



勞安所研究報告

奈米微粒危害分級技術探討

**The Technic of Hazard Classification
for Airborne Nano-scale Particles**

勞動部勞動及職業安全衛生研究所

INSTITUTE OF LABOR, OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH, MINISTRY OF LABOR

奈米微粒危害分級技術探討

The Technic of Hazard Classification for Airborne Nano-scale Particles

勞動部勞動及職業安全衛生研究所

奈米微粒危害分級技術探討 / 陳春萬, 王應然, 蕭大智研究主持. -- 1 版. -- 新北市 : 勞動部勞研所, 民 103. 03

面 ; 公分

ISBN 978-986-04-0762-4(平裝)

1. 工業安全

555.56

103005011

奈米微粒危害分級技術探討

著(編、譯)者: 陳春萬、王應然、蕭大智

出版機關: 勞動部勞動及職業安全衛生研究所

22143 新北市汐止區橫科路 407 巷 99 號

電話: 02-26607600 <http://www.ilosh.gov.tw/>

出版年月: 中華民國 103 年 3 月

版(刷)次: 1 版 1 刷

定價: 650 元

展售處:

五南文化廣場

台中市區中山路 6 號

電話: 04-22260330

國家書店松江門市

台北市松江路 209 號 1 樓

電話: 02-25180207

- 本書同時登載於本所網站之「出版中心」, 網址為 <http://www.ilosh.gov.tw/wSite/np?ctNode=273&mp=11>
- 授權部分引用及教學目的使用之公開播放與口述, 並請注意需註明資料來源; 有關重製、公開傳輸、全文引用、編輯改作、具有營利目的公開播放行為需取得本所同意或書面授權。

【版權所有, 翻印必究】

GPN: 1010300902

ISBN: 978-986-04-0762-4

奈米微粒危害分級技術探討

**The Technic of Hazard Classification
for Airborne Nano-scale Particles**

研究主持人：陳春萬、王應然、蕭大智

計畫主辦單位：行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所

研究期間：中華民國 102 年 05 月 28 日至 102 年 12 月 13 日

勞動部勞動及職業安全衛生研究所

中華民國 103 年 3 月

摘 要

奈米科技是近年來最炙手可熱的高科技產業之一，越來越多的奈米產品被製造出來改善人們的生活。但在人們享受奈米科技帶來的便利的同時，其潛在風險也逐漸浮現出來。所以，如何對奈米材料進行毒性測試和評估便成為現今發展的重點之一。目前最常被用來做為毒性測試的方法有三種，分別是動物試驗、*in vitro* 和 *ex vivo*，其中動物試驗雖可模擬微粒對細胞傷害或移轉機制的影響，也可以明顯看出奈米材料對動物身體的危害，但其成本偏高且有道德疑慮。研究已開發 *in vitro* 暴露奈米氣懸微粒的靜電集塵式空氣-液介面系統(ESP-ALI system)，對此系統的收集效率和貫穿率進行實驗分析和程式模擬，並建立一套奈米微粒細胞株危害的方法，可提供後續毒性研究測試。

目前我們對奈米微粒的毒性以及危害效應的了解程度仍相當有限。奈米微粒的物化特性分析被認為是在進行毒性評估前的必要流程，因為這些特性與其在細胞及動物體內所產生的生物效應有很大的關聯性。研究目標之一在建立能執行各項商品化奈米材料毒性分析之細胞株檢測平台，並持續對於提升 ALI 系統多粒徑微粒帶電效率與觀察微粒於液相中物化特性的改變方面進行探討。另外也持續透過奈米微粒細胞株危害探討毒性試驗的影響因素，評估與動物實驗之差異，且以自行合成的不同粒徑大小與不同表面修飾(檸檬酸鈉或 PVP)的奈米銀微粒，來評估此平台所擬用的毒性分析方法及生物效應指標(包括：細胞凋亡、自噬作用以及活性氧自由基的誘發程度)是否適用於奈米毒性之探討。此外本研究選用斑馬魚的胚胎與幼魚來進行暴露實驗，以評估細胞株毒性測試平台能否預測生物活體暴露奈米銀微粒所受之危害。為了可以進一步探討奈米特性與所誘發之毒性及生物效應的關聯性，我們亦針對所有合成的奈米銀微粒進行詳盡的物化特性(包括粒徑大小與分佈、外形、表面電位、化學組成、比表面積等)分析，並且檢測它們於細胞培養液中的銀離子溶離能力，以期釐清銀離子對奈米銀毒性所扮演之角色。另一研究方向亦嘗試建立 THP-1 分化之巨噬細胞與

