

# 第一章 緒論

## 1.1 研究緣起

隨著全球工業快速起步，經濟大幅起飛的同時，許多環境問題也伴隨誕生，而工業上的廢水放流參雜許多複雜的毒性化學物質，這些物質對水體方面之污染都會造成長遠的傷害，因此，為避免這樣的情況再發生，許多分析毒性化學物質的環境指標也被發展出來。

生物性指標目前已漸漸成為重要的水體保護依據，不管是魚類、甲殼類動物抑或是本實驗所採用之單細胞藻類，都是廣為許多學者研究的物種。藻類屬於食物鏈的最底層，當水中之毒性物質對藻類造成毒性傷害時，經由食物鏈的傳遞，同時也會對其他物種造成影響。而且許多試驗方法也相繼由 U.S. EPA，OECD，ISO 等組織訂定出來，而且，由於藻類繁衍迅速，生命週期短暫，於試驗期間，幼年或是老年對於毒性物質不同忍耐力之影響亦會較小。更重要的，利用藻類作毒性試驗評估具有迅速、簡單、敏感性佳且成本低等種種優點，因此藻類之毒性試驗也成為評估毒化物質對水體影響的重要依據。

而本實驗所選用之毒性化學物質為丙烯腈，根據許多文獻指出，丙烯腈為工業上一重要之化學物質，它可合成出許多聚合物，常常也隨著工業廢水進到水體環境裡，因此其對水體有一定的衝擊。

在台灣，丙烯腈為列管之毒物，而其他許多國家，如：美國、中國及德國...等，也將丙烯腈列為一級的污染物，對於如此重要的物質，但是其水體毒性數據卻相當的稀少，因此針對這樣的毒性化學物質，有需要再

深入研究的價值。

而因為工廠林立，水體的影響已經不是單一種物質了，因此不同毒性化學物質間交互作用後的混合毒性也必須被重視，藉由兩種毒化物的混合來評斷其作用為拮抗、加成或協同，進一步準確的評估對水體的影響，減低錯估的可能性。

因此本實驗除了針對丙烯腈進行單一毒性試驗分析外，亦將其與另一重要毒性化學物質—醛類，進行混合毒性試驗，探討不同的醛類及丙烯腈衍生物相互混合後的毒性效應，為水體作一更完整的評估。



## 1.2 研究目的

1. 利用密閉式藻類毒性試驗系統評估不同丙烯腈衍生物，以溶氧變化、生物質量及生長率作為實驗終點，求得 $EC_{50}$ 值和劑量反應曲線，利用此結果評估其對藻類的急毒性。
2. 根據單一毒性試驗之結果，利用相同實驗系統，將丙烯腈及醛類根據劑量反應曲線之斜率大小分類相混，進行混合毒性試驗，評估不同斜率之化合物相混後的毒性效應。

## 1.3 研究架構

實驗自參考資料與文獻收集開始，首先確定欲實驗的化合物，進而蒐集化合物之物化資料、文獻回顧、數據收集，做進一步整理與分析，再建立實驗目的、實驗方法及分析方法，最後完成試驗。試驗流程圖 Fig 1.3.1

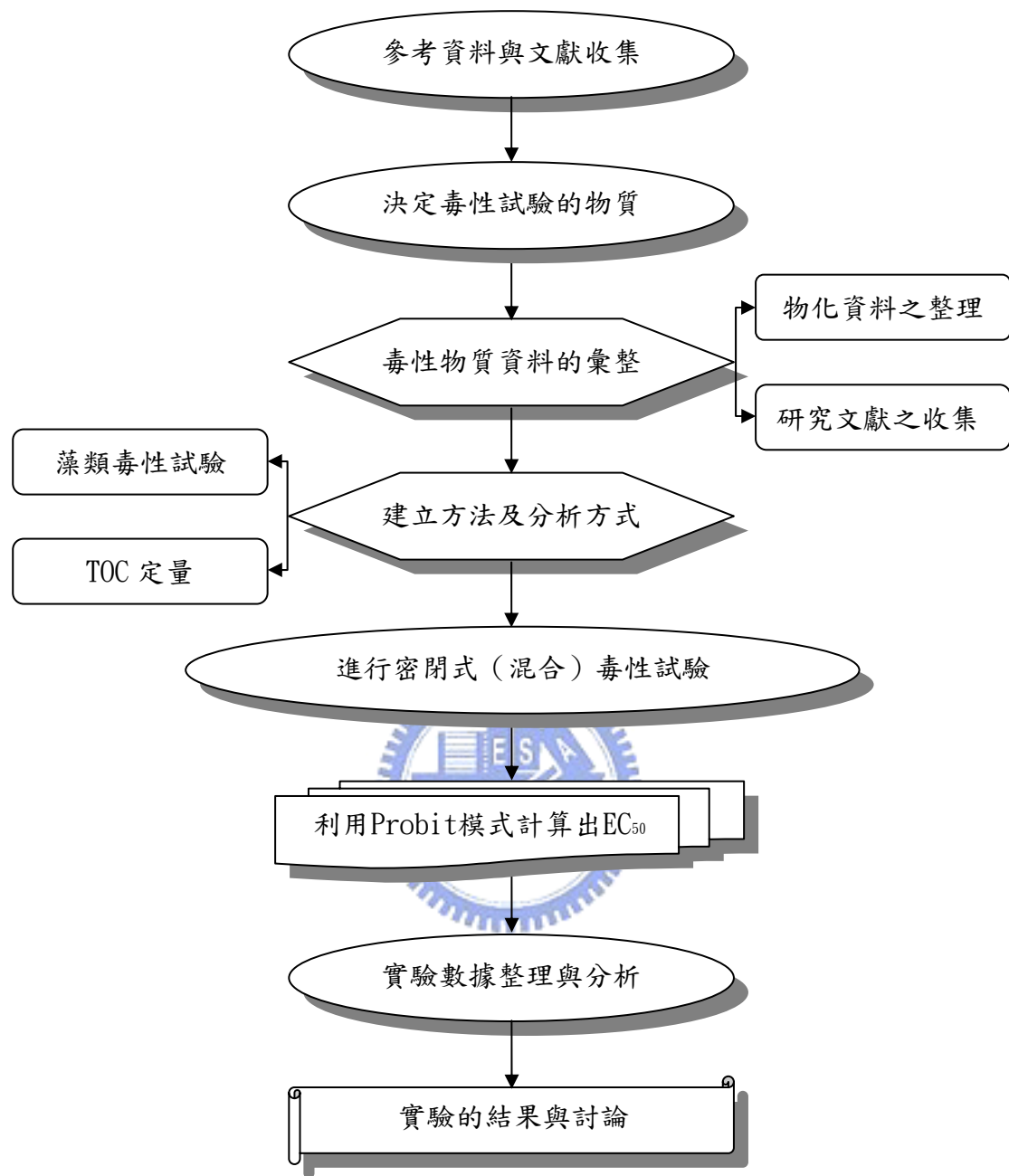


圖 1.3.1 研究架構流程圖

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 藻類毒性試驗

藻類毒性試驗在過去幾十年來已經發展得相當迅速，至今，此種毒性試驗可以由實驗系統分成批次式及連續式[1]；而目前大多數的毒性試驗，則多使用批次式方法為主（如：U.S.EPA, OECD, ISO, APHA, AST 等）[2]。

此類的批次式藻類毒性試驗常用的反應終點包括了有細胞密度（cell density、biomass、growth rate）、溶氧變化量（ $\Delta DO$ ）、葉綠素量（chl-a）及細胞平均體積（Mean cell volume, MCV）或總體積（Total cell volume, TCV）等等；通常都會依據實驗的需求來選擇最為適合的參數及技術方式。大部分的試驗標準方法，則常以生物量來作為反應終點，但是因程序上的困難，因而又發展出以溶氧變化量作為實驗的終點[3]，由此來定義實驗中所用之藻類的生長情形及毒性效應。

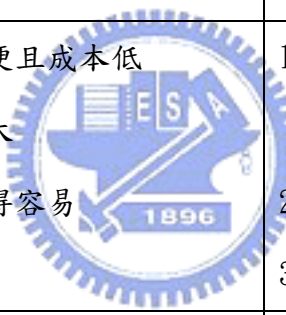
雖然後來所發展出的這些參數更為便利，且具一定可信度，應用於無機性化學物質或重金屬實驗來看，相當的成功；但卻忽略到以往所使用的開放式系統，在研究具揮發性的有機物試驗時，造成揮發上的誤差，而限制了藻類毒性試驗的使用。

Glassi and Vighi 引用 U.S.EPA 所提出的 Algal Assay Procedure Bottle Test (AAPBT)，並另外做了一些修改，實驗中針對五種氯苯類有機物以 *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocelis subcapitata*) 為試驗物種進行試驗，以一 2 升之密閉容器內裝試驗溶液僅 100 ml，利用剩餘的大空間沖入 CO<sub>2</sub> 氣體以提供足夠之碳源，最後將試驗結果與以往文獻記

載的實驗數據作一比較，雖然此系統也屬密閉式系統，相對於僅 100 ml 的試驗溶液，過大的空間（head space）仍使得有機物有揮發、逸散的可能性[4]。

為了改善上述的缺點，本研究室進而採取完全密閉式系統設計，以溶氧變化量及細胞密度作為反應參數；使用簡單的 BOD 瓶，借其水封之特性製造出一個完全密閉空間，不但解決了揮發性有機物揮發的問題，並可顯示極佳敏感度及再現性之優點，且成本較低又快速試驗方式，讓藻類毒性試驗應用變得更為廣泛 [5, 6]。

表 2.1.1 批次式及連續試藻類毒性試驗之優缺點比較

	優點	缺點
批次式	 1. 培養技術簡便且成本低 2. 樣品處理量大 3. 實驗數據取得容易	1. 使用高於自然水體的營養鹽濃度 2. 無法反應自然水體之情況 3. 再現性不佳
連續式	1. 符合自然水體情況 2. 實驗敏感度高 3. 代謝物不累積	1. 設備組裝費時 2. 流量控制不易 3. 數據取得困難

## 2.2 常用之毒性試驗物種

各式各樣的工廠林立，其放流水排放到水體中，對許許多多的水體生物都會造成傷害，單用化學分析的方法並沒有辦法很直接的了解對水中生態的影響程度，且一承受水體中有相當多的物種存在，單只針對一種的生物進行毒性評估並不足以描述毒性化學物質完整的危害性，因此，許多學

者會選用不同的物種進行毒性試驗，藉由大量的物種數據來建立毒物的危害完整的資料。

利用生物測試物質毒性的方法有很多，在文獻上廣為使用的種類如下：

### (一)魚類

魚類是最常用來做為水域環境急毒性測試的物種，包括guppy (*Poecilia reticulata*)、rainbow trout[7]和fathead minnow (*Pimephales promelas*)[8]，其中以fathead minnow流經急毒性的測試 (flow-through *Pimephales* acute toxicity)-96h LC<sub>50</sub>使用最廣泛，為美國環保署所使用的標準方法之一。

### (二)Microtox (海洋發光菌)

Microtox 是 1980 年由 Beckman 公司發展的測試方法，其利用 *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*)會行生物發光的特性，當此細菌受到毒物抑制時，其發光能力會減弱，利用在特定時間內發光程度減為一半時的抑制濃度作為判斷化合物毒性的指標[9]，此種方法廣泛的用在沉積物毒性的分析上[10]。

### (三)纖毛蟲 (Ciliate)

纖毛蟲 (*Tetrahymena pyriformis*)是一種單細胞原生動物，常應用於水域毒性的測試，以IGC<sub>50</sub> (50% Inhibitory Growth Concentration)來代表毒性效應。Mekapati and Hansch曾利用纖毛蟲在三至四小時之內，即完成了毒性試驗[11]。Schultz等其他的工作群曾建立以纖毛蟲為測試物的資料庫，稱之為「TETRATOX」。



#### (四)水蚤 (Water flea)

水蚤 (*Daphnia magna*)常被利用為靜水式生物毒性試驗方法的物種之一，以四十八小時之半致死濃度 ( $LC_{50}$ )，檢測水樣之急毒性。Ramos et al., 發現，當水蚤與其他測試物種，包含藻類、二棲類、環節動物、軟體動物等比較之後，水蚤對苯胺類的敏感性，均高於其他測試物種[12]。Kaiser et al的實驗結果亦認為水蚤為敏感性很高的物種[13]。

#### (五)植物與藻類

植物較適用於土壤及空氣中毒性的偵測，由於其生長速度及物種分佈的侷限，觀測時間較長，大多應用於長期毒性的偵測；而藻類對於水中毒物則相當敏感，常用來當做急毒性偵測的生物指標。方法為利用偵測葉綠素螢光的方式得知 $EC_{50}$ ，藉以評估水中的毒性概況[14]。Yen et al.以 *chlorella* (*chlorella vulgaris*)、*daphnia* (*Daphnia pulex*)、*carp* (*Ciprinus pulex*) 和 *tilapia* (*Tilapia zilli*)對多種有機物進行毒性試驗，發現綠藻 *chlorella* 對於氯酚類、鹵烷類和 Quinone 類的有機物，其敏感性皆高於其他三種生物。[15] 而本研究選用藻類作為毒性試驗物種主要的原因有幾點：

1. 藻類為生態系統中最低階的生產者，在食物鏈的過程中會由於生物濃縮作用 (Bioconcentration)，將毒性累積在較高等的消費者體內。
2. 藻類的生長周期較短，可縮短毒性試驗之時間。
3. 單細胞藻類結構較為簡單，物種間之基因多樣性小，因此不容易有物種間之巨大差異。

## 2.3 有機化學毒物



### 2.3.1 有機化學毒物---丙烯腈化合物介紹及來源

丙烯腈 (Acrylonitrile, 簡稱 AN) 在台灣為列管之毒性化學物質, 許多文獻皆指出其對人類或水體生物都有危害的能力[16], 因此如美國、荷蘭、中國及德國等, 都將丙烯腈列為一級之污染物[17]。

