

R  
008.8  
0043-1  
88

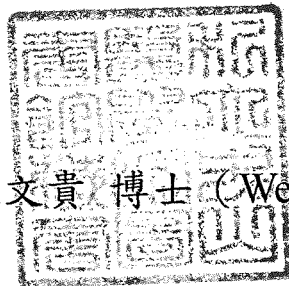
# 私立中山醫學院毒理學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Toxicology,  
Chung Shan Medical and Dental College

揮發性有機溶劑甲苯及丁酮對重金屬鎘  
之複合毒性研究

Synergistic Effect of Volatile Organic Solvent -Toluene and  
2-Butanone on the Biological Toxicity of Cadmium

指導教授：陳文貴 博士 (Wen-Kang Chen)



參考書恕不外借

研究生：廖培湖 (Pel-Hu Liao) 撰

中華民國八十八年七月

中山醫學院圖書館



C055202

授權書  
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在中山醫學院毒理學研究所  
八十七學年度第二學期取得理學碩士學位之論文。

論文名稱: 揮發性有機溶劑甲苯及丁酮對重金屬鎘之複合毒性研究  
**Synergistic Effect of Volatile Organic Solvent-Toluene and 2-  
Butanone on the Biological Toxicity of Cadmium**

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數，以微縮、光碟或數位或等各種方式重製後散布發行或上載網路。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名: 陳文貴

研究生簽名: 廖培翔 學號: R86501  
(親筆正楷)

日期: 民國 88 年 7 月 30 日

## 簽署人須知

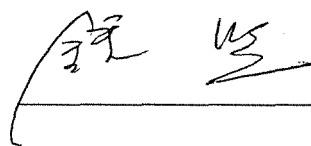
1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在兩種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。我國博碩士論文八十二學年度以前摘要資料庫及八十四學年度以後全文資料微片目錄資料庫已上載於行政院國家科學委員會科學技術資料中心網站 [www.stic.gov.tw](http://www.stic.gov.tw)，八十一學年度以後摘要資料庫已上載於教育部國家圖書館網站 [www.ncl.edu.tw](http://www.ncl.edu.tw)。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。
3. 全國博碩士論文全文資料整合計畫的宏觀效益：  
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位必備條件之一，經中山醫學院毒理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

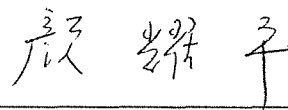
國立清華大學原子科學研究所教授

鍾 堅 博士



靜宜大學應用化學研究所教授

顏耀平 博士



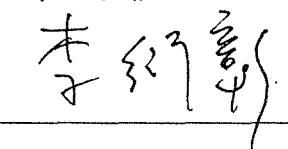
大仁技術學院工業安全衛生系副教授

仇 敏 博士



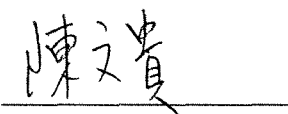
彰化師範大學化學系副教授

李衍彰 博士



中山醫學院毒理學研究所教授  
(本論文指導教授)

陳文貴 博士



中華民國八十八年七月

學生廖培湖論文題目為揮發性有機溶劑甲苯及丁酮對重金屬鎘之複合毒性研究，其論文已經中山醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並經由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：陳文貴 博士

簽名：陳文貴

中國民國八十八年 7 月 30 日

## 誌 謝

兩年的研究生活，一轉眼就過去了，雖然只是短短的兩年，但不論是實驗上或生活上的回憶，都深切地映在我的腦海中。研究的路是沒有終點的，研究的成果令人期待，好的結果使人振奮，而實驗的挫折雖使人失望，但也是一個研究人員成長中必定會遭遇的結果，累積失敗的經驗可以作為未來研究的參考。「不要怕失敗」是我對這兩年研究生活的體驗。

這份論文能夠順利完成，要感謝的人非常多，首先要感謝指導老師 陳文貴教授在研究上的指導及精神上的鼓勵。論文初成，承蒙清華大學原子科學研究所 鍾堅教授、靜宜大學應用化學研究所 顏耀平教授，於繁忙中撥冗審閱、細心審稿並提供寶貴意見，在此致上衷心的感謝。

另外，感謝大仁技術學院工業安全衛生系 仇敏副教授及彰化師範大學化學系 李衍彰副教授對本論文審閱外，在研究過程中給予我許多指正及實驗技巧的傳授，並導引我正確的研究觀念。另感謝胡超群老師在實驗上及生活上的指導與協助，使我能順利的完成學業及研究，受益匪淺。

感謝實驗室的伙伴們陪我渡過這兩年的研究生涯：游維哲學長在實驗技術上的指導和生活上的關懷；賴志昌學長、鄭彥敏學長、佳芳、欽誌、俊發等，對實驗上的協助及精神的鼓勵。

最後，將本論文獻給我的父母及兄姐，感謝您們對我的支持及鼓勵，使我能專心在學業及研究工作上。

廖培湖 謹誌於  
中山醫學院毒理學研究所  
中華民國八十八年七月二十七日

# 目 錄

目錄	
中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
緒論.....	5
實驗材料.....	25
實驗方法.....	28
統計與計算.....	36
實驗結果.....	39
討論.....	44
結論.....	50
文獻資料.....	52

## 圖 目 錄

Fig.(1) 甲苯在不同脫附劑下之脫附效率.....	63
Fig.(2) 丁酮在不同脫附劑下之脫附效率.....	64
Fig.(3) 混存溶液中甲苯濃度固定，丁酮在不同脫附劑之脫附效率.....	65
Fig.(4) 混存溶液中甲苯及丁酮濃度固定下，甲苯在不同脫附劑之脫附效率.....	66
Fig.(5) 混存溶液中改變甲苯及丁酮濃度，丁酮在不同脫附劑之脫附效率.....	67
Fig.(6) 有機溶劑暴露系統中，以主動式採樣器採集之甲苯濃度變化.....	68
Fig.(7) 丁酮以不同濃度暴露下，細胞暴露系統中，以主動式採樣器採集到丁酮的濃度變化.....	69
Fig.(8) 細胞培養箱甲苯與丁酮以固定比例改變濃度時，以主動式採樣器採集細中甲苯的濃度.....	70
Fig.(9) 甲苯與丁酮以固定比例改變濃度時，細胞培養介質中，丁酮的濃度變化.....	71
Fig.(10) 甲苯與丁酮以不同比例改變濃度時，細胞培養介質中，甲苯的濃度變化.....	72
Fig.(11) 甲苯與丁酮以不同比例改變濃度時，細胞培養介質中，丁酮的濃度變化.....	73
Fig.(12) 甲苯與丁酮混存下，丁酮對甲苯濃度的影響.....	74
Fig.(13) 甲苯與丁酮混存下，甲苯對丁酮濃度的影響.....	75
Fig.(14) 在不同時間，丁酮在細胞培養箱及細胞培養介質中濃度的變化.....	76



Fig.(15)在甲苯與丁酮混存下，細胞培養介質中甲苯對丁酮濃度的影響.....	77
Fig.(16)在不同劑量下，主動式及被動式採樣所採集丁酮的濃度.....	78
Fig.(17)主動式採樣及被動式採樣中，丁酮對甲苯採樣的影響.....	79
Fig.(18)不同丁酮濃度存在下，對甲苯採樣之影響.....	80
Fig.(19)不同甲苯濃度存在下，對丁酮採樣之影響.....	81
Fig.(20)混存溶劑中，甲苯對丁酮採樣的影響.....	82
Fig.(21)單一或混存有機溶劑對 V79 細胞的活性影響.....	83
Fig.(22)甲苯與氯化鎘對 V79 細胞的複合毒性.....	84
Fig.(23)丁酮與氯化鎘對 V79 細胞的複合毒性.....	85
Fig.(24)混存有機溶劑與氯化鎘對 V79 細胞之複合毒性.....	86
Fig.(25)甲苯與丁酮以固定比例改變下，與氯化鎘對 V79 細胞的複合毒性.....	87
Fig.(26)混存溶液中固定甲苯濃度與氯化鎘對細胞的毒性.....	88
Fig.(27)混存溶液中，同時變動甲苯與丁酮的濃度，與氯化鎘共同暴露對 V79 細胞的加成毒性.....	89
Fig.(28)甲苯、丁酮及氯化鎘對 V79 細胞之細胞週期影響.....	90

## 表 目 錄

表(一) 單一甲苯環境主動採樣、被動採樣之濃度.....	91
表(二) 單一丁酮環境主動採樣、被動採樣及培養皿中之濃度.....	92
表(三) 混合甲苯與丁酮其主動採樣、被動採樣及培養皿中之濃度(甲苯與丁酮濃度比不固定).....	93
表(四) 混合甲苯與丁酮其主動採樣、被動採樣及培養皿中之濃度(甲苯與丁酮濃度比固定).....	94
表(五) 甲苯、丁酮與氯化鎘對細胞週期的影響.....	95

## 中文摘要

揮發性有機化合物是勞工及日常生活中常會接觸及吸收之環境污染物，雖然對於揮發性有機物之毒性，已有許多公衛調查及動物實驗研究報告，但因為目前未能提供一個具有穩定濃度有機物之暴露系統，無法利用細胞體素對其毒性做更進一步之探討，故本研究主要在建立一套可調整式揮發性物質之細胞培養系統，可長期將細胞或組織穩定的暴露在不同濃度之揮發物質下，觀察與測試如有機溶劑等揮發性物質的毒性。

在現今工作場所之勞工，大都不止暴露於單一有機溶劑中，而其中尤以甲苯及丁酮為大宗，而在實際的作業場所常因各別之需要而使用不同比例之混合有機溶劑，於是本研究以所建立之有機蒸氣模擬暴露槽，以 V79 細胞(中國倉鼠肺纖維母細胞)對單一有機溶劑(甲苯、丁酮)之暴露做毒性探討，再對兩種溶劑混合後之毒理效應做進一步之了解，另外更嘗試探討在有機溶劑存在下，對重金屬鎘毒性之加成作用。

本研究以主動式及被動式採樣器，對暴露槽中之有機蒸氣進行採樣，前者每二小時採樣一次，主要在監測暴露槽中有機溶劑蒸氣濃度變化，後者則 12 小時及 24 小時各採樣一次，主要在計算暴露時間內之平均濃度，以 GC/FID 分析所採集之檢體，發現系統在通入含不同濃度之有機蒸氣(Toluene:50~200 PPM、Methyl ethyl ketone MEK: 100~600 PPM)之空氣後，均能在 6~8 小時達到所欲完成之暴露濃度。

為了擁有較佳之脫附效率，本研究另外以添加方式(spike)比較不同的脫附劑配方，對活性碳管中甲苯及丁酮(MEK)之脫附效率之影響，結果發現  $CS_2 + 4\% 1\text{-Butanol}$  後對丁酮脫附效率有正面之效應。

MTT 細胞活性測試顯示，甲苯及丁酮在容許濃度(PEL)下，對 V79 細胞並無明顯之細胞毒性，但在 1 PEL (200 PPM)之 MEK 暴露下卻可增強  $CdCl_2$  對 V79 細胞毒性，而由細胞週期顯示，在 24 小時的有機溶劑暴露下，可明顯的改變其細胞週期的比例，提高 S 期(DNA 複製期)之比例，尤以 MEK 比 Toluene 更為顯著。

本研究首次發現，將 V79 細胞暴露在被認為無毒性之 200 PPM 丁酮容許濃度下、卻可增加  $CdCl_2$  對 V79 細胞之毒性，而且由細胞週期之 PI 測定揭出，不同之有機溶劑在低濃度下，仍會改變細胞生長之機轉。

## Abstract

As a crowd living place, Taiwan has little tolerance toward environmental hazard. Therefore, emissions of the pollutant have not only disrupted the balance of environment but also caused severe impact to human being. Human exposure to organic solvents is widespread and occurs regularly. The principal routes of direct exposure to organic solvents are skin and inhalation. Organic solvent like toluene and methyl ethyl ketone(MEK) is widely used in industry and is well known to be neurotoxic and nephrotoxic. It is often used with other pollutants. Toluene and methyl ethyl ketone (MEK) can cause many of the pathophysiological effects. But they have been proposed that there have no mutagenic, carcinogenic and teratogenic effect for both solvents.

Currently no suitable instrument can assay the biological effects of volatile organic chemicals (VOCs) in cell culture system, but the in vitro system like culture cell can tell some details about the mechanism of biological response than experimenting animal does.

A cell-incubation system that can introduce different concentration of volatile organic solvent mimic the occupational of environmental exposure condition has established and presented in this work. The concentration of organic solvents in the exposed chamber has been evaluated by GC measurement of samples from air sampling of charcoal tube, passive monitor or CS<sub>2</sub> extraction of medium. The effect of the cell cycle performance of V79 , a normal lung cell line, exposed in organic solvents has been assayed by flow cytometric determination of DNA histograms. Different organic solvents produce various types of

V79 cell cycle performance and its effect has been observed in this study. The design of exposure system, stability of analytical results, and the application of this system on toxicity evaluation of volatile substance, are discussed. Recently, the concentration of organic solvents in most of workplaces has been reduced below the permissible exposure limit (PEL), however, the phenomenon of human exposed to multiple environmental hazard waste is often observed. Therefore, it is important to study the influence of organic solvent only, or coexistence with other heavy metal such as Cadmium, for human body.

To understand the additive effect of the toxic chemical mixtures to biological system, as well as to estimate the cytotoxicity or cell cycle inhibition the in vitro assay has been performed in this work. It is devoted to establish the use of V79 cells as an in vitro screening tool for the cytotoxicity or cell cycle inhibition of volatile chemical agents. In this study MTT has been used to assay in vitro additive toxic effects of  $\text{Cd}^{2+}$  and solvents on V79 cells. As to elucidate the details of the combine effect of cell growth, the cell cycle with or without the chemical treatment has been assessed by propidium iodine stain in flow cytometric instrument.

## 緒 論

甲苯、二甲苯、正己烷、丁酮等有機溶劑在近代工業發展下被廣泛用於製藥、化學合成、油漆塗料、黏合劑等工業製程中。而在許多日常用品，如石油，膠合劑，噴霧劑中，亦含有一定量的有機溶劑，也就是說，除了作業現場的工作人員之外，在日常生活中一般民眾亦可能吸入或接觸到有機溶劑，因此，對於有機溶劑的毒理作用，應有相當的認識。大部份之有機溶劑在短期大量暴露下，會造成急性過敏性反應，或因大量免疫性蛋白阻塞在腎小管或腎絲球而造成急性腎炎；而長期的曝露在有機溶劑中，亦可能造成腎、肝等器官，及神經官能性之不可逆傷害。因此，為了工業衛生及環境保護需要，有必要對工作人員或一般民眾進行有機溶劑之暴露量監測。

在現今作業場所工作的勞工，大都不只暴露於單一有機溶劑中，例如印刷業中從事塑膠製品印刷勞工所使用的有機溶劑，至少包含有甲醇、異丙醇、丁酮、乙酸乙酯、甲基異丁酮、甲苯、環己酮等七種[1]，其中以甲苯及丁酮為其主要暴露。在實際的作業場所常因各別之需要，以不同之比例混合有機溶劑，於是本研究除了對單一有機溶劑之暴露作毒性之探討外，欲再對兩種溶劑混合後所造成之毒理效應作進一步的瞭解，另外更嘗試探討在有機溶劑存在下，對重金屬鎘毒性之加強作用。

為了進一步分析環境污染物之生物效應，一般經由環境偵測與生物偵測來測定污染物在環境中與進入人體的含量。環境偵測適用於評估外在的暴露，即測量空氣中、食物中及飲水中有害的化學物質濃

度。在工業衛生上的環境測定一般是指測量作業場所空氣中有害化學物質濃度。環境測定的採樣可以用個人採樣與定點採樣兩種方式進行：個人採樣可以評估勞工暴露情形，而定點採樣可以監測工廠內某一區域有害物質之濃度。對於勞工暴露評估大都採用個人採樣，而工廠通風設施評估及有害化學物質發生源的鑑定則採用定點採樣。勞工健康危害評估可採用以個人或群體為基點的方式進行，其結果需與環境暴露極限，比較以確認是否過度暴露。

生物偵測適用於評估生物體內的吸收，即測量體內有害化學物質或其代謝物質濃度。生物偵測的主要目的在於確保勞工的作業安全，了解現在及以前對於有害物的暴露情形是否過量。在此技術下，過量暴露與否乃是以勞工體內劑量與暴露極限(例如：美國ACGIH所建議的生物偵測暴露指標-BEI或德國DFG所發布的生物偵測暴露最高容許濃度·BAT)比較而決定。

當環境中存在有害物質，則會因吸入、食入或皮膚接觸進入到人體，經過體內運輸、代謝進入血液及組織，若這些有毒物質或有毒代謝物無法被解毒或排除，則會引發疾病、癌症，嚴重者會導致死亡。所以，當我們在環境中偵測到超過環境暴露極限值的有害物質時，可以當作生物偵測的指標，進而採樣檢體以了解該有害物質在勞工體內的濃度，並改善環境中的暴露源及定期健康檢查，以維護勞工身體健康。

由於我們所關切的問題是人類的健康，對人類的直接觀察所獲得的結果當然是最為直接正確。但是基於人道的考量，我們無法使人暴露於有害物質環境下以評估健康效應。在先進國家中甚至還以法規嚴



格規範以人為對象所進行的實驗。因此這方面的實驗觀察大多侷限於流行病學研究。但是由於受測者的環境無法有效掌握，流行病學的研究方法並無法探討特定污染物對人類健康的暴露危害關係。至於動物實驗的最大關鍵課題則在於如何將結果推估應用於評估人類健康。環境中的污染物需透過種種機制才能進入生物體，此進入生物體的污染量即為劑量(Dose)，在生物體中的劑量還必須經過多種機制才會成為生物本身的反應，進一步造成危害。由於一切的病變均發生於細胞體素，因此我們也必須進行細胞體素對毒物的變異觀察以瞭解各種污染物對不同生物體的直接效應。

又因為作業流程之不同或使用混合性溶劑，個體往往暴露在不止一種有機溶劑下，而不同有機溶劑在人體中可能被 P450 同功酵素所代謝，在共同暴露時可能有競爭性反應，進而影響代謝物之形成，所以欲利用代謝物做有機揮發性物質之生物指標，有必要進一步考量共同暴露量造成之交互效應。

近年來研究揮發性有機化合物 VOC's (Volatile Organic Compounds)之毒性機轉時，往往必須建立一套能保持穩定濃度之暴露系統。也就是說要測定評估揮發性有機化合物之毒性(尤其是疏水性 Hydrophobic)時，往往必須將待測體素(動物細胞，體外組織培養)保持在同時具有標準條件(溫度、CO<sub>2</sub>)及固定揮發性毒物蒸氣濃度下。目前雖然已有數種動物暴露槽(animal expose chamber)上市，但未有相當之暴露系統可適用於細胞、組織等體外培養，故本研究嘗試結合揮發性物質標準濃度產生器與細胞培養箱，建立一套可調整式揮發性物質細胞培養系統，可長期(1~4天)以細胞或組織培養等體外系統，觀察與測試如有機溶劑等揮發性物質之毒性。

由於台灣地區地狹人稠，對於環境衝擊耐受之程度較低，因此本土環境污染不但會破壞生態平衡，更極易對人體健康形成危害。由於周遭環境中往往不僅只有一種環境毒物，有時會有兩種或兩種以上的環境污染物，而這些環境毒物彼此之間對於生物的影響，是否具有某些交互作用，進而影響細胞的存活或造成細胞轉形作用是值得研究的課題。目前大多數研究僅探討單一毒物的毒性，對於複合毒性的研究則較少。本研究以V79細胞株(中國倉鼠肺纖維母細胞)為研究對象，探討不同的揮發性有機溶劑和重金屬化合物對於細胞毒性之複合效應。於組織培養箱中通入定量之有機溶劑甲苯(50-200 PPM)或丁酮(100-600 PPM)模擬實際暴露，並加入氯化鎘，來探討單一或複合的有機溶劑與重金屬共同暴露是否會造成加成性的生物毒性。

為了能夠維持本研究所建立的系統，控制該系統中有機蒸氣的穩定性。我們藉由主動式採樣器及被動式採樣器共同採樣，偵測細胞培養箱中有機蒸氣的濃度，以控制實驗的變數，而在此恒定的密閉空間中培養細胞，了解細胞在此環境下的變化情形。如此我們除了可以做單一有機蒸氣的毒性研究，最值得重視的，即是可以做多種有機蒸氣的複合曝露，穩定的控制不同有機溶劑在空氣中的比例。如此可以了解在不同的有機蒸氣下是否會對人體有加成或抑制毒性的作用。

主動式採樣器及被動式採樣器各有其優缺點：

#### (一)主動式採樣器(Active Sampler)：

以幫浦為動力來採樣，配合採樣介質進行空氣中污染物的捕集，是傳統的採樣方式。

主動式採樣器的採集包括有：

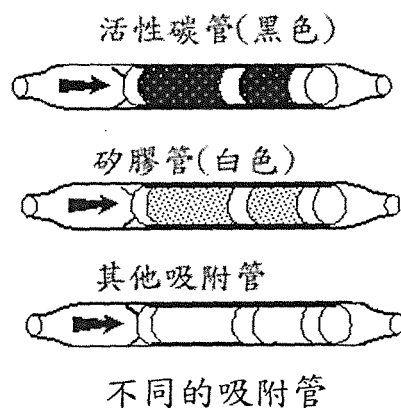
活性碳管：適用於有機溶劑及非極性化合物。

矽膠管：矽膠因具有極性基，適用於丁酮、醇類、脂肪族及芳香胺等極性物質採樣，但因對水吸附力強之關係，經常因矽膠中含水量不同而造成對採集物質的吸附力產生差異。

其他吸附管：如XAD-7管【聚丙酸酯 (acrylate polymer)】：適用於採集酚和甲酚；XAD-2管【2-(hydroxymethyl)piperdine】、矽酸鎂管：適用於採集多氯聯苯；Hydrar sorbent(吸附劑)管：適用於採集汞蒸氣；PorapakQ：適用於採集甲酸 (formic acid)；TenaxGC：適用於採集黃磷 (P4)；PorapakP：適用於採集硫酸二甲酯；PorapakN：適用於採集乙酸酐；TEA三乙醇胺 (triethanol amine)採集管：適用於採集NO，NO<sub>2</sub>。

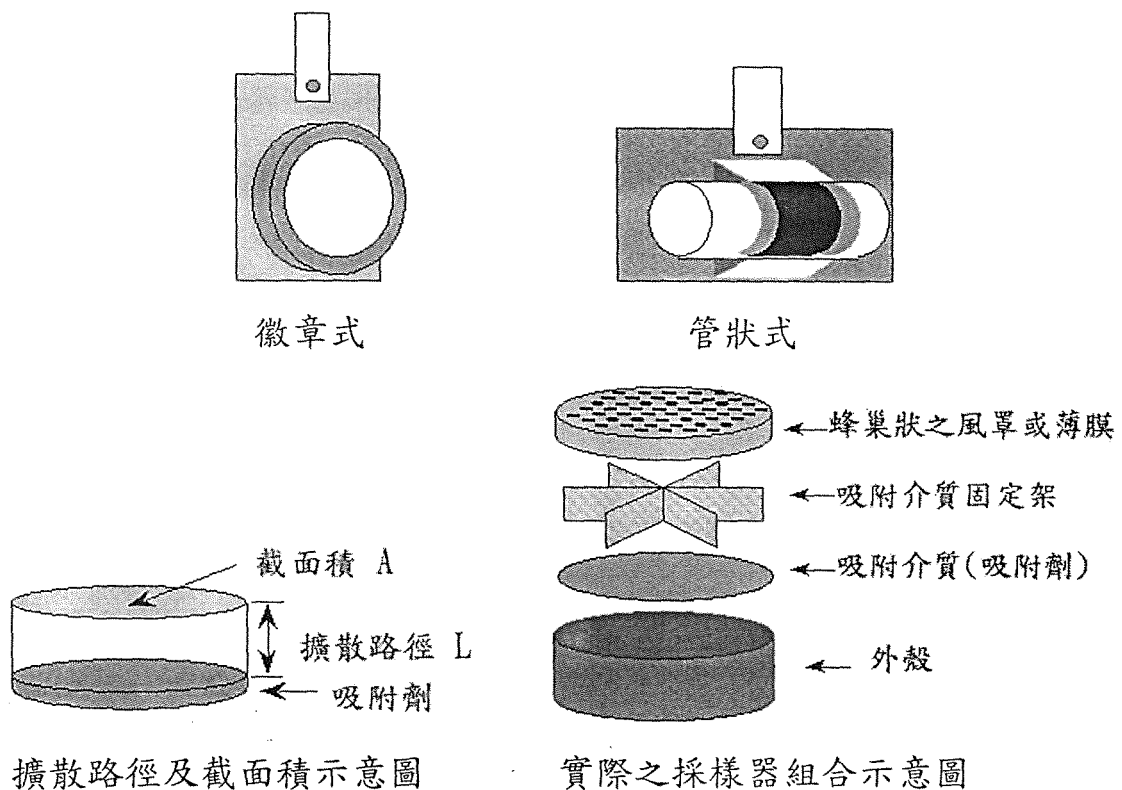
另有氣體採樣袋、小型衝擊式採集瓶 (midget impinger)及濾紙等不同的採集介質。