A549 細胞的共培養系統，以於未來作為氣液界面呼吸道暴露系統之理論基礎。我們亦彙整國際組織對奈米物質的安全管理策略，並探討目前的研究成果對於奈米物質危害分級管理以及建立符合奈米材料之安全資料表之應用性。

我們的研究結果指出，以電噴霧帶電的方式來提高多粒徑分布的微粒帶電效率，針對多粒徑微粒帶電效率的部分，經實驗證明此一帶電方式的帶電效率與以 DMA 篩分後的帶電效率接近，且大於 50 nm 的微粒經過電噴霧帶電後於 ESP-ALI 系統有良好的收集效率，微粒損失遠少於 DMA 篩分過程，證明此一帶電方式應可直接應用於 ESP-ALI 系統進行多粒徑分布微粒的暴露。微粒在水中的物化特性的實驗結果顯示，微粒進入溶液之後會有明顯的聚集現象，可能造成毒性的改變；銀離子釋出的實驗結果則顯示若溶液中含有多種配位基，可能與銀離子結合產生沉澱，減少溶液中銀離子濃度，造成毒性的改變。研究中也以 ESP-ALI 系統搭配生物用濾膜實際收集多粒徑分布的奈米銀微粒，結果顯示 ESP-ALI 有一定的收集效率且濾膜上的微粒粒徑有上升的現象。

奈米銀微粒的物化特性對細胞毒性、細胞死亡機轉(包括細胞凋亡與自噬作用)以及活性氧自由基產生研究結果顯示，粒徑大小較其表面化學修飾的影響程度更大。對 Beas2B 細胞來說，奈米銀微粒在暴露早期(三個小時內)就會被攝入細胞內，而且粒徑越大者程度越明顯。暴露後六個小時會逐漸誘發自噬作用及細胞凋亡反應，亦是較大粒徑者所引發的程度較顯著。不過，活性氧自由基的產生程度則是相反，粒徑較小者誘發程度較為顯著。另一方面，以生物相容性較高的 PVP 進行表面修飾，可能具有降低毒性與相關生物效應的效果。在斑馬魚胚胎及幼魚的暴露實驗中，可發現奈米銀微粒會降低孵化率與存活率，甚至發育畸形，並且也增加組織細胞內的氧化壓力。我們發現在較低暴露劑量下，隨暴露時間拉長，就會對斑馬魚胚胎與幼魚產生顯著毒性。雖然從實驗結果之比較，細胞株實驗與動物實驗之間很難在暴露之劑量效應與時間效應上得到一致的結果，然而就危害風險評估的觀點，細胞株毒性測試平台之建立仍具有相當程度的重要性。此外，我們針對合成奈米銀於細胞培養液中溶離釋放出銀離

子的能力進行分析，對照我們以銀離子進行細胞毒性分析的結果，可發現溶離出的銀離子濃度遠低於銀離子造成細胞毒性時的濃度。此結果顯示奈米銀溶液自發釋放出的銀離子不足以影響其毒性，但奈米銀暴露過程中由細胞攝入的銀粒子所釋放出的銀離子是否為其毒性呈現的關鍵因子仍需進一步探討。

關鍵詞：奈米微粒、細胞危害、靜電集塵式空氣-液介面系統、物化特性、奈米毒性分析平台、危害分級管理

Abstract

Nanotechnology is considered as the technology of the 21st century, with tremendous promise and applicability in a variety of different sectors. However, there are also concerns about the potential adverse effects on the human body of exposure to nano-particles (NPs). Therefore, evaluation of the potential toxicity of NPs has become an important issue in recent years. Currently, three methodologies--animal experiments, ex vivo studies, and in vitro systems--are generally used to study the adverse cellular effects induced by inhalable NPs. Among these methodologies, in vitro experimental setups are widely employed because of their relatively low labor and capital costs. In addition, in vitro studies can avoid the ethical issues raised by animal experiments. Therefore, an ESP-type air-liquid interface (ALI) exposure system for nano-particle cell exposure experiments was developed and evaluated in 2011.