水體中丙烯腈主要來源為工廠排放, 尤其以石化工業為大宗[18], 其他化學製程工廠也會在合成丙烯腈聚合物的過程中產生排放, 因此在工業發達的國家, 丙烯腈的毒害是應該要被重視的。其化學結構式如下:



圖 2.3.1 丙烯腈之化學結構式

許多學者對於丙烯腈的危害都做了毒性評估的研究, Zhang Tong 這位學者曾針對丙烯腈做許多水體生物的毒性試驗研究, Zhang 利用了甲殼類 (*Daphnia magna*) 對丙烯腈探討了 21 天及 14 天的試驗時間對實驗結果之影響[18], 結果發現若將標準方法所提的 21 天試驗時間改為 14 天, 其慢毒性之數據並不會有太大的影響。

Zhang 亦曾對魚類幼年期做 Early life stage 之毒性試驗, 其所採用的方法為靜水式且為每日更新測試水體, 結果對魚類 (*C. Carpio*) 其 NOEC 值與 LOEC 值分別為 1.6mg/l 和 3.2mg/l[17]。

Zhang 利用了許多中國當地之物種以及浮萍等植物做了一系列物種對丙烯腈的毒性試驗[16], 為丙烯腈建立了許多水體生物的資料, 同時也為中國確立一套丙烯腈排放廢水之管制標準。

台灣亦有學者針對丙烯腈做過毒性研究, Liu 利用甲殼類 (*Daphnia similis*) 及海洋發光菌 (*Microtox*) 對含有丙烯腈的工業廢水做毒性的評

估[19]，發現針對丙烯腈這一類的廢水以 *Daphnia similis* 較為敏感，而 5 分鐘及 15 分鐘的 Microtox 試驗皆顯示較低的毒性，作者評估認為含有丙烯腈的排放廢水具有一定的毒性，必須做適度的監控管制，因此這一類的毒性化學物質是有被重視的必要。下表為學者針對丙烯腈所研究過之毒理數據。

表 2.3.1 丙烯腈之毒理數據整理

測試物種	毒性數據	Ref.
<i>C. idellus</i>	9.216 mg/l	Zhang, 1996[16]
<i>D. magna</i>	8.697 mg/l	Zhang, 1996[18]
<i>B. bufo gargarizans</i>	14.22 mg/l	Zhang, 1996[16]
<i>Chironomus sp.</i>	14.21 mg/l	Zhang, 1996[16]
<i>A. salina</i>	14.34 mg/l	Zhang, 1996[16]
<i>R. plicatula</i>	39.97 mg/l	Zhang, 1996[16]
<i>C. carpio</i>	42.33 mg/l	Zhang, 1999[17]
<i>D. similis</i>	13.4(% effluent)	Liu, 2002[19]

### 2.3.2 丙烯腈化合物的應用

丙烯腈主要用以生產合成纖維（丙烯腈纖維）、合成橡膠 NBR（由丁二烯與丙烯腈共聚而成）、塑膠如 AS（由丙烯腈與苯乙烯共聚而成）、ABS 樹

脂（由丙烯腈、丁二烯及苯乙烯共聚而成）等，亦可用於纖維樹脂加工及塗料工業，尚可作抗氧化劑、醫藥、界面活性劑、染料合成的中間合成原料。此外，丙烯腈可反應生成丙烯鹽胺作為水處理劑，也可生產 Lysine（胺基酸之一），或製成 ADN 作為耐龍 66 之原料，用途相當廣泛，且這類的產品目前並無替代品。





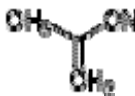
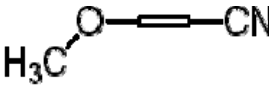
### 2.3.3 丙烯腈化合物之物化特性

丙烯腈係無色、具輕度氣味、蒸氣有毒之流動性液體，具有毒性及易燃之特性，可經由呼吸道、皮膚、眼睛接觸或誤食而進入人體。

丙烯腈及其衍生物都有相當高之溶解性，因此無須溶劑助溶，且依照亨利常數分類，其大部分都屬於揮發或半揮發性之物質，容易從溶液中逸散至大氣。

化學特性部分，丙烯腈會腐蝕鋁銅等金屬，亦會和強酸強鹼起激烈反應，且遇氧或光熱都會起聚合反應，表 2.3.3 為丙烯腈化合物之物理性質：

表 2.3.3 丙烯腈及其衍生物之重要物理特性

毒化物名稱/CAS NO.	分子式	亨利常數	結構式	Vapor Pressure	logP	Water Solubility
acrylonitrile (107-13-1)	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N	0.000138 atm-m <sup>3</sup> /mole		109 mm Hg	0.25	7.45E+004 mg/L
2-Chloroacrylonitrile (920-37-6)	C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> ClN	9.89E-005 atm-m <sup>3</sup> /mole		61.1 mm Hg	0.7	2.11E+004 mg/L
3-(Dimethylamino) acrylonitrile (2407-68-3)	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	1.43E-007 atm-m <sup>3</sup> /mole		1.5 mm Hg	-0.66	2.63E+005 mg/L
3-Ethoxyacrylonitrile (61310-53-0)	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO	1.7E-005 atm-m <sup>3</sup> /mole		1.4 mm Hg	-0.14	8.59E+004 mg/L
Methacrylonitrile (126-98-7)	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N	0.000247 atm-m <sup>3</sup> /mole		71.2 mm Hg	0.68	2.54E+004 mg/L
3-Methoxyacrylonitrile (60838-50-8)	---	---		---	---	---

### 2.3.4 丙烯腈化合物之毒理特性及對生物體之危害

丙烯腈進到人體後會產生 CN，而破壞血紅素帶氧的功能，許多國家也已針對丙烯腈定立出法定的暴露極限[20]，如下所示：

表 2.3.4 各國法定之丙烯腈暴露極限[2]

Exposure limits	
Germany(TRK-8hr)	3ppm(7mg/m <sup>3</sup> )
Austria	2ppm(4.5mg/m <sup>3</sup> )
France(VME-8hr)	2ppm(4.5mg/m <sup>3</sup> )
France(VLE-15min)	5ppm(11.25mg/m <sup>3</sup> )
Netherlands	DSM use 4ppm as MAC
Spain	2ppm(4.5mg/m <sup>3</sup> )
UK(MEL)	2ppm(4.5mg/m <sup>3</sup> )
USA(OSHA)	2ppm(4.5mg/m <sup>3</sup> )

上述之數據資料多為以動物性的毒性試驗數據為基礎所建立出來的準則，但是對於水體生物的數據相當的缺乏，因此利用水體生物作為測試物種的毒性試驗是必須被進行的。

腈類在毒性化學物質的作用機制上主要被分類在非極性麻醉[21]，只有很少數的腈類是屬於反應性的物質，而丙烯腈則為其中一種，丙烯腈的作用方式主要是針對 GSH-P00L 這一類酵素，此酵素會和有害於細胞的自由基(radical)結合，以維持細胞正常的氧化還原態[22]，而丙烯腈則會和 GSH 產生化學共價反應(即 michael addition)，使其失去活性，及降解掉該酵素，其反應之數學式如下：

$$DR_{GSH} = K_{GSH} \times LC_{50}$$

其中 $DR_{GSH}$ 為GSH的降解率，而GSH降解的反應為二級反應， $K_{GSH}$ 是其反應速率常數，此處之 $LC_{50}$ 為魚類急毒性數據。

## 2.4 混合毒性試驗介紹

在生態系統中的污染，不論是陸生或者是水生生態系中，目前所受到的污染衝擊已經不再侷限在於單一的毒性物質的污染上，取而代之的則是複合的污染[23]，若只單針對一種毒性化學物質進行研究已無法滿足實際環境評估的需求，因此混合毒性試驗也被發展出來。

毒物在有機體內所產生的毒性作用與一種毒物所產生的毒性作用，並不完全相同；所以我們必須討論這些化學物質混合的作用情形。通常混合狀的化學物質對有機體產生的聯合作用可分成下幾種類型：

### (一)、 相加作用

相加作用 (additive effect) 指多種化學物的聯合作用等於每一種化學物單獨作用的總和。化學結構較為相近或同系物、或毒性作用目標器官相同、作用機理相類似的作用；具有麻醉作用的毒物，在麻醉作用方面也多表現為相加作用。

### (二)、 協同作用與增強作用

協同作用 (synergistic effect) 指幾種化學物的聯合作用大於各種化學物的單獨作用之和。若是一種物質本身存有毒性，但與另一有毒物質同時存在時可使該毒物的毒性增加時，我們稱這種作用為增強作用



(potentiation)。

### (三)、拮抗作用

拮抗作用 (antagonistic effect) 指的是幾種化學物質的聯合作用小於化學物單獨作用的總合。凡是能使另一種化學物質的生物學作用減弱的物質稱為拮抗物 (antagonist)。在毒理學及藥理學中，常以一種物質抑制另一種物質的毒性或生物學效應，這種作用也可稱為抑制作用。

混合毒性的研究已經進行了有數十年之久，早期的研究工作是 Southgate[24] 對魚類進行試驗，發現鱒魚對氰酸鉀和對甲酚的毒性反應完全不同，可是對二甲酚及對甲酚之毒性卻有部分相似。而混合毒性理論的發展較早是由 Bliss[25] 所提出，他利用單一毒性物質之常態分布函數所作成的劑量-反應曲線之平行與否，來作為判斷混合毒性效應為 similar joint action 或 independent joint action，以找出生物體對毒性的容忍相關係數，並且又將生物體對於毒性的容忍度分布相關係數定義在零與一之間，可以此作為判斷混合的毒性準則，不過由於頗不準確，近二十年來已無人採用。

而近一步的發展則是 Plackett and Hewlett[26] 提出非交互作用形式的混合毒性理論，其為擴充毒性相關容忍度的範圍至負相關，假設受體反應與劑量間的關係呈一常態分布的情況下，討論毒性作用的相似性 (similarity) 及獨立性 (independence) 和毒性加強的關係，提出相關係數作為判斷混合毒性物質的毒性作用彼此相似程度的指標。直到 Christensen and Chen[27] 擴充 Plackett and Hewlett 的模式，將混合毒性的理論推展至處理多維的多混合毒性效應，而不再侷限於常態分布，其基本假設為受體對於混合毒性容忍度的分布是多維的，以描述及定義兩



種以上的混合毒性作用。且經由分布的 mapping，可以涵蓋任何類型毒性物質所擁有的容忍度分布模式，如 Probit、Weibull 及 Logit 模式。

## 2.4.1 腈類及醛類化合物之混合毒性

腈類的混合毒性試驗也廣為學者研究，Chen 於 1996 年及 2005 年時針對反應性的毒性化學物質進行混合毒性試驗，發現大部分醛類和腈類兩種毒性化學物質混合時都有協同效應(Synergistic)的產生[28]，而 Chen 在 1996 年時討論不同大小之劑量-應曲線的斜率，對混合毒性的影響[29]，發現劑量-反應曲線中大斜率的毒物混合後有傾向拮抗效應(Antagonistic)的現象。

Lu & Chen 亦在 2002 年探討不同劑量反應曲線斜率對 *Microtox* 及 *E coli*. 兩種物種的效應，發現斜率小者之毒性物質相混合在 *Microtox* 呈現協同現象，轉而到 *E coli*. 卻變為拮抗作用，說明不同試驗物種對不同的毒性化學物質會有不同的混合效應結果[30]。而本研究亦會針對斜率及丙烯腈和醛類的混合現象作一探討。

Chen 於研究中表示，腈類化合物與醛類相混合時，其混合效應會較模式預測值更為強烈，可能是因為交互作用產生更毒的第三種物質[28]，學者 Shinkai[31]提出此腈類化合物與醛類同時存在時，利用之酵素 FMN 作為催化，會產生新的物種，而 Lin 則進一步修正其實驗[33]，將乙腈和醛類相混合，改用加入 Mice cell 作為催化，經過 HPLC 分析發現，也產生了第三種苯甲酸物質，因此，本研究選用同樣含有 CN 官能基的丙烯腈物質，觀察其與醛類混合後之效應是否與文獻相符。

## 第三章 基本理論

### 3.1 毒性物質劑量-反應模式

當毒性物質對受體生物發生作用時，受體生物所受影響或死亡的百分率會因毒性物質劑量而有所影響。通常毒性物質劑量對於受體生物反應劑量會呈現成 S 曲線關係，稱之為劑量-反應曲線圖。

由於由 S 型曲線求取  $EC_{50}$ （半致死濃度）並不容易。所以有一些模式則是將 S 型曲線轉換成直線形式以利求取。其中最常見的毒性物質劑量-反應模式有 Probit、Weibull 及 Logit 三種，Christensen 曾經對這三種模式做比較；發現這三種模式是依據不同的假設發展而成；Weibull 模式是假設毒性物質與受體生物間產生化學鍵結，至於 Logit 模式則為假設毒性反應形式如同某種酵素反應。

Probit 模式，則為最常用的劑量-反應模式，主要是由實驗所得，假設生物對毒性物質的容忍度分布為常態分布 (Log-normal distribution)，其主要以毒性物質濃度之  $\log$  值與反應率之 NED (Normal equivalent deviation) 具有線性關係為基礎，其中反應率即測試生物對毒性物質之反應比率 (如死亡率等)。此模式將劑量-反應模式之 S 型曲線，轉換成 NED 尺度上的一直線，原來之劑量-反應曲線 50% 反應率之處對應到 NED scale 上為零。84.1% 反應率之處對應為 1，而 NED scale 之座標值加 5 即為 Probit 的座標，Probit 單位與反應率與毒性物質劑量間之轉換關係如下：

$$Y = NED + 5 \quad (1)$$

$$Y = a + b \log (Z) \quad (2)$$

$$P = 0.5 \left[ 1 + \operatorname{erf} \frac{(Y-5)}{\sqrt{2}} \right] \quad (3)$$

