

國立交通大學
環境工程研究所

碩士論文

以 Microtox 針對反應性有機物丙烯腈類與醛類做

混合毒性之研究

Combined toxicity of acrylonitriles and aldehydes to Microtox test



研究生：陳百珊

指導教授：陳重元教授

中華民國九十八年七月

以 Microtox 針對反應性有機物丙烯腈類與醛類做混合毒性之研究

學生：陳百珊

指導教授：陳重元

國立交通大學環境工程研究所

摘 要

本研究利用 Microtox 試驗，以反應性有機物丙烯腈類為主，探討其與 5 種反應性有機物之醛類，混合後所造成之毒性效應。

在 Microtox 混合毒性試驗中，所選用之化學物質皆屬於劑量-反應曲線斜率小於 2 之物質，因此混合後所產生的毒性效應主要為協同作用(佔 73%)，尤其在與 Glutaraldehyde 混合時，協同作用更為明顯。

利用 QSARs 的反應性有機物質作用機制之分類與混合毒性理論中代表混合毒性作用位置之相似係數 λ ，並無一致性；而在混合毒性理論中，代表混合毒性物質之生物劑量-反應分布相關程度的相關係數 ρ 則趨向於 1，這也驗證在混合毒性試驗之生物是純種的。而在預測混合毒性時，CA 及 IA model 是最常被使用的模式，本研究群又利用 ρ 與 λ 將 IA model 再區分為 Response Addition (RA)、Response Multiplication (RM) 及 No Addition (NA) model 三種，而在預測上 RA model 最趨近於實際之結果，至於以 RA model 作為環境風險評估的預測基礎也是對於生態系較具保護力的。

而 Microtox 與藻類試驗在混合毒性的比較上，並無良好之相關性，但是仍可發現在丙烯腈類與 Glutaraldehyde 混合時，對兩試驗物種都呈現毒性增強之作用，因此對於 Glutaraldehyde 排放至環境中對生態造成之傷害影響可能會較預期來得高。

最後，利用 HPLC 對丙烯腈類與醛類混合後做一化學分析，針對兩反應性有機物混合後實際結果與預測不符合者(呈拮抗作用)，我們可以發現，其混合後濃度減少較多；反之，若符合預測結果者，其混合後濃度則與單一濃度無太大之差異。造成此一結果，是否是由於兩化學物質混合時產生新的化學物質或其他因素，將有待之後更詳細之研究與探討。



Combined toxicity of acrylonitriles and aldehydes to Microtox test

Student : Pai-Shan Chen

Advisor : Chung-Yuan Chen

Institute of Environmental Engineering
National Chiao-Tung University

Abstract

The joint toxic effects of reactive organic mixture were evaluated using the Microtox test. Greater than additive effect was always found because the slopes of the dose-response curve for the two tested chemicals were smaller than 2.

In prediction mixture toxicity of organic chemicals, concentration addition (CA) and independent action (IA) model were used frequently. In our study, IA model was subdivided into three types: response addition (RA), response multiplication (RM) and no addition (NA) model. The result was found that the actual situations of combine toxic effect of organic mixture were more conformable to RA model. On the other hand, it is not always adequate to predict the toxicity of organic mixtures base on CA model. In this study, predict the toxicity with RA model was powerful to protect of aquatic environment.

According to the HPLC result, much chemical concentration reduced when the toxicity effect tend to show antagonistic joint action. Find out this reason will be important things in next study.

誌謝

在這兩年多的時間裡，感謝陳重元教授的指導，一直以來陳教授秉持著嚴謹的教學態度，令我懾服並且獲益良多。口試期間，也承蒙林志高教授及董瑞安教授提供寶貴的意見與指教，在此對各位教授們獻上最深的謝意。

研究期間，特別感謝博士班楊詔茶學姊的幫忙與意見，欣好、介華以及學弟妹們，對於你們的幫忙，謝謝了!還有文彬學長，感謝你在忙碌之際還為我和欣好解決問題，真的是非常謝謝你!

最後，親愛的媽咪和爸比，感謝你們一路的栽培與支持，謝謝你們!

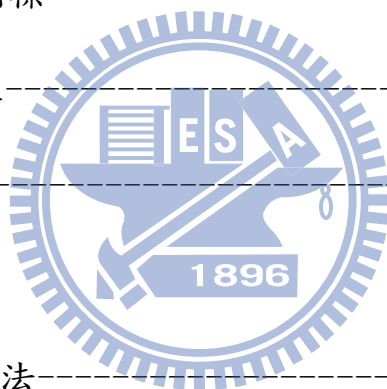


目 錄

中文摘要-----	i
英文摘要-----	iii
誌謝-----	iv
目錄-----	v
表目錄-----	viii
圖目錄-----	ix
第一章 前言-----	1
1.1 研究緣起-----	1
1.2 研究目的-----	2
第二章 文獻回顧-----	3
2.1 <i>Photobacterium phosphoreum</i> 螢光反應-----	3
2.2 丙烯腈化合物的介紹-----	4
2.3 混合毒性研究之介紹與相關理論與發展-----	7
2.4 QSARs 模式在環境毒物學上的應用-----	9
2.5 腈類與醛類化合物之混合毒性-----	10
2.6 混合毒性之 CA & IA model 預研究-----	12