We still have limited knowledge about the toxicity and adverse effects of nanoparticles. Physico-chemical characterization of nanoparticles has been regarded as a prerequisite to toxicological studies, as these characteristics are presumed to be correlated with the biological effects of nanoparticles upon exposure to cells and animals.

The objective of this project was to establish a cell line-based assessment platform that can be used to analyze the toxicity of commercially and industrially available nanoparticles. In this study, we attempted to enhance the ALI collection efficiency of polydisperse aerosol by increasing particle charging efficiency using the electrospray method. We synthesized silver nanoparticles with different sizes and surface modifications (i.e. citrate or PVP coatings) to evaluate the feasibility of toxicity testing approaches and the targeted biomarkers (e.g., apoptosis, autophagy, and ROS generation) that are related to nanotoxicity. Secondly, we chose zebrafish embryos and larvae as an in vivo animal model system to examine whether the results acquired from the cell line-based platform could predict the biohazard effects caused

by *in vivo* exposure. We also performed detailed physico-chemical property measurements (including characterizing particle size and distribution, shape, surface potential, chemical composition, specific surface area, etc.) to gain a deeper insight into the link between nano-related properties and their toxic effects or biological influences. Dissolution capacity in a culture medium was determined in order to understand the role of ionic silver in the toxicity of nano silver colloid. Moreover, we attempted to set up a co-culture system of THP-1-derived macrophages and A549 cells to serve as a theoretical base for the air-liquid interface airway-simulation exposure system. In addition, our report summarizes the collection of safety management policies of international organizations regarding nanomaterials, and attempts to integrate our research achievements into the risk ranking and management of nanomaterials and also to establish MSDS for nano materials.

Our experimental results show that the mean charging efficiency of polydispersed particles by using electrosprays is no less than that of monodispersed particles classified by differential mobility analyzers (DMAs). In addition, after electrospray charging, the ALI collection efficiency of polydisperse aerosol significantly improved for AgNPs larger than 50nm. The changes of chemical and physical properties of AgNPs collected in the liquid of the ALI system were also investigated. It was found that AgNPs aggregated fast initially, potentially influencing their toxicity. The experiment results also showed that ligands in solutions will bind with Ag⁺, leading to a significant reduction in the Ag⁺ concentration. Our project used the ESP-ALI system equipped with Transwell vessels to collect polydisperse AgNPs. SEM images of the Transwell membrane indicated that ESP-ALI has a good collection efficiency for polydisperse AgNPs; however, the size of the collected AgNPs is slightly larger than the size measured by SMPS.

Compared to surface chemical modification, particle size contributes more to the level of cytotoxicity, cell death mechanism (e.g. apoptosis and autophagy), and ROS generation triggered by exposure to silver nanoparticles. For Beas2B cells, the cellular uptake of silver nanoparticles was shown to occur at the early exposure stage

(approximately within 3 hrs) and the larger the size, the greater the extent of uptake. Autophagy and apoptosis were induced gradually after 6 hrs post-exposure, conforming to the aforementioned inference. However, a significantly higher level of ROS generation was caused by exposure to smaller silver nanoparticles, and chemical modification by biocompatible PVP seemed to reduce the toxicity and bioadverse effects of the silver nanoparticles. In vivo experiments using zebrafish embryos and larvae demonstrated that silver nanoparticle exposure could reduce both the hatching and survival ratios, even resulting in developmental abnormalities, as well as producing oxidative stress in tissues. We found that with increased exposure periods, even lower dosages could evoke significant toxicity in embryos and larvae. Although we were unable to achieve consistent results for the dose-response relationship and/or time course effects between cell line-based studies and animal studies, the establishment of a cell line-based testing platform is still of great importance in view of the need for risk assessment. Furthermore, the level of ionic silver released from colloidal nano silver was much lower than that capable of inducing obvious cytotoxicity, which suggests that spontaneous silver ion dissolution might not sufficiently account for the toxic effects of nano silver. Whether the dissolution of ionic silver from colloidal nano silver upon exposure, or uptake into the cells, is a key determinant of nanotoxicity, remains a question for further investigation.