其中，Y 為 Probit 的概率單位；a, b 為反應曲線之截距與斜率；Z 為毒性物質所加之劑量；P 為生物體之抑制反應率，在本研究中以抑制 50% 為主；erf 為數學上之 Error Function。

## 3.2 混合毒性理論

### 3.2.1 非交互作用混合毒性理論

非交互作用混合毒性模式最早由 Hewlett & Plackett[26]所提出，為一個二維的模式，其限制條件為毒性物質之混合，假設生物之反應為非死即生 (quantal)，且毒性物質間不能有交互作用產生，意即另一毒性物質加入並不影響原毒性物質與受體之結合能力。而 Christensen & Chen[27]則發展出可選用 Probit、Logit、Weibull 三種劑量-反應模式來分析並可考慮多種毒性、營養物質交互作用之數學模式及應用程式，認為多種毒性物質的機率分布也可能為任何單一毒性試驗所應用的其他模式，且對多種混和毒性效應，可以用一樣的方法加以分析。

當生物反應與毒性物質劑量，呈一常態分佈，其毒性試驗之不反應率 (non-response- fraction，及物種之存活率) 為：

$$Q = \Pr \left( \delta_1 \frac{1}{\lambda_{12}} + \delta_2 \frac{1}{\lambda_{12}} \leq 1 \right) \quad (4)$$

$$\delta_i = \frac{Z_i}{Z_i} \quad (5)$$

Q：毒性試驗中，生物不反應部份分率(non-response fraction)，由

機率分布函數內的積分區間決定其大小；

Pr：機率分布函數(可能是常態分布函數，或其他分布函數)，函數值

由刮號內積分區間定義式  $\delta_1^{1/\lambda} + \delta_2^{1/\lambda} \leq 1$  決定；生物體對兩毒性物質的容忍度分布，這兩組不同的容忍度分布，有一個相關係數  $\rho$  存在；

$Z_i$ ：毒性物質 I 的濃度；

$\bar{Z}_i$ ：單一生物體對毒性物質 I 的毒性容忍濃度；

$\lambda$ ：相似係數(similarity)，在混合毒性理論中，假設為兩者毒性作用系統相似程度的度量指標，且  $0 < \lambda < 1$ 。相似係數  $\lambda$  越接近 1，表示毒性物質的作用位置越相近。

### 3.2.2 交互作用混合毒性理論



Hewlett 於 1969 年提出交互作用混合毒性模式欲以描述混和毒性效應的。交互作用與非交互作用混合毒性模式唯一的不同之處在於相似係數  $\lambda$  的範圍。在某些情形下，不同毒性物質間的交互作用造成毒性增加，於是將非交互作用模式之  $\lambda$  的限制消去， $\lambda$  可為 0 到無限大， $\lambda$  等於一為毒性相加作用， $\lambda$  值越大則會使得毒性作用增強，值的大小即為這些混合毒性效應強弱的度量。交互作用混合毒性模式積分區間定義式為：

$$\delta_1^{1/\lambda} + \delta_2^{1/\lambda} \leq 1 \quad , \quad \lambda > 1$$

### 3.2.3 混合毒性效應與 $\rho$ 、 $\lambda$ 的關係

$\rho$ 、 $\lambda$  兩參數為混合毒性效應的指標，將相似係數  $\lambda$  與相關係數  $\rho$  相對配對下，混合效應模式的 action mode 主要有四種，Response Multiplication (RM)、No Addition (NA)、Concentration Addition (CA)、Response Addition (RA)，這四種不同的組合。四種不同混合效應模式的 action mode 整理如表 3.2.1 所示，包含各種各種 action mode 的 response；兩毒性物質彼此間與相關係數的表現上， $\rho = 1$  表示兩毒性物質容忍分布為正相關， $\rho = -1$  表示兩毒性物質之容忍分布為負相關， $\rho = 0$  表示兩毒性物質之容忍分布為不相關。

經由理論的數學推導，可得當相關係數  $\rho = -1$ （負相關）時，且其劑量-反應曲線之斜率同樣很小，會有毒性加強之協同效應產生。在模式分析上，其 action mode 為 Response addition.

表 3.2.1 Definitions of basic modes of action

Parameter values		Type of action	Abbreviation	Response
$\rho$	$\lambda$			
0	0	Response multiplication	RM	$1-(1-P_1)(1-P_2)$
1	0	No addition	NA	$\max (P_1, P_2)$
1	1	Concentration addition	CA	-
-1	0	Response addition	RA	$\min (1, P_1+P_2)$

### 3.2.4 毒性單位

研究常用的混合毒性效應指標有有混合毒性單位 (toxic unit, TU)、加性指標 (additive index, AI)、混合毒性指標 (mixture toxicity index, MTI)。而本研究僅選用混合毒性單位，其說明如下：

$$M (\text{additive index}) = \sum_{i=1}^n \frac{Z_i}{\overline{Z_i}} \quad (6)$$

$\overline{Z_i}$  = 毒性物質於毒性試驗中之 EC50 值。

$Z_i$  = 混合毒性試驗中化學物質的濃度。

N = 混合的毒性化學物質數目。

當混合毒性單位  $M > 1$ ，代表混合毒性效應為毒性減弱 (antagonistic)

若混合毒性單位  $M = 1$ ，代表混合毒性效應為毒性相加 (additive)

而混合毒性單位  $M < 1$ ，代表混合毒性效應為毒性加強 (synergistic)

### 3.2.5 Isobologram

將混合毒性試驗中之兩種毒性物質取不同毒性單位比例加以混合，在一個固定的抑制率或死亡率下（如 EC50 或 LC50），按不同的混合比例畫出一個等抑制率或死亡率曲線，此一圖形稱為 Isobologram。

Isobologram（如圖 3.2.5 所示）的兩軸為分別代表二種混合之毒性物質各別的毒性單位，若畫出之曲線為通過 (1, 0) 及 (0, 1) 的直線，及無論任何毒性單位比例相混合其毒性單位均為 1，則判定混合毒性效應為毒性相加；若為凹向原點之曲線，則判定為毒性加強；若曲線偏離原點，則為毒性減弱。通常兩毒性

物質以毒性單位 3:1、1:1、和 1:3 互相混合，將實驗結果繪製成 Isobologram。

Isobologram 另一個主要功用，即可用來判斷混合毒性效應是否為 complex joint action。而 complex joint action 的主要特性如下：(1)在任何毒性單位比例下，均呈現混合毒性減弱現象。(2)不同毒性單位比例，有毒性效應減弱現象發生。(3)對於劑量-反應曲線斜率較大之毒性物質，其在毒性單位較小時，對另一種毒性物質有解毒作用。

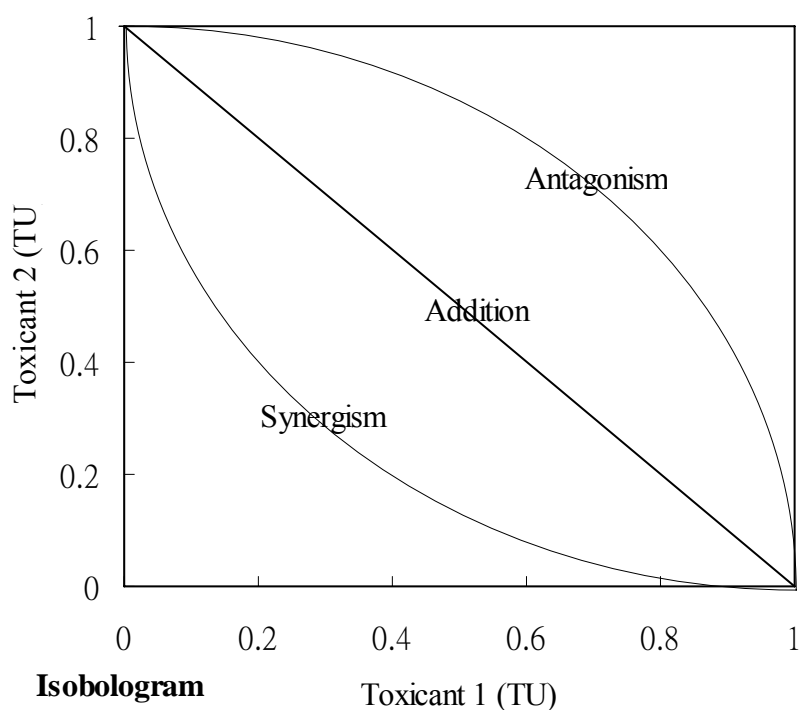


圖 3.2.5. Isobologram 示意圖



## 第四章 實驗流程及設備

### 4.1 實驗設備

#### 1. 恆溫無塵室

恆溫無塵室大小約為五坪，其溫度控制在  $24 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

#### 2. 水質

所有實驗及培養用水皆經過過濾、離子交換、RO 逆滲透及蒸餾，最後經由 millipore 超過濾處理之去離子水，實驗前必須將去離子水以  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  之濾紙過濾，其水質之比電阻  $\geq 18.2\text{ Megaohm}$ 。

#### 3. 連續式培養母槽

連續式培養之母槽使用體積 5 公升，直徑為 18 cm 之玻璃容器。

#### 4. 電子顆粒計數器

使用 Coulter Electronics 公司之 Coulter Counter，型號為 MULTISIZER II，並以  $5.06\text{ }\mu\text{m}$  標準顆粒乳液來校正。

#### 5. 溶氧測定儀

使用美國 YSI 公司出產之數字型溶氧測定器，型號 Model 59，BOD 探頭型號為 YSI5730。

### 4.2 實驗藥品

使用 Merck 及 ACROS 公司生產的化學品，樣品純度均大於 95%。

### 4.3 試驗藻種

本研究中，採用植物性浮游生物，月芽藻 (*Raphidocelis subcapitata*)。*Raphidocelis subcapitata* 屬於綠藻綱 (Chlorophyceae) 其特徵為單細胞、成群體但不糾結、不能移動，培養達穩定時藻類平均細胞體積在  $40\text{-}60\ \mu\text{m}^3$  之間，其體型呈半月型。此藻種之使用極為廣泛，例如 U.S. EPA、ISO、OECD 及 APHA 等單位之藻類毒性試驗法，皆使用此藻種為標準試驗物種之一。實驗藻種購自於 University of Texas，Austin。



### 4.4 培養基質配製

本研究使用之培養基質為參考 U.S. EPA 使用之營養基質組成，配製方法如下：

將下列 (1) ~ (7) 的貯備液 (Stock Solution) 各加 1 ml 至含 900 ml 去離子水中，再稀釋至 1 公升。接著以 0.1 N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養基質之 pH 值調至  $7.50 \pm 0.10$ 。儲備液的配法如下：

- (1) 硝酸鈉貯備液：溶解 12.750 g  $\text{NaNO}_3$  於 500 ml 去離子水。
- (2) 氯化鎂貯備液：溶解 6.082 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  於 500 ml 去離子水。
- (3) 氯化鈣貯備液：溶解 2.205 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  於 500 ml 去離子水。
- (4) 微營養鹽貯備液：溶解下列所有藥品於 500 ml 去離子水中。

表 4.4.1 微量營養基質之成分

92.760 mg $\text{H}_3\text{BO}_3$	0.714 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
207.690 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.630 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
1.635 mg $\text{ZnCl}_2$	0.006 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
79.880 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	150 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

表 4.4.2 巨量營養基質成分

化合物	濃度 (mg/l)	元素	各元素實際濃度 (mg/l)
$\text{NaNO}_3$	25.5	N	4.2
$\text{NaHCO}_3$	15.0	C	2.14
		Na	11.0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.04	P	0.186
		K	0.649
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14.7	S	1.91
$\text{MgCl}_2$	5.7	Mg	2.9
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.41	Ca	1.20

(5)硫酸鎂貯備液：溶解 7.350 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  於 500 ml 去離子水中。

(6)磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  於 500 ml 去離子水中。

(7)碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g  $\text{NaHCO}_3$  於 500 ml 去離子水中。

其中微營養鹽貯備液中，EDTA 分別有 100%、10% 及 0% 三種。100% 是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時使用 10%，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。最後配成之營養基質，其所巨量及含微量營養素濃度列於表 4.3.1 和表 4.3.2。營養基質的滅菌是以 0.45  $\mu\text{m}$  的濾膜過濾，過濾滅菌後的營養基質須保存在 4  $^{\circ}\text{C}$  且置於陰暗無光線照射處，以免產生光化學反應。

## 4.5 電子顆粒計數器之操作原理

電子顆粒計數器量測設備為玻璃管及攪拌器，操作時玻璃管需浸入含有 ISOTON II 稀釋樣品的燒杯中，水樣在計數的過程攪拌以使顆粒均勻分佈。其特殊原理為玻璃管近底端的側面鑲有紅寶石的精準小圓孔，玻璃管利用虹吸原理從小圓孔吸入水樣，而玻璃管內外各有一電極片通以直流電，當水樣中所含之顆粒被帶經圓孔時，會暫時性地干擾到電流，形成某特定的電阻。而電阻量化後其高度正比於顆粒的大小，脈衝數為顆粒的數目，如此即可得到水中顆粒粒徑分佈及數量。最終資料可輸送到電腦，以軟體程式（Multisizer Accucomp V. 2.01）進行分析。電子顆粒計數器主要條件設定如下表 4.3.1，本實驗採用 100  $\mu\text{m}$  孔徑之毛細玻璃管。

進行藻類計數時，僅需取 1 ml 的藻液置入 50 ml 之量瓶內，再加入 ISOTON II 至 50 ml，然後倒入燒杯中，置入顆粒計數器內計數。顯示之數值需扣除 ISOTON II 之背景值後再乘以 100 倍才是真正的水中藻類細胞數目。

