

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

內毒素的測定

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：師資改善專研計劃 CNIS-91-13

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

計畫主持人：莊依文

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：嘉南藥理科技大學工業安全衛生系

中華民國 92 年 2 月 28 日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

內毒素的測定

計畫編號：師資改善專研計畫 CNIS-91-13

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

計畫主持人：莊依文 嘉南藥理科技大學工業安全衛生系

一、 中文摘要

在醫療院所、畜牧業、紡織業與金屬製造業等作業勞工必需面臨潛在性生物性危害的威脅。而對於生物性危害的評估，目前並無標準的採樣分析方法可供依循。本研究將針對文獻上對於內毒素的採樣分析作探討，以期有助於標準內毒素的採樣分析方法的建立。

關鍵詞：內毒素、危害評估、測定

Abstract

Occupational exposure to endotoxin occurs in a variety of industries including hospital, agriculture, metal manufacturing. Since there is no standardization of sampling and analysis of airborne, the efforts of this work focus on the study of the endotoxin measures published in literatures.

Keywords : Endotoxin, Health hazard, evaluation

二、 緣由與目的

近年來生物科技產業的蓬勃發展，創造人類經濟繁榮與希望。但也帶來生物性危害的隱憂。除了生物科技產業外，生物性危害也發生在醫療院所、畜牧業、紡織業與金屬製造業等。為保護作業勞工免於生物性危害暴露的威脅，必須對生物性危

害作正確的評估。而對於生物性危害的評估，目前並無標準的採樣分析方法可供依循。本研究將針對文獻上對於內毒素的採樣分析作探討，以期有助於標準內毒素的採樣分析方法的建立。

內毒素來自於格蘭氏陰性細菌的外細胞膜，結構上為一種 lipopolysaccharide，其脂鏈為 3-hydroxyfatty acids。內毒素經呼吸道侵入人體後，主要之健康效應為發燒，身體不適、白血球數量改變和呼吸道壓迫[1-3]。

藉由內毒素的採樣分析，可對空氣中格蘭氏陰性細菌作定量。以了解作業環境空氣中格蘭氏陰性細菌污染的情形。

三、 研究方法

經由收集文獻，整理、比較內毒素的採樣分析。

四、 結果與討論

1. 內毒素的採樣方法[4]

(1) 以玻璃液體衝擊瓶採樣

使用收集液 :20mL，1% peptone-distilled water，其中含 0.01% Tween 80 0.005% antimycin A。以流率每分鐘 12.5L 採樣。玻璃瓶及吸收液均須先以高溫滅菌。採樣時間 30 分鐘。採樣後將樣本置於冰桶冷藏送回實驗室分析。

(2) 以單階式安德森生物採樣器採樣

單階式安德森生物採樣器以酒精擦拭消毒，將培養基 Trypticase soy agar、

MacConkey's medium 或 Malt extract agar 置入採樣器中。以流率每分鐘 28.3L 採樣。採樣時間 1-15 分鐘，視現場內毒素濃度而定。採樣後將樣本於室溫下送回實驗室分析。

(3) 以濾紙採樣

玻璃纖維墊片 (AP40, Millipore) 滅菌後，與濾紙 (polycarbonate membrane filter, 0.4 μ m pore size, 37mm diameter, Millipore) 置入濾紙匣 (3-stage polystyrene cassette 37 mm diameter, Millipore) 中密封帶至採樣現場。採樣時，採樣口朝下，採樣流率 1.5~2.0L/min。採樣後濾紙匣接上乾燥劑，於室溫下送至實驗室分析。

2. 內毒素的分析方法

(1) 測定 lipopolysaccharide 中 3-hydroxyfatty acids 的量，可使用 HPLC[5]和 GC-MS[6]分析。

(2) 基於 Chromogenic Limulus amoebocyte lysate (LAL) 的分析 [7, 8] 在此分析法，內毒素活化一個切斷合成受質的 proenzyme。釋出物可吸收 405-410nm 的光。藉由光的吸收用於測量內毒素的濃度包含兩種方法。

- 、終點法(the endpoint method): 於測量吸光度前以醋酸終止反應。
- 、動力學法(the kinetic method): 隨著反應進行中的不同時間點測量吸光度。

