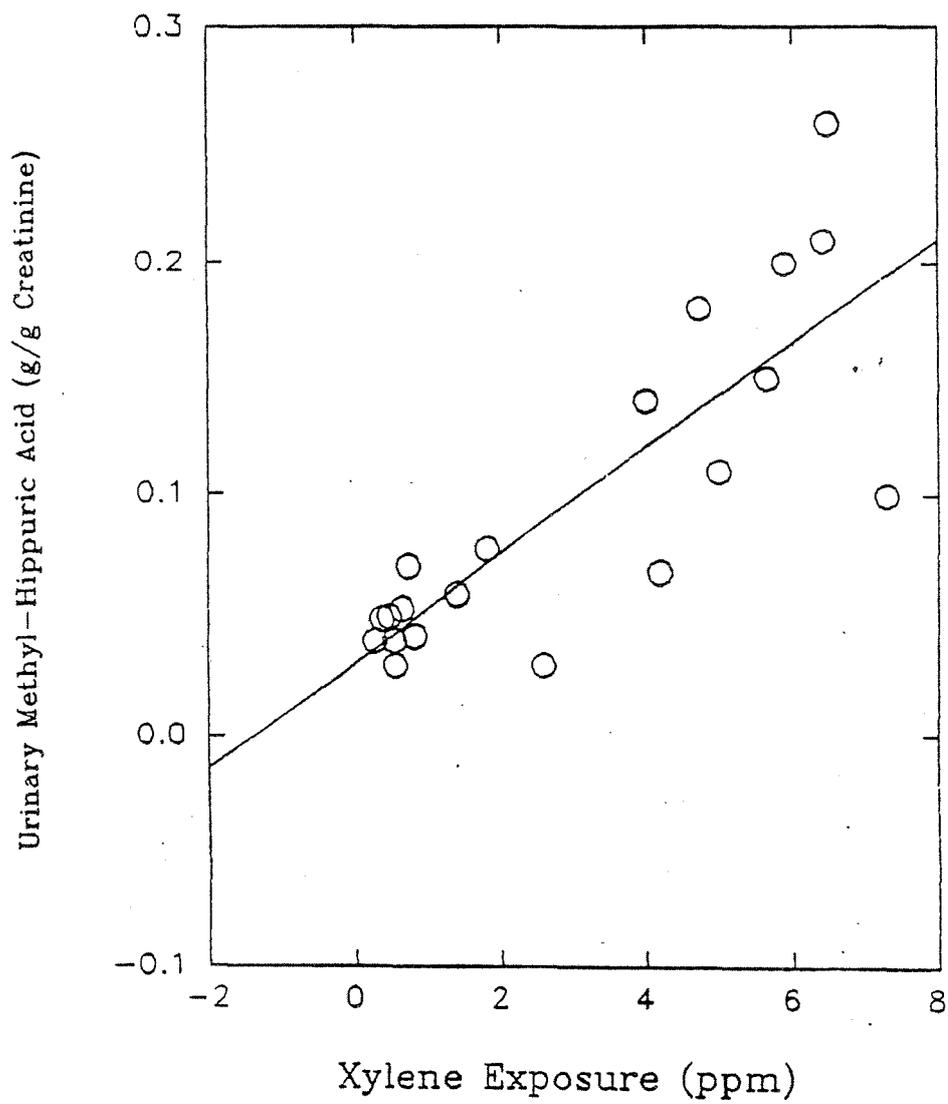


Fig 8. 被動式採樣器測定之二甲苯曝露量和尿液中甲基馬尿酸含量之相關分析 (兩者呈現正相關 $r=0.867$)