表 4.5.1 電子計數器設定之條件

項 目	數 值
滿刻度電流量 (Full scale)	10 mA
極性 (Polarity)	+
電流 (Currents I)	100
粒度下限 (Diameter Lower Threshold , Tl)	2.177 $\mu\text{m}$
粒度上限 (Diameter Lower Threshold , Tu)	6.975 $\mu\text{m}$
脈衝衰減倍率 (Attenuation , A)	1
脈衝放大倍率 (Preset Gain)	1
警戒粒徑限度 (Alarm Threshold)	OFF
分析量	500 $\mu\text{L}$

#### 4.6 溶氧測定儀之校正

一般溶氧測定儀可使用飽和空氣於水中校正與空氣校正兩種，但前者須將水曝氣至 100%，操作上相當困難，因此在此採用空氣校正法。空氣校正之方法是將電極置於盛有 2.5 公分左右水量之 BOD 瓶上，將此可視為 100% 之溼度，轉鈕至校正鍵 (calibrate)，輸入校正值 (100%)，確認後轉回測定鍵，連續重覆校正三次。每個月定期更換 CLARK-TYPE 薄膜與 3 M 氯化鉀電解質。必要時，需以 30% 之亞硫酸鈉將 PROBE 表面清洗乾淨，使其不殘留任何化學物質，而得 0% 之 DO 溶液，進行零點校正。

## 4.7 實驗條件之控制

- 1.溫度：藻類之培養及毒性試驗皆在  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  下進行。
- 2.光度：藻類之培養及毒性試驗皆在光度為  $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  下進行，所使用之光源為連續白冷光。
- 3.氮、磷濃度：培養藻類時使用 USEPA 規定濃度的一半濃度進行培養，毒性試驗時則不變。
4. $\text{HCO}_3$ 濃度：原濃度不變。
- 5.pH：基質的初始 pH 值需控制在  $7.5 \pm 0.1$  下實驗。
- 6.EDTA 含量：在批次培養活化藻類時使用 USEPA 規定的 EDTA 濃度(100 % )，而在連續式母槽中培養藻類時使用 USEPA 規定 EDTA 濃度的 10 % ，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。
- 7.試驗時間：48 小時。
- 8.藻類初始植種密度： $1.5 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ 。



## 4.8 儲備溶液

進行實驗所使用的濃度皆由事先配好的儲備溶液中取出，將需要的藥品量加到裝有去離子水的 BOD 瓶中，亦利用 BOD 瓶水封之特性，避免化學藥物有揮發之虞，最後利用磁攪拌器幫助溶解，若試驗藥品溶解度不高時，則可適度的加入溶劑助溶，例如：DMSO。

## 4.9 總有機碳分析儀 (Total Organic Carbon)

總有機碳定義為 TOC，而 TIC 為總無機碳，TC 則為總碳，而 TOC 簡單的定義為  $\text{TOC} = \text{TC} - \text{TIC}$ ；所利用的分析方法有兩種：第一種為直接分

析模式 (NPOC Method):  $\text{NPOC} = \text{TOC}$ , 此方法的優點是分析快速, 適合高濃度的樣品分析, 但是缺點則為不適合高揮發性物質, 因此並不適合本研究, 而本研究所使用的是相減法 (Differential Method):  $\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$ , 此方法較適合揮發性有機物的偵測, 為了將化合物於燃燒管中完全氧化, 因此溫度設定於 800 至 1000°C, 在建立背景校正曲線即分析樣品時採用柱入不同濃度相同體積, 用此方法亦可發現其誤差值在較小的範圍。

## 4.10 高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography)

HPLC 是利用樣品與動相、靜相介面間大小不同之作用力所造成之速度差導致於樣品中物質之分離。不同的分析物質及 Column 種類會不同的移動相, 有的物質較易和動相介面結合, 其通過 Column 時速度較其他物質快, 因此由於此時間差, 使其較先被偵測器偵測到, 隨後其他的物質再一一被偵測到; 反之較容易和靜相介面結合的物質, 則較慢出現在偵測器上。當偵測器偵測到物質時, 觀測螢幕上會出現一個脈衝 (Peak Shape), 依造脈衝出現的時間點和標準品比較則可以得知此物質之種類, 並可以計算脈衝面積之大小以得之其濃度等數據, 本研究利用其三維分析功能分析時間, 吸收值及吸收波長之關係。

本研究管柱採用 C18 - 4.6 × 150 mm (Type :T91971L), 移動相為乙腈與水, 比例為 55:45, 流速為 1 ml/min。

## 4.11 實驗步驟

### 4.11.1 連續式母槽之培養



首先，將移植的藻類由 4°C 的冰箱中取出，以藻液體積比上培養基質（含 10% EDTA）體積比為 1:5 的比例將藻液培養三天，藉以活化藻細胞，使其能夠達到指數生長期。將 4 公升之連續式培養母槽及裝營養基質之廣口瓶、無菌膠管等經過清洗、殺菌之後，置於 24 ±1°C 之溫度控制室中，並將連續式培養母槽放置在磁石攪拌器上連續攪拌，攪拌具有混合和避免藻類沈澱之功能，能使藻液和加入之營養鹽以及曝氣之氣體均勻的混合。連續式培養母槽所需之燈光由一方照射，使用白冷光燈，其光照強度為 64.5 ±10%  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。本實驗中，連續式培養母槽之曝氣設備所提供之曝氣量為 250ml/min，且空氣進入母槽之前先經洗滌瓶和空氣濾膜，以去除空氣中之雜質，並藉此濕潤空氣。整個裝置架設好後，即可植入藻液。植入藻液時，以藻液、營養基質體積比為 1:10 之比例，將藻液植入連續式培養母槽之中。當連續式培養母槽中藻細胞數量達到約為最大可能藻細胞數量之 80—90% 時（約為  $1.9-2.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ ），則開始以蠕動幫浦輸入營養基質，此處使用之營養基質參考 U. S. EPA 標準方法中之營養基質，但將其中之 EDTA 濃度降為原本之 10%。因為連續式培養母槽有一固定之體積，所以可以藉由流入之營養基質體積直接來計算、控制所需之稀釋率，也就是藉此來控制連續式培養母槽中藻細胞之生長率。本實驗中所稀釋之比率為  $0.25 \text{ day}^{-1}$ 。每日量測連續式培養母槽中藻細胞之細胞濃度（Cell Density）、平均細胞體積（Mean Cell Volume）、pH 值、溢流率等數值，以判定連續式培養母槽是否已經達到穩定狀態（Steady State Condition）。本實驗以連續三天之上述參數值皆在一定控制範圍之內，即認為系統達到穩定狀態。

#### 4.11.2 批次式藻類毒性試驗

當確定連續式培養母槽穩定之後，即可以開始藻類毒性試驗。毒性試驗之營養基質為參考 U. S. EPA 標準方法，而後修改濃度配製。將自行設計

之純水曝氣設備裝滿純水並用含 0.5% 二氧化碳 ( $\text{CO}_2$ ) 之氮氣 ( $\text{N}_2$ ) 進行曝氣。曝氣前之純水先以 0.1N 之氫氧化鈉 ( $\text{NaOH}$ ) 調整至 pH 值為  $7.5 \pm 0.1$ 。曝氣步驟可以降低營養基質中之溶氧值並增加其  $\text{CO}_2$  濃度。曝氣時之氣體流量約為 600ml/min，經過 5 至 6 分鐘的曝氣後，溶氧值可接近 1.0 mg/l。迅速將純水筒之蓋子蓋上。由穩定狀態之連續式培養母槽中取出適量之藻液，分別加入 BOD 瓶中使試驗時藻類之初始細胞密度為  $1.5 \times 10^4$  cells/ml。之後再迅速加入曝氣好之純水，然後逐瓶加入所需之營養基質和不同體積的毒性物質以達到所需的濃度。每次實驗一組七瓶，重複三組。每組之第一瓶為控制組，即不加入任何毒性物質，藉此了解在移植之過程中是否有其他因素影響到藻類之正常生長。當藻液、營養基質及毒性物質皆分別加入 BOD 瓶中後，測量各瓶之溶氧值，視為初始溶氧值 (Initial DO,  $\text{DO}_i$ )，並由各瓶中取出少量之溶液 (約 1ml)，以計數初始藻液細胞密度是否為  $1.5 \times 10^4$  cells/ml。然後將 BOD 瓶置於培養箱內迴轉式震盪混合器上震盪。實驗條件控制在溫度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，光照來自於上方平行照射，強度為  $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  之白冷光燈，震盪頻率為 100rpm。從植入藻種開始，每 8-12 小時須注意 BOD 瓶上水封是否因蒸發或其他因素而減少，適當的加上去離子水，使水封確實。於 48 個小時後量測各個 BOD 瓶中之溶氧值，視為最終溶氧值 (Final DO,  $\text{DO}_f$ )。由最終溶氧值減掉初始溶氧值可得到一溶氧差，為淨溶氧值 ( $\Delta\text{DO}$ )。即  $\text{DO}_f - \text{DO}_i = \Delta\text{DO}$ 。由此淨溶氧值及毒性物質濃度即可由模式分析求得此毒性物質於試驗終點為溶氧值時之  $\text{EC}_{50}$  值。在量測完溶氧值後，緊接著量測每個 BOD 瓶的 pH 值以了解 pH 的變化。緊接著用顆粒計數器量測每個 BOD 瓶的藻類細胞密度，由此計算藻類之生長率，並藉由模式分析求得以藻類細胞密度為試驗終點時之  $\text{EC}_{50}$  值。圖 4.8 則是整個實驗的流程圖。

#### 4.11.3 混合毒性試驗

本研究選用甲醛、戊二醛以及三氫基苯甲醛，根據斜率的不同與丙烯腈及其衍生物進行混合毒性試驗，將戊二醛與同樣為小斜率的丙烯腈類化合物進行混合，而將大斜率的三氫基苯甲醛與大斜率的丙烯腈化合物相混合，觀察其效應。而甲醛為醛類常見之化合物，本研究亦將其與小斜率之丙烯腈化合物進行混合毒性試驗。

混合毒性試驗利用毒性單位取代濃度，兩種化合物以毒性單位比 1:1 (Equitoxic) 的比例進行混合，實驗步驟同單一藻類毒性試驗，實驗結束後利用 Probit 模式分析其 50% 抑制之毒性單位，同時利用 MTOX 程式預測其混合之毒性單位值，藉以比較實際值與觀測值間的差異。

本研究亦於 Isobologram 分析中，增加毒性單位比例 1:3 及 3:1 之混合毒性試驗，分析更完整之混合效應。



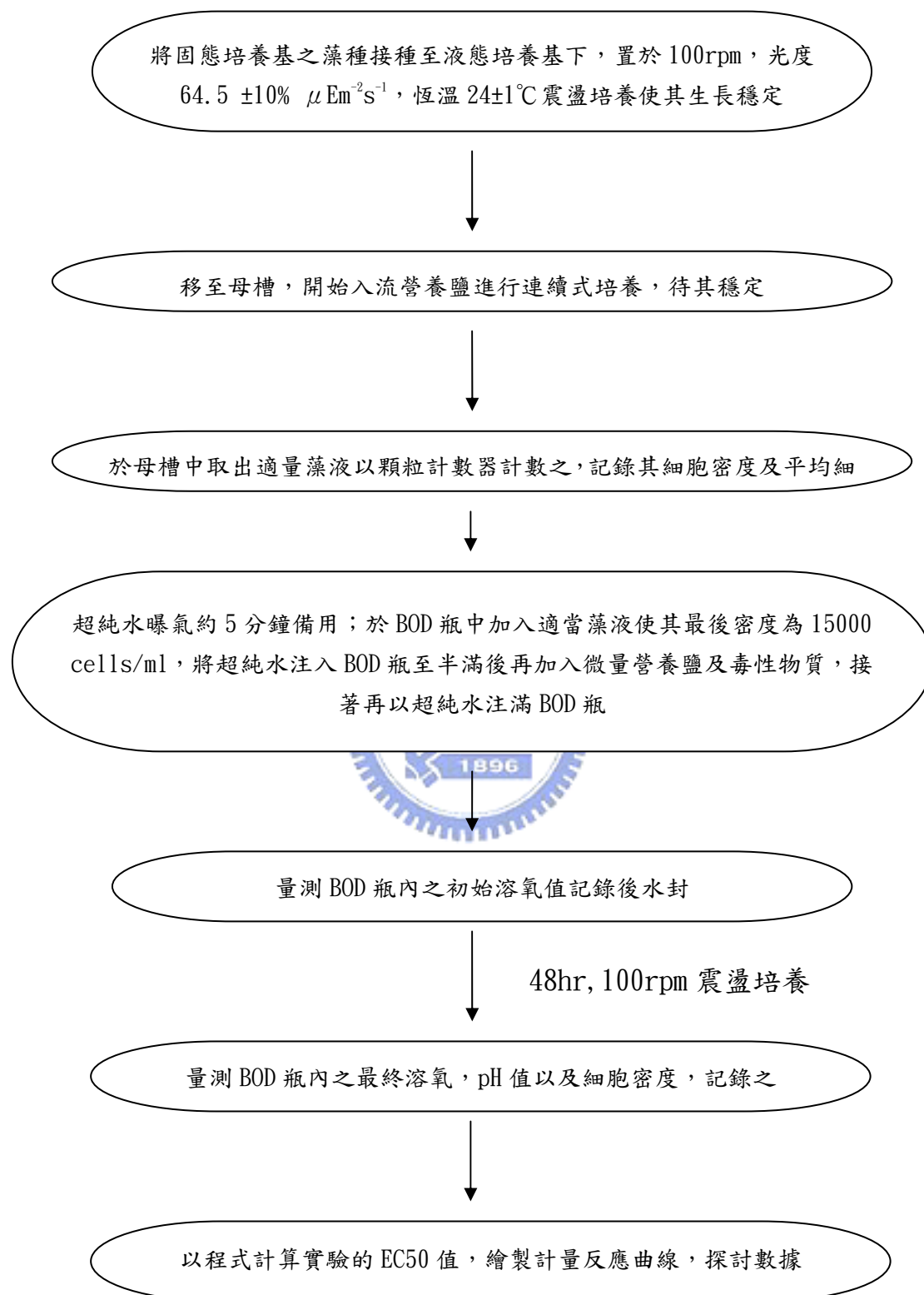


圖 4.11 藻類毒性試驗流程圖

## 第五章 結果與討論

### 5.1 丙烯腈類毒性物質單一毒性試驗數據

表 5.1.2 為丙烯腈類化合物之單一毒性試驗結果，本實驗以溶氧、生物質量以及生長率作為試驗終點，由結果可知，除了 3-ethoxyacrylonitrile 外，生物質量 (Biomass) 為最敏感的實驗終點，而以生長率 (Growth rate) 為最不敏感。