主動式採樣器是使用已久的採樣設備，但其缺點是設備成本高且攜帶不方便。採樣結果會受吸附容量、濃度、濕度、溫度、干擾物及採樣時間的影響。



## (二)被動式採樣器(Passive Sampler)：

被動式採樣器在 1973 年由 Palmes 首度發表[2]，有別於主動式採樣器，主要是利用氣體擴散原理來採集空氣中有害物質。其基本構造包括：主體、吸附介質、擴散室、及滲透薄膜。一般而言，徽章式採樣器係指採樣器截面直徑與採樣器長度比值較大者，而管狀式採樣器則截面直徑與長度之比值較小。徽章式及管狀採樣器各有優缺點，應以採樣條件來選擇適當型的採樣器。



圖形取材自勞工安全衛生研究所

被動式採樣器的優點如下：

- (1)成本低:被動式採樣器係利用自然之物理現象，不需藉助動力採樣幫浦，因此可減少採樣幫浦設備費，亦可省卻校正及維修採樣幫浦之麻煩。因為成本低，且適合於個人採樣，因此可用於大規模之流行病學調查採樣。
- (2)使用容易:採樣前後不需校正採樣幫浦之流速，只需準確的記錄採



樣時間，使用上較主動式採樣器方便。

- (3)體積輕巧：較不妨礙配戴者之活動，適合於個人採樣使用。
- (4)兼具直讀及定量之功能：被動式採樣器的採集介質若為吸附劑裡反應劑(reagent-impregnated sorbents)，採樣後可由呈色反應直讀出暴露濃度，亦可再帶回實驗室進一步準確地定量分析。利用液態吸附劑，製成液態被動式採樣器(liquid diffusive sampler)，可減少脫附之誤差。

被動式採樣器雖有以上多種優點，但仍無法完全取代主動式採樣，此乃因被動式採樣仍有一些未能克服的缺點，例如風速、方位、捕集率、逆擴散、採樣時間、溫度、濃度、濕度、吸附時間等因素都會影響採樣結果。

由於主動式採樣器及被動式採樣器各有優缺點，所以本實驗用兩種並行的採樣方式，以降低環境的影響因素，藉此可偵測在密閉有機溶劑暴露環境中有機蒸氣的濃度及比例，將該環境控制在恆定的條件下，使細胞毒性的實驗能順利進行。

建立此有機蒸氣暴露的環境，因其可以控制不同有機蒸氣的濃度比例，比較能符合實際的工廠作業環境。與環境偵測比較，能夠有較確實的有機蒸氣複合影響；又與生物偵測比較，因生物偵測主要是檢驗其生化代謝物的濃度來了解該化合物對人體的影響，但其易受背景值或其他食物成份的干擾，且不同的化合物有不同的代謝產物，或要偵測的代謝物又被代謝成其他物質而影響分析結果。而本研究設計則可用穩定的有機蒸氣濃度控制及在短時間內就可了解不同的有機蒸氣是否會造成生物體不同程度的複合毒性。如此可以彌補環境偵測及

生物偵測的不足，其結果可當做生物偵測的參考及製訂環境中有害物質容許濃度的考慮因子。

首先對在研究中使用到的化合物的性質作初步的認識：

### (一) 甲苯(Toluene)

化學性質：液體；澄清無色；具有芳香族的特性味道。

沸點 110.6°C；熔點-95°C

蒸氣密度(空氣=1)：3.1

揮發速率(乙酸丁酯=1)：2.24

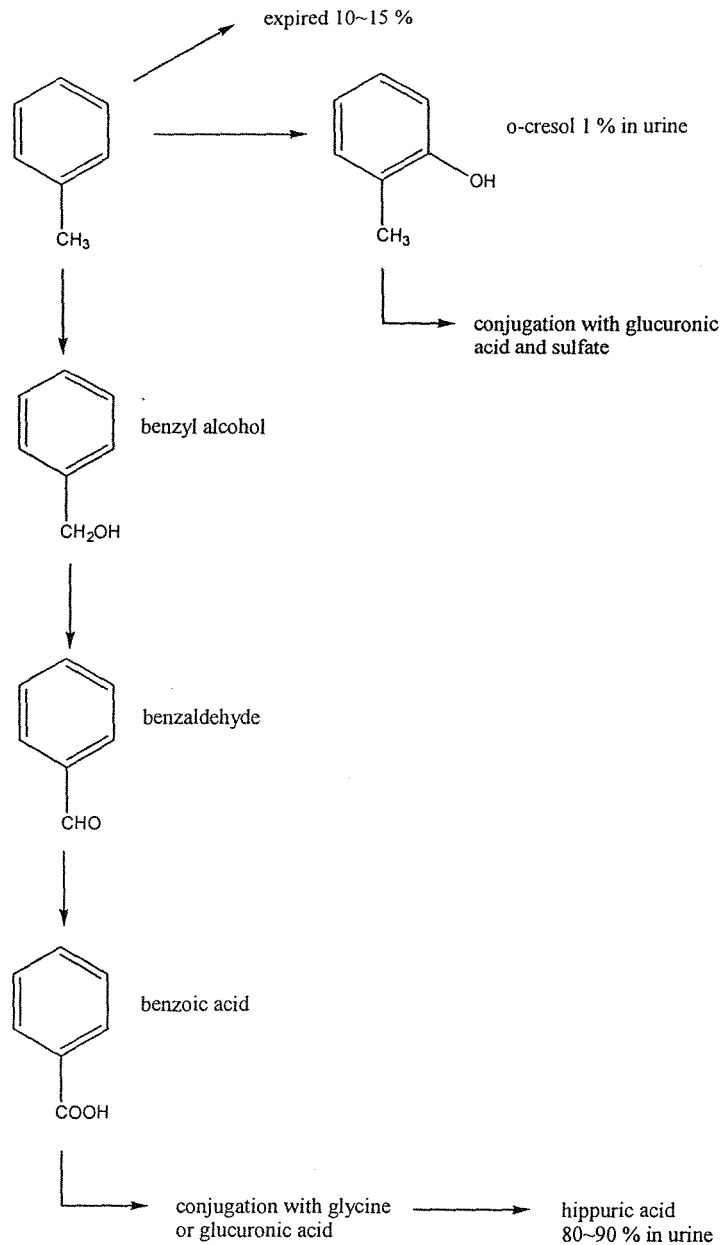
水中溶解度：54~58 mg/100 mL

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 %）[3,4]。在上述環境中之工作人員往往暴露在甲苯蒸氣中，雖然甲苯相對於其他有機溶劑而言具有較低之毒性 [5]，但短期間或長期暴露在低劑量之甲苯，對人體神經系統、肝、腎所造成之傷害仍不容忽視。

文獻上指出甲苯暴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 [6,7,8]。另有報告指出，暴露在 1000~4000 PPM 之甲苯下，可造成大白鼠學習障礙及行為改變[9]。長期暴露在 100 PPM 下 6~20 天，亦可造成小白鼠轉輪能力之下降、神經功能異常及記憶力降低 [10,11]。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暴露會造成某些酵素濃度上昇，例如胺基轉胺酵素(ALT)、麩胺醯基轉移酵素(GLT)、琥珀酸去氫酵素(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[12]。

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[13]。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 [14]。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·)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，此類化合物僅佔甲苯代謝物中極低之比率(約 2 %左右)[14]。其代謝途徑見下頁之流程：



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，由火焰離子偵測器(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碳之被動式採樣器(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碳之擴散比率及暴露時間，計算出甲苯之環境濃度[15,16,17]。

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，其曝露後呼出之甲苯蒸氣前者為 18 PPM，而後者升至 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[18]，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。

對人體而言，甲苯的毒性可由急毒性及慢毒性兩方面來討論：

(A) 急性毒性：

吸入：甲苯蒸氣濃度約50 PPM會引起輕微嗜睡和頭痛；50~100 PPM：刺激鼻子、喉嚨和呼吸道；約100 PPM：引起疲勞和暈眩；超過200 PPM：引起之症狀與酒醉類似，眼花、麻木和輕微噁心；超過500 PPM引起精神混亂和不協調；更高濃度(約10000 PPM)則更進一步抑制中樞神經系統，會導致無意識和死亡；更嚴重暴露可能引起腎臟衰竭。

皮膚接觸：接觸初期可能引起溫和的刺激，長期接觸可能導致皮膚炎(皮膚乾、紅)。

眼睛：短暫(3-5分鐘)暴露於300 PPM蒸氣或長時間(6-7小時)暴露於100 PPM皆會引起輕微刺激。

食入：因食入而吸收，會抑制中樞神經，症狀如吸入所描述。

若是在食入或嘔吐時將物質吸入肺部，可能導致肺部刺激，肺部組織受損和死亡。

(B) 慢性毒性：

神經系統：慢性中樞神經系統受損，記憶力喪失、睡眠不安、意志不集中和動作不協調。

長期暴露可能影響聽力。

引起皮膚炎(皮膚紅、癢、乾燥)。

在環境偵測上採樣分析甲苯的方法是以 GC/FID(氣相層析儀：備有火焰離子化偵檢器)為主，以個人採樣幫浦採樣，使用活性碳管為採樣介質採集甲苯蒸氣。採集後以塑膠蓋封管，並以石蠟薄膜(parafilm)加封後運送。分析時將活性碳管兩端切開，倒出後段的活性碳丟棄。以微量注射針筒取適量的分析物，直接注入前段的活性碳上。再將塑膠蓋封管，並以石蠟薄膜加封，冷藏靜置過夜。隔夜後打開活性碳管塑膠蓋，前段之活性碳倒入玻璃小瓶中。取出分隔之聚甲醯胺甲酯(PU)泡綿，後段之活性碳倒入另一個玻璃小瓶。每一玻璃小瓶中加入脫附劑，以超音波振盪器振盪 30 分後測定。注射樣品進入氣相層析儀，分析結果以電子積分器或其他適當方法計算面積(或高度)，自檢量線上求出甲苯所吸附的量。

(二) 丁酮(Methyl ethyl Ketone)

化學性質：液體；無色透明；丙酮味

沸點： 79.6 °C；熔點： -86.3 °C

蒸氣密度(空氣=1)：2.41

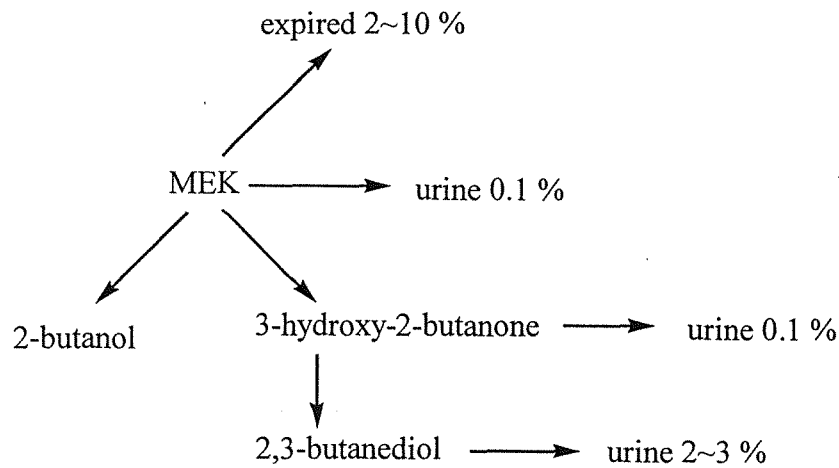
揮發速率(乙醚=1)：2.7

水中溶解度：26.8~29 mg/100 ml

丁酮是一種無色液體溶劑，對於大多數有機溶劑和水都有很好的溶解性，由 1996 年台灣化學進口商品錄，可以知道丁酮年進口量約為 21,644,523 公斤，在工業界中使用應用非常廣泛，常被用於硝化纖維塗料及乙烯塗料之溶劑“Glyptal”樹脂、去漆劑、固化劑及黏著劑、有機合成、無煙炸藥之製造、清潔液體、印刷、觸媒軟體及丙烯塗料等。但丁酮的沸點只有 79.6°C [19]，很容易揮發形成蒸氣狀態，在使用丁酮的作業環境中，若沒有適當的防護，易使作業工人不自覺的經由呼吸道或皮膚接觸而吸入大量的丁酮。長期暴露在丁酮溶劑時，會引起神經組織的中度麻醉作用，因而引起意識不明和精神錯亂等現象。

美國職業安全衛生署 (Occupational Safety and Health Administration, OSHA)、美國職業安全衛生研究所 (National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH) 頒佈之容許暴露界限值 (Permissible Exposure Limit, PEL)，其八小時日時量平均容許濃度 (Time Weight Average, TWA) 均為 590 mg/m<sup>3</sup>。美國政府工業衛生師協會 (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH) 建議的界限值 (Threshold Limit Value, TLV-TWA) 也是 590 mg/m<sup>3</sup> (200 PPM)。目前我國丁酮所規定之暴露容許濃度為 200 PPM [20]。但丁酮的皮膚穿透速率為 2.45 mg/cm<sup>2</sup>/hr [21]，丁酮之直接接觸或皮膚暴露於作業環境空氣中，均可造成自皮膚滲透吸收。

由動物實驗及人類生化代謝的檢測，丁酮經由呼吸道或皮膚接觸吸收進入體內後，一部分會以原來的丁酮存在，另一部分會被氧化和還原為 3-羥-2-丁酮 (3-hydroxy-2-butanone) 及 2,3-丁二醇 (2,3-butanediol) [22-28]，且均能排泄在尿液中。



在有些自願的作業人員的實驗中發現，丁酮在皮膚的吸收比二甲苯(xylene)、甲苯(toluene)、四氫呋喃(tetrahydrofuran)有較高的吸收量 [29]。丁酮的代謝速率比其他酮類慢，若以腹腔注射，其在血清中的半衰期為 270 分鐘[26]。有研究報告指出，暴露在含有丁酮的環境中(如油漆工廠...等)，作業工人在暴露 30 週後，有姐妹染色體改變 (Sister-chromatid exchanges, SCE)的情形發生[30]。在印刷工廠中，印刷工人若急性暴露於混合有機蒸氣中(包括丁酮、甲苯、醋酸、二氯甲烷...等)，會影響手的靈活度、視力降低、記憶力減退及情緒低落[31]。若共同暴露在酚類、甲苯、丁酮、苯的環境中，可能會影響血小板的數目、凝血時間及微量元素銅、鐵的含量[32]。

OSHA 及 NIOSH 均尚未有適當的丁酮生物暴露指標值。而 ACGIH 所建議之生物暴露指標值 (biological exposure index, BEI) 為下班後的尿液，含有 2 mg/L 丁酮[33]；德國所建議之生物容許恕值(biological

tolerance value, BAT) 為下班後的尿液，含有 5 mg/L 丁酮 [34]；且均不需要以肌酸酐或尿液比重做校正 [35]。

目前之生物偵測分析方法：Van Door 以 o-nitrophenolhydrazine 與尿液或血液樣品中的丁酮形成 o-nitrophenolhydrazone 衍生物，以固相萃取法 (solid phase extraction) 分離，再用紫外線光譜儀 (UV) 及高效液相層析儀 (HPLC) 分析此衍生物[36]。但此方法之樣品前處理手續很麻煩，衍生劑本身的毒性較大，容易危害到分析人員的健康。另該方法的偵測極限為 100 mg/L，只能應用於高暴露群之志願者或動物實驗研究。Kezic 於 1988 年時，將尿液檢體先酸化後，依序以二氯甲烷萃取、高效率液相層析儀濃縮，再以氣相層析儀分析丁酮[37]。然該方法所使用的萃取溶劑沸點只有 40°C，萃取樣品的過程中，二氯甲烷很容易揮發出來，導致添加回收率會在 85~91 %之間。該分析方法的偵測極限 10 mg/L，但 ACGIH 所建議之尿中丁酮生物暴露指標值(2 mg/L)；德國所建議之生物容許恕值 (5 mg/L)，因此 Kezic 所發表的分析方法仍然無法應用於丁酮現場作業勞工暴露者之尿液分析。Deveaux [38]於 1987 年，以頂層法和 Fourier 轉換式紅外光 (Fourier Transform Infrared Spectrometry, FTIR) 定量分析血液及組織液樣品，但此方法所使用之儀器較昂貴，且該方法的偵測極限為 6 mg/L，只能應用於高暴露群之動物實驗研究。Wallace [39]於 1984 年，以 Tedlar bag 收集人體呼出氣體，並以 Tenax cartridges 捕集丁酮，再以熱脫附法和氣相層析質譜儀(GC-Mass)定量分析樣品。

毒性方面亦可分急性毒性及慢性毒性兩方面討論：

(A)急性毒性：

吸入：100~200 PPM 會刺激鼻、喉。更高濃度可能抑制中樞神經，引起頭痛、噁心、頭昏眼花、困倦。極高濃度則可能導致意識喪失，甚至死亡。

皮膚：丁酮的蒸氣會對皮膚及粘膜具有中度刺激性和滲透皮膚。

眼睛：蒸氣會引起刺激。

食入：影響與吸入相同。

(B)慢性毒性：對神經、肝及皮膚有影響。長期接觸皮膚會造成皮膚炎(紅、乾、癢)與皮膚白化,亦有皮膚過敏之報導。

一般測量作業場所空氣中丁酮的濃度多以主動式個人採樣方法來偵測[40,41,42]，國內目前分析丁酮的方法也是以GC/FID(氣相層析儀：備有火焰離子化偵檢器)為主，以個人採樣幫浦採樣，使用矽膠管採集，採樣分析步驟如同甲苯之採樣分析。

### (三)鎘(Cadmium)

鎘金屬為稀有元素之一，亦為人體非必需之元素，在地球上岩石中平均含量為1.5g/t [43]。鎘在工業上使用廣泛，由於塑膠工業在我國十分發達，因此塑膠安定劑的用量十分可觀。而用以製造硬脂酸鎘  $(C_{18}H_{35}COO)_2Cd$  以作塑膠安定劑的原料氧化鎘，用量亦十分龐大。其有關之製造廠，如陶器染料、電鍍合金、鹼性蓄電池的製造、塗料、油漆、煉鋅、電鍍電子工廠等，都是含鎘工業廢水主要來源[44]。由於鎘金屬與其化合物為人體的致毒性物質[45]，在極低的濃度便有極高的毒性並且只有很長的生物半衰期(約25~30年)[46]，不易由生物體

內排除，於血中的半衰期大約是2.5個月，於肝臟中大約是10年，於腎臟大約是20年。而且鎘因其化學性安定和易累積轉移的特性，可經由廢水或廢棄物的污染累積到生物體或轉移到自然水域中，進而造成全球的環保問題，而這些被轉移到自然界中的鎘，不僅傷害到動植物，更嚴重地威脅到人類的健康[47]。流行病學調查指出，經常暴露於鎘金屬的工人罹患癌症比例較正常人高[48]。除了職業上暴露於鎘所引起的健康效應問題，即使是一般族群也可能有鎘暴露的存在，如由飲食而食入鎘，或是抽煙都會造成低劑量鎘暴露[49]。在某些報告中，鎘被認為與人類肺癌以及前列腺上皮性腫瘤有關，Takenaka等人[50]研究發現將鎘利用吸入性方式對大老鼠(rat)作長時間暴露，其結果產生肺癌發生率高達70%，並且Waalkes等人[51]也發現受到鎘的暴露與前列腺上皮性腫瘤有關。另外Blakley等人[52]以及Waalkes等人[53]利用口服方式對小老鼠(mice)給予鎘暴露，發現鎘會使造血系統受到破壞，容易導致病毒感染，並減弱對病毒監控之免疫系統。除此之外，鎘會間接地經由懷孕母體的暴露導致胎盤的壞死，進而造成胎兒的死亡[54]。鎘對於人體的影響主要在腎臟及骨骼系統，鎘的吸收，主要是經由呼吸道和腸胃道，腎皮質則是其主要侵襲的器官；而職業上暴露於鎘塵埃中，則可能會造成肺氣腫的發生。慢性鎘暴露會導致早期的腎功能不良，鎘中毒病人會因腎病變造成尿液中產生含大量低分子量蛋白質，如 $\beta_2$ -microglobulin及醣解N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (NAGase)等，這是因為腎小管的持續破壞，除了蛋白尿，甚至會造成糖尿、氨基酸尿、鈣尿等稱為凡可尼症候群 (Fanconi's syndrome) 之症狀，嚴重的個案會造成腎絲球過濾分率下降甚至造成尿毒症。嚴重者更會因大量的鈣流失而產生骨質疏鬆症，進而導致軟骨症[55,56]。例如日本著名的痛痛病(Itai-itai disease) 之特徵就包括了骨質疏鬆、

骨質疼痛及腎小管功能失調，其可能的機轉是鎘抑制了腎小管的功能造成維他命D製造不足而間接引起骨質疏鬆。鎘亦會造成心血管疾病及高血壓；對於呼吸系統而言，鎘作業場的工人可能引起慢性鼻炎、咽喉炎或慢性阻塞性肺氣腫。在In vitro的實驗方面，鎘會造成細胞毒性(cytotoxicity)、基因毒性(genotoxicity)及致癌性(carcinogenicity)，其可能是經由氧化性傷害進而導致細胞死亡及細胞轉形作用(transformation)[57,58]。鎘對於體內一些參與生化代謝的必需重金屬(如Zn、Cu、Ca)具有置換作用，可能造成細胞內巨分子結構及功能發生改變，導致細胞死亡或癌化。鎘亦會影響細胞間巨分子的交互作用以及修飾DNA，RNA和蛋白質的代謝途徑，進而造成細胞的死亡[59]。

鎘對人體的曝露途徑主要是藉由食入與吸入，而正常情形下經皮膚的吸收量幾乎可以忽略。一般而言，鎘主要是經由食物進入人體，而吸煙是鎘的一個重要來源之一。至於職業性的曝露途徑是經由工作場所中吸入被鎘污染的空氣。

鎘的曝露途徑分別由下列來說明：

(一)吸入：工作場所中鎘的粉塵和薰煙會經由作業人員的呼吸道進入肺部，其中大約有25%~50%鎘會被吸收進入人體，主要是由其粉塵粒徑大小和化學組成來決定，但在土壤中的鎘由於其揮發性極低不太容易造成一般環境中的空氣污染，所以對住在污染區的一般群眾來說，除非其附近工廠排放出來的鎘嚴重污染了環境中的空氣，否則土壤中的鎘很難經由空氣進入人體，故對於非職業性曝露的一般族群經由肺部吸入的這條途徑可以忽略不計。



(二)食入：雖然食物中的鎘從腸胃道吸收進入人體的量只有 5 %，遠低於肺部的吸收能力，但是對於非職業性曝露的一般族群而言，經由食物攝入是最主要的途徑，根據世界衛生組織統計，一般住在非污染區的民眾每天大約會從食物中食入 10~40  $\mu\text{g}$  的鎘，從飲水食入的量小於微克( $\mu\text{g}$ )，可是住在鎘污染地區的居民若食用當地所生產的食物甚至每天可食入數百微克的鎘。如果要造成腎臟的毒性，則每天要從食物中食入 140~260  $\mu\text{g}$  的鎘超過 50 年以上，才會造成腎小管功能失調。至於鎘污染地區的地下水也可能經土壤中的滲透水而增加鎘含量，但因地下水具稀釋能力及流動性，經由這一途徑進入人體的量可能遠低於食物攝取量，因此污染區居民鎘的攝取主要是經由含鎘食物而來。(通常一般飲用水含鎘量在 1  $\mu\text{g/L}$  以下)

(三)吸煙：根據世界衛生組織所公佈的報告指出，一般的吸煙者若每天吸 20 支煙，每天約可多 2-4  $\mu\text{g}$  的鎘吸收進入人體，因此吸煙也是一個重要的暴露因子。

到目前為止，研究機構似乎還沒有一套系統可以用來研究揮發性有機化合物對細胞體素的影響。於是本研究的目的就是要建立揮發性有機蒸氣暴露系統，控制該系統的內部環境變因，符合作業環境中多種不同有機蒸氣暴露的狀況。觀察在此環境下細胞體素可能造成的傷害。在本研究中為了測試系統的穩定性，選用三種化合物(有機溶劑為甲苯與丁酮，無機金屬為氯化鎘)來做測試。選用此三種化合物主要的目的是在作業環境中可能同時出現，此三者在使用上非常廣泛，