第三章 基本理論-----	15
3.1 毒性物質劑量-反應模式-----	15
3.2 混合毒性理論-----	16
3.2.1 非交互作用混合毒性理論-----	16
3.2.2 交互作用混合毒性理論-----	17
3.2.3 混合毒性效應與 ρ 、 λ 之關係-----	18
3.3 混合毒性效應指標-----	19
3.3.1 混合毒性單位-----	19
3.3.2 Isobologram-----	20
第四章 實驗設備與方法-----	22
4.1 儀器與藥品-----	22
4.2 Microtox 單一及混和毒性試驗方法-----	24
4.3 數據處理-----	29
4.3.1 Probit 模式-----	29
4.3.2 混合毒性單位-----	29
4.4 HPLC 儀器分析-----	30



第五章 結果與討論-----	32
5.1 Microtox 單一物質毒性試驗結果-----	32
5.2 Microtox 混合物質毒性試驗結果-----	40
5.2.1 混合毒性單位分析-----	40
5.2.2 醛類與丙烯腈類作用機制與混合毒性理論的關係--	53
5.2.3 CA 與 IA model 的比較-----	55
5.3 Microtox 與藻類毒性試驗混合毒性結果之比較-----	59
5.4 化學分析結果-----	63
第六章 結論與建議-----	70
6.1 結論-----	70
6.2 建議-----	71
參考文獻-----	72
附錄-----	78



表目錄

表 2.2.1	丙烯腈及其衍生物之重要物理特性-----	6
表 2.2.2	各國法定之丙烯腈暴露極限-----	7
表 3.2.1	基礎混合效應模式之定義-----	19
表 5.1.1	單一毒性物質資料表-----	33
表 5.2.1	不同機制之反應性物質混合毒性效應-----	43
表 5.2.2	各個毒性效應占總混合毒性效應之比例關係-----	44
表 5.2.3	不同類反應性有機物相關及相似係數分析-----	54
表 5.2.4	不同 model 預測結果與實際結果之差值-----	57
表 5.2.5	實際結果與預測結果符合度之比例關係-----	58
表 5.3.1	Microtox 與藻類毒性試驗之混合毒性試驗結果比較--	61
表 5.3.2	Formaldehyde 與 3-Ethoxyacrylonitrile 之混合毒性單位下兩 者所需各別之濃度-----	62
表 5.4.1	HPLC 分析結果-----	65

圖目錄

圖 3.3.1	Isobologram 示意圖-----	21
圖 4.2.1	Microtox 螢光快速分析儀 32 個槽相關位置圖-----	27
圖 4.2.2	Microtox 標準分析程序之濃度稀釋圖-----	28
圖 5.1.1	Acrylonitrile 之劑量關係反應曲線-----	34
圖 5.1.2	2-Chloroacrylonitrile 之劑量關係反應曲線-----	34
圖 5.1.3	Methacrylonitrile 之劑量關係反應曲線-----	35
圖 5.1.4	Methoxyacrylonitrile 之劑量關係反應曲線-----	35
圖 5.1.5	3-Ethoxyacrylonitrile 之劑量關係反應曲線-----	36
圖 5.1.6	3-Dimethylaminoacrylonitrile 之劑量關係反應曲線---	36
圖 5.1.7	Formaldehyde 之劑量關係反應曲線-----	37
圖 5.1.8	Propionaldehyde 之劑量關係反應曲線-----	37
圖 5.1.9	Butyraldehyde 之劑量關係反應曲線-----	38
圖 5.1.10	Glutaraldehyde 之劑量關係反應曲線-----	38
圖 5.1.11	3-Hydroxybenzaldehyde 之劑量關係反應曲線-----	39
圖 5.2.1	不同 model 預測 Acrylonitrile and Glutaraldehyde 混合毒性 與實際結果之 isobologram 繪製圖-----	45
圖 5.2.2	不同 model 預測 Methacrylonitrile and Glutaraldehyde 混合	

	毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖-----	46
圖 5.2.3	不同 model 預測 2-Chloroacrylonitrile and Glutaraldehyde 混合毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖-----	47
圖 5.2.4	不同 model 預測 3-Dimethylaminoacrylonitrile and Propionaldehyde 混合毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖-----	48
圖 5.2.5	不同 model 預測 Methoxyacrylonitrile and Butyraldehyde 混合毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖-----	49
圖 5.2.6	不同 model 預測 3-Dimethylaminoacrylonitrile and 3-Hydroxybenzaldehyde 混合毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖-----	50
圖 5.2.7	Probit Isobologram of Methacrylonitrile and Propionaldehyde-----	51
圖 5.2.8	Probit Isobologram of 3-Ethoxyacrylonitrile and 3-Hydroxybenzaldehyde-----	52
圖 5.4.1	Methacrylonitrile 之 HPLC 分析圖-----	66
圖 5.4.2	Formaldehyde 之 HPLC 分析圖-----	66
圖 5.4.3	Methacrylonitrile + Formaldehyde 之 HPLC 分析圖-----	66
圖 5.4.4	3-Dimethylaminoacrylonitrile 之 HPLC 分析圖-----	67