根據歐盟訂立水體危害標準，當其及毒性數據  $< 0.1$  或  $0.1 \sim 1 \text{ mg/L}$  皆歸類為 Acute Toxicity I (very toxic to aquatic life)，而  $1 \sim 10 \text{ mg/L}$  則為 Acute Toxicity II (toxic to aquatic life)，若是  $10 \sim 100 \text{ mg/L}$  或大於  $100 \text{ mg/L}$ ，則為 Acute Toxicity III (harmful to aquatic life)。

由表中可知，2-chloroacrylonitrile 在任何一個終點，都是呈現最高毒性，在歐盟所訂立的毒害標準分類，2-chloroacrylonitrile 被歸類在非常毒害 (Very toxic)，是必須要被嚴格監控的。

而 methacrylonitrile 則在三個反應終點中為最不具毒性者，然而 methacrylonitrile 在台灣被分類為第六類具有毒性之化學物質，但於本實驗中並未察覺到其高毒性，於美國 EPA 發行之 ACUTE EXPOSURE GUIDELINE LEVELS (AEGLs) 中提到其對人體或其他較高等的動物有明顯較高之危害，因此推估 methacrylonitrile 對於較食物鏈中基層的藻類較不敏感，而工業中最常被使用的 acrylonitrile 在實驗中也呈現較高的毒性。而在其他的丙烯腈類化合物也幾乎都是對水體有危害的等級，因此對於這一類的毒性化學物質，必須注意其排放後的監控。

由單一實驗的結果亦可發現，除了 2-chloroacrylonitrile 外，大部

分的丙烯腈化合物其濃度-反應曲線之斜率皆偏小，較大斜率即表示，生物對此類化合物的最高容忍濃度(Threshold)到完全抑制濃度，僅在一個狹小的範圍內，因此對於 2-chloroacrylonitrile 的處理必須更加的謹慎注意，此外，在過去的混合毒性研究中，亦指出同樣小斜率的腈類物質和醛類相混合，容易得到協同的情形[28]、[29]，因此對於幾乎都是小斜率的丙烯腈物質，必須嚴密的監控其在水體的情形。

由表 5.1.2 亦可發現取代基較複雜的丙烯腈化合物，如：3-methoxyacrylonitrile、3-ethoxyacrylonitrile 及 3-dimethylaminoacrylonitrile，其 $EC_{50}$ 在不同的反應終點呈現較大的變動，變動範圍最大到 21 倍左右，其原因可能是取代基複雜的丙烯腈化合物有比較複雜的作用機制，但是詳細的原因還需要進一步的探討研究。

而混合毒性試驗中，本研究選用 Formaldehyde、Glutaraldehyde 以及 3-hydrobenzaldehyde 與不同之丙烯腈化合物進行混合，根據其不同的濃度-反應曲線斜率和丙烯腈化合物進行混合毒性研究，觀測混合後之毒性效應。

表 5.1.1 為不同物種對丙烯腈的毒性數據，將藻類和其他測試物種做比較可以發現，藻類對於丙烯腈是較敏感的物種，相較於兩棲類及浮萍等測試物種，藻類的毒性標準可更完善的保護水體生物。



表 5.1.1 不同測試物種對丙烯腈之毒性數據

	<i>C. idellus</i>	<i>D. magna</i>	<i>B. bufo</i>	<i>C. carpio</i>	<i>R. subcapitata</i>
丙烯腈毒性數據	9.216	8.697	14.22	42.33	4.78
單位:mg/L					
BASE ON BIOMASS					





表 5.1.2 丙烯腈化合物及醛類之單一毒性試驗結果

毒物名稱	base on DO		Base on Biomass		Base on growth rate	
	EC50 值 (mg/L)	斜率 (Dose-response)	EC50 值 (mg/L)	斜率 (Dose-response)	EC50 值 (mg/L)	斜率 (Dose-response)
acrylonitrile	6.76	1.14	5.56	1.66	18.06	1.53
2-chloroacrylonitrile	0.145	2.84	0.106	3.14	0.190	3
methacrylonitrile	586.64	1.17	223.53	1.01	1197.0	1.05
3-methoxyacrylonitrile	78.15	0.668	10.97	1.146	47.19	0.917
3-ethoxyacrylonitrile	17.90	0.65	70.67	0.96	417.73	0.91
3-dimethylaminoacrylonitrile	13.109	0.98	4.28	1.39	20.43	1.08
Formaldehyde	1.28	2.83	1.71	2.97	3.27	2.7
Glutaraldehyde	3.71	1.61	3.48	1.79	12.07	1.22
3-hydrobenzaldehyde	5.17	3.3	3.66	2.86	6.45	2.55