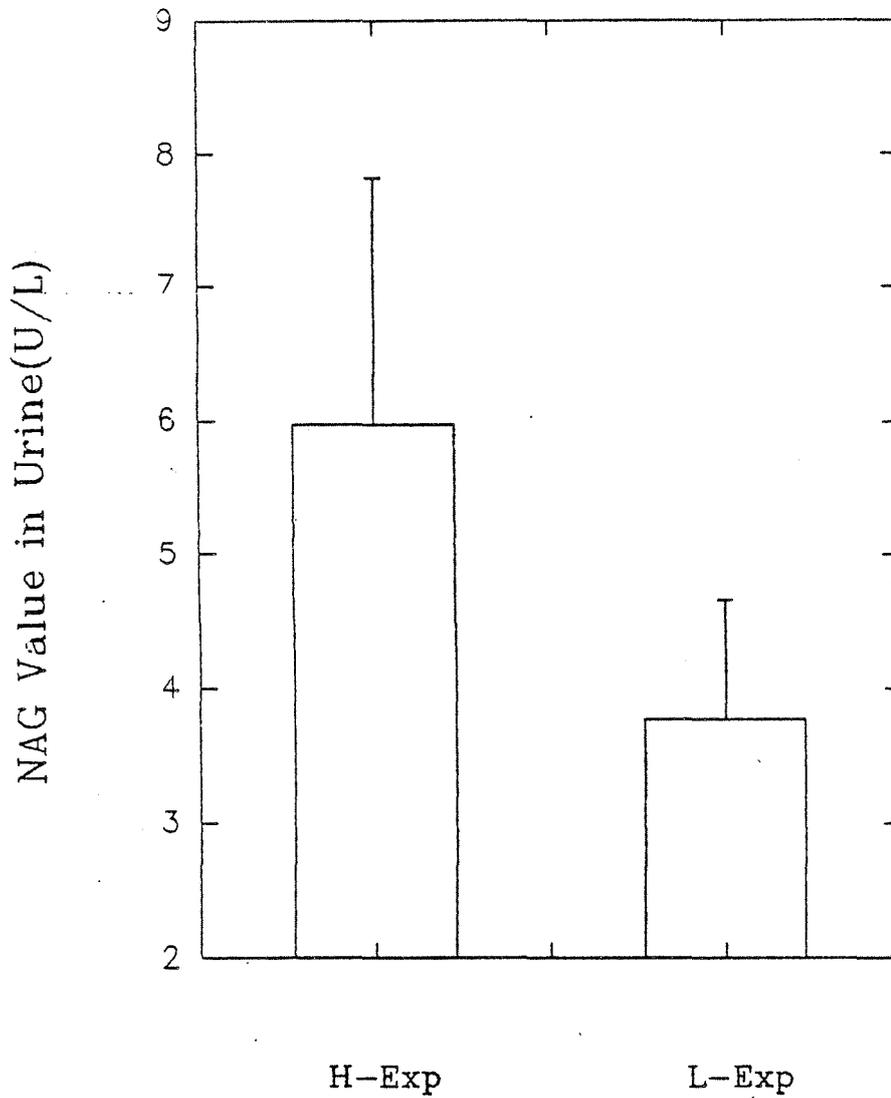


Fig 9. 現場工作人員中甲苯高曝露組 (H-Exp > 1/10 PEL) 與低曝露組(L-Exp < 1/10 PEL) 尿液中 NAG 活性平均值之比較 (p<0.05)