圖 5.4.5	Butyraldehyde 之 HPLC 分析圖-----	67
圖 5.4.6	3-Dimethylaminoacrylonitrile + Butyraldehyde 之 HPLC 分析圖-----	67
圖 5.4.7	Acrylonitrile 之 HPLC 分析圖-----	68
圖 5.4.8	3-Hydroxybenzaldehyde 之 HPLC 分析圖-----	68
圖 5.4.9	Acrylonitrile + 3-Hydroxybenzaldehyde 之 HPLC 分析圖	68
圖 5.4.10	Methacrylonitrile 之 HPLC 分析圖-----	69
圖 5.4.11	Propionaldehyde 之 HPLC 分析圖-----	69
圖 5.4.12	Methacrylonitrile + Propionaldehyde 之 HPLC 分析圖--	69



第一章 前言

1.1 研究緣起

隨著時代的進步，科技日新月異，每年都有數以萬計的化學物質被廣泛的使用，甚至合成新的化學物質，而最終他們也將進入我們的環境中，使得化學物質對環境的影響也日趨明顯。而工業放流的廢水中包含許多複雜的毒性化學物質，而這些毒性物質不僅對水體環境造成污染，更進而影響整個生態環境。因此，毒性評估的重要目的不僅在於保護水體環境更是為了保持生態系的平衡，然而複雜的水體環境使我們在評估污染物對其影響時，除了單一的毒性作用，更要考慮其混合時所產生的毒性效應及變化。

細菌類、藻類、魚類甚至是甲殼類等都是一般常見毒性試驗的測試物種，本研究採用生物發光菌（*Photobacterium phosphoreum*）之 Microtox 試驗其方法為 Microbics corp.^[1]所訂定之標準方法，更由於其操作簡單、耗費時間短、再現性高等優點，使之為水體環境毒化物評估之重要試驗，更因此常被使用作為其他物種的替代試驗。

行政院環保署於民國 82 年公告丙烯腈為列管之毒性化學物質，主要是由於其具有 C=C 雙鍵，於大氣中光氧化速度快速，對人體具致癌性，且為工業中常用之化學物質，往往隨工業廢水排放至水體環境中，卻極少被探討，因此本研究即以丙烯腈為主要探討對象，除了進行單一毒性測試外，更與醛類進行混合毒性試驗，探討其混合後之毒性效應。藉由兩種有機物混合毒性的研究，將其作用分成協同、相加及拮抗三類，利用其結果來評估對水體環境的影響。

1.2 研究目的

在 Chen and Yeh ^[2] 的研究中發現含氰基(-CN)有機物在與其他反應性有機物混合時，具有強烈的協同現象(synergism)，這表示此類化學物質對水體環境具有危害性，故本研究採取含氰基之丙烯腈有機物為主要研究對象，並與醛類混合，利用 Microtox 試驗來進行混合的急毒性研究。

根據單一毒性試驗之結果，將丙烯腈類及醛類物質進行混合毒性試驗，探討這兩類反應性物質混合後所產生的毒性現象，並作為混合毒性預測規則的基礎及混合毒性效應關係之研究。

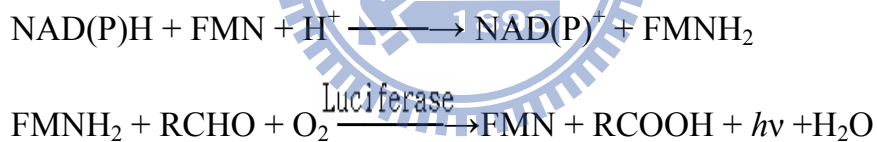


第二章 文獻回顧

2.1 *Photobacterium phosphoreum* 螢光反應

對於 *photobacterium phosphoreum* 放出螢光的反應式，以及螢光抑制的回顧，有助於了解 Microtox 毒性試驗的原理。早期觀察家認為生物螢光現象是由於組織的敗壞分解所導致的，直到 Pfluger (1875)說明這個發光的細菌是可以直接從魚類身上取下來培養的，Cohn(1878)將此菌命名為 *Micrococcis phosphoreus*，Fischer(1894)研究螢光菌後發現 *Bacterium phosphorescens*。McElroy(1956)提出發光反應的進行是由於一長鏈醛、氧分子、被還原的 FMN 以及細菌發光酶(bacteria luciferase)所組成。^[3]

此反應式為：



而 Danilov(1989)則對螢光菌作為生化試劑的功能、應用以及原理做一廣泛且深入的回顧與探討，其中提到關於螢光酶的鍵結位置(binding sites)有三種，分別能和親脂性物質以及磷酸鹽(酯)類結。另外螢光菌具有一個反應性的硫氫基，當此硫氫基被轉化後就會造成生物螢光的抑制。而第一個鍵結位置為產生螢光反應的長鏈醛之反應位置；第二個鍵結位置則為連接磷酸鹽(酯)類，連接後可能造成酵素的結構改變，導致螢光強度增強，並提高其穩定度；最後的鍵結位置則可能為反應性物質的反應位置。

2.2 丙烯腈化合物的介紹

丙烯腈是一種液態、無色、具輕度氣味且具有毒性之化學物質。而丙烯腈與其衍生物都具有相當高的溶解性，且大部分皆屬於揮發性或半揮發性之物質，因此容易逸散致大氣中，經由呼吸道、皮膚、眼睛等接觸進入人體，其與衍生物之重要物理特性如表 2.2.1。