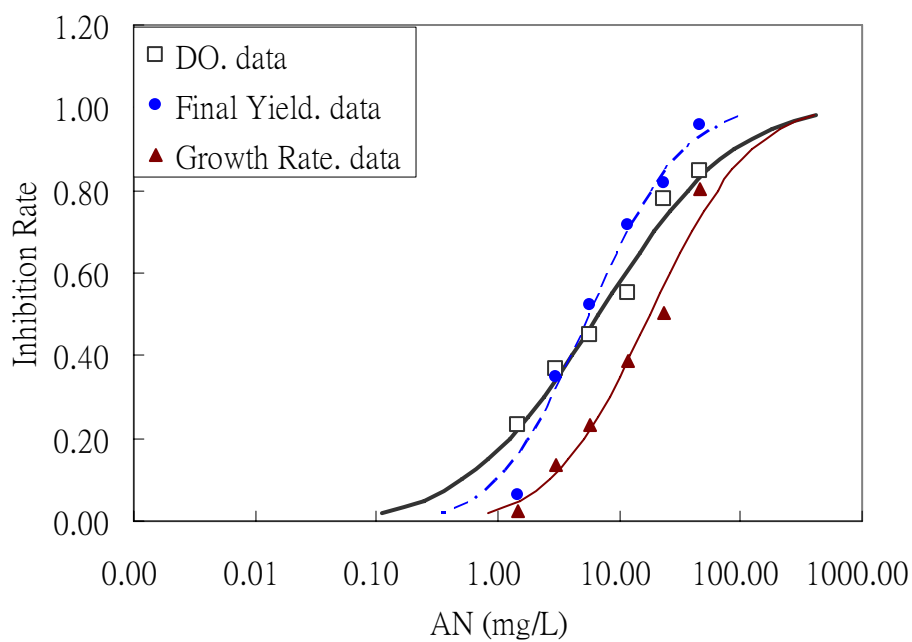


圖 5.1.1 三種試驗終點下 Acrylonitrile 之劑量反應曲線

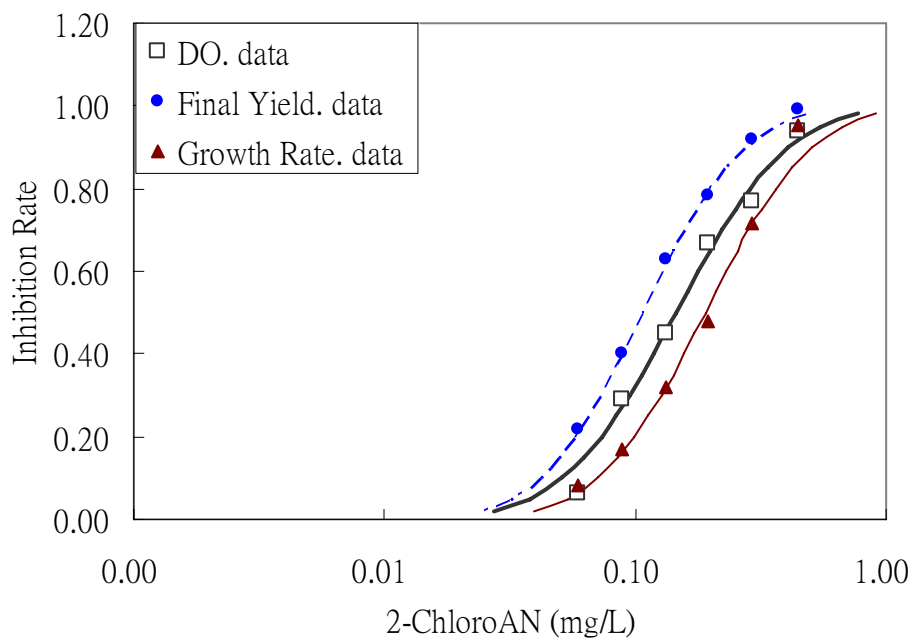


圖 5.1.2 三種試驗終點下 2-Chloroacrylonitrile 之劑量反應曲線

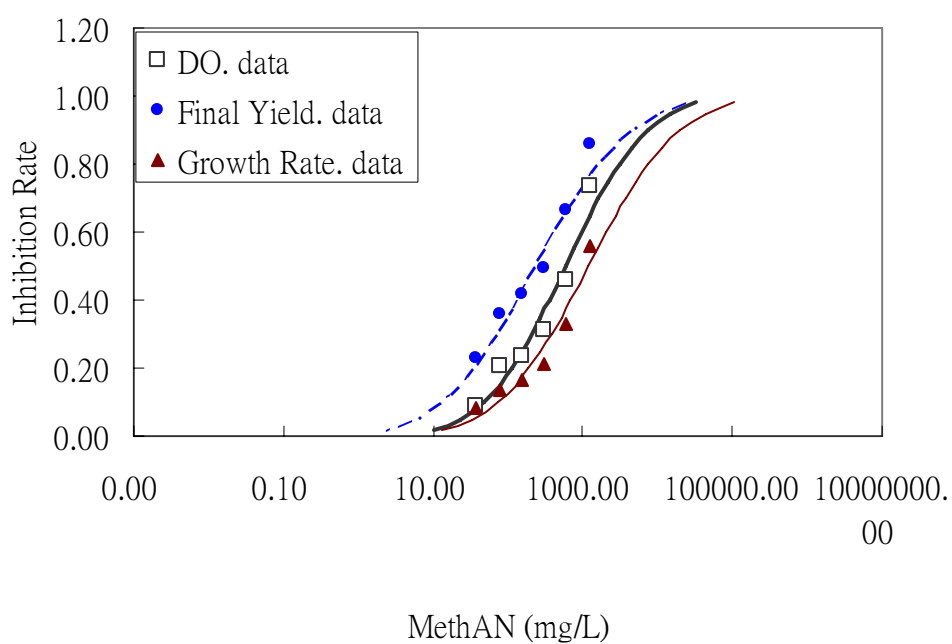


圖 5.1.3 三種試驗終點下 methacrylonitrile 之劑量反應曲線

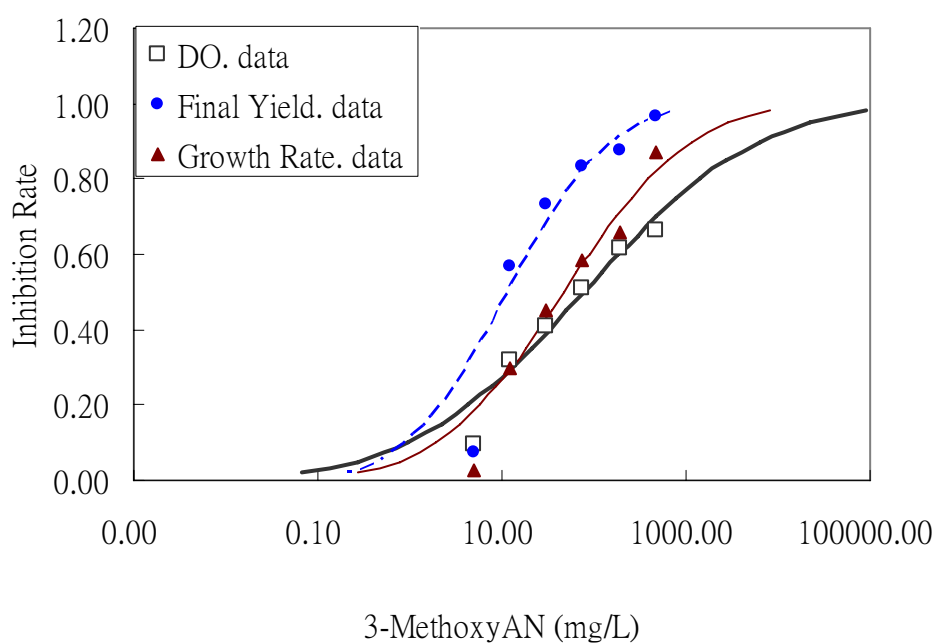


圖 5.1.4 三種試驗終點下 3-methoxyacrylonitrile 之劑量反應曲線

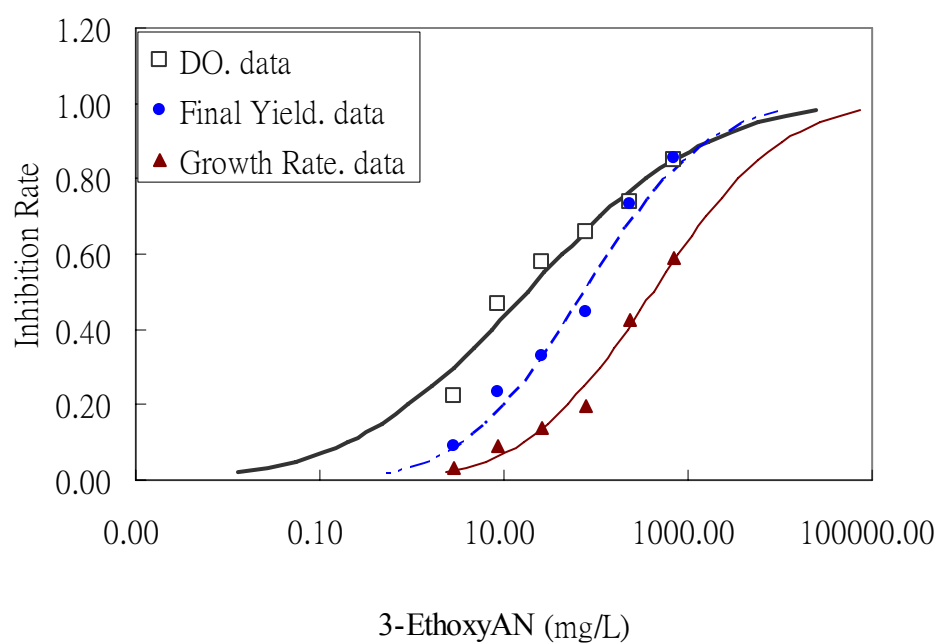


圖 5.1.5 三種試驗終點下 3-Ethoxyacrylonitrile 之劑量反應曲線

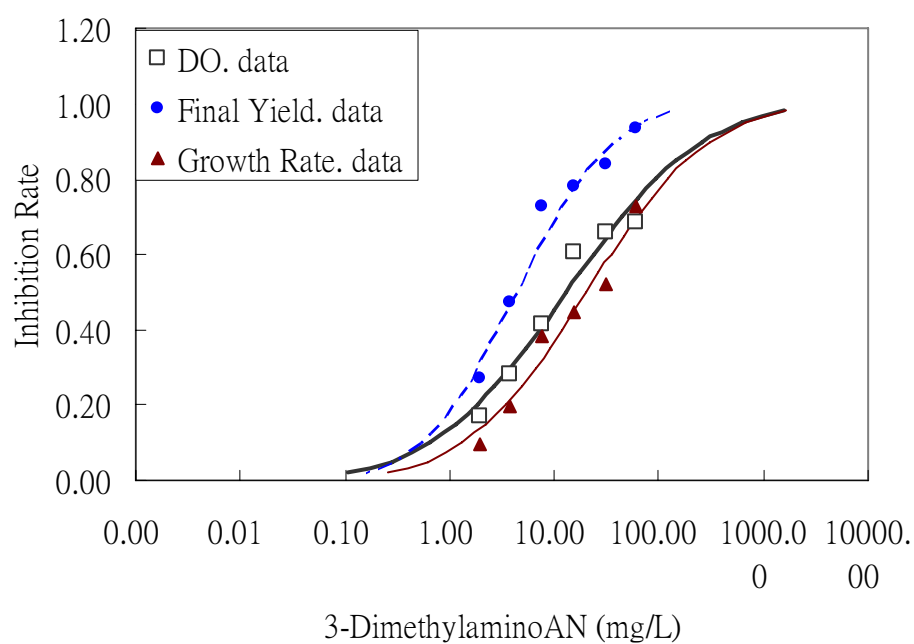


圖 5.1.6 三種試驗終點下 3-Dimethylaminoacrylonitrile 之劑量反應曲線

## 5.2 NOEC 及 EC10 數值之比較

毒物學中，我們常以低濃度的影響作為保護水體生物的重要依據，表 5.2.1 列出了三種反應終點之 NOEC (No Observed Effect Concentration) 值與 PROBIT 模式所計算出之 EC10 值，本實驗同樣針對三中不同的實驗終點來進行比較。

NOEC 值的判定通常和實驗濃度的取決、重複組的數量和選定參數有所關聯。一般 NOEC 值是由統計方法中的 Dunnett' s test 方法來做分析的，若重複組間的差異變小，與處理組的差距便較為明顯，所求得的 NOEC 值也較為準確，通常較不嚴謹的實驗易出現較高的 NOEC 值。

在 NOEC 方面，三個終點皆有 NOEC 值小於實驗最低濃度的現象，佔實驗組 50%，而在 3-dimethylaminoacrylonitrile 中則是三個實驗終點皆呈現 NOEC 小於最低實驗濃度的情形；在與 EC10 相比較的部份，EC10 和 NOEC 的比值因為實驗濃度的關係，使得部份 NOEC 無法求得，因此其 EC10 與 NOEC 之比值無法確定，由表 5.2.1 可知，有確切求得比值的組數中，大於 1 者佔約 44%，而比值小於 1 者則佔了 56%。

然而由上述的分析方法無法描述 NOEC 值與 EC<sub>10</sub> 何者較為嚴謹，為了更深入比較 EC<sub>10</sub> 與 NOEC，本實驗將更進一步地利用 ANOVA (analysis of variance) 檢定三項重要參數：Sw、F ration 以及中斷值 (cut-off value)。Sw 代表的是試驗的組內變異，而 F ration 為組間變異與組內變異的比值，用以表示組間與組內變異的差異程度。

由表 5.2.2 發現，Sw 值在不同參數下的差異性皆很大，主要是溶氧產生量的單位是 mg/L，細胞密度變化量的單位是 cells/mL，使得 Sw 不能用以直接比較三種反應終點的組內變異，也因此 F ration 基於相同理由，同

樣無法判斷哪一個觀測參數較為精準。為了能夠比較不同參數的準確度，本研究使用了一判斷參數中斷值，其介於 NOEC 與 LOEC 之間，能夠更嚴謹地判斷藻類受到抑制的顯著性，並使之包含單位的複雜參數與控制組的平均值比較並以抑制的百分率作為單位，使其能夠用於不同單位的試驗終點間的比較。

溶氧、生物質量以及生長率三個終點的平均中斷值分別為 10.25、8.91、7.35，以中斷值來看，以生長率為實驗終點的組內差異最小，因此生長率對於低濃度的分析是較穩定的實驗終點。

因為中斷值介於NOEC與LOEC之間，但高於NOEC，故當中斷值小於10%時，生物受到NOEC的影響濃度會比10%的抑制濃度要低，也就是說，此時建議選擇NOEC值會比EC<sub>10</sub>提供更加嚴謹的保護標準。由平均中斷值來看，生長率及生物質量其中斷值皆小於10%，即說明在這兩個終點，以NOEC比EC<sub>10</sub>更適合作為保護水體的依據。而溶氧的中斷值略高於EC<sub>10</sub>，以數據來看是EC<sub>10</sub>比NOEC適合，但以整體而論，NOEC依然是低濃度效應較好的監測標準。

表 5.2.1 NOEC、LOEC、EC10 及 EC10/NOEC

	DO			Biomass			Growthrate			EC10/NOEC		
	NOEC	LOEC	EC10	NOEC	LOEC	EC10	NOEC	LOEC	EC10	DO	BIO	GRO
acrylonitrile	<1.46	1.46	0.51	1.46	2.97	0.94	1.46	2.97	2.63	>0.35	0.64	1.80
methacrylonitrile	38.36	76.72	47.13	<38.36	38.36	11.97	<38.36	38.36	72.7	1.23	>0.31	>1.90
2-chloroacrylonitrile	0.059	0.089	0.051	<0.059	0.059	0.041	<0.059	0.059	0.071	0.86	>0.69	>1.20
3-methoxyacrylonitrile	4.84	12.1	0.95	4.84	12.1	0.84	4.84	12.1	1.89	0.20	0.17	0.39
3-ethoxyacrylonitrile	<2.91	2.91	0.2	2.91	8.73	3.27	2.91	8.73	16.31	>0.07	1.12	5.60
3-dimethylaminoacrylonitrile	<1.92	1.92	0.65	<1.92	1.92	0.51	<1.92	1.92	1.33	>0.34	>0.27	>0.69



表 5.2.2 Sw、Fratio 及 Cut-off value

毒物名稱	base on DO			Base on Biomass			Base on growth rate		
	Sw	F ratio	cut-off value	Sw	F ratio	cut-off value	Sw	F ratio	cut-off value
acrylonitrile	0.24	269.61	5.29	11519.86	170.86	8.67	0.06	159.19	8.22
2-chloroacrylonitrile	0.24	120.95	10.74	5919.37	414.06	5.1	0.05	244.52	7.82
methacrylonitrile	0.38	42.64	12.88	13359.62	73.48	9.16	0.04	141.43	5.36
3-methoxyacrylonitrile	0.3	16.15	19.1	8350.85	113.97	10.12	0.06	93.44	11.1
3-ethoxyacrylonitrile	0.14	219.37	5.43	13486.6	64.38	12.54	0.04	136.31	6.79
3-dimethylaminoacrylonitrile	0.22	94.61	8.05	12134.07	123.71	7.85	0.04	296.57	4.81
mean	0.25	127.22	10.25	10795.06	160.08	8.91	0.05	178.58	7.35

### 5.3 混合毒性試驗

本研究利用甲醛、戊二醛以及三烷基苯甲醛與丙烯腈類化合物進行混合毒性試驗，根據斜率大小的不同進行配對的依據，若斜率小於 2，則將其歸類於小斜率，斜率介於 2 至 2.5 間，歸類為中斜率，大於 2.5 則視為大斜率，而表 5.3.1 至 5.3.3 為三種不同實驗終點下，混合毒性試驗的結果。

本研究亦將毒化物斜率作以下分類：斜率小於 2.0 視為小斜率，介於 2.0 至 2.5 間為中斜率，而大斜率則以大於 2.5 為標準。

由結果發現，在醛類中，劑量反應曲線斜率較小的戊二醛，將其與同樣有小斜率的丙烯腈類化合物以毒性單位比 1:1 進行混合毒性試驗，可以發現，無論在哪個終點，其混合效應皆呈現協同的情形。這與 Chen 在 1996 年發表的研究結果相符合，根據其推測，在腈類跟醛類相混合的時候，若同樣為較小的斜率，容易產生協同的情形，且效應比模式預測值更為強烈，根據本研究之結果，可推測在丙烯腈類的化合物與同樣為小斜率的戊二醛相混合時，亦可能會有這樣的情形。

而在斜率較大的三烷基苯甲醛和同樣大斜率的二氯丙烯腈相混合，則是在三個實驗終點都呈現拮抗的情形，Chen 定義這樣拮抗的現象乃 “complex joint action” 所引起的，本研究則會在 Isobologram 分析時觀察這樣的現象。

而甲醛在醛類中是屬於常見的化合物，在工業上也很常被利用，因此我們也希望了解這樣的物質跟丙烯腈相混合後的效應為何，我們將其與丙烯腈相混合後發現，在屬於大斜率的甲醛和其他小斜率的丙烯腈化合物相混合時，其結果為拮抗或相加作用，Chen 的研究結果亦有此現象，其指出在進行混合毒性試驗的兩種化學物質中，若其中一種毒物其劑量反應曲線斜率為大斜率，則混合後的效應比較容易是拮抗或相加，三烷基苯甲醛

與二氯丙烯腈的混合亦是這樣的結果，而圖 5.3.1 則是混合效應和斜率的關係圖。

在實驗中點方面，協同效應平均出現在三個終點，而拮抗現象則以溶氧以及生物質量為主，相加作用大部分出現在生長率的部份，以生物質量作為反應終點時，並沒有觀察到相加的作用。

此外，在本研究中我們亦根據二維非交互作用型混合毒性理論針對醛類及丙烯腈類化合物進行混合毒性的預測，比較利用模式預測之結果與實驗得到的實際觀察值之差異。

由表 5.3.1 至 5.3.3 可知，預測值與實際的觀測值有明顯的差異，且於皆為小斜率的醛類與丙烯腈化合物混合毒性試驗結果中，協同的效應都較模式預測更為強烈，其可能的原因是混合毒性理論是以非交互作用型（Non-interactive）為基礎，但是在實驗時則包含了交互作用（Interactive）與非交互作用，因此在可能有交互作用的實驗情況下，便會導致在模式的預測上會產生較大的差異。

由表 5.3.4 至 5.3.6，可更進一步了解斜率與混合效應之間的關係。協同效應都集中出現在表格的左上方，即小斜率相互混合的情形，而越偏向右方或下方，則開始出現加成或拮抗的現象，可更詳細了解斜率與混合效應在丙烯腈類化合物與醛類之間的關係。

表 5.3.1 以溶氧為終點之混合毒性效應

	BASE ON DO			效應
	S1/S2	Obs. TU	Pred. TU	
AN + formaldehyde	1.14/2.83	1.64(1.13~3.92)	0.88	A/S
3-dimethylaminoAN + glutaraldehyde	0.98/1.61	0.32(0.25~0.45)	0.6	S/S
3-ethoxyAN + glutaraldehyde	0.65/1.61	0.32(0.25~0.42)	0.48	S/S
2-chloroAN + 3-hydrobenzaldehyde	2.84/3.30	1.42(1.18~1.70)	1.2	A/A
3-methoxyAN + glutaraldehyde	0.668/1.61	0.23(0.18~0.27)	0.49	S/S
methAN + glutaraldehyde	1.17/1.61	0.31(0.27~0.35)	0.64	S/S
3-dimethylaminoAN + formaldehyde	0.98/2.83	1.34(1.22~1.50)	0.84	A/S
3-ethoxyAN + formaldehyde	0.65/2.83	6.38(5.29~7.65)	0.74	A/S
3-methoxyAN + formaldehyde	0.668/2.83	0.75(0.51~1.10)	0.75	AD/S
methAN + formaldehyde	1.17/2.83	1.54(1.13~2.78)	0.9	A/S

\* AN=Acrylonitrile.