甲苯及丁酮都是目前常用之有機溶劑，很容易存在同一作業環境之中，共同暴露的機會非常大，而使用這兩種有機溶劑的工廠也有使用鎘的可能，例如油漆工業即包含此兩種有機溶劑的使用[60]，而鎘也是油漆、塗料的原料之一。

本研究之結果應有助於了解環境中揮發性有機毒物在其他環境毒物共存下對生物體之交互效應，以做為共同暴露時評估環境污染物毒性之參考指標。

## 實驗材料

### (一)儀器

名稱	廠牌
氣相色層分析儀 (Gas Chromatography , GC)	惠普(Hewlett Packard 5890 Series II )
自動注射器 (Autosampler)	惠普(Hewlett Packard 7673 GC/SFC injector )
分離管柱 (Column)	惠普 Hp-20M Carbowax 20 M 30m×0.53mm×1.33 μm
高流量採樣幫浦	SKC model 224
低流量計數型採樣幫浦	SKC model 222-3
皂泡式流量計	SKC model 303
浮子流量計	Kofloc RK1600R
自動注射器(Sage™ Pumps)	ATI Orion
無菌操作台(Lamina Flow)	High Ten
細胞培養箱(Incubator)	Nuair™ Us Auto Flow
流式細胞分析儀(Flow cytometry)	FACScan Becton Dickinson
離心機(Centrifuge)	Kubota KN-70
倒立式顯微鏡	Nikon
光學顯微鏡	Nikon
恆溫水浴槽 ( Water Bath )	Kodman
血球計數器	Reichert-Jung
加熱板 ( Hotplate )	Corning

## (二) 材料

### 1. 消耗性材料：

名稱	廠牌
活性碳管(charcoal tube)	SKC ST-226-01 批號 LOT-120, 椰子殼製, 100/50 (mg/mg)
徽章式被動採樣器 (passive monitor)	SKC CAT.No.575-001 批號 LOT 656
組織培養瓶 Tissue Culture Flask (25 cm <sup>2</sup> )	TPP, Falcon
細胞培養皿 Tissue Culture Dish (100×20mm style)	Falcon
細胞培養盤 (24 well)	Falcon
無菌過濾膜 (0.2 μm)	<b>Gelman Sciences</b>
Microprep (0.22 μm, 25 mm)	Poretics
15 ml 塑膠離心試管	Falcon
1.5 ml 塑膠離心試管	Eppendorf

## 2. 試藥：

名稱	廠牌
Toluene	Merck
Methyl Ethyl Ketone (MEK)	Merck
Carbon Disulfide (CS <sub>2</sub> )	Merck
1-Butanol (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH)	Merck
FOETAL CALF SERUM (胎牛血清)	Kibbutz Beit Haemek Israel
Minimum Essential Medium	Gibco Brl
Dulbeccols Phosphate Buffered Saline	Gibco Brl
Penicillin-Streptomycin	Gibco Brl
Trypsin-EDTA	Gibco Brl
Trypan Blue Stain 0.4 %	Gibco Brl
CdCl <sub>2</sub>	Sigma
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)	Sigma
Ribonuclease A	Sigma
Propidium Iodide (PI)	Sigma
n-Butanol	Merck
Gimsa	Merck
Isopropanol	Ultra Pure

## 實驗方法

### (一) 脫附效率 (Desorption Efficiency, DE)

將定量的各種單一或混合溶劑以實驗用注射針，直接注入 (spike) 活性碳管前端管壁，而後迅速以原廠所附之專用紅色塑膠蓋密封，直立儲存二十小時以上。待其平衡後，將前、後段分別倒入 2 mL 小玻璃瓶中，加入 1 mL 的脫附劑進行脫附，脫附劑分別為 CS<sub>2</sub> 及 CS<sub>2</sub> 混合 4% 1-Butanol 兩種。最後再以自動採樣器 (autosampler) 抽出 2 μL 注入惠普 5890 系列 II (HP SeriousII) 氣相色層分析儀 (Gas Chromatography, GC)，配合火焰離子偵檢器 (Flame Ionization Detector, FID) 進行定量分析。樣品的分析條件為：

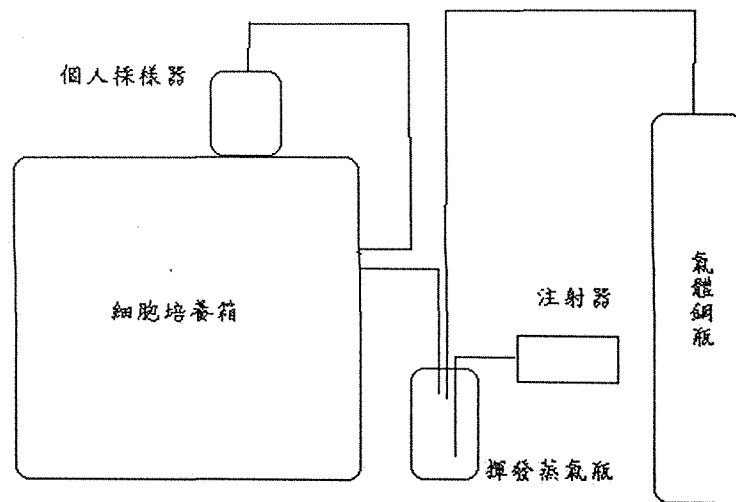
溫度梯度：35°C-5 分鐘 → 10°C/min → 55°C-5 分鐘 →  
20°C/min → 100°C-5 分鐘

載流氣體(N<sub>2</sub>)流量：5.0 mL/min

### (二) 環境偵測 (Environmental Monitoring)

#### (I) 有機暴露系統的建立

為了模擬工廠的有機溶劑暴露環境，藉以了解在實際狀況下，作業人員暴露於多種不同揮發性有機溶劑對生物體之影響。於是建立一個穩定的揮發性有機溶劑暴露培養箱如圖所示：



將配好之不同濃度比例的有機溶劑放入注射針筒，以固定的速率打入一密閉空瓶中使其揮發成蒸氣狀態，再利用瓶裝空氣將該有機蒸氣打入細胞培養箱 (incubator) 中。並在細胞培養箱中培養細胞株，觀察有機蒸氣對該細胞株的生物毒性。

## (II) 暴露槽中揮發性有機溶劑之採樣方式

為了解細胞培養箱中有機蒸氣濃度的穩定性，我們在培養箱中放入了被動式採樣器，並配合活性碳管採樣 (主動式採樣)，採樣結果由 GC-Mass 分析。

首先配製不同濃度比例的甲苯(50~200 PPM)與丁酮(100~600 PPM)，放置於自動注射器中，以固定的速率打入密閉空瓶中，用瓶裝空氣打入細胞培養箱中，持續 1 小時後，在細胞培養箱中放入 5 mL 的細胞培養液

(分為兩組:添加及不添加等量的有機溶劑於細胞培養液中)及兩個被動式採樣器,並裝上個人採樣幫浦及計數採樣器,設定空氣流速為 500 mL/min,將活性碳管兩端切除,一端接暴露箱(incubator),一端接在採樣幫浦,打開計數器開始計數。1 小時後關閉計數器,取下活性碳管,將活性碳管兩端用塑膠蓋蓋住,封上石蠟薄膜,放於 4°C 冰箱中儲存,並記錄計數器上的數字。間隔一小時後再裝上活性碳管,重覆前述的採樣步驟,連續採樣 12 小時。於放入被動式採樣器 12 小時後取出其中一個,蓋上蓋子,封上石蠟薄膜,放於 4°C 冰箱中儲存。於第 24 小時取出另一個被動式採樣器及抽取最後一個主動採樣樣品,分析其中樣品的濃度。在活性碳管採樣的同時,另抽取 200  $\mu$ L 的細胞培養液注入裝有 800  $\mu$ L 脫附劑的玻璃小瓶中密封儲存於 4°C 冰箱中。

### (三)毒理試驗

(I)細胞實驗之準備:

#### \*細胞培養:

V79 細胞(中國倉鼠肺纖維母細胞)以含有 10 % FBS, 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03 % L-glutamine 和 1 % penicillin/streptomycin 之 MEM 細胞培養液培養,將細胞株置於含 5 % CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恆溫培養箱內培養,每二天更換一次新鮮的培養液,約隔三天分盤培養。

本實驗的 V79 細胞解凍後均不超過十代以上,主要是



避免細胞過度老化以干擾實驗結果。

### \* 細胞分盤

首先將培養皿中舊的細胞培養液吸出，加入 10 mL 1 倍的 PBS (phosphate buffer saline, 0.2 g/L KCl、0.2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、8 g/L NaCl, and 2.16 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 緩衝溶液洗一下，然後將 1 倍的 PBS 緩衝溶液吸出，再加入 1 mL 1 倍的 trypsin (為一種內切酶，能幫助細胞脫離培養皿)，當 trypsin 覆蓋所有細胞後，即馬上吸出 (盡量吸乾，因為對細胞會有傷害)，置於 37 °C 培養箱 5 分鐘，使細胞能脫離培養皿，5 分鐘可利用倒立式顯微鏡 (Nikon) 觀察細胞是否已脫離培養皿 (若尚未完全脫離，可用手輕輕拍打培養皿邊緣，以幫助細胞脫落)，細胞脫落後，我們以 10 mL trypsin 抑制劑 (用含有血清的細胞培養液即可) 沖洗細胞，並將細胞吸出，置於 15 mL 離心管中，於 4 °C 離心 800 rpm (Kubota KN-70) 5 分鐘後，將上清液去除 (盡量吸乾)，再加入適當細胞培養液，待混合均勻後即可種入培養皿中。

### \* 冷凍細胞

將欲儲存之細胞由細胞培養皿中的培養液抽出，以磷酸緩衝液 (PBS) 洗兩次後，用 trypsin 將細胞洗下 (待 4~5 分鐘後)，加入 MEM 培養液以去除 trypsin 活性，再將細胞懸浮液移置離心管中，以離心 800 rpm、5 分鐘。接著去除上清液，經確定細胞數後，加入適當的冷凍細胞培養液【以 2 倍的冷凍細胞培養液 (50 % incomplete 細胞培養液, 40 % FBS, 10 % DMSO) 與 complete 細胞培養液 1:1 混

合】，將細胞稀釋成  $2 \sim 4 \times 10^6$  個細胞/mL，以每個冷凍管約 1 mL 的量將細胞移至冷凍管中，再將冷凍管移至保麗龍盒中，先於  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷凍 1 小時，再移至  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  隔夜放置，隨即將細胞移至液態氮桶中，以確保細胞之完整。

#### **\*解凍細胞**

首先，取 9 mL 新鮮的細胞培養液，置於 15 mL 離心管中備用。將細胞自液態氮桶取出(動作要快)，於  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  快速回溫，將冷凍管中之細胞液取出，與 9 mL 新鮮的細胞培養液充分混和，於  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  離心 800 rpm (Kubota KN-70) 5 分鐘後，將上清液去除(盡量吸乾)，再加入 10 mL 新鮮的細胞培養液，待混合均勻後，種入 10 cm 細胞培養皿中，在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱中，培養 18 小時後，換新鮮的細胞培養液。

## (II) MTT 之細胞活性分析

細胞之活性分析係根據 Alley 等之方法[61]，細胞內粒線體為主要表現細胞活性產生能量的來源，存活的 V79 細胞能將 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-z-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (tetrazolium salt)經由粒線體中去氫酵素(dehydrogenase)作用代謝還原成 Formazan 晶體，再將結晶物溶出，經由測量其吸光值即可了解細胞的活性。

在 24 wells 的細胞培養盤中，每個 well 種  $2 \times 10^4$  個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液(PBS)洗去培養液，再換

胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液( PBS )洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不同濃度的毒物(氯化鎘，Toluene、MEK)做複合曝露。置入 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培養箱(包含有機溶劑曝露裝置及不含有機溶劑曝露裝置的培養箱)24 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗兩次，防止與細胞進一步作用。將 PBS 抽出後，加入新鮮的 MEM 培養液，再加入 MTT( 0.5 mg/mL )試劑，放入培養箱 4 小時。待培養 4 小時後，將上清液去除，再以 1 mL 的異丙醇將細胞打破，使藍紫色結晶物溶出，於光波長 563 nm 下測其 OD 值。

相對細胞存活率(%)=(不同濃度對細胞之吸光值/control 組細胞之吸光值)×100 %

### (III)流式細胞分析儀(flow cytometry)-細胞週期之測定

本研究採用中山醫學院貴儀中心之 Flow Cytometry 分析暴露在含有機溶劑中，V79 細胞週期之改變。早期測定細胞膜上各種標示物(如膜蛋白等)之表現情形，是用單克隆抗體(Monoclonal Antibody)及螢光劑作用後，再以螢光顯微鏡判讀結果。由於是以人工判讀螢光之有無，並計算數目，不但肉眼的敏感度差，且一顆顆的計算螢光染色細胞相當費時，每次計算數百顆細胞，至少需半小時以上，人為的誤差極大，對於抗原濃度較低的細胞，經常無法測得。流式細胞儀不但能快速的測量較多的細胞數目(其速度可達 15000 Cell/Second 以上)，而且敏感度高(< 1000 FITC/particle)，它可以測定及計算單一細胞或生物顆粒上的化學或物理特性。首先必須使用已結合上螢光染料的抗體與單一

細胞，如白血球、紅血球、染色體、病毒、細胞或組織細胞之標的細胞作用後，再將這些已染上螢光染料之細胞通過 Fluid stream，並以激光照射在已結合上螢光染料的細胞上時，會隨著螢光染料種類之不同，放射出不同波長的光線，並以光學濾光器 (Optical Filter) 去篩選所欲測定的波長，最後使用 PMT (Photomultiple Tube) 將訊號接收放大後再轉換，處理成數據並儲存起來，等測定完後再將資料叫出，並給予分析。

細胞週期之分析係根據 Fried 等[62]之實驗法。一般細胞週期分為增殖期(G phase)、DNA 複製期(S phase)及分裂期(M phase)等週期，每一期中 DNA 之含量均不相同。一般而言，因為 M 期後細胞即分裂成兩個完整細胞，故其中 DNA 之含量約為  $G_0/G_1$  期之兩倍，如以 proptium iodine (PI) 等螢光染劑和雙股 DNA 結合後，可比未結合前增強 200 倍以上之螢光值，故可以流式細胞測定儀 (Flow cytometry) 計算細胞週期中各期之比例變化。本實驗主要觀察細胞在受毒物傷害後細胞週期的變化。

取 10 cm 培養皿種入  $5 \times 10^5$  個 V79 細胞，培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液 (PBS) 洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不同濃度的毒物 (氯化鎘 0~10  $\mu\text{M}$ ，甲苯 0~200 ppm 或丁酮 0~400 ppm) 做複合暴露。置入 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱 (含有機蒸氣暴露之細胞培養箱) 24 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗兩次，防止與細胞進一步作用。將 PBS 抽出後，加入胰蛋白酶 (Trysin/EDTA) 將細胞洗下，收集細胞約  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  個，在 800 rpm 轉速下離心 5 分鐘，去除上清液，約留 50  $\mu\text{L}$  的 PBS，避免碰及細胞。再加入 150  $\mu\text{L}$

PBS，振盪以打散細胞。在振盪打散細胞時，一滴一滴地加入 800  $\mu\text{L}$  冰冷的乙醇(80 % ethanol)混合均勻，在冰上培養 30 分鐘以上，在 800 rpm 轉速下離心 5 分鐘，盡量吸除上清液。再用 1 mL PBS 將細胞團塊均勻打散，最後在 1 mL 的細胞懸浮液內分別加入 RNase A Stock(終濃度 PI 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 RNase A 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，並輕搖晃混合，在室溫 37°C 下暗室中作用 15~30 分鐘，以鋁箔紙包好儲存在 4 °C 冰箱中。利用流式細胞分析儀來分析細胞週期。

## 統計與計算

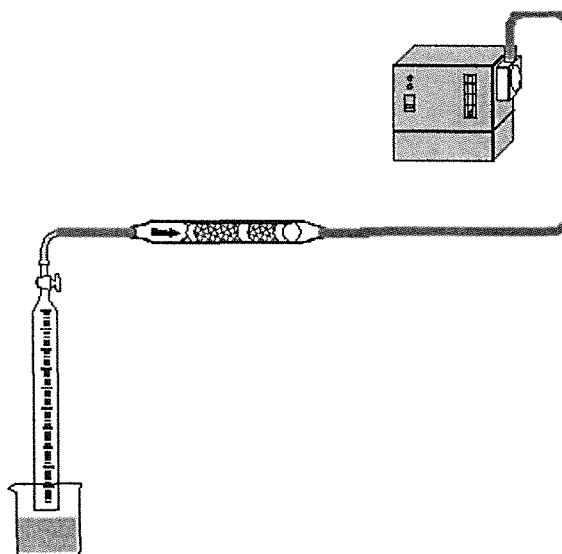
### 空氣流率計算

採樣幫浦為 SKC 公司的產品，型號為 222-3，採樣以計數(count)方式進行，經由採得的計數乘以每一計數所代表體積即得到採樣總體積。採樣器每一計數所代表體積由皂泡式流量計在不同幫浦抽力時分段校正，皂泡每走 50 毫升除以所得總計數，即可得到在不同幫浦抽力時，每一計數所代表的精確體積值。

$$\text{流率(mL/min)} = \frac{\Delta V(\text{mL})}{\Delta t(\text{sec})} \times \frac{60(\text{sec})}{(\text{min})}$$

$\Delta V$ =肥皂泡所上升之體積(mL)

$\Delta t$ =肥皂泡從  $V_0$ (mL)上升到  $V_n$ (mL)，所需之時間(sec)



### 檢量溶液 (calibration solution) 配製量計算

檢量溶液的濃度應包括待測物的濃度，其配製量計算步驟如下：

配製質量 = 預估現場濃度 × 採樣體積

預估現場濃度的單位為  $\text{mg}/\text{m}^3$ ，若為 PPM 則需以換算因子換算之。

#### 檢量線範圍

檢量線的線性相關係數 (r 值) 不得小於 0.995。標準溶液濃度的配製值和量測值的平均相對誤差 (relative error)，相對於最高濃度之相對誤差不得大於 3%，其餘濃度之相對誤差減去最高濃度的相對誤差不得大於下列標準。

濃度	相對誤差
1/2~2 PEL	7.0 %
其它	10.0 %

相對誤差 =  $(| \text{量測濃度} - \text{配製濃度} | / \text{配製濃度}) \times 100\%$

例如設檢量線標準溶液的最高濃度為  $50 \text{ mg}/\text{mL}$ ，它經檢量線計算後的計算值為  $51 \text{ mg}/\text{mL}$ ，則最高濃度的相對誤差為

$$[(51 - 50) / 50] \times 100 \% = 2 \%$$

則檢量線最低濃度的相對誤差須不大於 12 %。

#### 被動式採樣器

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

C=濃度(PPM)

SW=分析樣本重量(mg)

DE=脫附效率

MW=分子重量

SR=採樣速率(mL/min)

MIN=採樣時間(minutes)

數值分析:

本實驗之數據均以 Sigma Plot 4.0 統計軟體作各項統計分析，而流式細胞儀之 DNA 直方圖的定量分析則以 ModFit LT 程式分析。



# 實 驗 結 果

## (壹) 有機溶劑暴露濃度之偵測

### (一) 脫附效率 (Desorption Efficiency)

由於本實驗所用之有機溶劑為甲苯及丁酮，其二者的性質相異性很大，其中一為極性溶劑，另一為非極性溶劑，故選用不同性質的脫附劑，進行脫附效率的測試。

首先選用一般性的脫附溶劑—二硫化碳( $CS_2$ ) 脫附，甲苯的脫附效率可達 96.3 % (三次平均)，丁酮的脫附效率為 83.8 % (三次平均)。接著在二硫化碳中加入 4% 的 1-丁醇 (1-butanol) 為助脫附劑，結果使得甲苯的脫附效率增為原來的 1.04 倍，丁酮的脫附效率更顯著提升 1.18 倍。見 Fig.(1)及 Fig.(2)

若將甲苯及丁酮二者混合，同樣以兩種溶劑測試脫附效率，不論是固定其中甲苯濃度，Fig.(3)；固定甲苯與丁酮濃度比，Fig.(4)；亦或是改變甲苯與丁酮濃度比，Fig.(5)，其結果都會使脫附效率明顯地增加，故本研究即以  $CS_2$  加 4% 1-butanol ( $C_4OH$ )的混合溶劑，作為日後分析時的標準脫附劑。

為了建立有機溶劑對生物體毒性測試的系統，本實驗建立一套設備，由其中的檢測可瞭解其環境暴露中，利用抽氣方式所捕集到的有機溶劑劑量（主動式採樣），和經由自然擴散方式進入到採樣介質中

的劑量（被動式採樣），以及進入到生物培養皿中劑量間的關係。以下即分別為各種測試的結果：

### （一）單一有機溶劑暴露

#### （I）甲苯

當我們以自動注射器分別注入不同劑量的甲苯於暴露箱（incubator）後，暴露箱內置入含 5 c.c.介質的培養皿及兩個徽章式的被動式採樣器（passive monitor），隨著暴露時間，每隔兩小時以活性碳管，配合計數型低流量個人採樣器（personal sampler）採氣一個小時，至暴露 24 小時止。其間亦每隔兩小時自培養皿中抽取 0.2 c.c.的介質，置入小玻璃瓶中，加 0.8 c.c.的脫附劑，再以氣相色層分析儀/火焰離子化偵檢器（GC/FID）分析甲苯濃度。以活性碳管作主動式採樣的結果見 Fig.(6)。由圖中可見，當外在注入不同劑量的甲苯於暴露箱內，在暴露箱中的培養皿中未直接添加甲苯的情況下，隨著暴露時間的增長，暴露箱中的濃度亦隨著增加。以注入一個容許濃度（Permissible exposure limit, PEL）的劑量來看，大約在暴露八小時，其濃度已趨於穩定。被動式採樣結果見 Fig.(18)。至於主動式、被動式二者間的關係，見表（一）。

#### （II）丁酮

丁酮單獨存在的濃度測試與甲苯相同，以活性碳管採樣，隨著時間的增加，培養箱中的濃度增加，但在暴露 6 小時後，濃度會下降，而後再增加，見 Fig.(7)。主動式與被動式採樣的結果見 Fig.(16)與表（二）。

## (二) 混存有機溶劑暴露

將甲苯與丁酮以各種不同的比例混合，以活性碳管採樣分析後，其間各種關係，分別列於 Fig. (8) 至 Fig. (15)；主動與被動間相互影響之效應，見 Fig.(17)至 Fig.(20)；主、被動與介質三者間的關係於表 (三) 與表 (四) 可見。

## (貳) 毒理作用

### (一) 甲苯、丁酮及氯化鎘的交互作用對細胞活性的影響：

本實驗利用 MTT 在粒線體代謝的方法來測試細胞活性，觀察有機溶劑單獨與細胞作用及不同濃度的氯化鎘在單一或兩種有機蒸氣(甲苯、丁酮)下對細胞活性的傷害程度。實驗中選取不同劑量的鎘濃度(0~8  $\mu\text{M}$ )與不同濃度的有機溶劑作用，每次實驗各做兩組，其中一組放在不含有機蒸氣暴露的細胞培養箱中當作控制組，另一組在添加毒物之後放入含有甲苯蒸氣暴露的細胞培養箱中暴露 24 小時。

單獨有機溶劑對 V79 細胞的活性影響：

由 Fig.(21)可以觀察到甲苯以 1 PEL 單獨作用在 V79 細胞上時對細胞活性並沒有什麼影響，再加入丁酮 1/2 PEL 與甲苯一起暴露，則細胞存活率稍有下降，但也不明顯。而丁酮(1 PEL)單獨與細胞作用產生的毒性較甲苯略高，但丁酮(1 PEL)與甲苯(2 PEL)一起作用對細胞的毒性反而略低於只有暴露於 1

PEL 的丁酮。

單一有機溶劑與鎘共同暴露對細胞毒性之影響：

Fig. (22)顯示，當單獨以甲苯蒸氣與氯化鎘共同作用 24 小時，培養後對細胞的活性並沒有什麼加成毒性產生。接著再觀察丁酮與鎘之間有無複合毒性，實驗方法是先將鎘(0~8  $\mu\text{M}$ )添加在細胞中，放入含有丁酮蒸氣(1 PEL, 200 PPM)暴露的細胞培養箱中 24 小時，由 Fig (23)可以看到在丁酮與鎘共同暴露的實驗組，以整體的細胞活性(鎘濃度 0~8  $\mu\text{M}$ )來看，有丁酮暴露比沒有丁酮暴露的細胞其細胞活性要來得低，可以看到丁酮會影響鎘對細胞的毒性。