丙烯腈屬於美國最常使用的 50 種化學物質之一，美國每年平均約生產兩百萬噸的丙烯腈，而全世界丙烯腈之生產量為每年四百萬噸，每年生產量以 3% 成長。^[4] 丙烯腈為聚丙烯腈(polyacrylonitrile, PAN)人造纖維的主要原料，在進行人造纖維的製造時，排放廢水之組成則包含了丙烯腈單體及丙烯腈聚合物等物質；而 ABS (acrylonitrile-butadiene-styrene) 樹脂為我國塑膠工業的主軸之一，其原料為丙烯腈、丁二烯及苯乙烯等。因此兩工業的製程廢水中所含之丙烯腈不但會對人體造成傷害更因其不易為微生物所分解，因此其廢水需經妥善處理，避免不慎排入天然水體中對環境及生物造成災害。故國內之放流水標準明定腈化物之最高允許排放標準濃度為 1.0 mg/L (行政院環境保護署，2004)，丙烯腈之最高暴露濃度則為 2 ppm，而許多國家也針對丙烯腈定立出法定的暴露極限^[5]，其值如表 2.2.2 所示。

Zhang^[6]指出丙烯腈為美國、中國以及德國等國家重要考量之污染物，並針對石化工業廢水中所含之丙烯腈及乙腈做水體生物的毒性試驗研究。Zhang 利用 *Daphnia magna* 對丙烯腈及乙腈探討了 21 天及 14 天的試驗時間對實驗結果的影響，發現若將標準方法所提的 21 天試驗時間改為 14 天，其慢毒性之結果並無太大之影響，因此作者認為可將慢毒性之試驗時間縮短為 14 天。而他亦針對 Acrylonitrile 替中國建立了一套排放廢水之管制標準^[7,8]，Zhang 選擇了中國當地常見之八種物種做急毒性試

驗，另外在慢毒性部分則選擇了 *Daphnia magna* 做 21 天存活率試驗、*bufo bufo gargarizans* 28 天的 Early life stage 毒性試驗以及 *Lemna minor* 做 96 小時的生長抑制測試，為丙烯腈之毒性建立了一個較完善的水體生物資料庫。

1999 年時，Zhang^[9] 又針對工業廢水中常見的四種毒性物質：丙烯腈、乙腈等做短期之慢毒性研究，Zhang 利用鯉魚(*C. carpio*)以及黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)兩種測試物種由胚胎幼體期(embryo-larval)開始為期一週的慢毒性試驗，實驗結果發現丙烯腈在兩測試物種間皆為毒性最強之化學物質。而台灣學者 Liu^[10] 亦利用 *Daphnia similis* 及 Microtox 對工業放流水做毒性的評估，發現其所分類之七大項工業放流水中，僅電鍍業及丙烯腈製造業在兩測試物種皆檢測出毒性，針對丙烯腈這類的工業放流水以 *Daphnia similis* 較為敏感，而在 5 分鐘及 15 分鐘的 Microtox 試驗則顯示較低之毒性，因此作者評估認為含有丙烯腈之工業放流水具有一定的毒性，必須做適度的監控管制。

綜合上述學者們之研究，我們更加了解到丙烯腈這類的毒性化學毒性物質是值得被重視的，然而在丙烯腈的文獻上雖然較為完整，但在其衍生物的研究卻是非常地稀少，因此針對丙烯腈類的研究是值得我們加以了解探討的。

表 2.2.1 丙烯腈及其衍生物之重要物理特性



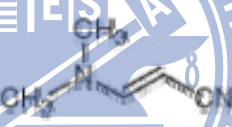

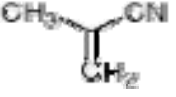

毒化物名稱/CAS NO.	分子式	亨利常數	結構式	Vapor Pressure	logP	Water Solubility
acrylonitrile (107-13-1)	C ₃ H ₃ N	0.000138 atm·m ³ /mole		109 mm Hg	0.25	7.45E+4 mg/L
2-Chloroacrylonitrile (920-37-6)	C ₃ H ₂ ClN	9.89E-5 atm·m ³ /mole		61.1 mm Hg	0.7	2.11E+4 mg/L
3-(Dimethylamino) acrylonitrile (2407-68-3)	C ₅ H ₈ N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

表 2.2.2 各國法定之丙烯腈暴露極限

Exposure limits:	
Germany (TRK-8hr)	: 3 ppm (7mg/m ³)
Austria	: 2 ppm (4.5 mg/m ³)
France (VME-8hr)	: 2 ppm (4.5 mg/m ³)
France (VLE-15 min)	: 5 ppm (11.25 mg/m ³)
Netherlands	: In the Netherlands there is no MAC value since 1997 because of the carcinogenic character of acrylonitrile. DSM uses 4 ppm as MAC.
Spain	: 2 ppm (4.5 mg/m ³)
UK (MEL)	: 2 ppm (4.5 mg/m ³)
USA (OSHA)	: 2 ppm (4.5 mg/m ³)

2.3 混合毒性研究之介紹與相關理論發展

當化學毒性物質進入生態系統中，往往不是以單一的情況存在，取而代之的則是複合的污染，因此目前生態環境所受到的污染衝擊已不再侷限於單一的毒性物質污染，因此針對單一種毒性化學物質進行研究已經無法滿足實際環境評估的需求，固混合毒性試驗也因此被發展出來。