\* S=Synergistic , AD=Addition , A=Antagonistic

\* Observe TU / Predict TU

表 5.3.2 以生物質量為終點之混合毒性效應

	BASE ON BIOMASS			效應
	S1/S2	TU	Pred. TU	
AN + formaldehyde	1.66/2.97	2.05(1.25~13.50)	1.02	A/A
3-dimethylaminoAN + glutaraldehyde	1.39/1.79	0.53(0.42~0.66)	0.74	S/S
3-ethoxyAN + glutaraldehyde	0.96/1.79	0.29(0.22~0.40)	0.64	S/S
2-chloroAN + 3-hydrobenzaldehyde	3.14/2.86	1.27(1.16~1.39)	1.184	A/A
3-methoxyAN + glutaraldehyde	1.146/1.79	0.34(0.27~0.41)	0.68	S/S
methAN + glutaraldehyde	1.01/1.79	0.41(0.30~0.53)	0.642	S/S
3-dimethylaminoAN + formaldehyde	1.39/2.97	3.03(2.37~4.03)	0.96	A/S
3-ethoxyAN + formaldehyde	0.96/2.97	3.32(2.32~4.87)	0.86	A/S
3-methoxyAN + formaldehyde	1.146/2.97	1.96(1.39~2.71)	0.9	A/S
methAN + formaldehyde	1.01/2.97	2.33(1.97~2.74)	0.88	A/S

表 5.3.3 以生長率為終點之混合毒性效應

	BASE ON GROWTHRATE			效應
	S1/S2	TU	Pred. TU	
AN + formaldehyde	1.53/2.70	0.74(0.43~5.09)	094	AD/A
3-dimethylaminoAN + glutaraldehyde	1.08/1.22	0.27(0.18~0.49)	0.52	S/S
3-ethoxyAN + glutaraldehyde	0.91/1.22	0.11(0.09~0.13)	0.46	S/S
2-chloroAN + 3-hydrobenzaldehyde	3.00/2.55	1.32(1.22~1.42)	1.15	A/A
3-methoxyAN + glutaraldehyde	0.917/1.22	0.11(0.08~0.13)	0.47	S/S
methAN + glutaraldehyde	1.05/1.22	0.22(0.15~0.37)	0.51	S/S
3-dimethylaminoAN + formaldehyde	1.08/2.70	1.12(0.93~1.46)	0.85	AD/S
3-ethoxyAN + formaldehyde	0.91/2.70	0.85(0.61~1.33)	0.82	AD/S
3-methoxyAN + formaldehyde	0.917/2.70	1.06(0.81~1.62)	0.826	AD/S
methAN + formaldehyde	1.05/2.70	0.83(0.66~1.19)	0.85	AD/S

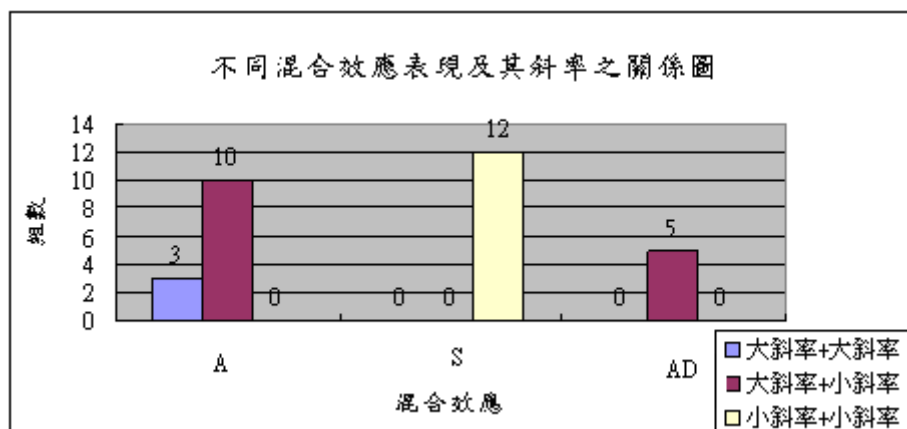


圖 5.3.1 不同混合效應與斜率之關係

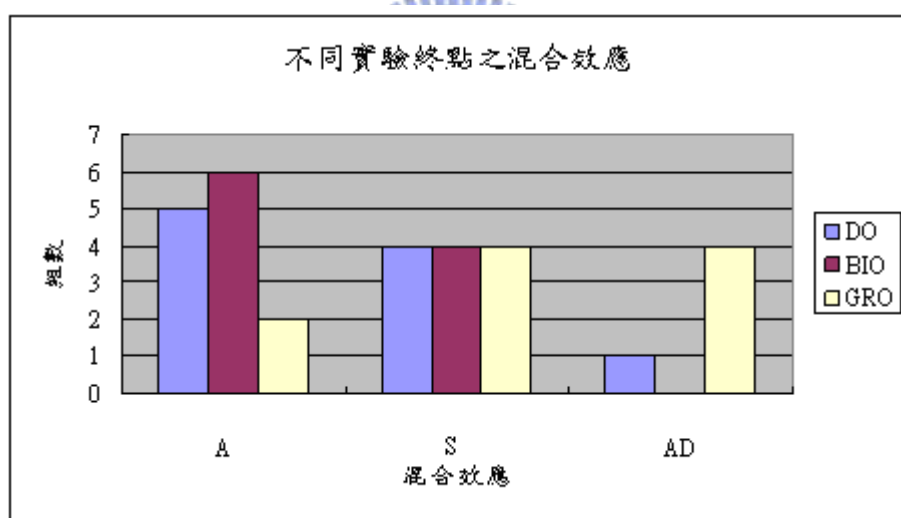


圖 5.3.2 不同實驗終點之混合毒性效應



表5.3.4 斜率與混合效應關係 (Base on DO)

		base on DO		
slope		small	median	large
small	synergism	4	0	0
	addition	0	0	1
	antagonism	0	0	4
median	synergism	---	0	0
	addition	---	0	0
	antagonism	---	0	0
large	synergism	---	---	0
	addition	---	---	0
	antagonism	---	---	1

\* slope < 2.0 (small), > 2.0 and < 2.5 (median), > 2.5 (large)

表 5.3.5 斜率與混合效應關係 (Base on BIOMASS)

		base on Biomass		
slope		small	median	large
small	synergism	4	0	0
	addition	0	0	0
	antagonism	0	0	5
median	synergism	---	0	0
	addition	---	0	0
	antagonism	---	0	0
large	synergism	---	---	0
	addition	---	---	0
	antagonism	---	---	1

表 5.3.6 斜率與混合效應關係 (Base on GROWTHRATE)

		base on Growthrate		
slope		small	median	large
small	synergism	4	0	0
	addition	0	0	4
	antagonism	0	0	1
median	synergism	---	0	0
	addition	---	0	0
	antagonism	---	0	0
large	synergism	---	---	0
	addition	---	---	1
	antagonism	---	---	0



## 5.4 丙烯腈與醛類相互作用之分析

由前一章節我們了解到，在同樣是小斜率的丙烯腈化合物與醛類相混合時會有明顯的協同效應，且會比模式預測值來的更明顯，Chen於1996年的研究中指出，當醛類與腈類相混合時，可能會產生更具毒性的第三種物質，而Lin(2002)則證實了，在甲醛與malononitrile相混合時，會產生第三種更毒的物質，因此，本研究以戊二醛以及Methacrylonitrile的混合為代表，進行HPLC的分析，觀察是否有新的物質在本實驗過程中產生，圖5.4.1到5.4.3則為HPLC之分析結果。

由圖5.4.1到5.4.3得知，在將Methacrylonitrile及戊二醛相混合後，並沒有發現有新的峰（PEAK）產生，也就是說在本分析中並沒有發現兩種毒物相混合後有新的產物，但是在圖5.4.3中可發現，原先相當明顯的戊二醛的波峰下降許多，在經過定量後發現，原本以50ppm濃度進行混合的戊二醛，經過換算定量，發現其濃度值只剩下約26ppm左右。

而在3D分析的吸收波長方面，在甲基丙烯腈及戊二醛的混合液並沒有明顯的第三種波長產生，同時比較圖譜及吸收波長部分，並無法明確看到新物種在混合的情況下產生。

學者Shinkai (1980) [31]的研究中指出，醛類在有cyanide ion存在的情況下，若經由生物體的酵素（如：FMN）作用，醛類有可能會轉換成Carboxylic acids，因此，上述分析無法分離出新的波峰可能的原因是醛類在分析中並沒有生物體的酵素進行催化，因此較不容易轉換出新的物種，而進行毒性試驗時則有藻類的生化酵素存在，而另一方面，因為尚無法確立新產生的毒性化學物質之種類與特性，因此在分析中亦無法決定其

HPLC的分析條件，基於上述原因，使得在HPLC的分析實驗中無法分離出新物種之波峰，但是在吸收波長的分析中，我們可以看到別於戊二醛及Methacrylonitrile的波長，若要明確的定義出新產生的化合物，則還需要加強研究。

而Methacrylonitrile在分析中其濃度並沒有明確分析，則是因為在醛類轉換成carboxylic acids的過程中，Methacrylonitrile的角色是提供一個有cyanide ion的環境，並未實際參與反應，因此在其濃度的部份並沒有詳加討論。