混存有機溶劑與氯化鎘對細胞活性的影響：

實驗中先以甲苯(100 PPM)、丁酮(100 PPM)混合，再加入氯化鎘(0~10  $\mu\text{M}$ )，放入含有混合有機蒸氣(甲苯 100 PPM、丁酮 100 PPM)的細胞培養箱中 24 小時，另外與沒有添加有機溶劑，只加入氯化鎘的控制組比較，由 Fig. (24)可觀察到，原本在沒有有機蒸氣暴露下，氯化鎘在 5~10  $\mu\text{M}$  時才有較明顯的細胞毒性，但是在含有混存有機蒸氣下，當氯化鎘濃度在 3~5  $\mu\text{M}$  時就可看出其對細胞的毒性。相同的，將混合有機溶劑濃度比例改變都有類似的加成毒性產生，如 Fig. (25)，Fig.(26)，Fig. (27)。

## (二) 甲苯、丁酮及氯化鎘對細胞週期變化的影響:

由 Fig.(28)可看出，單獨加入甲苯(100 PPM)或丁酮(100 PPM)對於 V79 細胞的細胞週期並沒有太大的影響，若加入氯化鎘(5  $\mu$ M)，則細胞週期的 S 期(DNA 複製期) (22.39 %) 略高於控制組的 S 期 (17.47 %)；再者，當 MEK 濃度為 150 PPM 時，S 期(41.75 %)則比控制組(17.47 %)高出很多。另外，甲苯與氯化鎘共同暴露或丁酮與氯化鎘共同暴露，其 S 期都會比控制組高，見表(五)。

# 討 論

## I.揮發性有機暴露系統的環境探討

### (一) 甲苯：

#### (A) 單一暴露

由 Fig.(6)及表(一)可見，當暴露箱內的培養皿中未直接添加甲苯時，在暴露 12 小時後，暴露箱內的濃度雖已達平衡狀態，但甲苯仍持續地擴散進入被動式採樣器中，使其濃度繼續增加，但由於暴露箱中培養皿中的介質為水溶液，呈現出極性，故甲苯無法進入介質中，使得無法偵測到甲苯的濃度。而由主動式採樣器的採樣結果可以了解，甲苯以一個容許濃度暴露時，約 8 小時細胞培養箱中的甲苯濃度可達到穩定的值，1/2 容許濃度的甲苯則達到飽合的時間較為延長。但在 10 小時後，不論暴露的濃度高低，在細胞培養箱中都可有穩定的有機蒸氣濃度可提供細胞或組織的培養。

#### (B) 共同暴露

當加入丁酮於暴露箱內，甲苯以活性碳管採樣的結果呈現出正效應，即丁酮的加入不致於影響甲苯的吸附。但對於進入被動式採樣器內的甲苯量反而減少，可能是由於丁酮擴散速率較甲苯為快，而被動式採樣器的採樣原理即是利用擴散吸附的方式。此現象與丁酮易由皮膚吸收之論點相同[29]。見 Fig.(17)

但是甲苯若處於兩個容許濃度下，丁酮的加入對於被動式採樣仍然維持正面效果，且加入相同劑量的效果尤其顯著，此結果應該是甲苯濃度升高後，對於擴散作用的競爭性提高，被丁酮影響的程度降低所致，見 Fig.(18)。但對於甲苯在活性碳管內的吸附作用，並無明顯的影響。見表(四)

## (二) 丁酮

### (A) 單一暴露

當暴露箱內加入丁酮暴露時，以活性碳管所採集的丁酮量係隨著暴露時間的增長而增加，但在某一時間達飽和後，濃度會降低而後再增加，由 Fig.(7)中可見。這種濃度飽和後，濃度降低又上昇的狀況，在每次主動式採樣都有發生，造成此現象的主要原因可能是在放入細胞作毒性測試時，培養箱開門的動作造成有機蒸氣洩漏，使培養箱中的有機蒸氣濃度降低所致。但當外在注入劑量太高時，隨著時間的增加，濃度反而會減少。擴散入被動式採樣器中的丁酮量則呈現持續性的增加，見表(二)。

當改以直接添加丁酮於細胞培養介質時，不論外在注入的劑量多寡，介質中的濃度都隨時間增加而濃度逐漸降低，在大約 6 小時後會呈現出較穩定的情形，見 Fig.(11)、Fig.(14~15)。這個結果可能是因初期實驗設計疏忽的結果，因作為採樣用的細胞培養介質在添加有機溶劑後，於第一管活性碳管採樣時就放入細胞培養箱，而由實驗數據顯示，培養箱中的有機蒸氣約在暴露後 6~8 小時才能達到穩定值，在達到穩定值之前，培養

介質中的有機溶劑已經揮發至環境中。至於被動式採樣則呈現出正常效應，即隨著外在濃度的增加而增加，亦隨著暴露時間的增長而增加。

#### (B) 共同暴露

當外在注入容許濃度時，不論甲苯加入的劑量為何，都能促使活性碳管捕集丁酮效率的降低，見 Fig.(20)，其理由為競爭效應。因為丁酮為極性物質，活性碳為非極性物質，比照「相似者互溶的原理」，甲苯與活性碳間的吸附力自然大過丁酮與活性碳間的附著力，故甲苯的加入，將導致丁酮捕集量的降低。而被動式採樣結果亦然。

當丁酮暴露於一個容許濃度下，等量甲苯之加入，不論是主動或是被動式採樣，其濃度均降低，但當丁酮的劑量高達兩倍容許濃度時，甲苯的加入反而促使丁酮吸附量的增加，此現象在以活性碳管採樣時尤其顯著，這也是值得作進一步研究的。

至於培養皿介質中濃度的變化不大，丁酮濃度的增加，自然使得介質中的濃度增加。見 Fig.(15)

由以上的採樣結果可以了解，本研究中所設計的有機暴露系統，可以提供一個穩定的有機蒸氣暴露環境，讓細胞或組織的揮發性毒性物質培養順利進行。在採樣中，不論是主動式或被動式的採樣，在混存溶液暴露時所造成採樣數值的變化，是因為不同特性的有機溶劑與採樣器間的吸附競爭。



## II. 細胞毒性探討

在本研究中培養 V79 細胞來觀察細胞在有機溶劑(甲苯、丁酮)及氯化鎘共同暴露下有無複合毒性產生，細胞在有機蒸氣暴露裝置內暴露 24 小時，以 MTT 分析方法觀察複合暴露對細胞活性的影響，再以流式細胞分析儀分析經過暴露後細胞的週期有無改變。

### (一) MTT 分析的細胞活性

單獨有機溶劑之毒理效應：

由 Fig.(21)得到的結果，甲苯及丁酮在 24 小時暴露後對細胞活性沒有明顯影響，但也略可觀察到在同為一個容許濃度下，丁酮的毒性高於甲苯。但其細胞存活率都高於 85 % 以上，較不易觀察到相互之間的差異。

單獨有機溶劑與金屬鎘的複合毒性探討：

在單獨以有機溶劑暴露時可略為觀察到丁酮的毒性較強，若再與金屬鎘複合暴露比較，由 Fig. (22)及 Fig. (23)來看，Fig. (22)是甲苯與氯化鎘共同暴露，Fig. (23)是丁酮與氯化鎘共同暴露，甲苯與丁酮蒸氣都是使用 1 PEL (permissible exposure limit) 的濃度，由圖中可看到丁酮與氯化鎘對細胞的複合毒性比甲苯與氯化鎘的複合毒性高。由此也可以再次證明丁酮的毒性較高，其與鎘的複合毒性也較高。

混存有機溶劑與金屬鎘的複合毒性探討：

甲苯對細胞的活性由前幾項實驗都沒有明顯改變，但是與丁酮混合與氯化鎘共同暴露，如 Fig.(24)所示，當甲苯為一個容許濃度而丁酮為 1/2 容許濃度時，即會加強氯化鎘所造成的細胞毒性。若比較 Fig. (23)及 Fig. (24)，當丁酮以一個容許濃度存在時，單獨與氯化鎘共同暴露，在氯化鎘濃度為 5  $\mu\text{M}$  時細胞尚有 60 % 以上的存活率，但即使丁酮只有 1/2 容許濃度，在甲苯有一個容許濃度存在下，氯化鎘 5  $\mu\text{M}$  時細胞只剩約 20 % 的存活率。可見混存的有機溶劑確實會對氯化鎘的細胞毒性有加成作用。Fig. (25)及 Fig. (26)中可見，當混合的有機溶劑濃度越高，使細胞在越低的氯化鎘濃度即造成影響。但值得再深入探討的是 Fig. (25)中，甲苯與丁酮各 1/2 容許濃度混存時，氯化鎘在 2~3  $\mu\text{M}$  時就有較明顯的加成毒性產生，且比各二個容許濃度的甲苯、丁酮混存所造成的細胞毒性高。

## (二)細胞週期分析

過去的研究已證實金屬鎘會造成細胞毒性、基因致突變性、以及染色體改變之毒性效應[63]。Zalcour 等人[64,65,66,67]指出，鎘會抑制 DNA 複製及細胞分裂和降低人類  $\beta$  DNA polymerase 的活性，並且抑制 DNA repair pathway，如： $\text{O}^6$ -alkylguanine-DNA-alkyltransferase 和 nucleotide-excision repair。也有研究指出鎘促進致癌基因的表現與細胞的增殖有關[68]。Payette 等人指出鎘會使  $\text{G}_0/\text{G}_1$  期增加而 S 期及  $\text{G}_2/\text{M}$  期有減少的現象[69]。在本研究中以流式細胞分析儀觀察有機溶劑與氯化鎘對細胞週期的影響，由 Fig. (28) 及表(五) 可觀察到如同過去被發表的研究結果，加入氯化鎘 5  $\mu\text{M}$  時細胞週期中 S 期(DNA

複製期)的比例有增加的情形，即細胞週期有停滯在 DNA 複製期的現象產生，若將丁酮加入細胞中與氯化鎘共同暴露，S 期的比例有明顯的增加情形(39.58 %) (丁酮 100 PPM(1 PEL) + 氯化鎘 5  $\mu$ M)。Richer 等人的研究指出，甲苯對於姐妹染色體的改變(sister chromatid exchanges)、細胞週期的延遲及細胞死亡沒有什麼影響[70]。在本研究中，甲苯對於細胞週期並沒有什麼影響，與氯化鎘共同暴露也沒有多大的加成作用。在本實驗中探討了甲苯與氯化鎘及丁酮對氯化鎘的複合毒性，發現丁酮與氯化鎘複合暴露時，V79 細胞的細胞週期有明顯改變，這個現象值得我們繼續探討甲苯、丁酮與氯化鎘之間的相互影響。

由以上運用在揮發性有機溶劑暴露系統中的細胞實驗可觀察到，丁酮對 V79 細胞的毒性較甲苯強，對鎘的複合毒性也較強，然而在甲苯的存在下更能促進丁酮與鎘對細胞的複合毒性。

## 結 論

揮發性有機化合物是許多作業場所常用之物質，在日常生活中作業勞工甚至一般的民眾都有可能常會接觸及吸收到這些環境污染物。目前對揮發性有機化合物之毒性研究，大多局限在許多公衛調查及動物實驗研究，因為至今未有一個可以穩定揮發性有機物濃度之暴露系統，無法利用細胞體素對其毒性做更進一步之探討，故本研究主要在建立一套可調整式揮發性物質之細胞培養系統，可長期將細胞或組織穩定的暴露在不同濃度之揮發物質下，觀察與測試如有機溶劑等揮發性物質的毒性。

在本研究中所建立的揮發性有機物質暴露系統，其特點在於可以提供一個恆溫、無菌且密閉的空間做細胞體素或組織培養的研究，而揮發性有機蒸氣能夠存在此空間中不會擴散出去，保持空氣中有機蒸氣與細胞或組織培養介質內所添加的有機溶劑間濃度平衡，將研究過程中培養介質內所添加的揮發性物質擴散降到最低，維持有機溶劑在培養介質中的濃度，使研究順利進行。而在這個系統中不僅可以做單一揮發性有機物的暴露研究，其特色是可以混合多種不同的揮發性有機化合物，控制個別的混合濃度。如此比較能夠接近我們一般勞工在作業場所所遭受的暴露因子，因為製程上的需要，可能會使用多種不同的有機溶劑或調配不同比例的溶劑。而目前各國對於有機溶劑的安全資料都是以單一物質為主，缺乏混合物質的標準；生物的偵測以體內的代謝物含量為人體暴露的指標，但是不同的化合物有不同的代謝物，雖然目前的一些研究報告已經注意到混合的有機化合物可能影響某些化合物的代謝，但因不確定因素(如食物、個人體質、生化代謝

缺陷等)眾多，不易找出其相關性。如此，本研究的系統設計即突顯出不同於傳統的方法，可以控制混合物的種類及濃度比例，找出不同混合有機揮發物質之間的相互影響，作為物質安全資料的參考及生物偵測的指標。

在本系統中經過主動式採樣器及被動式採樣器對細胞培養箱內有機蒸氣濃度的檢測，在 6~8 小時通入有機溶劑蒸氣後該細胞培養箱中可達到實驗中所要求的濃度比例，並能保持恆定狀態進行細胞體素或組織培養的研究。在研究中使用了兩種有機溶劑(甲苯及丁酮)及氯化鎘同時暴露，觀察是否會造成複合性的毒性。結果也証實了當甲苯與丁酮的混合有機蒸氣與氯化鎘共同暴露對細胞有複合的毒性。而這只是一個研究混合有機蒸氣的開端，因為有機溶劑的種類非常多，不同的劑量及種類組合不可計數。找到可能在工作環境中共同存在的有機化合物，研究它們之間對人類健康的危害，進而避免該有害環境的產生，才是本研究的最終目的。

## 文 獻 資 料

1. 台灣省政府勞工處研究報告(1998)“塑膠製品印刷作業有機溶劑採樣分析方法評估與勞工暴露相關因子調查”。
2. Palmes, E. D., and Gunnison, A. F. (1973) Personal monitoring device for gaseous contaminants. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 32: 78-81.
3. Cohr, K. H., Stokholm, J. (1979) Toluene: A Toxicological Review *Scand. J. Work. Environ. Health* 5:71-90.
4. 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. (1980) Exposure to Organic Solvents. *Scand. J. Work Environ. Health* 6:239-273.
5. ACGIH. TLV's Threshold Limit Value and Biological Exposure Indexes for 1992-1993. (1993) American Conference of Governmental Industrial Hygienists Cincinnati, Ohio.
6. Ravnsli, V. (1985) Possible Mechanisms of Hydrocarbon-associated Glomerulonephritis. *Clin. Nephro.* 23:294-298.
7. Tahti, H., Karkkainen, S., Pyykko, K., Rintala, E., Kataja, M., Vapa, H. (1981) Chronic Occupational Exposure to Toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 48: 61-69.

8. Nancy, A. N., Thomas, G. R., Friedrich, K. P. (1990) Solvent Nephrotoxicity in Humans and Experimental Animals. *Am. J. Nephrol.* 10:10-20.
9. Yamawaki, S., Segawa, T., Sarai, K. (1981) Effects of Acute and Chronic Toluene Inhalation on Behavior and (<sup>3</sup>H)-serotonin Binding in Rat. *Life Science* 30:1997-2002.
10. Juntunen, J., Matikainen, E., Antti-Poika, M., Suoranta, H., Valle, M., (1985) Nervous System Effects of Long-term Occupational Exposure to toluene. *Acta. Neurol. Scand.* 72:512-517,
11. Gregersen, P., Angelso, B., Nielsen, T. E., Norgaard, B., Uldal, C. (1984) Neurotoxic Effects of Organic Solvents in Exposed Workers: An Occupational, Neuropsychological, and Neurological Investigation. *Am. J. Ind. Med.* 5:201-225.
12. Ungvary, G., Hudak, A., Bors, Z., Folly, G. (1976) The Effect of Toluene on the Liver Assayed by Quantitative Morphological Methods. *Exp. Mol. Pathol.* 25:49-59.
13. Sato, A., Nakajima, T. (1978) Differences Following Skins or Inhalation Exposure in the Absorption Excretion Kinetics of Trichloroethylene and Toluene. *Br. J. Ind. Med.* 35:43-49.
14. Carlsson, A. (1982). Exposure to Toluene Uptake, Distribution and Elimination in Man. *Scand. J. Work Environ. Health* 8:43-55.

15. NIOSH eds. (1993) NIOSH Manual of Analytical Methods 3rd. Cincinnati, Ohio.
16. Cochrane, W. G. (1963). Sampling Methods. 2d ed. Wiley, Interscience, p164.
17. NIOSH. ed. (1975) Criteria for a Recommended Standard. Cincinnati, Ohio.
18. Astrand, I, Ehrner-Samuel, H., Kilborn, A., Ovrum, P. (1972) Toluene Exposure.(I): Concentration in Alveolar Air and Blood at Rest and During Exercise. *J. Work Environ. Health.* 9:119-130.
19. Weast, R. C., Astle, M.J., Beyer, W.H. (1988) CRC handbook of chemistry and physics, 69th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., C-170.
20. 行政院勞工委員會(1995)“勞工作業環境空氣中有害物質容許濃度標準修正說明” 58 .
21. Fiserova-Bergerova, V., Pierce, J. T., Droz, P. O. (1990) Dermal absorption potential of industrial chemicals: criteria for skin notation. *Am. J. Ind. Med.* 17:617-635.
22. Liira, J., Riihimaki, V., Pfaffli, P. (1988). Kinetics of methyl ethyl ketone in man: absorption, distribution and elimination in inhalation in inhalation exposure. *Int. Arch. Occup. Environ, Health* 60:195-200.



23. Liira, J., Riihimaki, V., Engstrom, K., (1988) Coexposure of man to m-xylene and methyl ethyl ketone: Kinetics and metabolism. *Scand. J. Work Environ. Health* 14: 322-327.
24. Liira, J., Riihimaki, V., Engstrom, K. (1990) Effects of ethanol on the kinetics of methyl ethyl ketone in man. *Bri. J. Ind. Med.* 47:325-330.
25. Perbellini, L., Brubnone, F., Mozzo, P. (1984) Methyl ethyl ketone exposure in industrial workers: Uptake and kinetics. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 54: 73-81.
26. DiVincenzo, G. D., Kaplan, C. J., and Dedinas, J. (1976) Characterization of the metabolites of methyl n-butyl ketone, methyl iso-butyl ketone, and methyl ethyl ketone in guinea pig serum and their clearance. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 36:511.
27. Dietz, F. K., Rodriguez-Giaxola, M., Traiger, G. J., Stella, V. J., and Himmelstein, K. J., (1981) Pharmacokinetics of 2-butanol and its metabolites in the rat, *J. pharmacokin et Biopharm.* 9:553.
28. Miyasaka, M., Kumai, M., Koizumi, A., Watanabe, T., Kurasako, K., Sato, K., and Ikeda, M., (1982) Biological monitoring of occupational exposure to methyl ethyl ketone by mean of urinalysis for methyl ethyl ketone itself. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 50: 131.
29. Brooke, I., Cocker, J., Delic, J. I., Payne, M., Jones, K., Gregg, N. C., Dyne, D. (1998) Dermal uptake of solvents from the vapour phase: an experimental study in humans. *Ann. Occup. Hyg.* 42(8):531-40.

30. Lemasters, G. K., Livingston, G. K., Lockey, J. E., Olsen, D. M., Shukla, R., New, G., Selevan, S. G., Yiin, J. H. (1997) Genotoxic changes after low-level solvent and fuel exposure on aircraft maintenance personnel. *Mutagenesis* 12(4):237-43.
31. White, R. F., Proctor, S. P., Echeverria, D., Schweikert, J., Feldman, R. G. (1995) Neurobehavioral effects of acute and chronic mixed-solvent exposure in the screen printing industry. *Am. J. Ind. Med.* 28(2):221-31,
32. Shamy, M. Y., Gazzar, R. M., Sayed, M. A., Attia, A. M. (1994) Study of some biochemical changes among workers occupationally exposed to phenol, alone or in combination with other organic solvents. *Ind. Health* 32(4):207-14.
33. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (1996) "Threshold limit values for chemical substances and physical agents, biological exposure indices," 65.
34. Maximum concentrations at the workplace and biological tolerance values for working materials(1991) "commission for the investigation of health hazards of chemical compounds in the working area VCH, Weinheim, FRG," report no. XXVII,:99.
35. Ong, C. N., Sia, G. L., Ong, H. Y., Phoon, W. H., Tan, K. T. (1991) Biological monitoring of occupational exposure to methyl ethyl ketone. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 63:319-324.

36. Van Doorn, J. E., De Cock, J., Kezic, S. (1989) Determination of methyl ethyl ketone in human urine after derivatization with o-nitrophenolhydrazine, using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* 489: 419-424.
37. Kezic, S., Monster, A. C. (1988) Determination of methyl ethyl ketone and its metabolites in urine using capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 428: 175-280.
38. Deveaux, M., Huvenne, J. P. (1987) Identification of solvents of abuse using gas chromatography/Fourier transform infrared spectrometry after headspace sampling. *Chromatographia* 23: 626-630.
39. Wallace, L. A., Pellizzari, E. D., Hartwell, T. (1984) Personal exposure to volatile organic compounds.(I): Direct measurements in breathing-zone air, drinking water, food, and exhaled breath. *Environ. Res.* 35: 293-319.
40. NIOSH.( 1977) Manual of Analytical Methods, #s1, and ed. NIOSH, Cincinnati, OHIO, Vol. 2.
41. NIOSH (1982) Manual of Analytical Methods, P & CAM 127, 2nd ed NIOSH, Cincinnati.
42. 林宜長 (1990) 作業環境空氣中丁酮採樣分析之研究，行政院衛生署。

43. Waalkes, M. P. and Barter, R. A. (1992) Toxicological principles of metal carcinogenesis with emphasis on cadmium. *Crit. Revi. Toxicol.* 22:175-201.
44. Lyon:IRAC Scientific Publications.(1987) Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. *IRAC Monogr. Eval. Carcinogen. Risks Human* 58:119-238.
45. Jean, M., M. G. and Alfredo, S. M. (1992) Determination of Cadmium in Urine Using Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry with probe atomization and Deuterium background correction. *J. Anal. At. Spectrom.* 7:1079-1083.
46. Friberg, L., Elinder, C. G., Kjellstrom, T. and Nordberg, G. F. (1986) Cadmium and Health: A toxicology and epidemiological appraisal, *CRC Press, Boca Raton, FL*. Vol. I and II.
47. Louis, W. C., and Tsuguyoshi S. (1996) Cadmium. Toxicology of metals. 231-245.
48. Friberg, L., Kjellstrom, T. and Nordberg, G. F. (1986) In Handbook of the Toxicology of Metals, 2nd ed., Vol. II, Friberg, L., Nordberg, G.F., and Vouk, V., Eds, Elsevier, Amsterdam, 130.
49. Moreau, T., Orssaud, G., Lellouch, J. and Calude, J. R. (1983) Blood cadmium levels in a general male population with special reference to smoking. *Arch Environ. Health* 38:163-167.

50. Takenaka, S., Oldiges, H., Konig, H., Hochrainer, D. and Oberdorster, G. (1983) Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 70:367-373.
51. Waalkes, M. P., Rehm, S., Riggs, C. W., Bare, R. M., Devor, D. E., Poirier, L. A., Wenk, M. L., Henneman, J. R. and Balaschak, M.S. (1988) Cadmium carcinogenesis in male Wistar [CrI: (WI)BR] rats: dose-response analysis of tumor induction in the prostate and testes and at the injection site. *Cancer Res.* 48:4658-4663.
52. Blakley, B. R. (1986) The effect of cadmium on chemical- and viral-induced tumor production in mice. *J. Appl. Toxicol.* 6:425-429.
53. Waalkes, M. P., Rehm, S., Riggs, C. W., Bare, R. M., Devor, D. E., Poirier, L. A., Wenk, M. L. and Henneman, J. R. (1989) Cadmium carcinogenesis in male Wistar[CrI: (WI)BR] rats : dose-response analysis of effects of zinc on tumor induction in the prostate, in the testes, and at the injection site. *Cancer Res.* 49:4282-4288.
54. Waalkes, M. P., Rehm, S., Sass, B. and Ward, J. M. (1992) In Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity, Nordberg, G.F., Alessio, L., and Herber, R.F.M., Eds; IARC Sci. Pub., International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 401.
55. Samuel, B., Donna, L., Susan, K. K. and David, H. P. (1996) Comparative effect of Cd<sup>2+</sup> and Cd-Metallothionein on culture kidney tubule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136:220-228.