不同的毒性物質混合後，其在生物體內所產生的毒性作用與單一之毒性物質產生作用並不完全相同；因此，藉由討論這些化學物質混合後的作用情形不僅可使我們更了解混合機制，更能進而利用其結果應用在藥物學等地方。通常混合的化學物質對生物體產生的聯合作用可分成下列三類型：^[11]

(一)、 相加作用

相加作用 (additive effect): 當多種化學物質的聯合作用等於每一種化

學物質單獨作用之總合時則稱之。一般而言，化學結構較為相近者或其毒性作用目標位置相同、作用機制相似者，較易產生此現象。

(二)、 協同作用

協同作用 (synergistic effect): 當多種化學物質的聯合作用大於每一種化學物質的單獨作用之總和時則稱之。一化學物質本身若具有毒性，其與另一毒性物質同時存在時可使該毒性物質之毒性增加時，我們稱這種作用為增強作用 (Greater than additive)，此現象對於生態系統而言是較具影響力的，在環境上的應用如殺蟲劑的使用，則是藉此來增加其毒性；另外，在藥物學上，也常利用其毒性增強的原理來使化學物質之用量降低進而達到殘留量減少的目的。

(三)、 拮抗作用

拮抗作用 (antagonistic effect): 當多種化學物質的聯合作用小於每一種化學物質單獨作用之總合時稱之，亦稱為 less than additive。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，因此此種作用又可稱為抑制作用。在環境上常常藉此作用降低毒性物質的強度來保存物種。

而混合毒性理論的發展最早是由 Bliss^[12]所提出，利用單一毒性物質之常態分布函數所做成的劑量-反應曲線之平行與否，用來判斷混合毒性效應為 similar joint action 或 independent joint action。其後 Hewlett and Plackett^[13]提出非交互作用混合毒性理論，屬於二維模式，此理論之限制條件是只能有兩種毒性物質同時進行混合毒性試驗，並且兩種毒性物質不會有交互作用之產生，也就是兩個毒性物質之間不可能發生彼此競爭受體之

鍵結位置的情形，並假設受體反應與劑量間的關係呈一常態分布。而 Christensen and Chen^[14]擴展此理論成為多維空間，並選用 Probit、Logit、Weibull 三種劑量-反應模式來分析，將混合毒性的理論推展至可處理多種毒性物質間的混合其反應劑量關係也不侷限於常態分布。

2.4 QSARs 模式在環境毒物學上的應用

QSARs 模式在環境毒物學上發展應用主要分為兩大類，其一為針對不同的試驗物種或不同種類的有機物質發展各種形式的 QSARs 模式，其二則為運用 QSARs 模式對有機物質的分類來作為預測混合毒性效應之基礎。

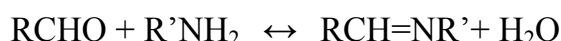
Lipnick^[15]的研究中，針對 logP QSAR 模式無法準確做毒性預估之反應性有機物質，依其毒性作用機制不同可分成四大類，其四類分別為：親電性(electrophile)、前親電性(pro-electrophile)、cyanogenic non-electrolytes 及 multistep multiplem；而本研究所選用之腈類及醛類即屬於 cyanogenic toxicity 及 electrophile toxicity。相關研究如 Cronin and Schultz^[16]選擇非反應性毒性作用(酮類)及反應性的親電性毒性(醛類)及前親電性毒性(α , β 不飽和醛類)三種作用機制對於 Microtox 試驗建立一 QSAR 模式。

腈這類毒性物質主要含有 $C\equiv N$ 基，而其毒性作用方式主要分為兩種：一種為經由 cyanohydrin-type functionality 的水解作用所釋放出之氰酸離子， $C\equiv N^-$ ，另一種方式則是經由單氧分解酵素(monooxygenase enzymes)的活化後，釋放出氰離子而造成之毒性。

親電性反應性有機物，其毒性作用機制主要在於所擁有之親電基

(electrophilic group)能和生物體內大分子上的硫氫基等親核部分(nucleophilic moiety)，產生取代反應(substitution)或相加反應(addition)，改變原生物組成，使得原生物功能受到抑制，如抑制酵素功能而形成毒性。而醛類則為另一類型之親電性毒性作用機制，其所進行之作用為 Schiff-base formation。

以其與胺基進行反應為例：



其中，RCH=NR'則稱為 Schiff base。

2.5. 腈類及醛類化合物之混合毒性

由於現今化學物質廣泛的被使用，因此在環境中其往往是以混合的方式存在，而以下之學者則利用了腈類與醛類兩種毒性物質，做一混合毒性的討論。

Lin *et al.*^[17]利用 *photobacterium phosphoreum* 對 6 種不同的腈類和 8 種不同的醛類做一混合毒性之研究，作者主要目的在於使用實驗得知之 IC₅₀ 值，作為混合毒性之預測模式，而在實驗中可看出腈類與醛類的混合毒性試驗，主要呈現協同及相加之作用。

Chen & Chiou^[18]研究反應性與非反應性的混合毒性試驗中發現一個新的混合毒性之協力作用(joint action)，稱之為 complex joint action，此一作用主要發生在兩個毒性物質之劑量-反應曲線斜率相差極大時，兩者有較強烈的毒性減弱之現象，且具有不規則之等效應曲線(isobologram)，可發現一種毒性物質對另一種毒性物質具解毒功能。而 Chen & Yeh 在 1996 時