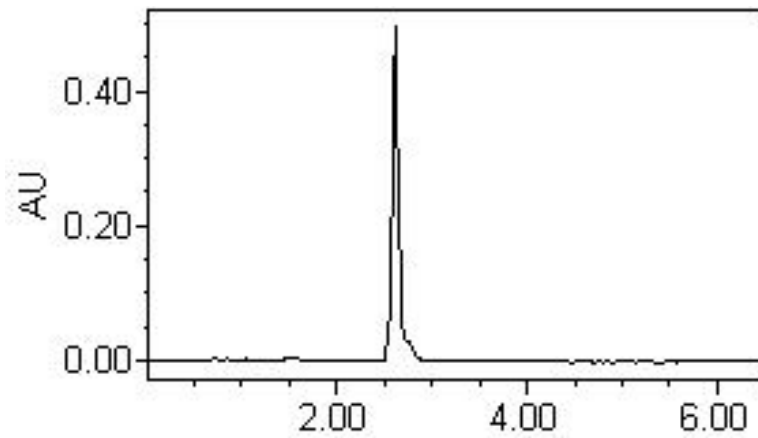


圖 5.4.1 甲基丙烯腈之 HPLC 分析結果

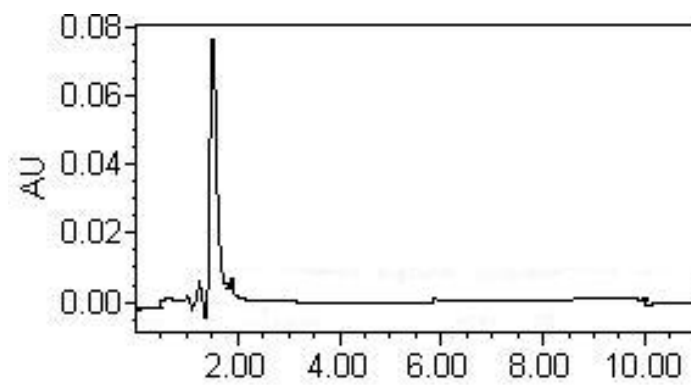


圖 5.4.2 戊二醛之 HPLC 之分析結果

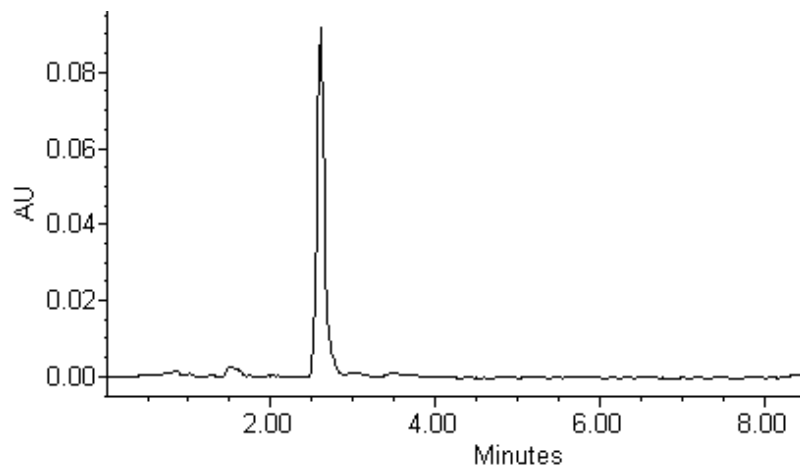


圖 5.4.3 混合液之 HPLC 分析結果

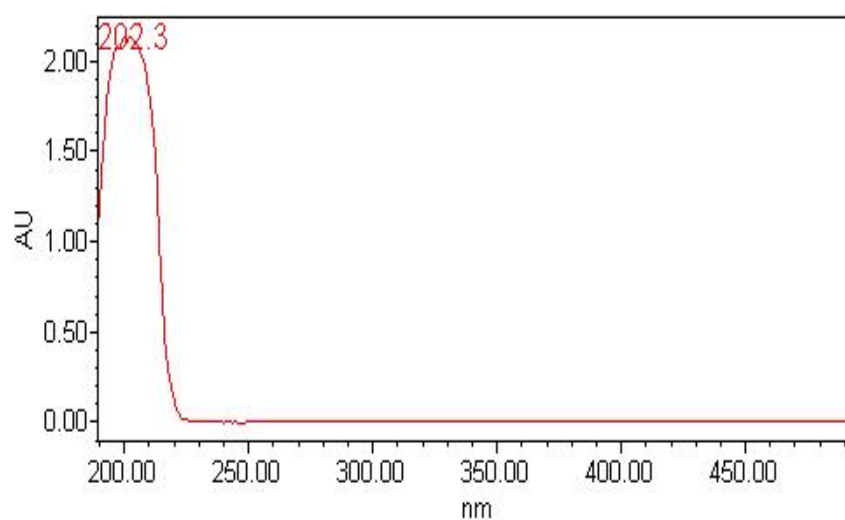


圖 5.4.4 Methacrylonitrile 之吸收波長分析

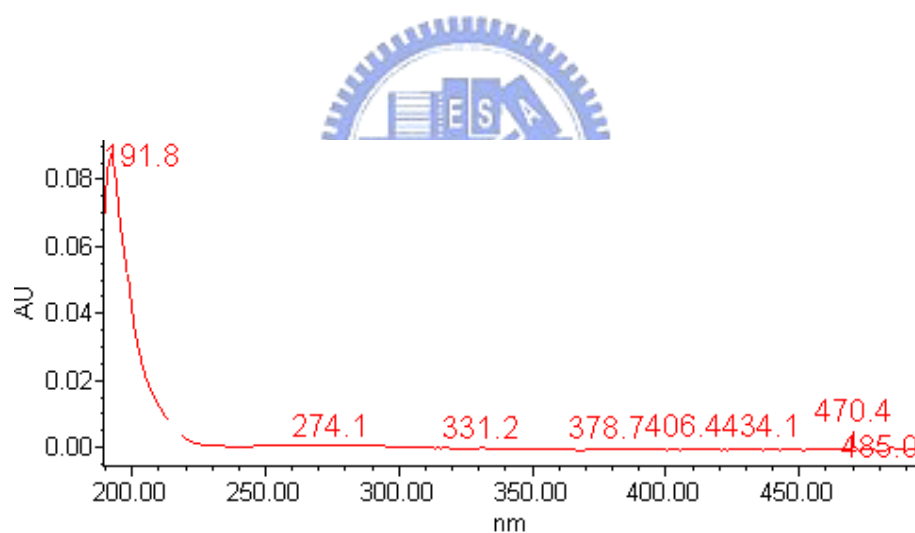


圖 5.4.5 戊二醛之吸收波長分析

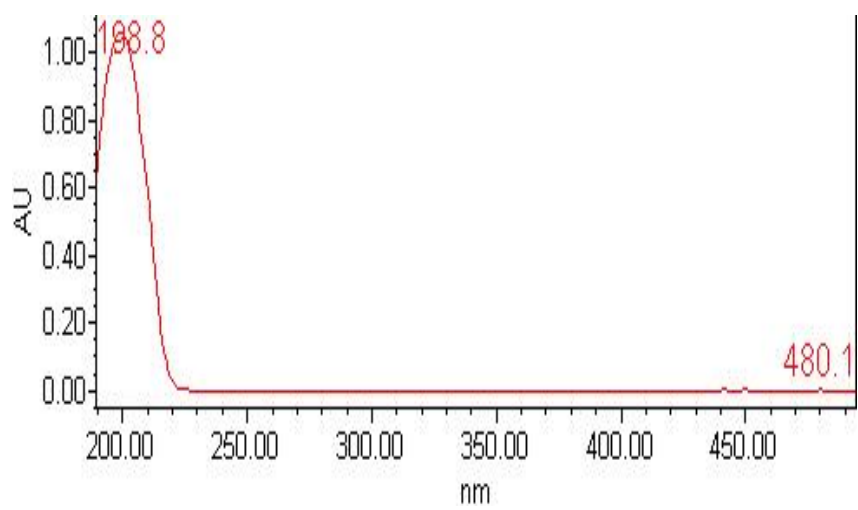


圖 5.4.6 混合液之吸收波長分析





## 5.5 Isobologram

本實驗亦利用 Isobologram 來描述混合毒性效應，利用不同的濃度比例來進行試驗，以求得其完整的混合毒性結果。此實驗挑選了協同效應 (Methacrylonitrile + Glutaraldehyde) 與拮抗效應 (2-Chloroacrylonitrile + 3-hydrobenzaldehyde) 各一組。

Chen and Chiou 曾經提到 Isobologram 曲線有可能會並不落在兩軸毒性單位等於一所圍成的範圍內，而呈現不規則之等效應曲線，此時的混和毒性效應定義為 complex joint action。而 complex joint action 的主要特性如下：(1) 在任何毒性單位比例下，均會有混合毒性減弱現象發生。(2) 不同毒性單位比例，其毒性效應減弱現象之強度會不相同，即在某一毒性單位比例下會有較強之毒性減弱效應產生。(3) 對於劑量-反應曲線斜率較大之毒性物質，其在毒性單位較小時，對另一種毒性物質有解毒作用。因此我們亦可藉由圖來判斷是混合毒性中是否有 complex joint action。

圖 5.4.1 到圖 5.4.3 為協同組的 Isobologram，我們可以看到其符合協同效應，各比例的混合毒性試驗點皆落在相加線的下方，而圖 5.4.4 到圖 5.4.6 則為拮抗組，由圖我們可以發現，以溶氧為試驗終點時，在丙烯腈和醛類的比例 1:3、3:1 時，混合效應呈現了加成的現象，在生物質量以及生長率為終點時，則有明顯的 complex joint action 的現象由此我們可以了解到，complex joint action 的現象在醛類以及丙烯腈化合物混合中是存在的，但詳細的機制尚不明確，有待進一步研究。由此可知，Isobologram 可以更完善的去解釋混合毒性在不同的情況下會有怎樣的變化。

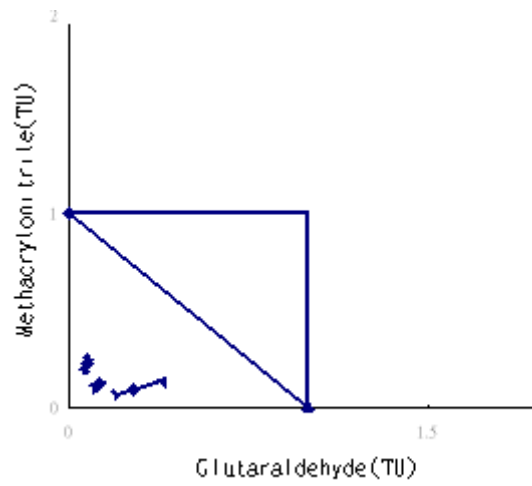


圖 5.5.1 以溶氧為實驗終點之 Isobologram  
(Methacrylonitrile+Glutaraldehyde)

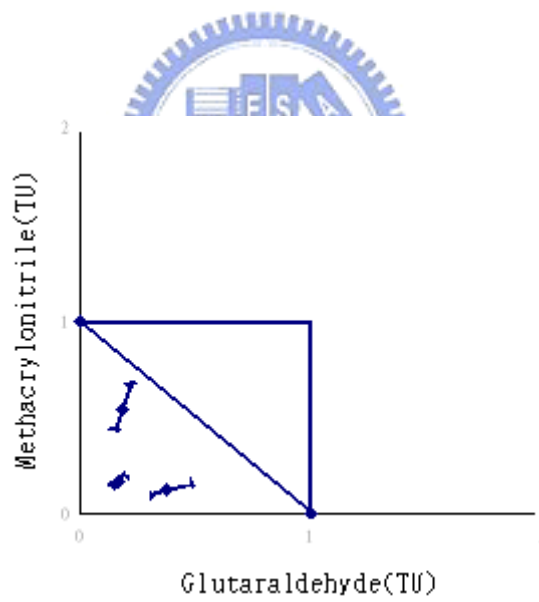


圖 5.5.2 以生物質量為實驗終點之 Isobologram  
(Methacrylonitrile+Glutaraldehyde)

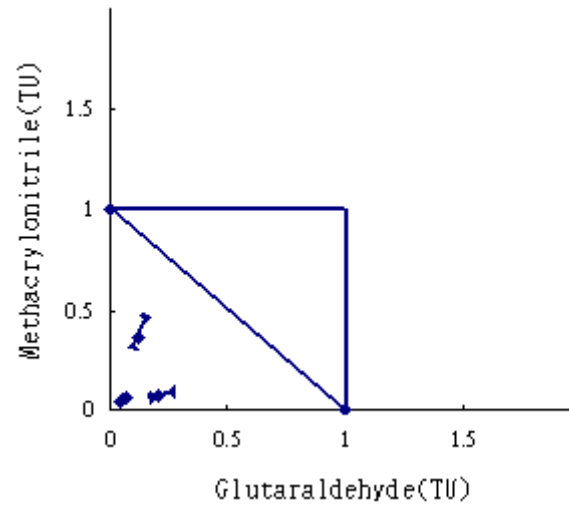


圖 5.5.3 以生長率為實驗終點之 Isobologram  
(Methacrylonitrile+Glutaraldehyde)



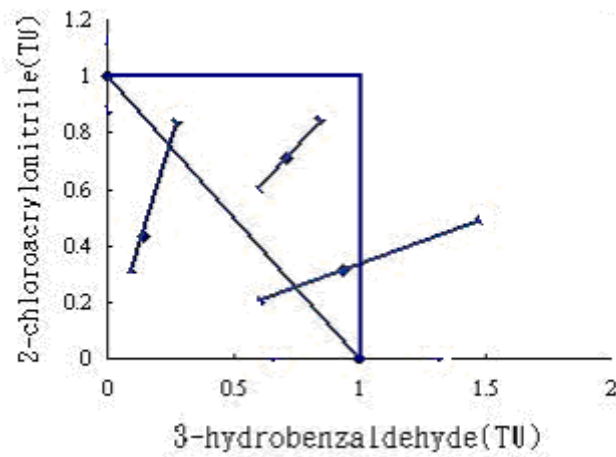


圖 5.5.4 以溶氧為實驗終點之 Isobologram  
(2-Chloroacrylonitrile+3-hydrobenzaldehyde)

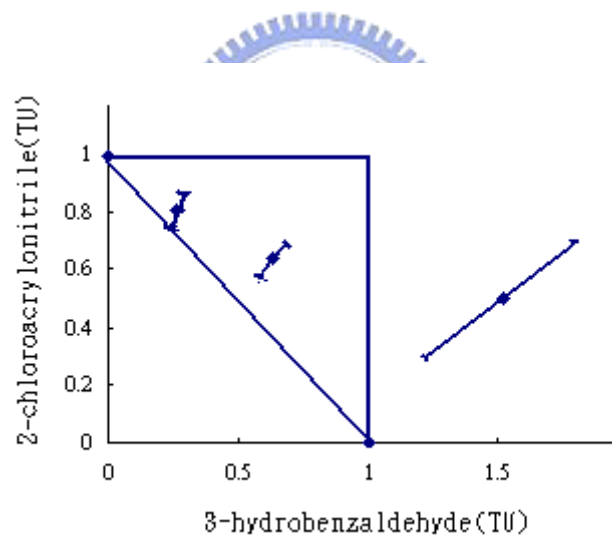


圖 5.5.5 以生物質量為實驗終點之 Isobologram  
(2-Chloroacrylonitrile+3-hydrobenzaldehyde)

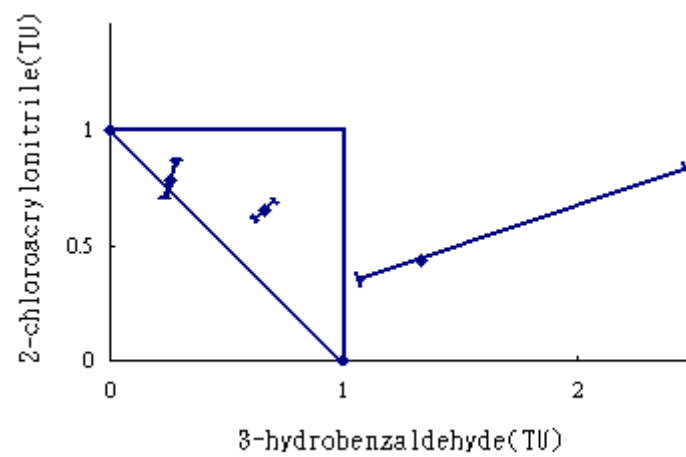


圖 5.5.6 以生長率為實驗終點之 Isobologram  
(2-Chloroacrylonitrile+3-hydrobenzaldehyde)



## 第六章 結論與建議

### 6.1 結論

本研究利用密閉式藻類毒性系統評估丙烯腈之單一毒性，同時分析其與醛類之混合毒性效應，所得的結論如下：

- (1) 在單一毒性方面，2-Chloroacrylonitrile 具有相當高的毒性，而 Methacrylonitrile 則毒性最低，而其他的丙烯腈類化合物也幾乎都在對水體具有危害的範圍內。
- (2) 當丙烯腈本體上所接的取代基越複雜時，其 EC50 值在三個不同的實驗終點下皆有較大的變異。
- (3) 根據比較不同的統計參數，Sw、F ratio 與 cut-off value，我們了解用 NOEC 會比 EC10 更適合用來保護水體環境。
- (4) 在混合毒性方面，小斜率的丙烯腈類化合物與同樣為小斜率的醛類相混合時會有協同的情形，而大斜率的化合物與小斜率或大斜率相混合時，則結果偏向相加或是結抗作用。
- (5) 在利用二維非交互作用型之混合毒性理論模式預測丙烯腈與醛類相混合結果時，其預測值會因為沒有考慮到兩化合物間交互作用，而和實際觀測值有很大的差異。
- (6) 在 Isobologram 分析中，我們發現，大斜率的 2-Chloroacrylonitrile 與同樣為大斜率的 3-hydrobenzaldehyde

相混合時，在不同的混合比例實驗中發現其有 complex joint action 的現象，因而導致拮抗的情形產生。





## 6.2 建議

- (1) 對於丙烯腈已有相當多的毒性數據，但是對於其他相似的衍生物的毒性數據卻相當稀少，因此需要針對一系列丙烯腈化合物做毒性分析評估，建立完整的數據。
- (2) 針對丙烯腈化合物與醛類相混合後的變化，需要更詳細的機制來確定新的物種。
- (3) 在學者 Shinkai 於 1980 年的研究中指出，醛類在有酵素作用的情況下有可能會轉換成新的化合物，因此可以針對加入酵素後的反應作更詳細的研究。
- (4) 雖然在本研究並未看到新的物種產生，但是根據一些側面的證據和文獻了解當丙烯腈和醛類相混合時，是有極大的可能會產生出新的毒性物質，因此必須有一個更完整的機制去了解新產生的物種，才可以找出確定的分析條件，進而將這一類新產生的毒性化學物質做一定性分離。