56. Waalkes, M. P. and Rehm, S. (1992) Carcinogenicity of oral Cadmium in the male Wistar (WF/NCr) rat: effect of chronic dietary zinc deficiency. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19:512-520.
57. Jungman, J., Reins, H. A., Schobert, C. (1993) Resistance to cadmium mediated by ubiquitin dependent proteolysis. *Nature* 361: 369-371.
58. Nocentini, S. (1987) Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc. *Nucleic Acid Res.* 21:359-365.
59. Kasahara, K., Fujiwara, Y., Ohmori, T., Sugimoto, Y., Komiya, K., Matsuda, T. and Saijo, N. N. (1991) Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res.* 51:3237-3242.
60. Vincent, R., Poirot P., Subra, I., Rieger, B., Cicoella, A. (1994) Occupational exposure to organic solvents during paint stripping and painting operations in the aeronautical industry. *Int. Arch. Occup. Env. Health* 65(6):377-80.
61. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monkds, A. (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48:599-601.
62. Fried, J. R., Perez, A. G. and Clarkson, B. D. (1976) Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. *J. Cell Biol.* 66:188-193.

63. Ochi, T. and Ohsawa, M. (1983) Induction of 6-thioguanine-resistant mutants and single-strand scission of DNA by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. *Mut. Res.* 111:69-78.
64. Andrea, H. and Detmar, B. (1989) Comutagenicity and inhibition of DNA repair by metal ions in mammalian cells. *Biol. Trace Element Res.* 21:359-365.
65. Singh, N. P. and Khan, A. (1995) Acetaldehyde: genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes. *Mut. Res.* 337:9-17.
66. Hartwig, A. (1994) Role of DNA repair inhibition in lead and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ. Health Perspect.* 102(suppl.3):45-50.
67. Falchuk, K. H., Drishan, A., Vallee, B. L. (1975) DNA distribution in the cell cycle of *Euglena gracilis*. Cytofluorometry of zinc deficient cells. *Biochemistry* 14(15):3439-44.
68. Tang, N., Enger, M. D. (1991) Cadmium induces hypertrophy accompanied by increased myc mRNA accumulation in NRK-49F cells. *Cell Biol. Toxicol.* 7(4):401-11.
69. Payette, Y., Lachapelle, M., Daniel, C., Bernier, J., Fournier, M., Krzystyniak, K. (1995) Decreased interleukin-2 receptor and cell cycle changes in murine lymphocytes exposed in vitro to low doses of cadmium chloride. *Int. J. Immunopharmacol.* 17(3):235-46.

70. Richer, C. L., Chakrabarti, S., Senecal-Quevillon, M., Duhr, M.A. Zhang, X. X. Tardif, R. (1993) Cytogenetic effects of low-level exposure to toluene, xylene, and their mixture on human blood lymphocytes. *Int. Arch. Occup. Env. Health.* 64(8):581-5.