針對反應性的毒性化學物質之混合毒性上，發現上述之 complex joint action 仍然存在。

而 Chen & Huang^[19]亦利用反應性毒性化學物質腈類與醛類進行 Microtox 的混合毒性試驗，其結果發現當與 malonitrile 混合時主要呈現協同作用，且與甲醛混合時更具有強烈毒性增強之現象；反之，在與 acetonitrile 混合時，則幾乎都呈現拮抗之作用。造成此結果的主要原因在於 acetonitrile 屬於劑量-反應曲線斜率斜率大的物質，即表示生物對此類化合物的最高容忍濃度到完全抑制僅在一狹小範圍內，也由於其劑量-反應曲線斜率過大，因此在與其他有機物混合時，發生了 complex joint action 而導致此結果。另外 Chen^[20]在藻類的毒性試驗中，利用藻類的生長速率 (algal growth rate) 及溶氧 (dissolved oxygen) 的產生來當做其測試終點，亦發現相同之情形。

針對腈類與醛類混合研究中，Chen & Huang^[19]利用魚毒試驗與 Microtox 試驗做比較，發現不同的試驗物種其混合毒性之效應是有所不同的。而 Chen & Lu^[21]則利用了 *E.coli* 做混合毒性的試驗，並與 Microtox test 做比較；以腈類和醛類之單一及混合毒性試驗來說，我們可發現相同的化學性有機物質在單一毒性試驗中，*E.coli* 與 Microtox 所表現出來的毒性及劑量-反應曲線斜率不僅不同，甚至有極大的差異，而在混合毒性試驗中其結果也因此大相逕庭的。這也說明了對於不同的試驗物種中，其毒性試驗結果也會有所不同，因此當我們在對化學物質做環境水體的毒性試驗時，選用多種物種來做試驗是有其意義的。

Lin *et al.*^[22]也針對醛類與腈化物做一混合毒性之試驗，並利用 HPLC 來做分析進而得知 malonitrile 與 *p*-nitrobenzaldehyde 混合後會產生新的物質 *p*-nitrobenzoic acid，且發現當腈化物與苯甲醛類混合時，其轉換成酸的能力愈強其協同之效應也越明顯；有趣的是，造成協同作用的現象並非是兩化合物混合時產生一更毒之化合物，因為 *p*-nitrobenzoic acid 的毒性較

ρ -nitrobenzaldehyde 來得弱，另外作者也利用 ρ -nitrobenzoic acid 與 malononitrile 或 ρ -nitrobenzaldehyde 互相混合以及三者相混，結果皆呈現相加作用之情況，而 Nakamura^[23]曾提出 *photobacterium phosphoreum* 之 luciferase 受 pH 的影響，其螢光訊號在 pH6-8.5 時最為穩定，當 pH<6 或 pH>8.5 時，螢光訊號則開始減弱，因此當 ρ -nitrobenzoic acid 產生時，同時也降低了其 pH 值，因此抑制了酵素之活性，故作者認為此為 malononitrile and aldehydes 混合時造成協同作用的主要原因。

由上述學者們的研究中可以了解，在腈類與醛類的混合毒性上，主要會有毒性增強的現象發生，因此，研究同為腈類的丙烯腈這類化合物與醛類混合後產生之效應則有其必要性。

2.6 混合毒性之 CA & IA model 研究

在預測混合毒性之理論中，最常被使用的就是 Concentration addition model (CA) 及 Independent action model (IA)。^[24.25] Concentration addition 一般而言即表示毒性物質在生物體上作用於相同之位置且毒性作用機制相似，並定義其混合後之總毒性為毒性物質其個別毒性之相加。以數學模式表示如下：^[26]

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{xi}} = 1$$

其中 n 代表化學物質混合的數量， EC_{xi} 表示化學物質 i 在單一毒性試驗中造成 x%抑制的 EC 值濃度， c_i 表示化學物質 i 在混合毒性試驗中所之濃度， c_i/EC_{xi} 則代表化學物質 i 之毒性單位(toxic unit)。

而 Independent action 則定義為毒性物質在生物體上之作用位置不同。以數學模式表示如下：

$$\begin{aligned} E(c_{\text{mix}}) &= E(c_1 + \dots + c_n) \\ &= 1 - \prod [1 - E(c_i)] \end{aligned}$$

其中 $E(c_{\text{mix}})$ 代表混合毒性的效應的抑制率，其值介於 0-1 之間， c_i 表示化學物質 i 之濃度， $E(c_i)$ 則表示化學物質 c_i 濃度下，在單一毒性試驗中所造成抑制效應的比率。舉例來說，當 $E(c_i)=0$ 時，表示化學物質不產生抑制效應，因此在混合毒性預測上 $E(c_{\text{mix}})$ 相對也等於 0。

Lin *et al.* (2004) 利用麻醉性及反應性化學物質，做一混合毒性的研究，作者認為 CA model 是可展示毒性化學物質混合後的效應。另外，對於反應性物質互相混合時呈現相加作用，這是由於反應性物質並沒有發生交互作用。

CA & IA model 常使用在環境風險評估上，用來預測化學物質的混合毒性效應。Backhaus *et al.*^[27] 選用 14 種殺蟲劑及抗菌劑等，利用生物發光菌 *vibrio fischeri* 進行 Microtox 試驗，作者發現利用 CA model 來預測會過分高估實際毒性，反之，利用 IA model 來預測則較符合實際之結果。因此，作者認為在環境風險評估的預測上，CA model 是較適合被使用的，因為 CA model 是以一個最壞的情況去估計化學物質混合後之毒性。