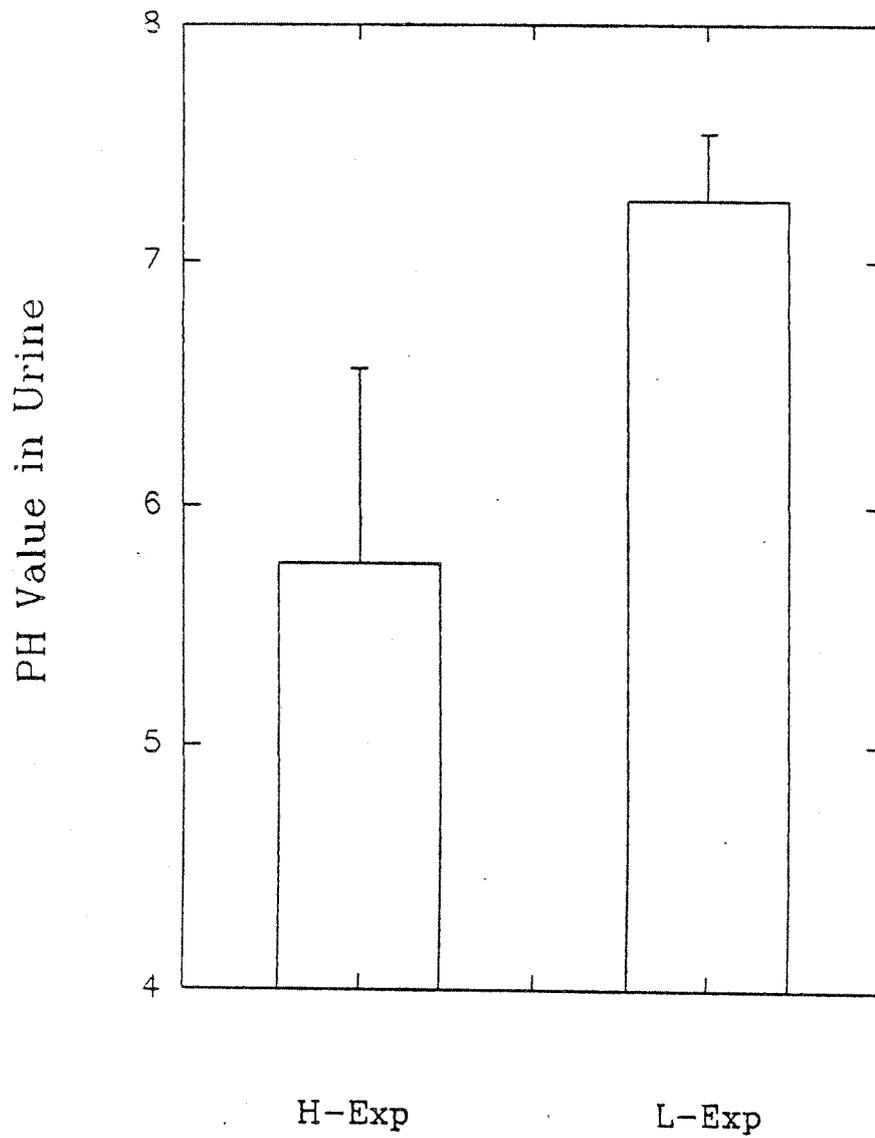


Fig 10. 現場工作人員中甲苯高曝露組 (H-Exp > 1/10 PEL) 與低曝露組(L-Exp < 1/10 PEL) 尿液 PH 值之比較 (p<0.05)