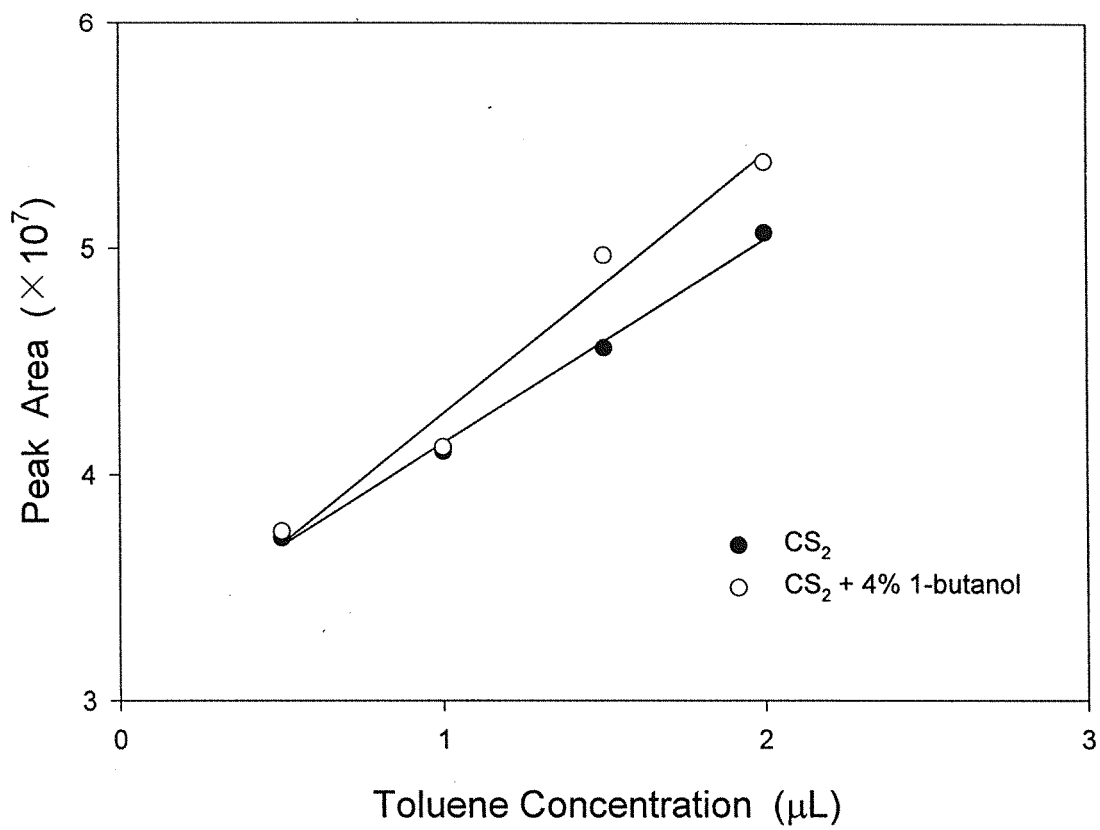


Fig. (1) 甲苯在不同脫附劑下之脫附效率

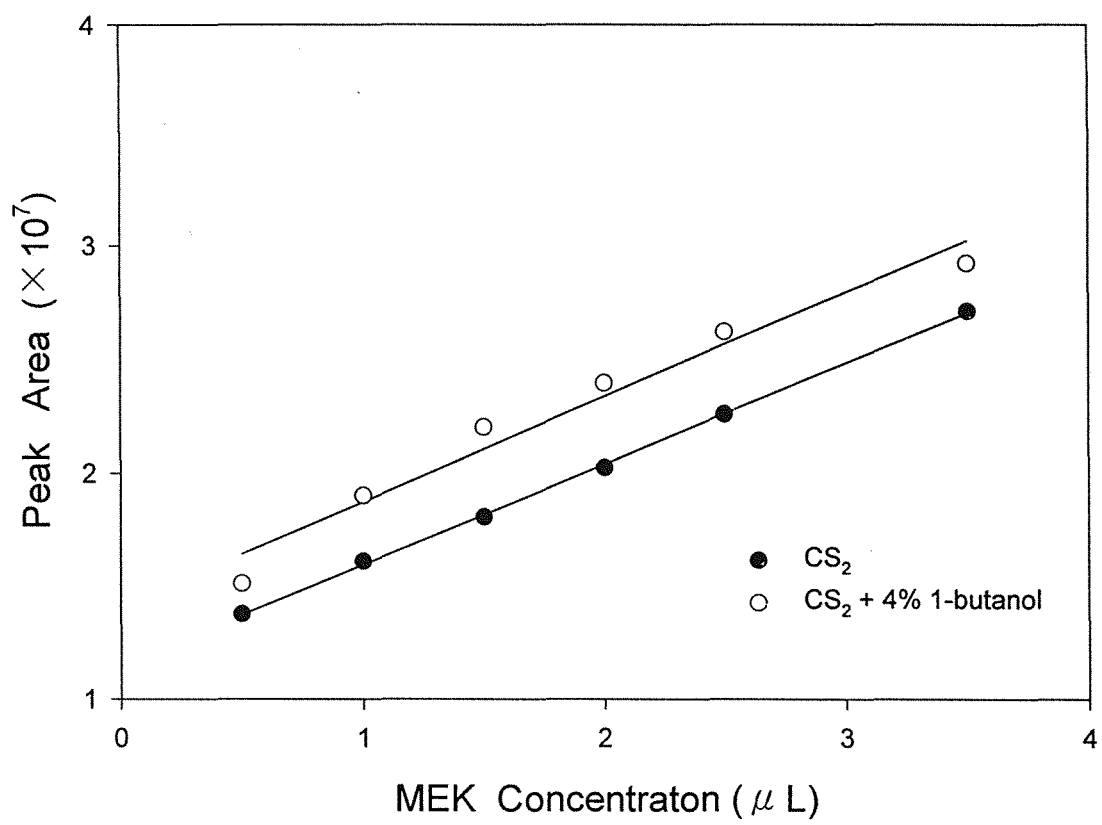


Fig. (2) 丁酮在不同脫附劑下之脫附效率

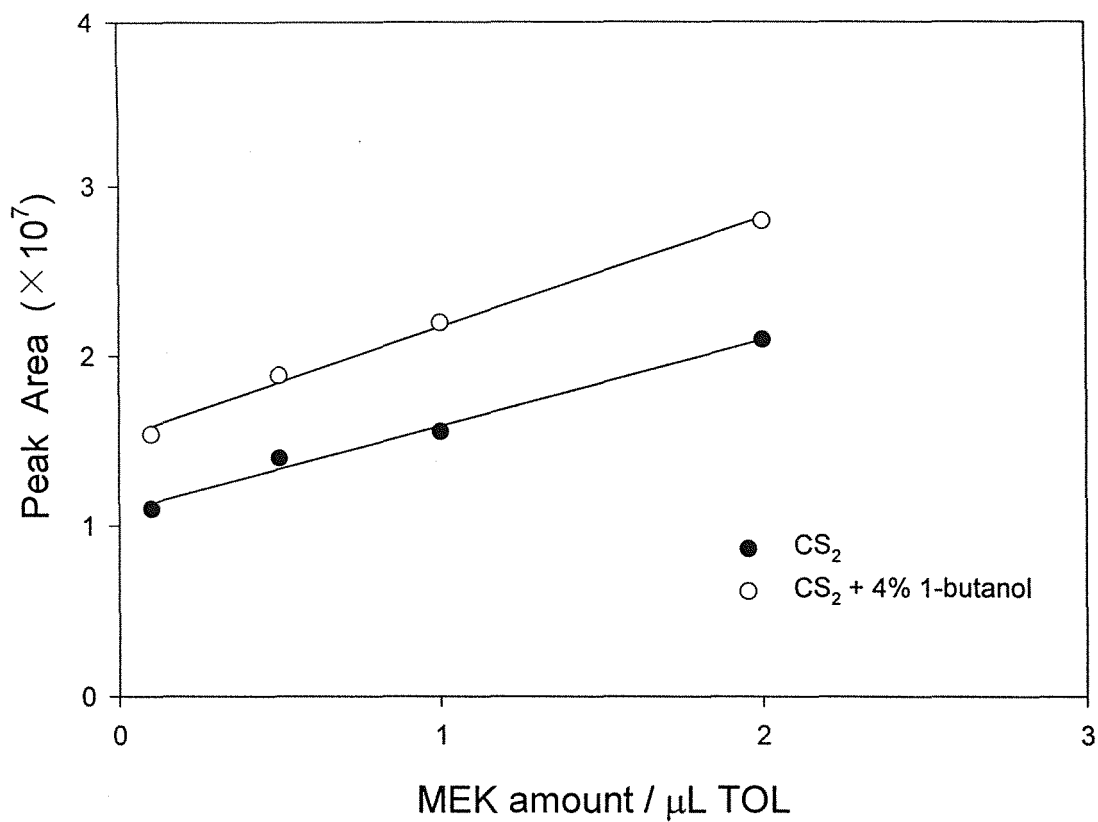


Fig. (3) 混存溶液中甲苯濃度固定，  
丁酮在不同脫附劑之脫附效率

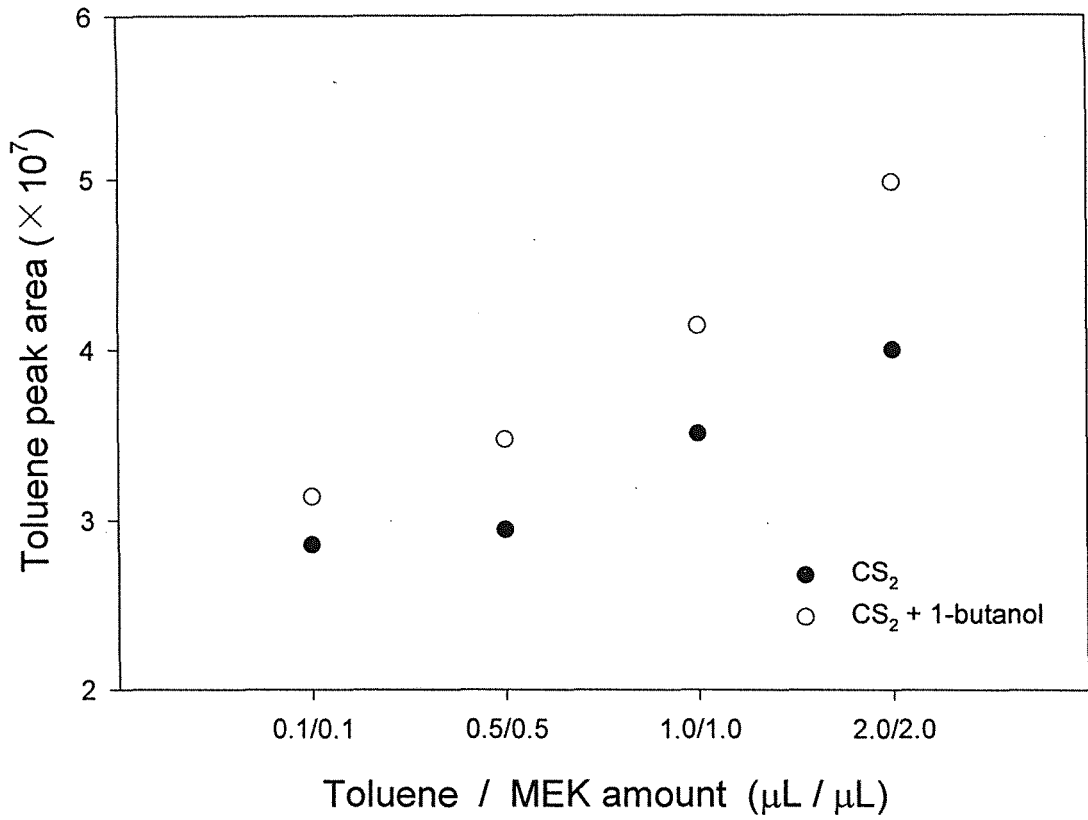


Fig. (4) 混存溶液中甲苯及丁酮濃度固定下，  
甲苯在不同脫附劑之脫附效率

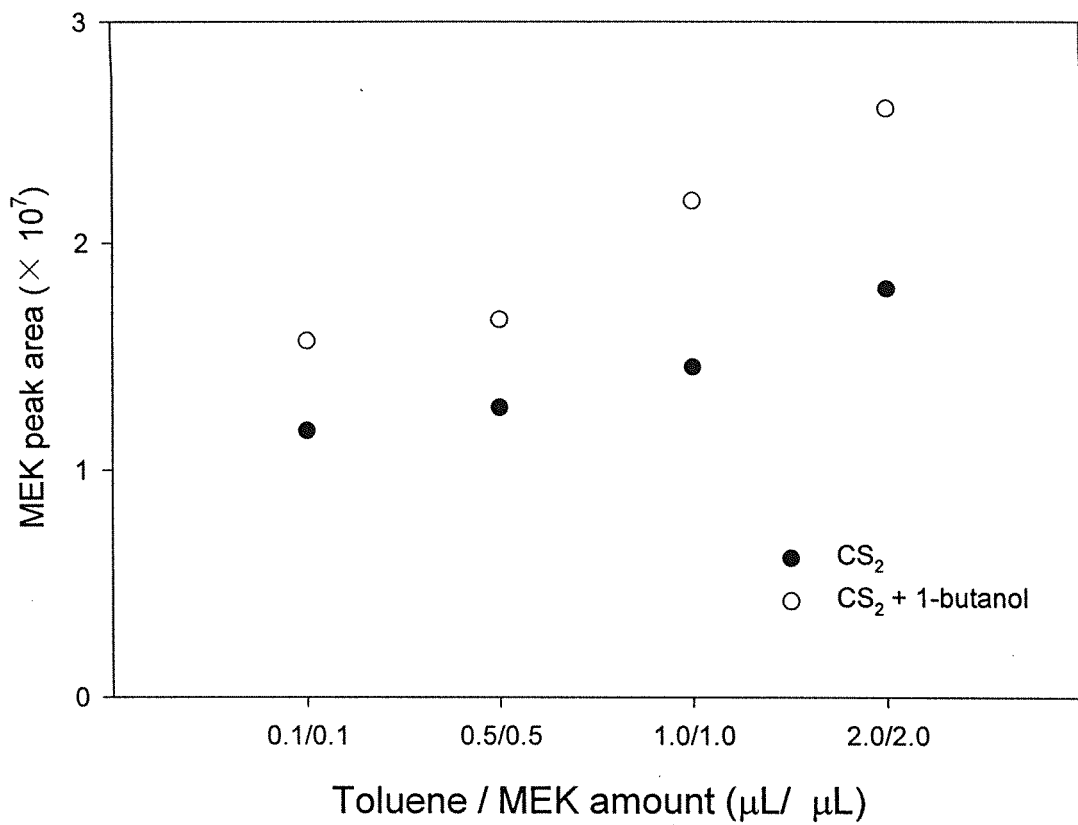


Fig. (5) 混存溶液中改變甲苯及丁酮濃度，  
丁酮在不同脫附劑之脫附效率

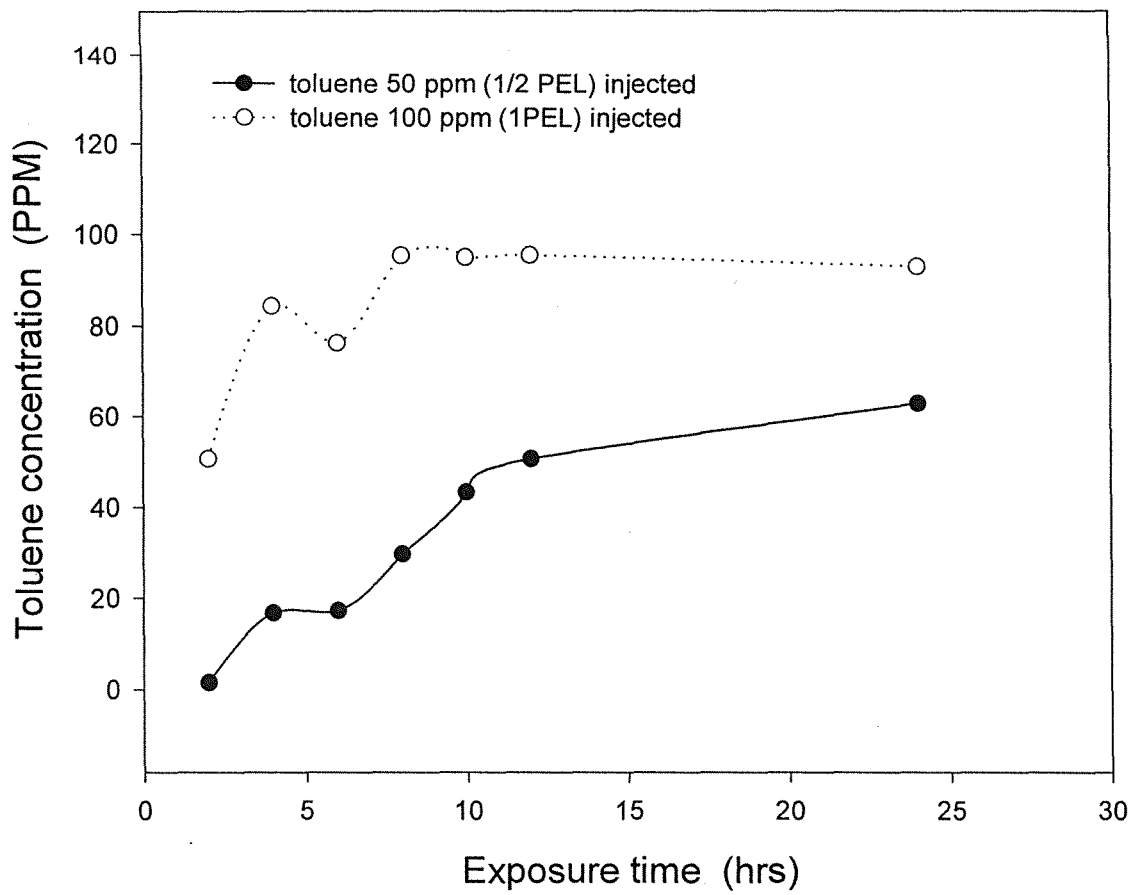


Fig. (6)有機溶劑暴露系統中，以主動式採樣器採集之  
甲苯濃度變化

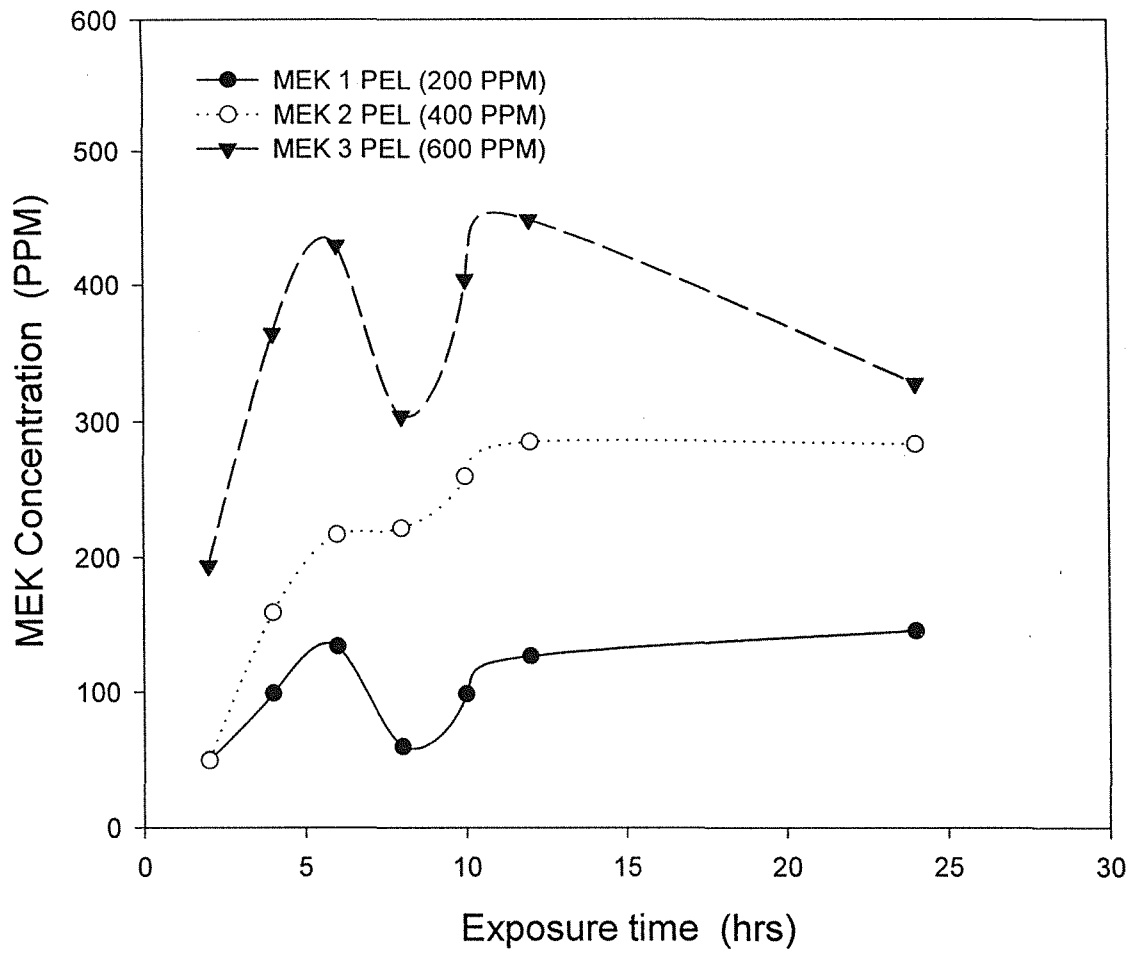


Fig. (7) 丁酮以不同濃度暴露下，細胞暴露系統中，以主動式採樣器採集到丁酮的濃度變化

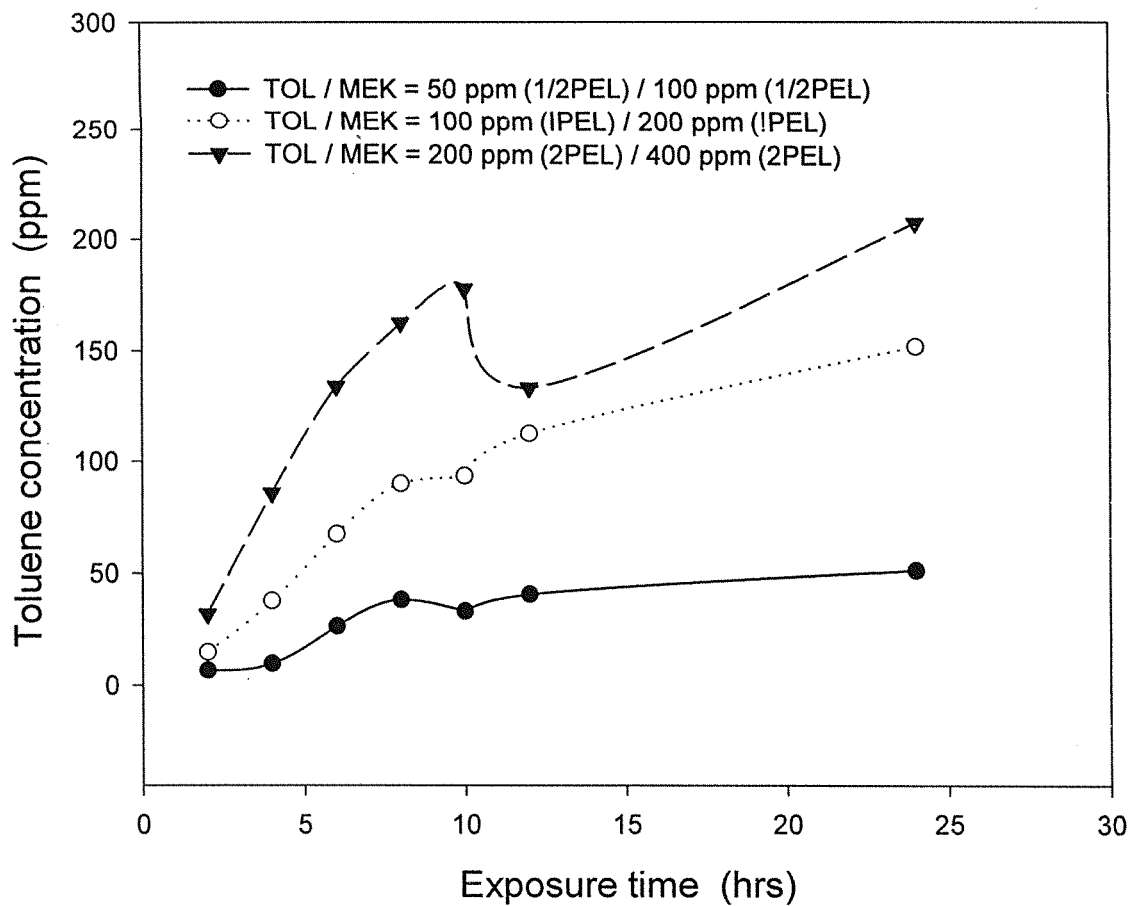


Fig. (8) 甲苯與丁酮以固定比例改變濃度時，以主動式採樣器採集細胞培養箱中甲苯的濃度



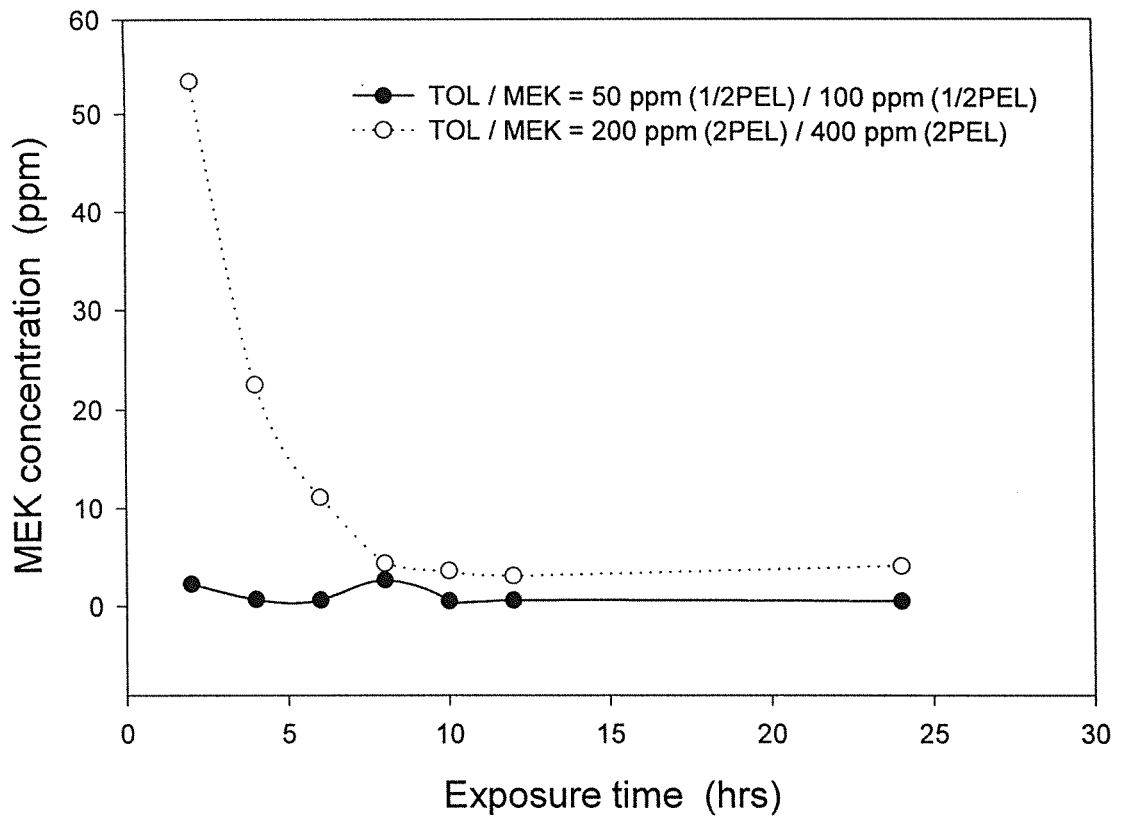


Fig. (9) 甲苯與丁酮以固定比例改變濃度時，  
細胞培養介質中，丁酮的濃度變化

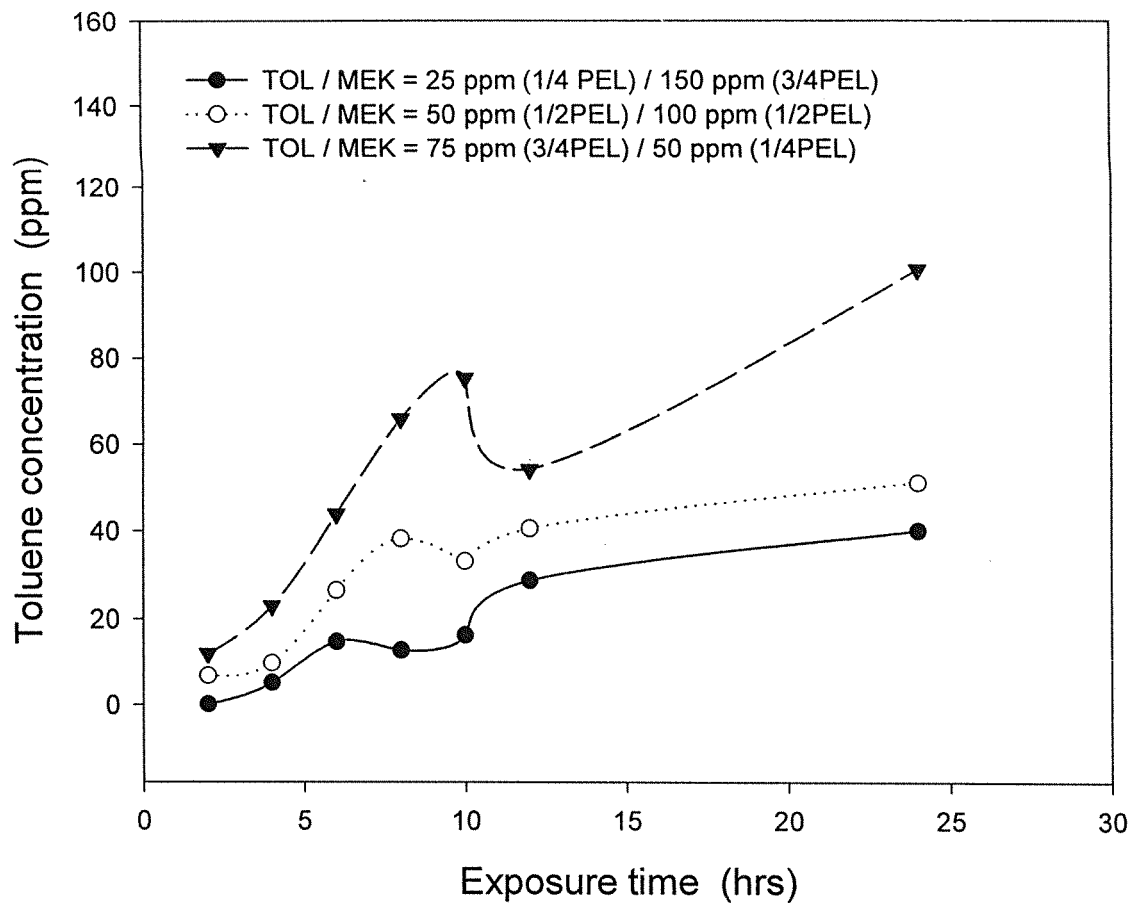


Fig. (10) 甲苯與丁酮以不同比例改變濃度時，  
細胞培養介質中，甲苯的濃度變化

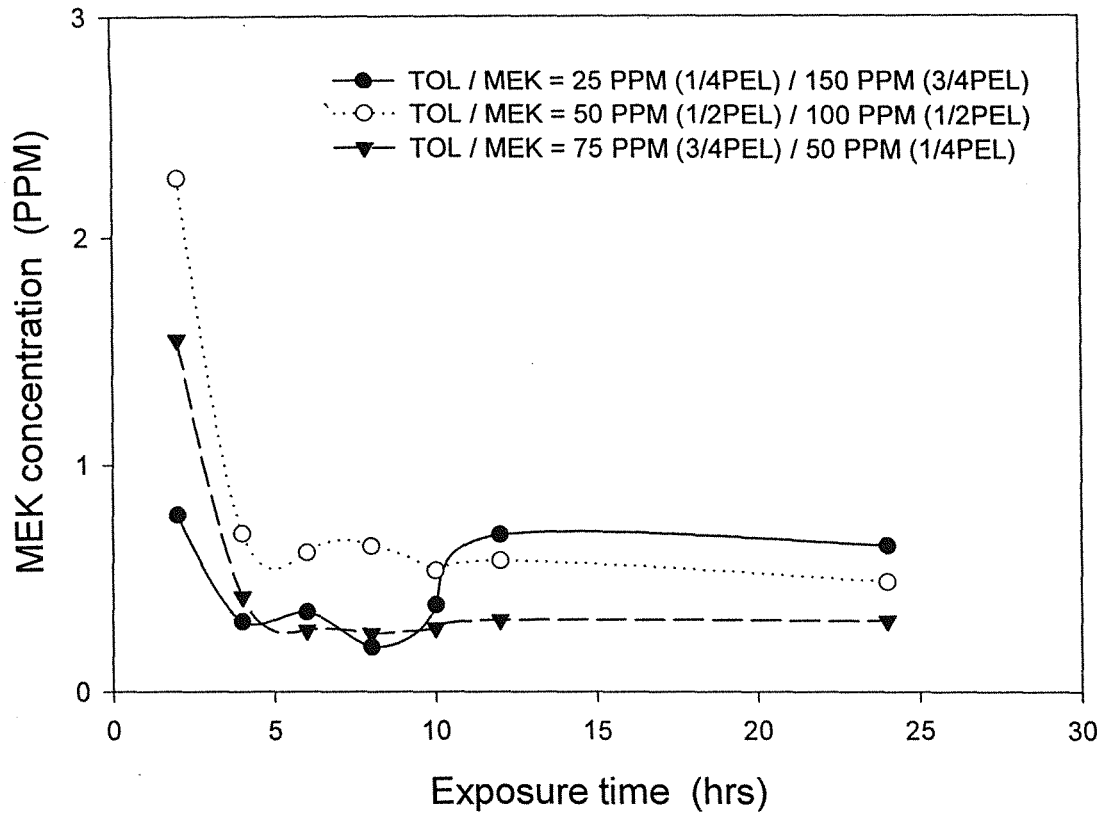


Fig. (11) 甲苯與丁酮以不同比例改變濃度時，  
細胞培養介質中，丁酮的濃度變化

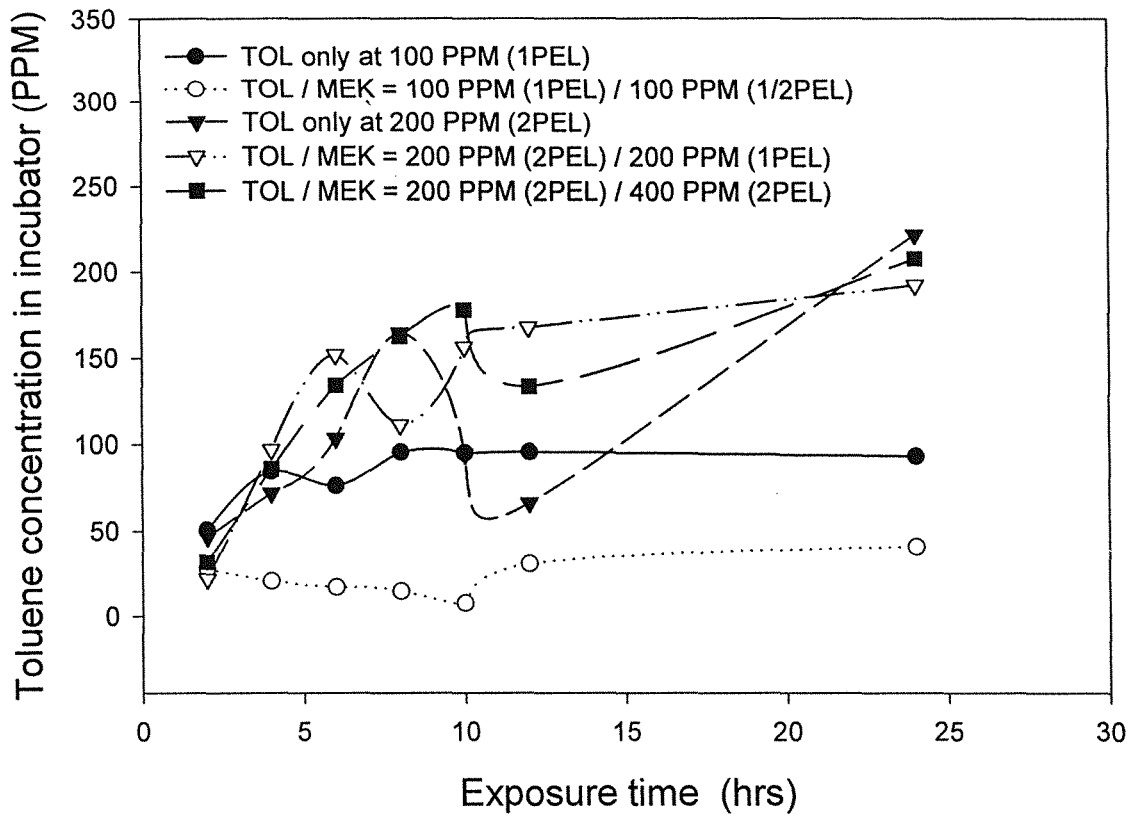


Fig. (12) 甲苯與丁酮混存下，丁酮對甲苯濃度的影響

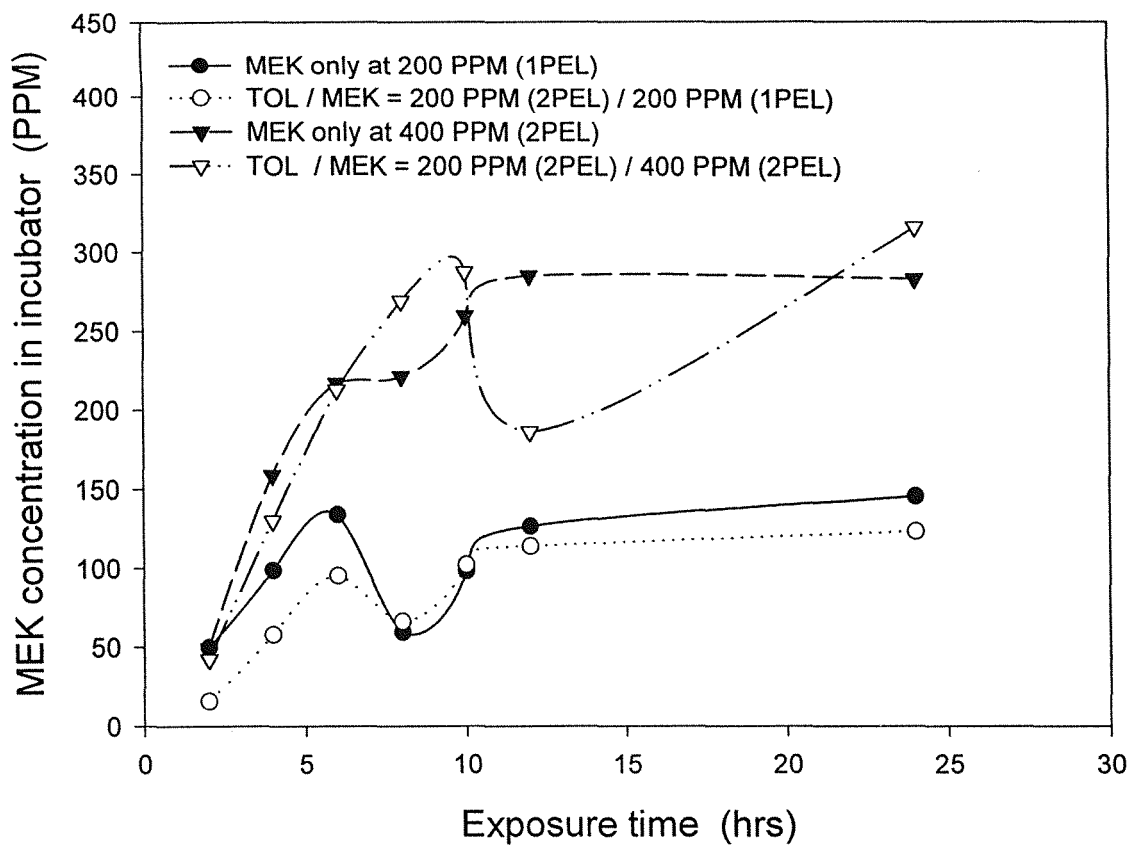


Fig. (13) 甲苯與丁酮混存下，甲苯對丁酮濃度的影響

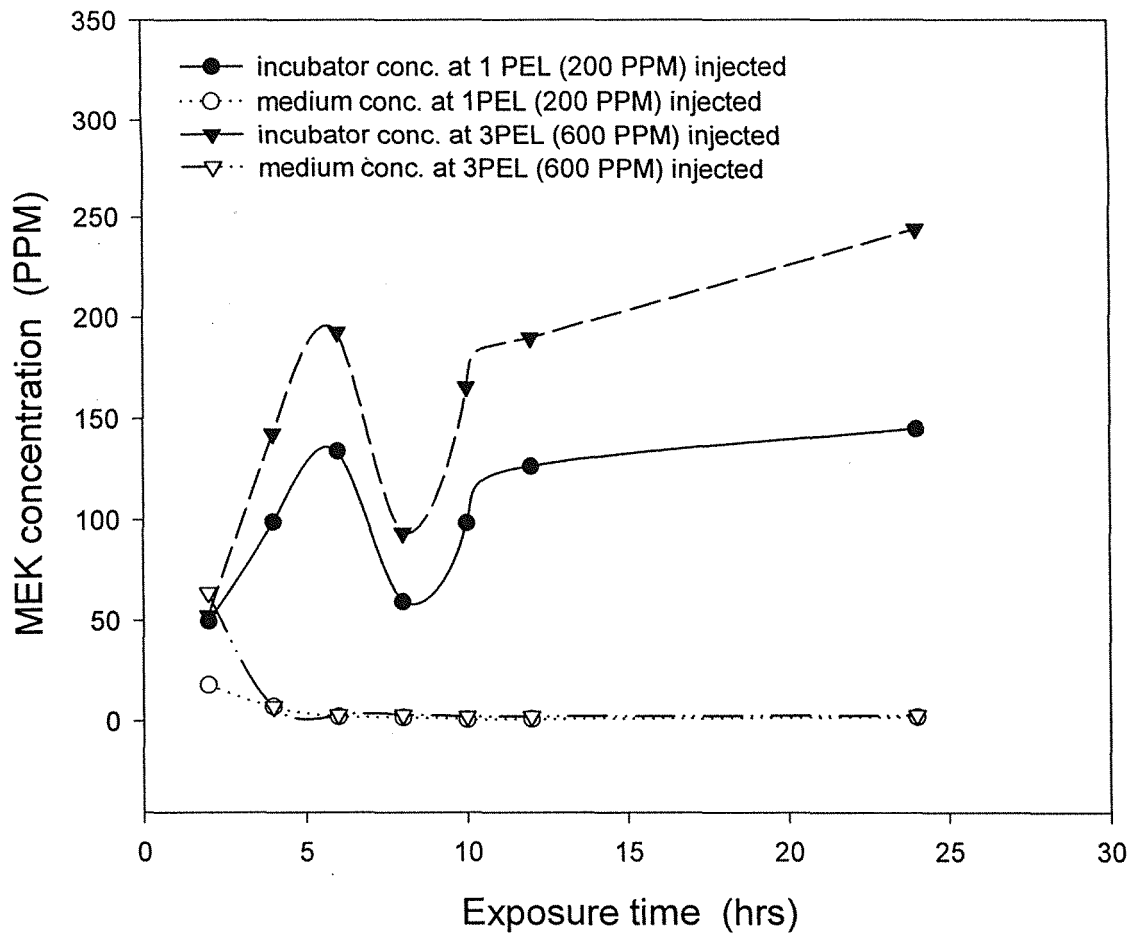


Fig. (14)在不同時間，丁酮在細胞培養箱及細胞培養介質中濃度的變化

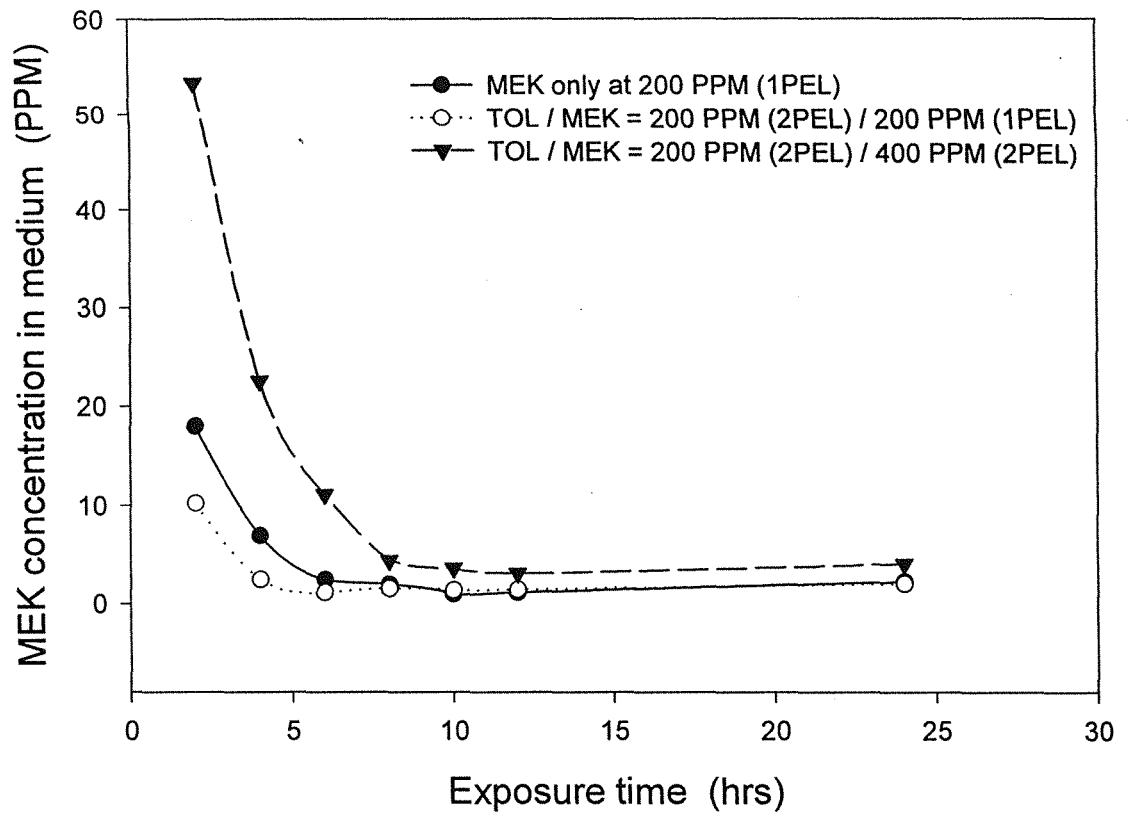


Fig. (15)在甲苯與丁酮混存下，細胞培養介質中  
 甲苯對丁酮濃度的影響

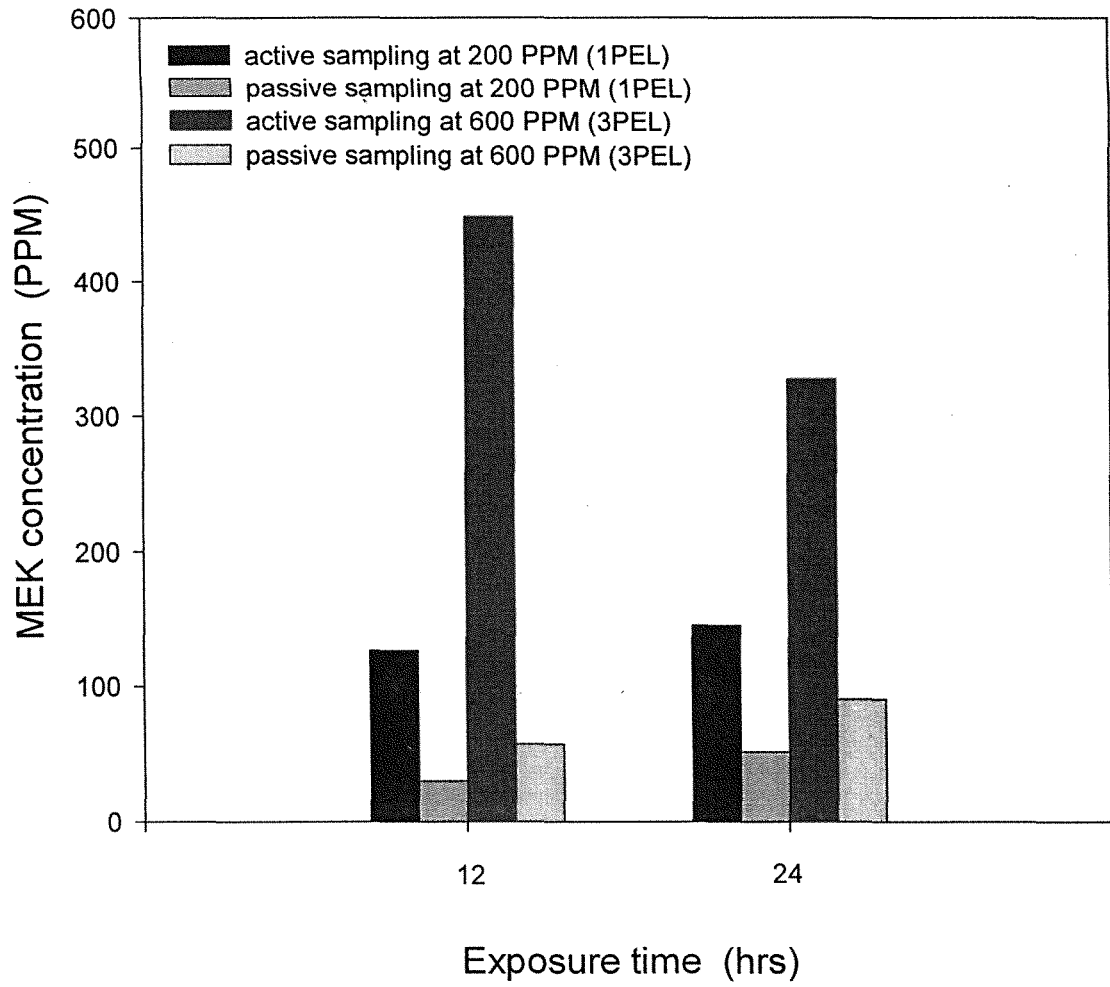


Fig. (16)在不同劑量下，主動式及被動式採樣所採集丁酮的濃度



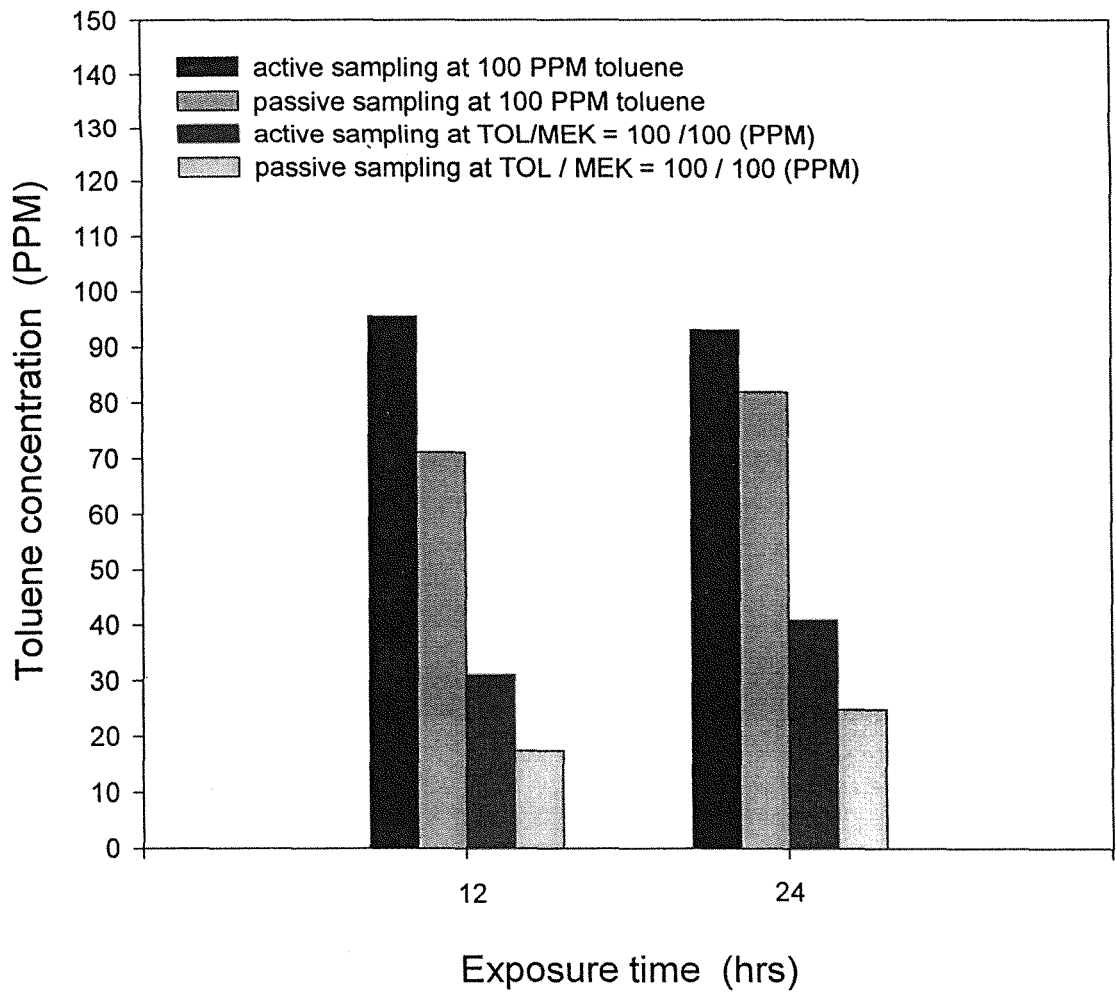


Fig. (17) 主動式採樣及被動式採樣中，  
丁酮對甲苯採樣的影響

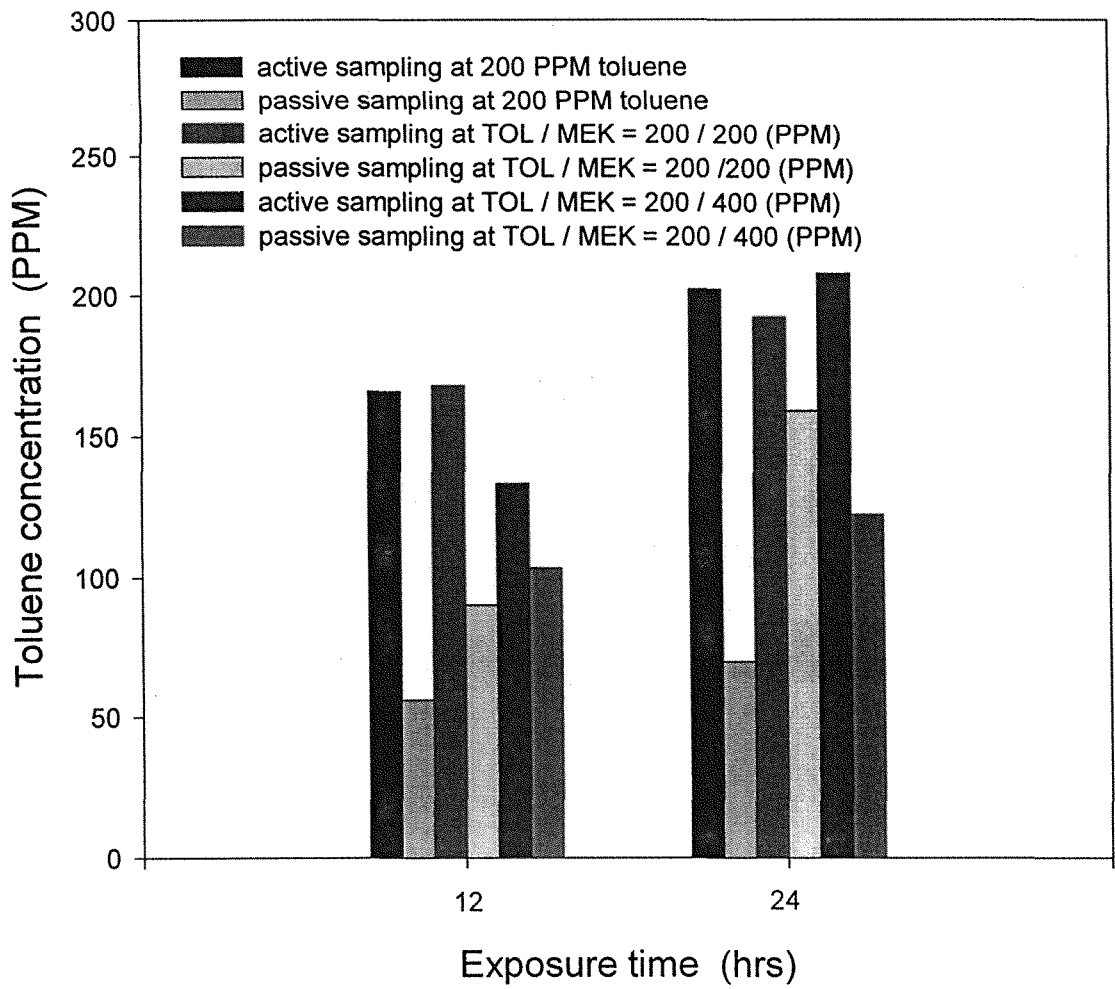


Fig. (18)不同丁酮濃度存在下，對甲苯採樣之影響