Olmstead & LeBlanc^[28] 也利用 *Daphnia magna* 對多環芳香族 (PAHs) 做一混合毒性試驗與 CA 及 IA model 預測做討論，同樣作者發現，CA model 較易過分高估化學物質混合後之毒性，IA model 則較符合實際結果。不僅上述作者，Arrhenius *et al.*^[29] 也同樣發現 CA model 過分高估毒性，因此認為 CA model 較適合利用在環境風險評估上。另外 Martin *et al.*^[30] 只選用 IA model 來作混合毒性試驗的預測，而 IA model 結果依然是低估了實際的混

合毒性效應，因此作者認為使用 CA model 來預測混合毒性並作為環境評估是需要進行研究的。

Cedergreen *et al.*^[31] 利用了生物發光菌 *vibrio fischeri*，水蚤 *daphnia*，月芽藻 *P.subcapitata* 及浮萍 *Lemna minor* 四種試驗物種，針對 Prochloraz 與殺蟲劑做混合毒性之研究，作者發現，在預測混合毒性的時候，除了看化學物質之作用機制與作用位置外還需考慮斜率，此篇研究中，作者選用 log-logistic model^[32] 來計算毒性物質之 EC₅₀ 值，利用 log-logistic model 所得之個別毒性物質斜率值做分類，當劑量-反應曲線斜率大於 1.25 時，CA model 有較佳的預測能力；反之，當劑量-反應曲線斜率小於 1.25 時，IA model 則有較佳之預測能力。而針對生物發光菌 *vibrio fischeri* 的部分來說，Prochloraz 與殺蟲劑混合之後，主要呈現協同之作用反應，而在 model 的預測中，也較符合 IA model 的預測，在此情況下，IA model 預測之毒性將大於 CA model 所預測之毒性，而此結果也與以往學者們所提出 CA model 較易高估毒性是有所不同的，因此在探討 CA 與 IA model 的預測能力時，毒性物質的劑量-反應曲線斜率也將會是影響結果的主要原因之一。

不同於上述作者之描述，本研究利用劑量-反應曲線斜率、相關係數及相似係數來作為預測混合毒性效應的參數，並將 IA model 又細分為 NA、RM 及 RA model。其中上述學者所使用之 IA model 則為本研究中分類之 RM model。Chen and Huang^[19] 也發現當化學物質其毒性混合效應為協同作用時，CA model 並不適用於保護水體環境，因此本研究中將探討 CA 及 IA model 在預測混合毒性效應上之適用性。

第三章 基本理論

3.1 毒性物質劑量-反應模式

毒性試驗過程中，實驗物種之某一生命跡象(如螢光發光強度、攝氧率、移動能力等)造成 50%的抑制率時所需要的毒性物質濃度稱為 EC_{50} 。劑量反應曲線為受體生物受到毒性物質作用的時候，隨著毒性物質濃度而呈現之 S 型曲線關係圖，但由此 S 型曲線來求取 EC_{50} 並不容易，因此必須藉由一些模式將此 S 型曲線轉換成直線的型式以便求取。不同的模式根據的理論基礎不同，因此同一組數據會因不同模式的分析而使結果有所差異，拿生物試驗來說，不同生物對於毒性物質容忍度也不盡相同，若以不適當之反應模式計算，可能導致實驗點與理論點間變異過大，所得結果則相當可議，故處理數據時須判斷最適合之使用模式。一般常見的毒性劑量-反應模式為 Probit、Weibull 及 logit 三種，Christensen(1985)曾對三種模式做比較，此三種模式是依據不同的假設發展而成的，Probit 為假設受體生物對於毒性物質的容忍度為一常態分布，具有統計上的意義，Weibull 則是毒性物質與受體生物間產生化學鍵結關係之假設，最後 Logit 則是與 Monod Equation 相似，假設毒性反應形式如同某種酵素的反應。而針對 *Photobacterium phosphoreum* 之劑量-反應關係上的適用性，根據葉(1994)所做之研究顯示，Probit 模式在三者中有較佳的適用性，本研究則以其來進行毒性數據之分析。

Probit 模式主要假設為受體生物對於毒性物質的容忍分布呈常態分布 (Log-normal distribution)，其主要是將 S 型之劑量-反應曲線轉換成 NED(Normal equivalent deviation) scale 上的一直線，原來劑量-反應曲線 50%

反應率之處對應到 NED scale 上為 0，84.1%反應率之處對應為 1，而 NED scale 之座標值加 5 極為 Probit 的座標，Probit 單位和反應率與毒性物質劑量間的轉換關係如下：

$$Y = a + b \log Z \quad (3-1)$$

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

$$Y = \text{NED} + 5 \quad (3-3)$$

其中 Y 為 Probit 單位，Z 為毒性物質之劑量濃度，P 為反應率，erf 則為 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(1959)所提出，為一個二維的模式，其限制條件為毒性物質間不能有交互作用產生，意即毒性物質與生物體內受體(receptor)結合不會影響其他毒性物質與生物體內受體之結合及毒性機制。經多位學者補充後，Christensen & Chen(1985)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，即物種之存活率)為：

$$Q = \Pr \left(\delta_1 \frac{1}{\lambda_{12}} + \delta_2 \frac{1}{\lambda_{12}} \leq 1 \right) \quad (3-4)$$

$$\delta_i = \frac{Z_i}{\bar{Z}_i} \quad (3-5)$$

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 ρ 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