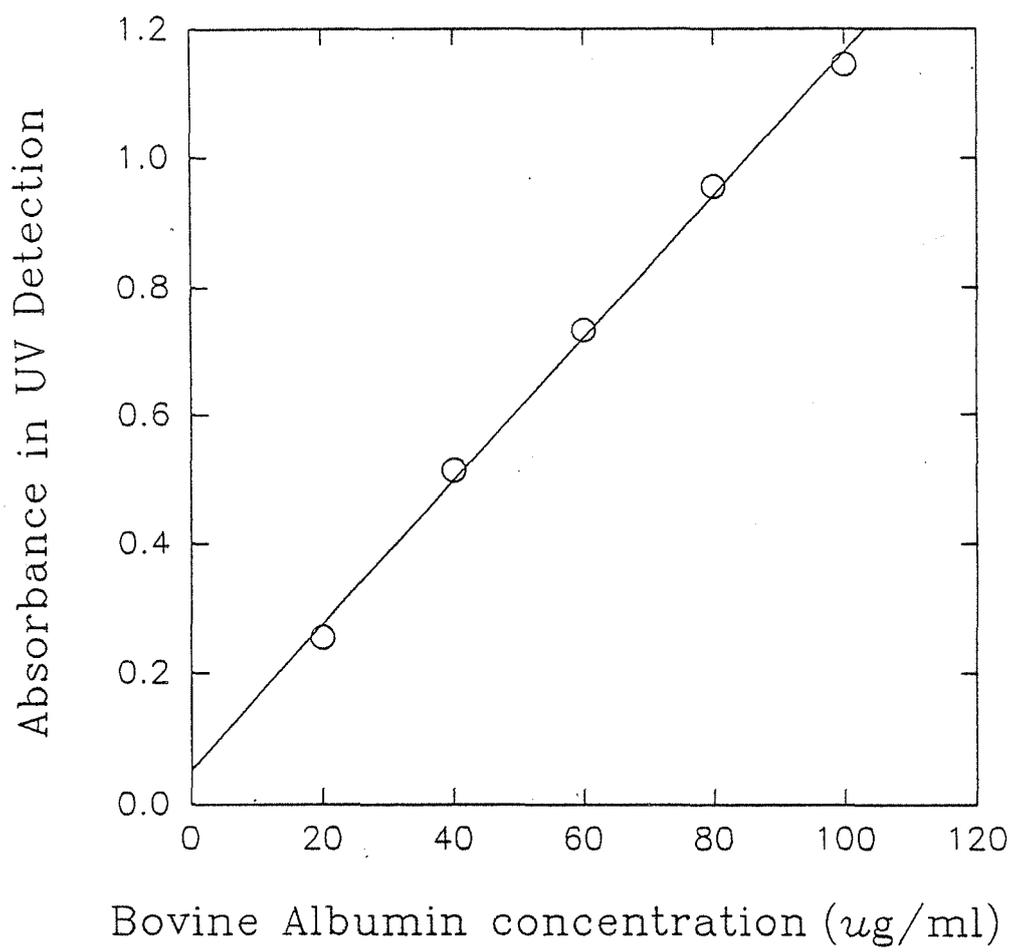


Fig 11. BCA 總蛋白質測定法之標準曲線圖

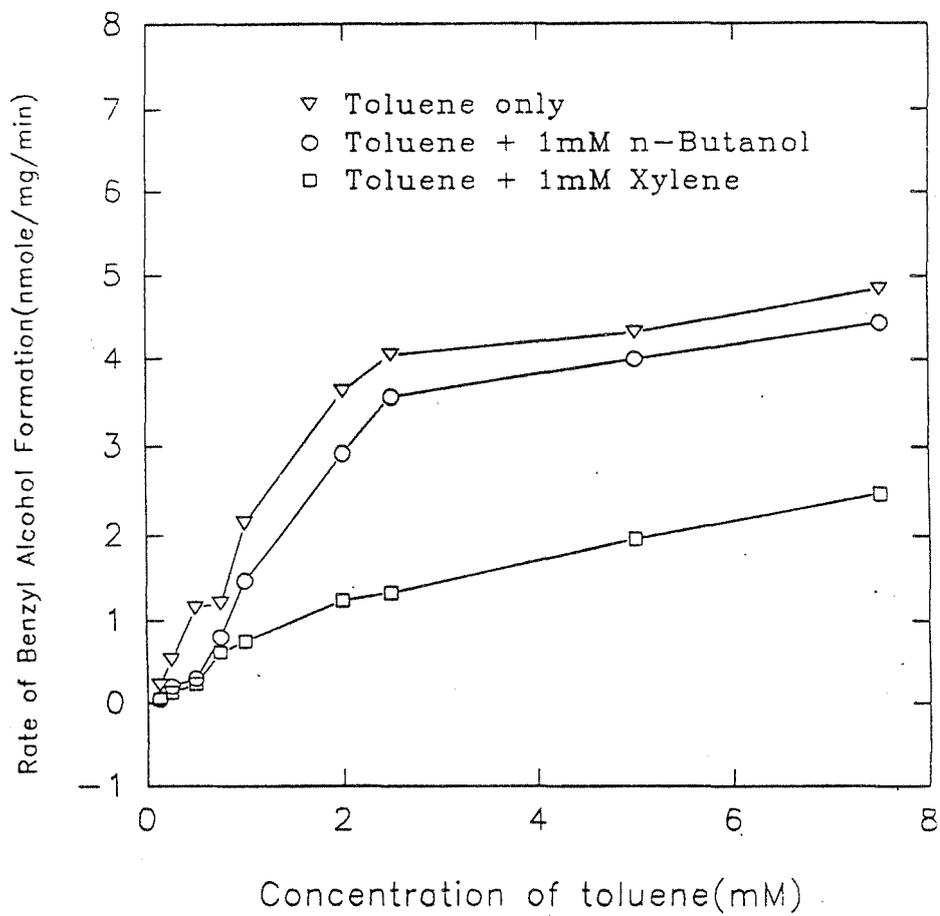


Fig 12. 在肝微粒體酵素系統中，正丁醇 (n-Butanol)，二甲苯 (Xylene) 對甲苯代謝之抑制作用