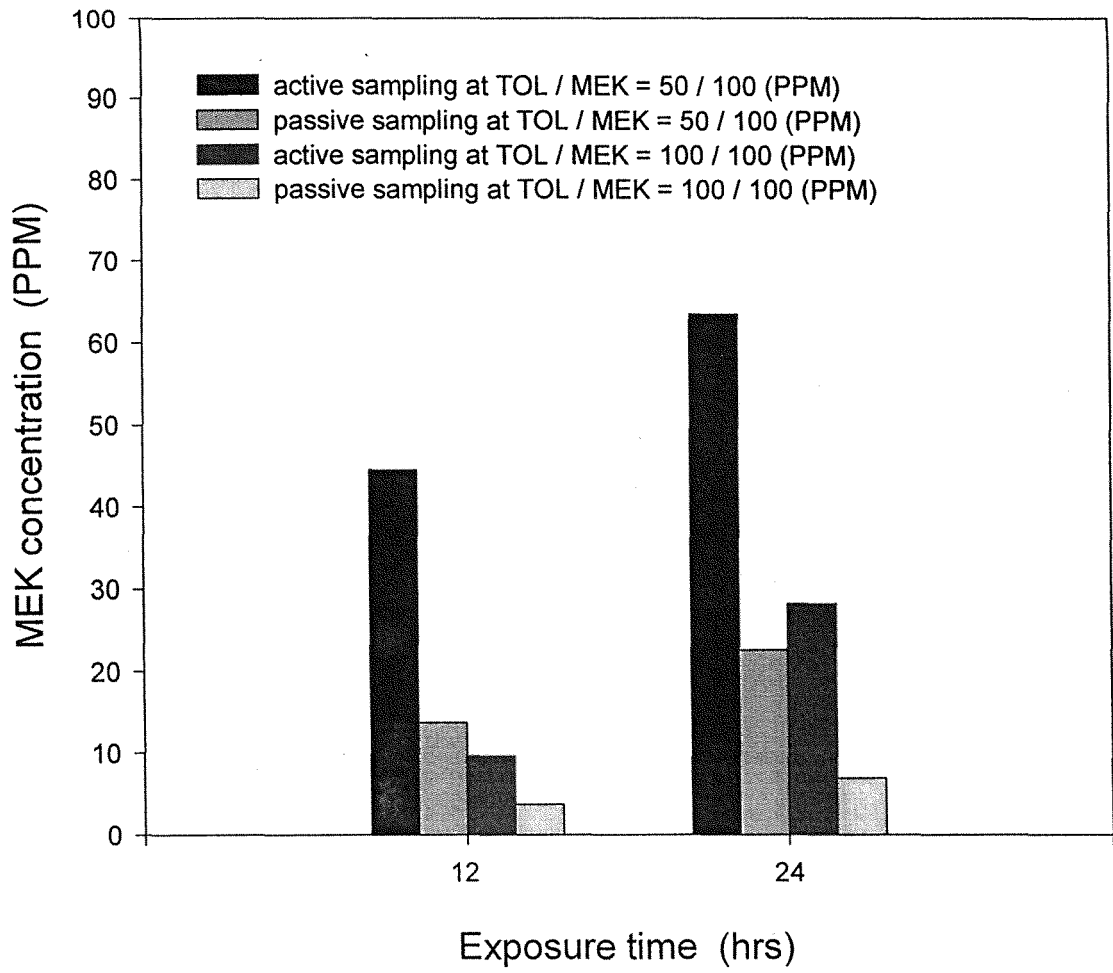


Fig. (19)不同甲苯濃度存在下，對丁酮採樣之影響

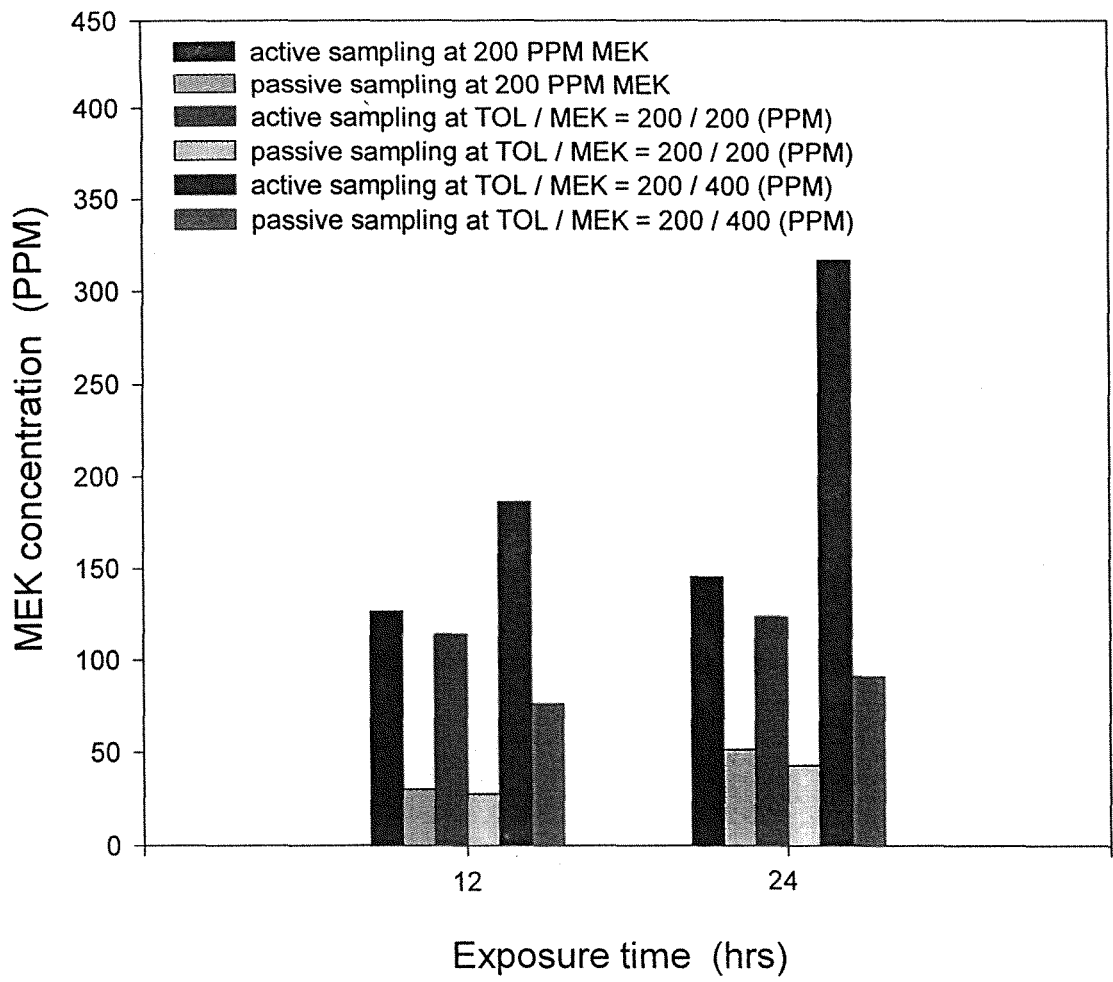


Fig. (20) 混存溶劑中，甲苯對丁酮採樣的影響

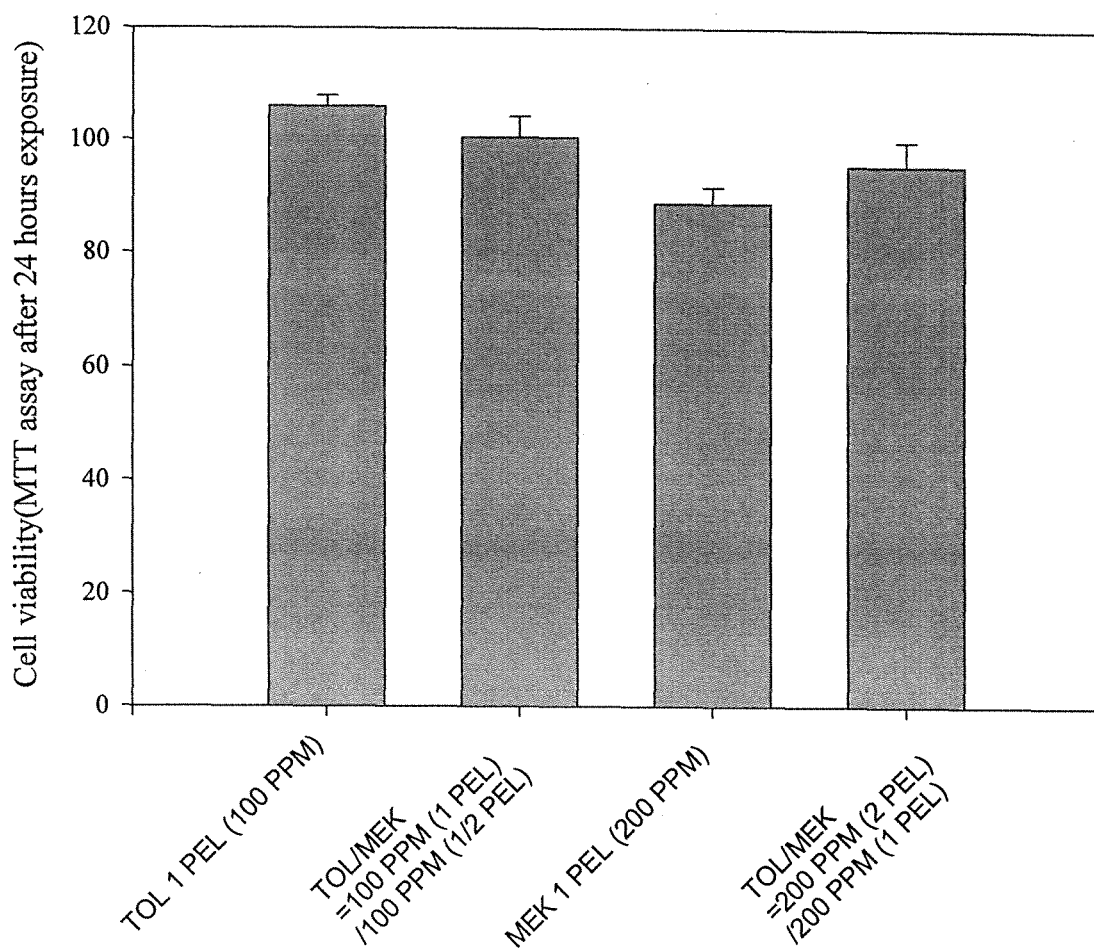


Fig.(21) 單一或混存有機溶劑對 V79 細胞的活性影響

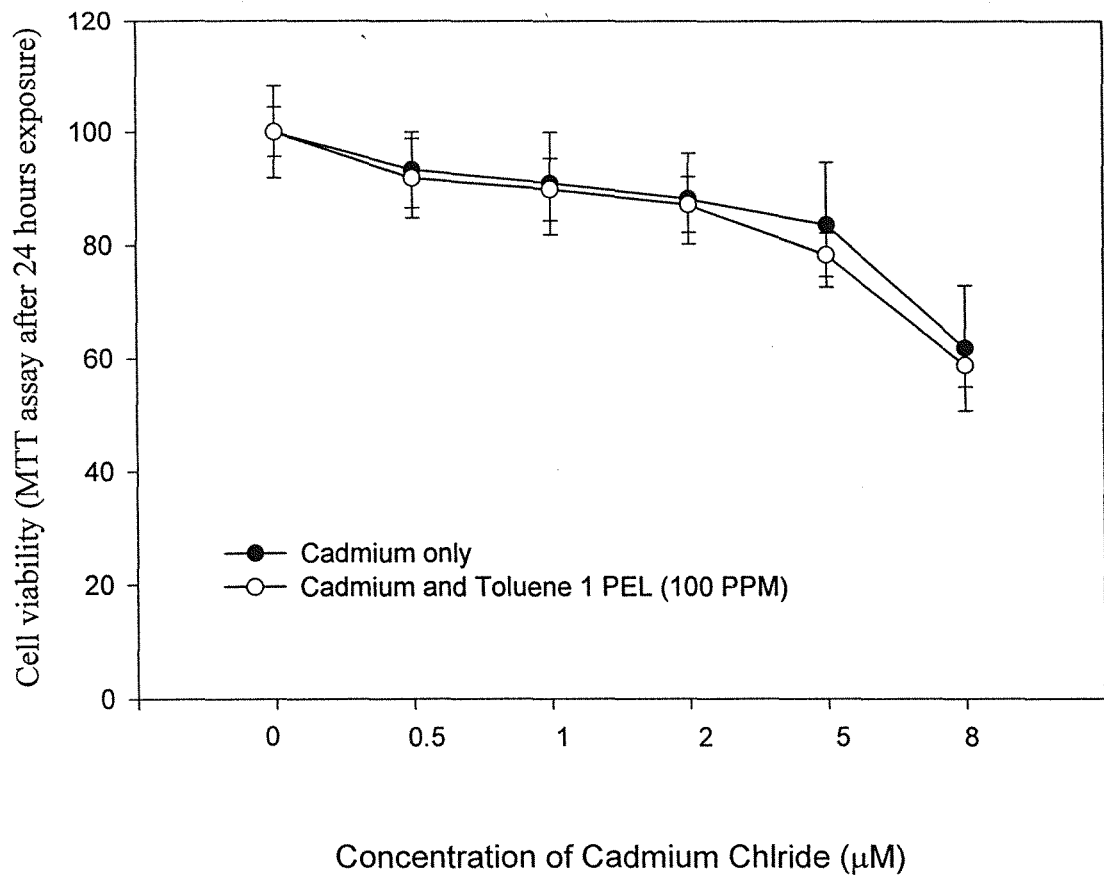


Fig.(22) 甲苯與氯化鎘對 V79 細胞的複合毒性

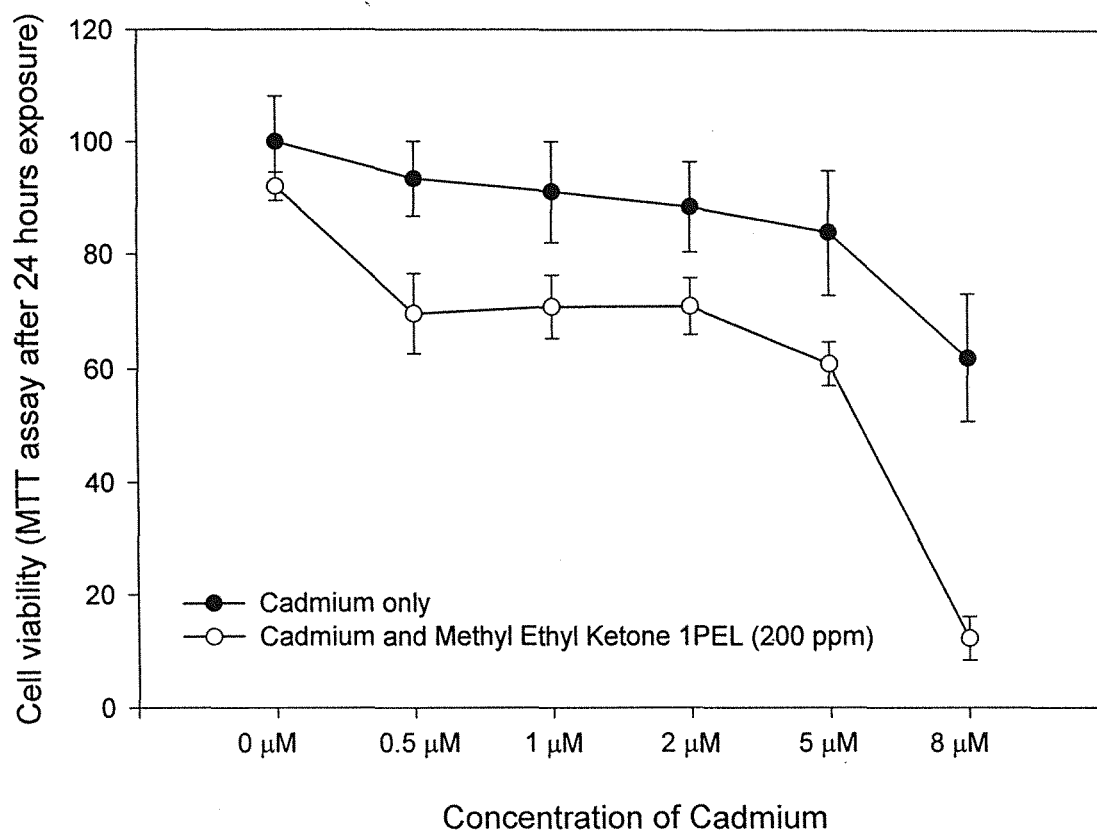


Fig.(23) 丁酮與氯化鎘對 V79 細胞的複合毒性

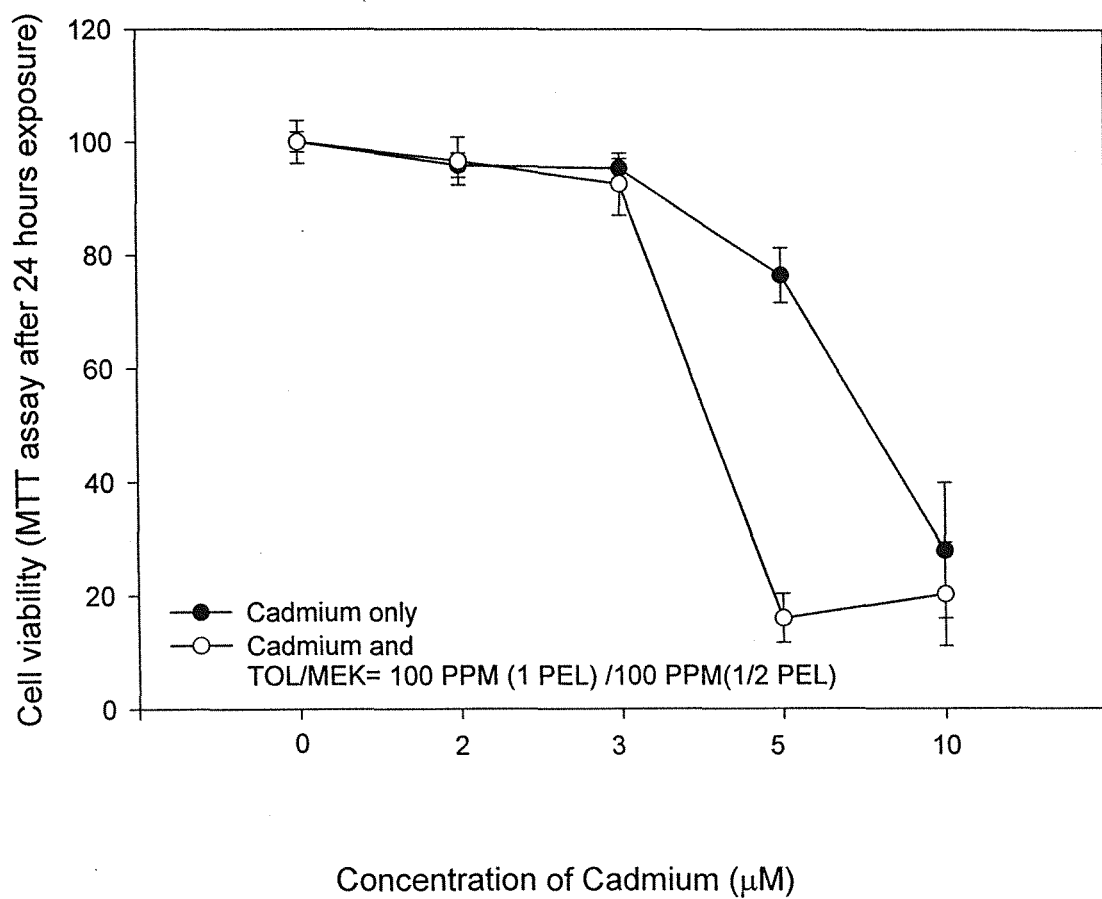


Fig. (24) 混存有機溶劑與氯化鎘對 V79 細胞之複合毒性



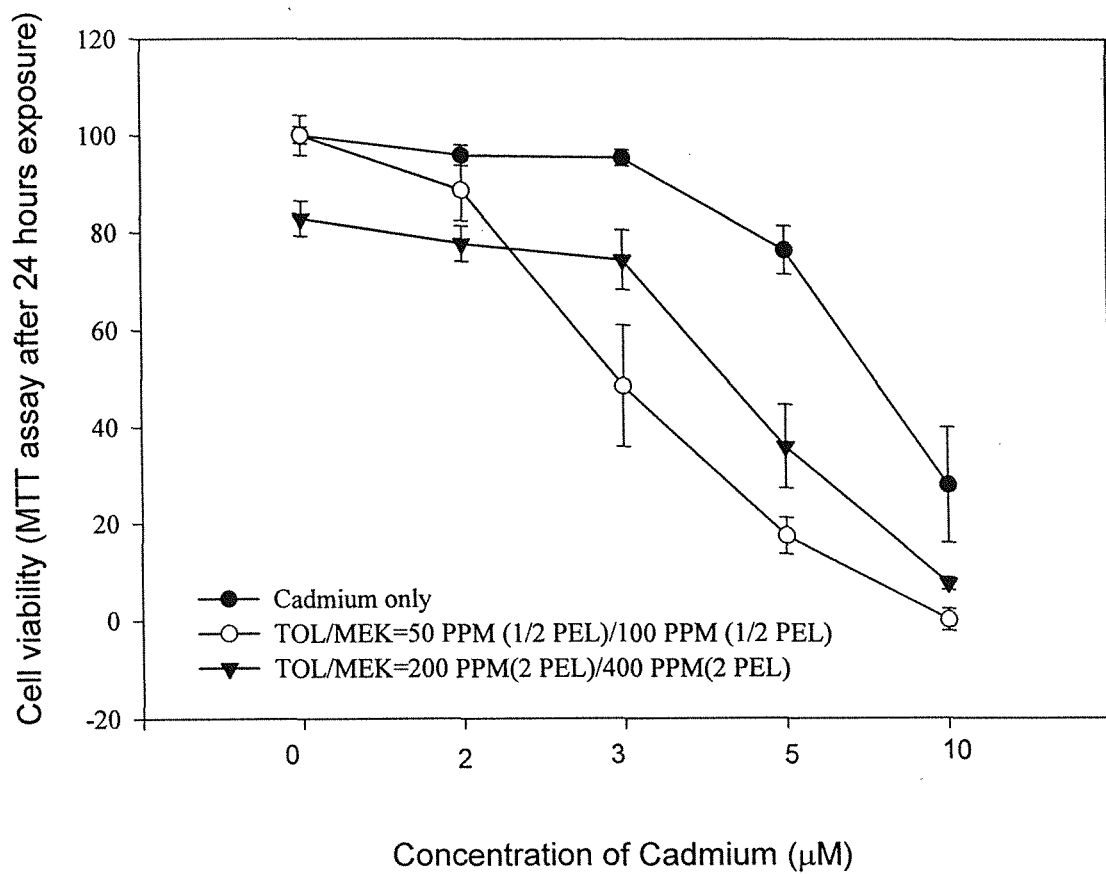


Fig.(25) 甲苯與丁酮以固定比例改變下，與氯化鎘對 V79 細胞的複合毒性

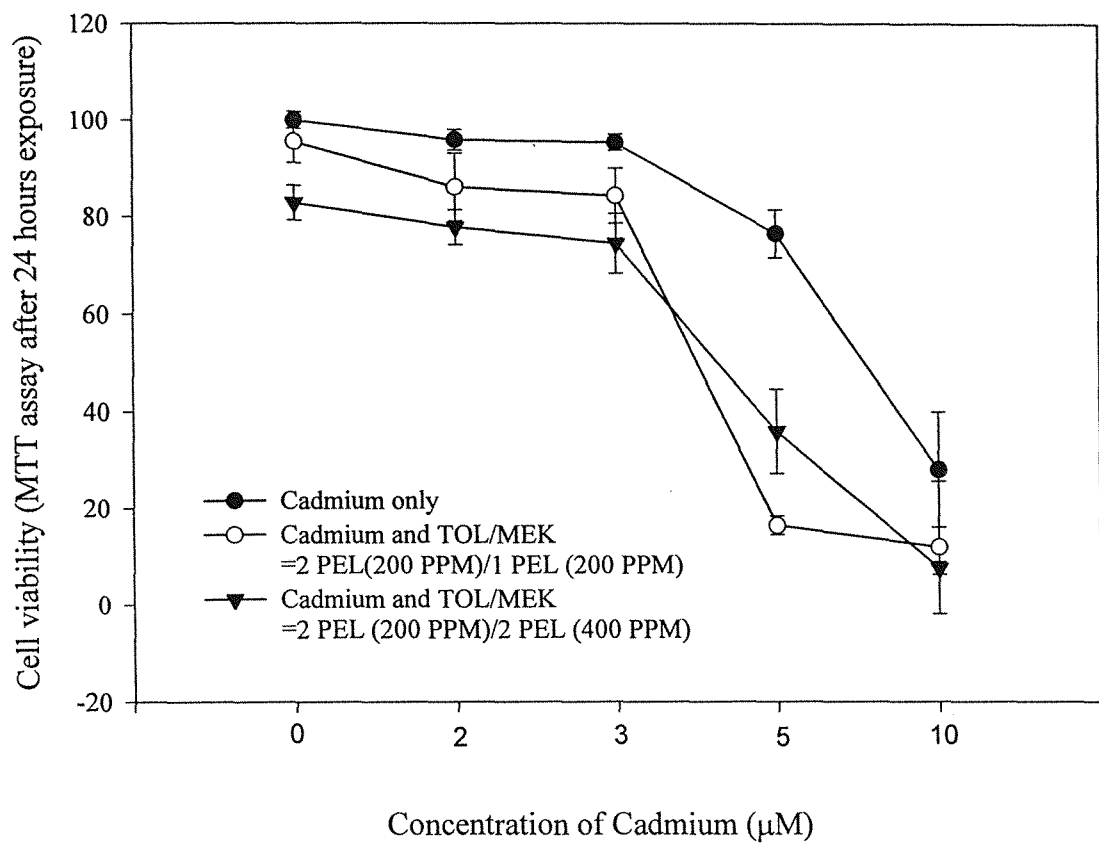


Fig.(26) 混存溶液中固定甲苯濃度與氯化鎘對細胞的毒性

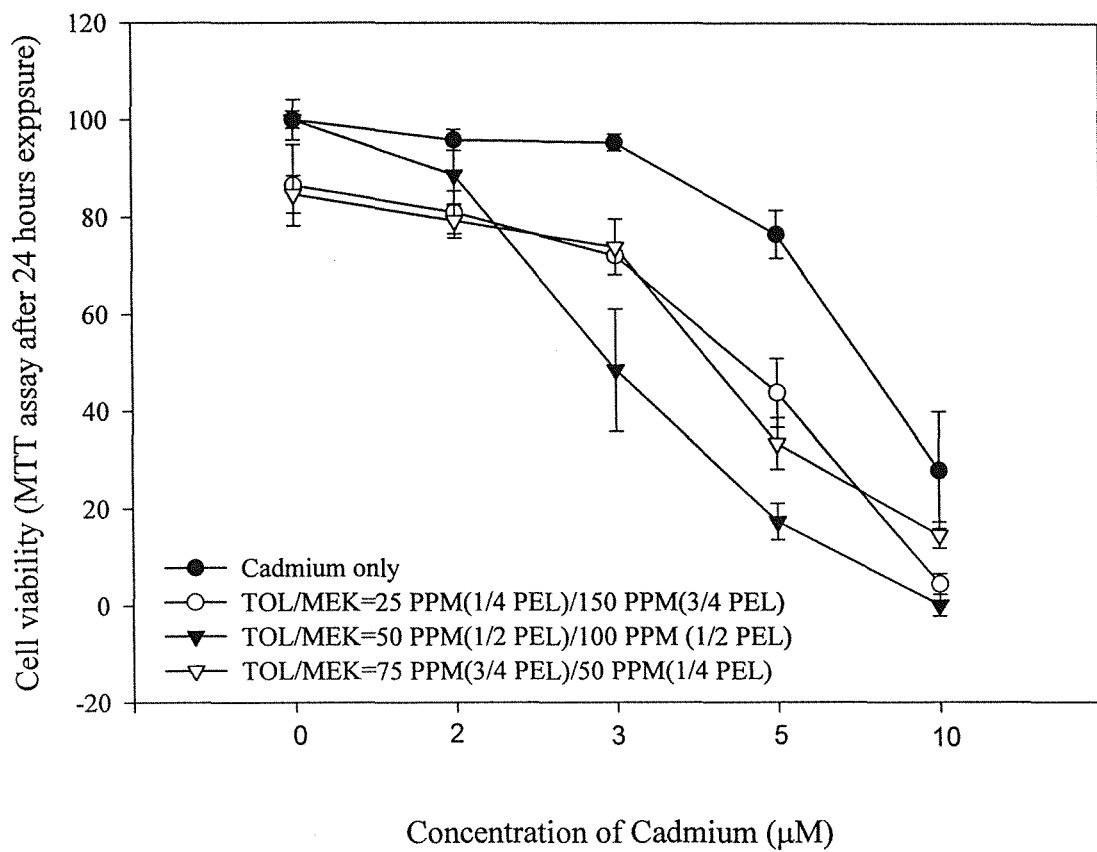
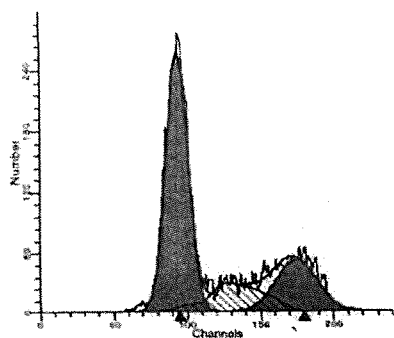
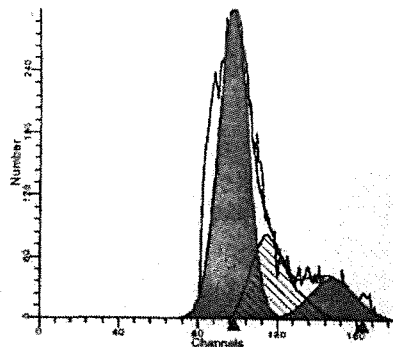


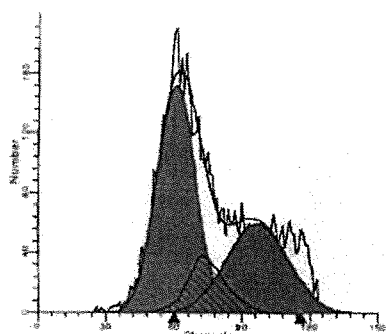
Fig.(27) 混存溶液中，同時變動甲苯與丁酮的濃度，與氯化鎘共同暴露對 V79 細胞的加成毒性



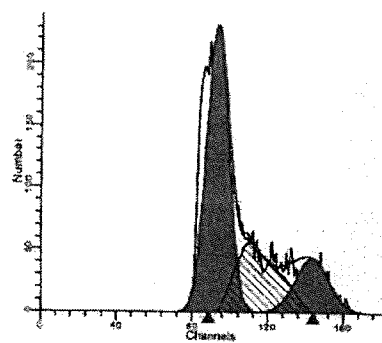
control



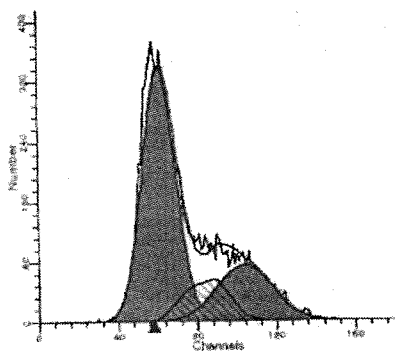
Cadmium 5  $\mu$ M



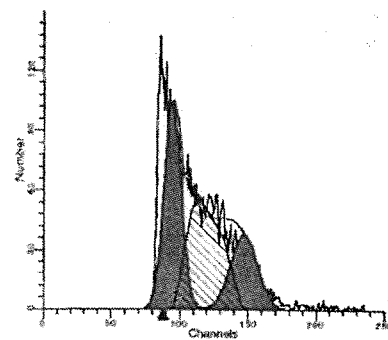
Toluene 100 ppm



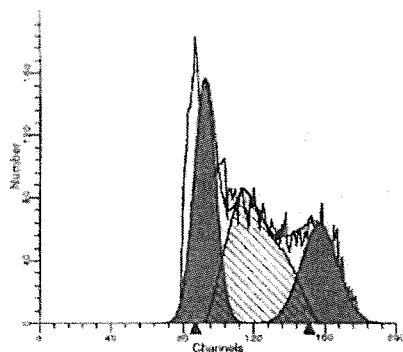
Toluene 100 ppm + Cadmium 5  $\mu$ M



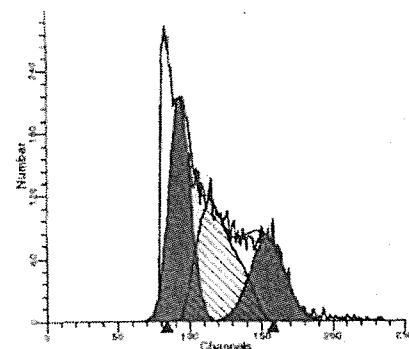
MEK 100 ppm



MEK 100 ppm + Cadmium 5  $\mu$ M



MEK 150 ppm



MEK 150 ppm + Cadmium 5  $\mu$ M

Fig.(28) 甲苯、丁酮及氯化鋇對 V79 細胞之細胞週期影響

表（一） 單一甲苯環境主動採樣、被動採樣之濃度

外在注入劑量	採樣方式	濃 度 (PPM)	
		暴露 12 小時	暴露 24 小時
甲苯 50 PPM	主動式採樣	50.7	63.0
	被動式採樣	18.9	25.2
甲苯 100 PPM	主動式採樣	95.6	93.4
	被動式採樣	71.2	82.2
甲苯 200 PPM	主動式採樣	166.0	202.7
	被動式採樣	56.0	69.9

表(二) 單一丁酮環境主動採樣、被動採樣及培養皿中之濃度