Key Words : nanoparticle, adverse cellular effects, ESP-ALI system, physico-chemical properties, nanotoxicity testing platform, risk ranking and management

目錄

摘 要.....	i
Abstract.....	iv
目錄.....	ix
圖目錄.....	xi
表目錄.....	xiv
第一章 計畫概述.....	1
第一節 背景與研究緣起.....	1
第二節 目的.....	24
第三節 工作項目.....	26
第二章 研究方法及步驟.....	29
第一節 實驗儀器.....	29
第二節 危害測試.....	32
第三節 ALI 性能測試.....	44
第三章 結果與討論.....	59
第一節 以電噴霧法提升多粒徑分佈微粒的帶電效率.....	59
第二節 氣相奈米微粒沉浸與液相中物化特性的改變.....	69
第三節 奈米安全衛生管理策略之發展與建議探討.....	100
第四節 奈米銀微粒之合成及其物化特性分析.....	116
第五節 合成奈米銀微粒於細胞培養液中之溶離狀況分析.....	123
第六節 Beas 2B 細胞株毒性檢測平台之測試結果.....	127
第七節 THP1 單核球細胞與 A549 細胞共培養模式建立.....	143
第八節 斑馬魚胚胎奈米毒性檢測平台建立測試結果.....	152
第四章 結論與建議.....	162
第一節 結論.....	162

第二節 建議.....	174
誌謝.....	177
參考文獻.....	178

圖目錄

圖 1 奈米微粒在乾燥狀態下與溶液中可能呈現的構形與分散狀況[36]	9
圖 2 奈米銀微粒製程添加穩定劑種類文獻統計分析	12
圖 3 奈米銀微粒造成細胞毒性的可能機轉	14
圖 4 以 Transwell 進行 co-culture 模式之示意圖	17
圖 5 細胞自體吞噬(autophagy)之流程圖	18
圖 6 自體吞噬及溶酶體功能失常的毒性機制[102]	20
圖 7 實驗室斑馬魚房建立現況及飼養與實驗相關設施	22
圖 8 實驗室斑馬魚胚胎發育解剖顯微鏡觀察記錄	22
圖 9 C60 和其衍生物的結構以及使用 Live/Dead cell viability assay 分析結果[141]	39
圖 10 Live/Dead cell viability assay 使用流式細胞儀分析	40
圖 11 斑馬魚動物實驗流程圖	42
圖 12 胚胎毒性對斑馬魚發育之影響	43
圖 13 Keqi et al. 所設計的電噴霧系統[152]	45
圖 14 電噴霧的不同型態[153]	45
圖 15 電噴霧帶電混和槽設計	47
圖 16 帶電效率測試實驗流程	48
圖 17 樣品溶液製備流程圖	51
圖 18 水質狀況實驗流程	51
圖 19 粒徑量測實驗流程	54
圖 20 界達電位量測實驗流程圖	55
圖 21 離子釋出實驗流程圖	56
圖 22 TFF 過濾示意圖	57
圖 23 樣品分區方式	58

圖 24 101 年本所研究所建置的 ALI 暴露系統.....59

圖 25 (a) cone jet (b) multiple jet 狀態下的電噴霧.....60

圖 26 (a)氣膠流量為 1.5lpm 時之電噴霧帶電內微粒損失 (b)氣膠流量為 0.6lpm 時
之電噴霧帶電內微粒損失61

圖 27 (a)Q=1.5lpm 時，multiple jet 模式電噴霧帶電之平均帶電量; (b)Q=1.5lpm
時，cone jet 模式電噴霧帶電之平均帶電量; (c)Q=0.6lpm 時，multiple jet
模式電噴霧帶電之平均帶電量; (d)Q=0.6lpm 時，cone jet 模式電噴霧帶
電之平均帶電量65

圖 28 (a)加裝電噴霧帶電系統後 ESP-ALI 暴露系統之單粒徑微粒貫穿率 vs. ALI
施加電壓; (b)加裝電噴霧帶電系統後 ESP-ALI 暴露系統之單粒徑微粒
貫穿率 vs. 微粒電移動飄移速度66

圖 29 (a)加裝電噴霧帶電系統後 ESP-ALI 暴露系統於 multiple jet 模式之多粒徑微
粒貫穿率; (b)加裝電噴霧帶電系統後 ESP-ALI 暴露系統於 cone jet 模式
之多粒徑微粒貫穿率68