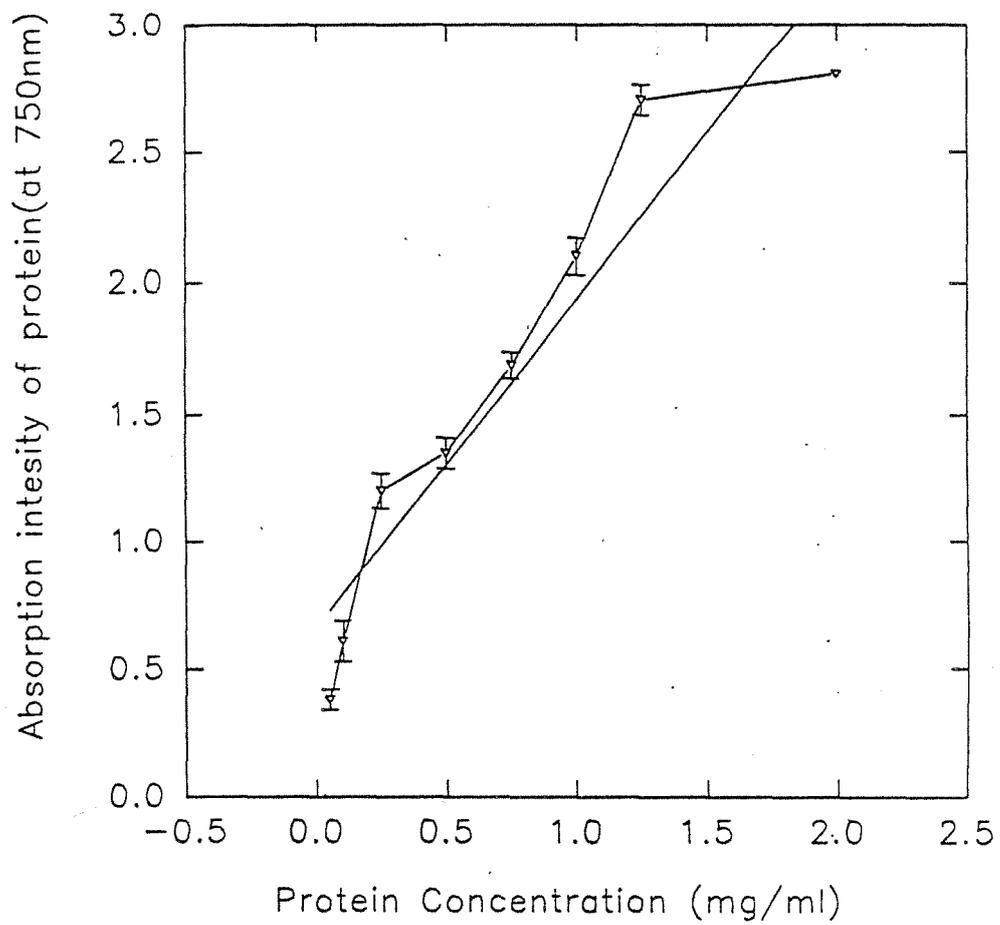


Fig 13. 對硝基苯 (p-nitrophenol) 在不同濃度肝微粒體酵素系統中之代謝效率

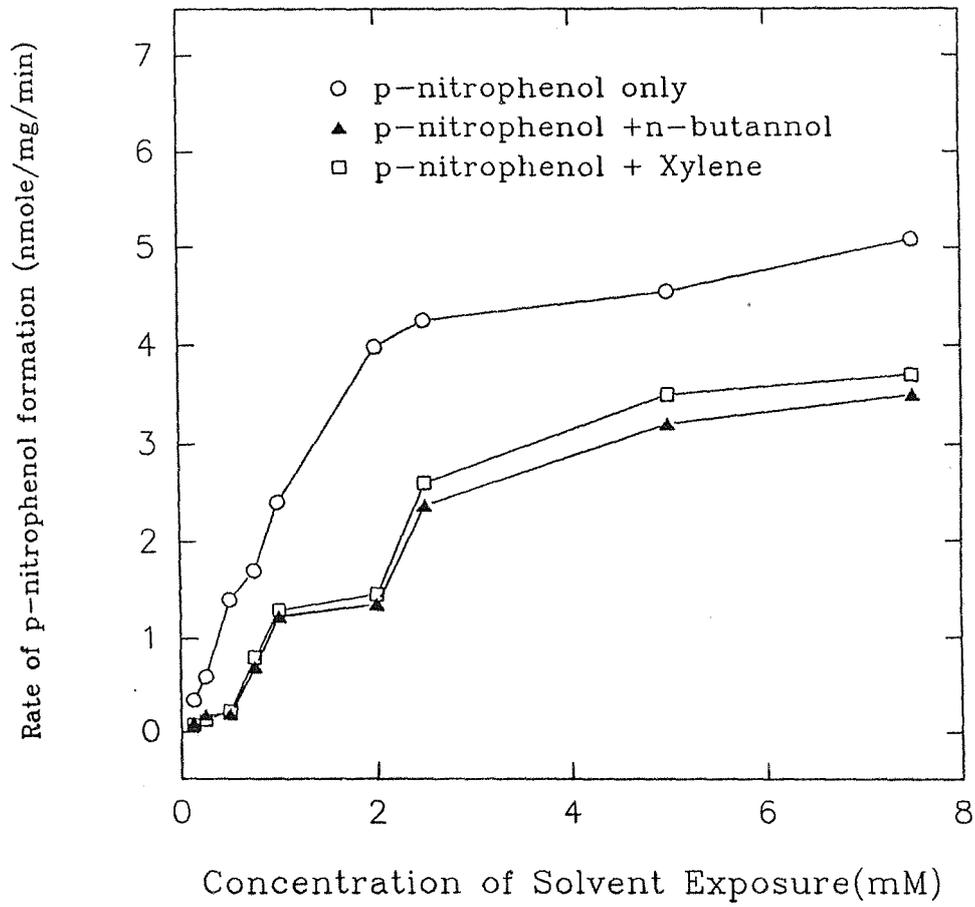


Fig 14. 肝微粒體中正丁醇 (n-Butanol), 二甲苯 (Xylene) 對 p-nitrophenol 代謝效率之抑制作用