張靜文、鐘弘等研究養豬場作業環境暴露危害[4]，比較不同採樣方法發現以單階式安德森生物採樣器採樣最適宜革蘭氏陰性細菌之採樣分析。使用濾紙採樣，分析總內毒素平均濃度在 3.7ng/m³-30 ng/m³ 之間。若暴露量高於 50 ng/m³，會使人產

生不適症狀[9]。而測定值有達 164 ng/m³ 情形，顯示內毒素的健康危害不可輕忽。

Zucker, Draz 和 Müller 比較畜舍空氣中內毒素的過濾和衝擊瓶採樣法[10]，發現有良好相關性， $r^2=0.75$ 。使用 AGI-30 衝擊瓶採樣有較高的補集效率，但只能用於短時間，60 分鐘以內的採樣，因吸收液會隨長時間採樣而流失。故長時間採樣時可選擇過濾法。AGI-30 衝擊瓶採樣後可直接使用 LAL 法分析，不需作樣本的萃取前處理，並可同時做其他的好氧菌分析。

比較清除糞便前、清除糞便中和清除糞便後畜舍空氣中內毒素濃度變化[10]，顯示在清除糞便中有較高濃度出現。而使 AGI-30 衝擊瓶採樣比過濾法有較佳的靈敏性。

Reynolds 和 Throne 等比較農業粉塵內毒素的分析[11]。使用 37mm 玻璃纖維濾紙，流率 1.8L/min 採樣。每一個採樣點採集 14 個重複(side by side)樣本，分送六個實驗室以 LAL 方法分析。分析結果顯示各實驗室對內毒素的分析有統計上之差異。此差異可能與萃取和分析方法有關。

Morris, Catalano 和 Berni 使用 HPLC 測定棉塵和粉塵中內毒素含量[5]。棉塵和粉塵經萃取處理與水解後製成 phenacyl esters，此 3-hydroxyfatty acid 的 phenacyl esters 再經由 HPLC 測定。此方法所測定的內毒素至少須 0.50 μ g 以上。

內毒素的測定一般使用 LAL 法，具有較高的靈敏性，並有商業化的測定藥品組與測定步驟可利用[12]，但價格昂貴，測定數據的準確性與精密性需更進一步的研究。使用 HPLC 測定，需製備成 phenacyl esters 的衍生物，步驟較繁瑣，且須較高內毒素量。由於 HPLC 普遍用於一般化學、分析實驗室，利用 HPLC 作內毒素之測定值得進一步研究。

五、參考文獻

- [1] Castellan, R.M.; Olenchock, S.A.; Hankinsen, J.L., *Ann. Intern. Med.* 101:157-163,1984.
- [2] Castellan, R.M.; Olenchock, S.A.; Kinsley, K.B.; Hankinsen, J.L., *N.E. J. Med.* 317:605-610,1987.
- [3] Heederik,, D., Brouwer, R., Biersteker, K., Boleij, J.S.M., *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 62:595-601, 1991.
- [4] 張靜文、鐘弘、黃金鳳、蘇慧貞，*勞工安全衛生研究季刊*，民國 86 年，第五卷第三期第 1-22 頁。
- [5] Morris, N.M.; Catalano, E.A.; Berni, R.J., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 49(2):81-88, 1988.
- [6] Mielniczuk, Z.; Mielniczuk, E.; Larsson L., *J. Micro. Methods*, 17:91-102, 1993.
- [7] Milton, D.K.; Gere, R.J.; Feldman, H.A.; Greaves, I.A., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 51: 331-337, 1990.
- [8] Milton, D.K.; Feldman, D.S.; Neuberg, D.S.; Bruckner, R.J.; Greaves, I.A., *Environ. Res.* 57: 212-230, 1992.
- [9] Jacobs, R.R.*Appl.Ind.Hyg.*,4(2):50-56, 1989.
- [10] Zucker, B.A.; Draz, A.M.; Müller, W., *J. Aerosol Sci.*, 31(6): 751-755, 2000.
- [11] Reynolds, S.J.; Thorne, P.S.;Donham, K.J.; Croteau, E.A.; Kelly, K.M.; Lewis, D...etc, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 63: 430-438, 2002.
- [12] Nieuwenhuijsen, M.J.; Noderer, K.S.; Schenker, M.B.; Vallyathan, V.; Olenchock, S.,*Ann.Occup. Hyg.*, 43(1): 35-42, 1999.