圖 30 Multiple jet 模式及 Cone jet 模式下微粒貫穿率的改善效率69

圖 31 奈米銀微粒經燒結過後粒徑大小變化.....70

圖 32 30、40、50nm 單粒徑奈米銀微粒，燒結前後微粒動力形狀控制因子變化
.....72

圖 33 不同暴露時間下奈米銀微粒分佈情形.....73

圖 34 離子釋出與聚集對於奈米銀毒性的影響.....73

圖 35 奈米銀微粒在環境中目前已知(或未知)的宿命[38]76

圖 36 氣相奈米銀微粒粒徑分佈.....79

圖 37 DI 水暴露時間 4 小時奈米銀微粒 (a)DI-4HR-1 粒徑 (b)DI-4HR-2 粒徑 (c)
界達電位隨時間的變化.....81

圖 38 DI 水暴露時間 4 小時後 (a)pH 值 (b)溶氧量 (c)電導度隨時間的變化.....82

圖 39 DI 水暴露時間 8 小時奈米銀微粒 (a)DI-8HR 粒徑 (b)界達電位隨時間的變

化.....	83
圖 40 DI 水暴露時間 8 小時後 (a)pH 值 (b)溶氧量 (c)電導度隨時間的變化.....	85
圖 41 DMEM-H 暴露時間 4 小時奈米銀 (a)粒徑 (b)界達電位隨時間的變化.....	87
圖 42 DMEM-H 暴露時間 4 小時後 (a)pH 值 (b)溶氧量 (c)電導度隨時間的變化	87
圖 43 Predominance diagram for Ag^+ and $AgCl_{x-(x-1)}$ species [21]	89
圖 44 不同 Cl/Ag ratios 的溶液中奈米銀微粒銀離子釋出量[21]	91
圖 45 DMEM-H 暴露時間 8 小時後奈米銀微粒 (a)粒徑 (b)界達電位隨時間的變 化.....	91
圖 46 DMEM-H 暴露 4 小時與 8 小時後粒徑隨時間的變化.....	92
圖 47 不同氯化鈉濃度下溶液中奈米銀微粒的 α 值[177].....	92
圖 48 DMEM-H 暴露時間 8 小時後 (a)pH 值 (b)溶氧量 (c)電導度隨時間的變化	94
圖 49 通過 ESP-ALI 後，未施加 corona 與施加 corona 微粒的粒徑分布.....	97
圖 50 DMEM-4HR 掃描式電子顯微鏡拍攝結果。(a)50000x (b)50000x (c)10000x (d)10000x	99
圖 51 不同粒徑與表面修飾(包覆)奈米銀微粒之穿透式電顯圖。(A) SCS ; (B) LCS ; (C) SPS ; (D) LPS ; (E) SAS ; (F) LAS	117
圖 52 奈米銀微粒(以 SCS 為例)水合動態粒徑分析圖(A)即時 (Realtime)動態粒徑 分析(每一點代表一次平均粒徑，共記錄 70 次)(B)動態粒徑數量分布圖	120
圖 53 奈米銀微粒之 UV-Vis 光譜特性 (A)同表面(檸檬酸鈉)修飾之大粒徑與小粒 徑奈米微粒之光譜特性(B)SCS 在純水與在含 1% FBS 培養液之光譜特 性.....	121
圖 54 SCS 之能量分散 X 光光譜分析結果.....	121
圖 55 以 LAL 試劑檢測合成奈米銀微粒是否含有內毒素(LPS)(A)正控制組(只含	