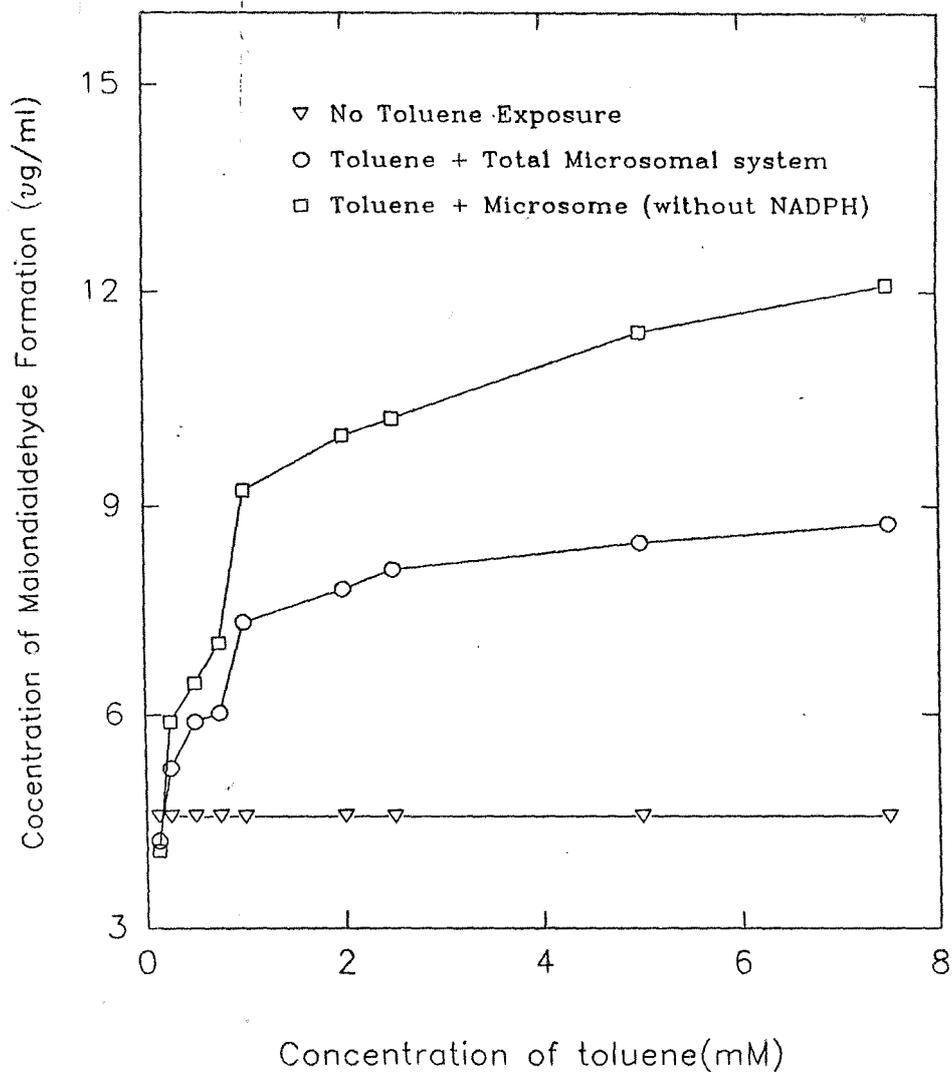


Fig 15. 肝微粒體酵素曝露在不同濃度之甲苯下，脂質過氧化之程度

Run : 04

Collection : 21:00:20 May 07 1993 Method : HU

Type : Sample

[20:02:39 May 07 1993]