(培養皿中直接添加丁酮)

濃 度 (PPM)			
外在注入劑量	採樣方式	暴露 12 小時	暴露 24 小時
丁酮 200 PPM	主動式採樣	126.6	145.6
	被動式採樣	30.0	51.5
	介質中	1.2	2.3
丁酮 600 PPM	主動式採樣	449.0	328.6
	被動式採樣	57.1	90.5
	介質中	2.5	3.0

表 (三) 混合甲苯與丁酮其主動採樣、被動採樣及培養皿中之濃度

(甲苯與丁酮濃度比不固定)

(培養皿中直接添加甲苯及丁酮)

		濃 度 (PPM)			
外在注入劑 量	採樣方式	暴露 12 小時		暴露 24 小時	
		甲苯	丁酮	甲苯	丁酮
甲苯/丁酮 = 25/150	主動式採樣	28.8	68.0	40.3	96.7
	被動式採樣	12.7	14.5	23.6	25.3
	介質中	—	0.7	—	0.6
甲苯/丁酮 = 50/100	主動式採樣	40.7	44.5	51.5	63.5
	被動式採樣	28.0	13.7	49.9	22.6
	介質中	—	0.6	—	0.5
甲苯/丁酮 = 75/50	主動式採樣	54.4	25.3	101.4	29.1
	被動式採樣	45.6	9.4	53.0	9.1
	介質中	—	0.3	—	0.3

表(四) 混合甲苯與丁酮其主動採樣、被動採樣及培養皿中之濃度

(甲苯與丁酮濃度比固定)

(培養皿中直接添加甲苯及丁酮)

		濃 度 (PPM)			
外在注入劑 量	採樣方式	暴露 12 小時		暴露 24 小時	
		甲苯	丁酮	甲苯	丁酮
甲苯/丁酮 = 100/100	主動式採樣	31.0	9.6	40.9	28.2
	被動式採樣	17.4	3.7	24.8	6.9
	介質中	—	—	—	0.3
甲苯/丁酮 = 200/200	主動式採樣	168.2	114.0	192.9	123.5
	被動式採樣	90.2	27.6	159.3	42.9
	介質中	—	1.4	—	2.1
甲苯/丁酮 = 50/100	主動式採樣	40.7	44.5	51.5	63.5
	被動式採樣	28.0	13.7	49.9	22.6
	介質中	—	0.4	—	0.5
甲苯/丁酮 = 200/400	主動式採樣	133.5	186.2	208.5	317.4
	被動式採樣	103.4	76.0	122.6	90.9
	介質中	—	3.5	—	4.1



表(五) 甲苯、丁酮與氯化鎘對細胞週期的影響

Chemical	cell cycle	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control		59.29 %	17.47 %	23.24 %
Cadmium only 5 μM		64.37 %	22.39 %	13.24 %
Toluene 100 ppm		53.32 %	13.18 %	33.50 %
Toluene 100 ppm+cadmium 5 μM		57.42 %	25.91 %	16.67 %
MEK 100 ppm		63.37 %	14.02 %	23.60 %
MEK 100 ppm+cadmium 5 μM		38.65 %	39.58 %	21.77 %
MEK 150 ppm		34.56 %	41.75 %	23.69 %
MEK 150 ppm+Cadmium 5 μM		39.28 %	36.70 %	24.02 %