細菌內毒素(LPS))；(B)同時含有奈米銀與內毒素(LPS)之對照組；	
(C)(D)(E)(F)(G)(H)分別為 SCS、SPS、SAS、LCS、LPS 與 LAS 之測	
試組	123
圖 56 合成奈米銀微粒於培養液中溶離釋放情形(A)銀離子標準液(10-50ppb)之標	
準曲線(B) 100ppm 的六種奈米銀微粒在 DMEM 中解離的狀態	124
圖 57 奈米銀粒子在 Hoagland 培養液中溶離的狀態[135]	126
圖 58 牛血清蛋白(BSA)與海藻酸(alginate)的保護機制[192]	126
圖 59 暴露 20nm 和 110nm 的奈米粒子在解離速率與生物使用度上的差異	127
圖 60 用比色分析法檢測不同粒徑大小√表面包覆之奈米銀微粒細胞毒性。Beas2B	
細胞分別處理 LPS、SPS、LCS 以及 SCS，經過 24 小時，再以(A) MTT	
細胞存活分析法與(B) MTS 細胞存活分析法進行檢測。	130
圖 61 流式細胞分析技術(Live/Dead Cell Viability Assay)，檢測 Beas2B 細胞處理	
不同粒徑/表面包覆奈米銀 24 小時後之存活率.....	131
圖 62 不同粒徑大小√表面包覆之奈米銀處理之 Beas2B 細胞。24 小時後細胞形態	
變化與死亡狀況 (A) LPS; (B) SPS; (C) LCS;(D) SCS。	132
圖 63 粒徑與表面包覆對奈米銀引發 Beas2B 細胞死亡之機轉比較。(A) Early	
apoptosis; (B) Late apoptosis; (C) Necrosis(暴露時間為 18 小時).....	134
圖 64 暴露不同粒徑大小√表面包覆之奈米銀微粒 18 小時後引發 Beas2B 細胞產	
生自體吞噬作用之比較.....	135
圖 65 不同粒徑大小√表面包覆之奈米銀暴露 Beas2B 細胞 1 小時後引發 ROS 產生	
之比較.....	136
圖 66 不同粒徑大小√表面包覆之奈米銀被 Beas2B 細胞攝入狀況，(A) 處理後 30	
分鐘觀察；(B)處理後 1 小時觀察；(C)處理後 3 小時觀察；(D)處理後	
18 小時觀察	138
圖 67 銀離子、微米級銀粒子與商品化奈米銀之細胞毒性比較.....	139
圖 68 LCS 所誘發自噬作用之計量與時間效應，(A)以流式細胞分析技術進行定	

量, (B)以西方墨點法分析 LC3II 與 p62 表達量〔 actin 爲 loading control 〕	140
圖 69 LCS 所誘發細胞凋亡之劑量與時間效應, (A)細胞發生細胞壞死比例 (B)細胞進入早期細胞凋亡比例(C)細胞進入晚期細胞凋亡比例 (D)以西方墨點法分析 Procaspase 3/Caspase3 與 Bax 表達量〔 actin 爲 loading control 〕	141
圖 70 LCS 所誘發 ROS 之計量與時間效應	142
圖 71 測試經不同 PMA 條件所誘導之 THP-1,對於 LPS 刺激後之 IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表現情形。THP-1 以(A)100 ng/mL PMA 進行誘導 48 小時, 及 (B)5 ng/mL PMA 進行誘導 24h 後,再以 100 ng/mL LPS 處理 24 小時,隨後萃取細胞之 mRNA,以 Real-Time PCR 進行 IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表現量分析	144
圖 72 PMA 誘導 THP-1 分化之條件對於曝露包覆 PVP 之小粒徑奈米銀(SPS)的影響。THP-1 經由 5 ng/mL PMA 誘導分化 24 及 48 小時後,再以 5 μ g/mL SPS 曝露 12 小時,隨後萃取 total RNA 並以 real-time PCR 進行 IL-1 β (A) 及 TNF- α (B)mRNA 表現量分析	145
圖 73 THP-1 經 PMA 誘導分化過程中細胞表面 CD14 表現量變化情形。THP-1 經由 5 ng/mL PMA 誘導分化 24 及 48h 後,分別以 DAPI(細胞核染劑)及 CD14-Alexa488 抗體(綠色螢光)進行染色,隨後再以螢光顯微鏡記錄細胞之可見光及螢光影像	146
圖 74 以流式細胞儀評估已分化之 THP-1 攝入奈米微粒之情形。(A)已分化之 THP-1 經曝露不同濃度之 SPS 於 13h 後,利用流式細胞儀測定細胞內複雜度之變化(SSC); (B)已分化之 THP-1 曝露不同濃度與時間之 SPS,對於其細胞內部複雜度之影響	147
圖 75 利用奈米微粒曝露 THP-1 所分化之巨噬細胞誘導 IL-1 β 的 mRNA 表現。THP-1 經 5 ng/mL PMA 誘導分化 48h 後,再曝露不同濃度之 SPS 於 12h	