(MULTI_00.D01) 60

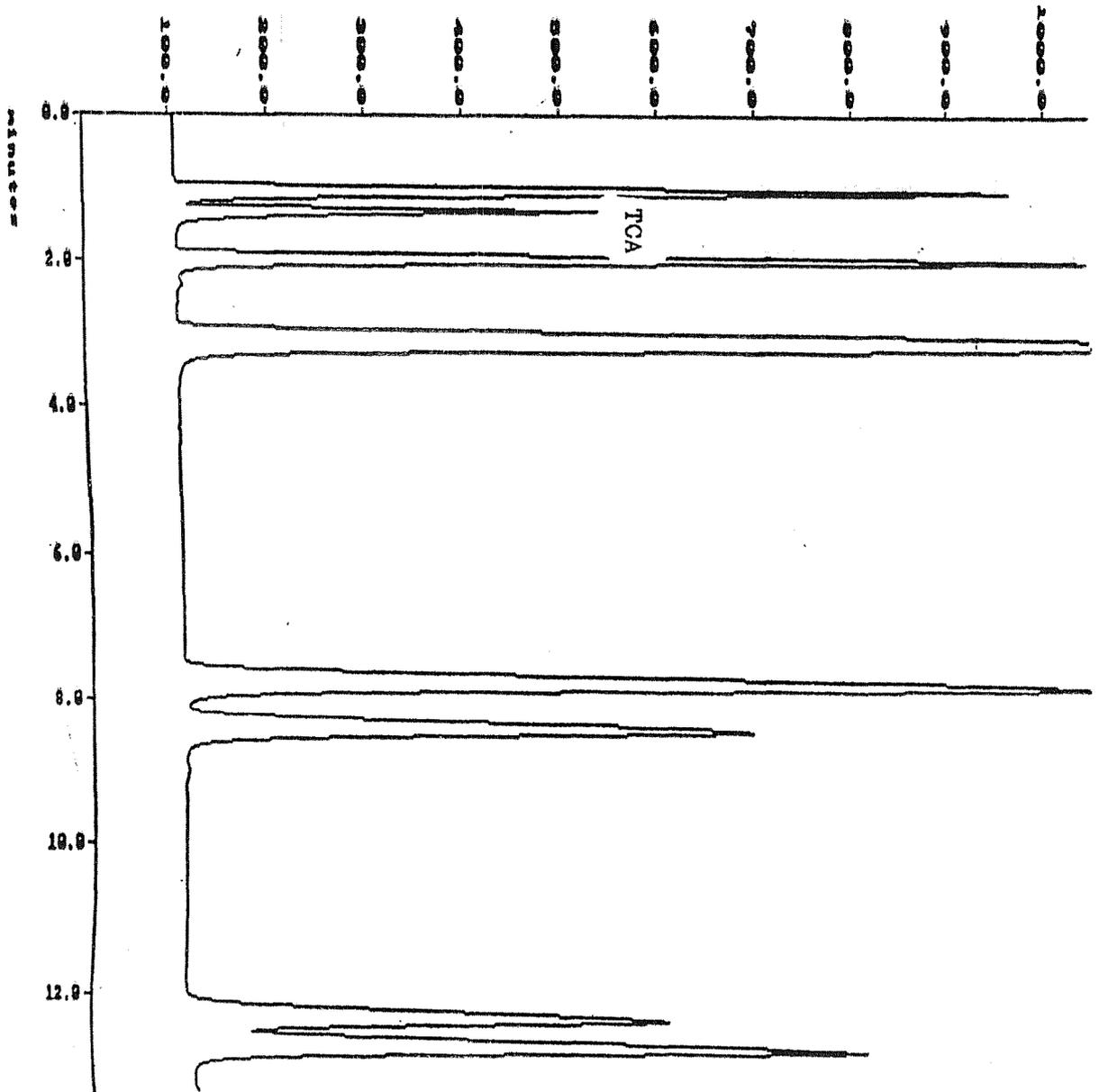


Fig 16. 正常人尿液中添加三氯醋酸 (TCA) 與甲苯, 二甲苯
代謝物標準品之層析圖