λ ：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 λ 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

非交互作用混合毒性模式只能描述毒性相加及毒性減弱作用兩種混合毒性效應，而 Hewlett(1969)提出交互作用混合毒性模式用以描述混和毒性效應的毒性增強作用，以彌補此一缺陷。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 λ 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，因此認為相似係數 λ 不只介於 0 至 1，

而是從 0 到無限大， λ 愈趨近於 0 為毒性減弱作用， λ 等於一為毒性相加作用， λ 大於一則為毒性增強作用，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從積分區間來看則定義式為：

$$\frac{1}{\delta^{\lambda_{12}}} + \frac{1}{\delta^{\lambda_{21}}} \leq 1 \quad , \quad \lambda_{12} > 1 \quad (3-6)$$

3.2.3 混合毒性效應與 ρ 、 λ 之關係

在預測混合毒性效應時， ρ 和 λ 為混合毒性效應的指標參數， ρ 即是相關係數，主要與生物體有關，一般而言，當物種奇異度越高， ρ 就越趨近於零，單一物種時， ρ 則趨向於 1 或 -1，而物種的健康情況或年齡皆會影響 ρ 值，而當 $\rho = 1$ 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。 λ 則是相似係數，主要則與化學物質有關，通常當作用在同一位置，毒性作用機制相同時 λ 會趨近於 1。而將相關係數 ρ 與相似係數 λ 互相對配對下，得到的混合效應模式主要可分為四種，分別是 Concentration Addition (CA)、No Addition (NA)、Response Multiplication (RM)、Response Addition (RA)，如表 3.2.1 所示。

表 3.2.1 基礎混合效應模式之定義

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

3.3 混合毒性效應指標

3.3.1 混合毒性單位



混合毒性單位定義如下：

$$TU = \sum_{i=1}^n \frac{Z_i}{\bar{Z}_i} \quad (3-7)$$

其中 Z_i 為毒性物質 i 於混合毒物中的濃度， \bar{Z}_i 為毒性物質 i 在單一毒性試驗中的對生物體造成特定抑制的濃度， n 則是代表在混合毒性試驗中所選取之單一毒性物質的個數。

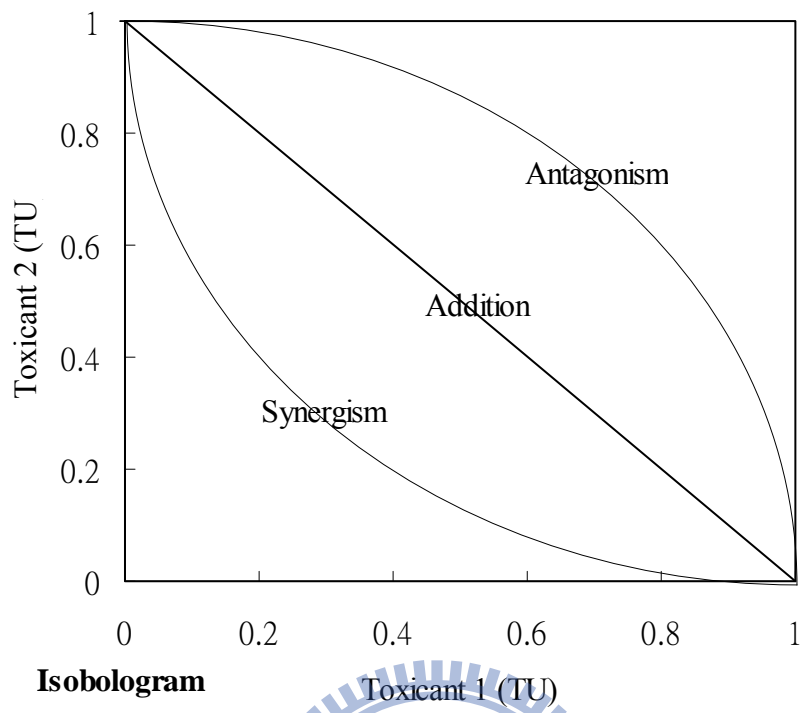
而混合毒性單位 $TU > 1$ 時，代表混合毒性效應為毒性減弱 (antagonistic)；若混合毒性單位 $TU = 1$ 時，代表混合毒性效應為毒性相加

(additive)；若混合毒性單位 $TU < 1$ ，則表示混合毒性效應為毒性增強 (synergistic)。

3.3.2 Isobologram

將混合毒性試驗中的兩種毒性物質取不同的毒性單位比例加以混合，在一個固定的抑制率或死亡率(如 EC_{50})下，以不同的混合比例所繪出之等抑制率或死亡率曲線，即稱為 Isobologram。

Isobologram(如圖 3.1)的兩軸分別代表二種混合之毒性物質個別的毒性單位，若畫出之曲線為通過(1, 0)及(0, 1)的直線，則其混合毒性單位將不受任何毒性單位比例混合之影響均為 1，即判定混合毒性效應為毒性相加作用；偏離原點的曲線代表混合毒性效應減弱，混合毒性單位大於 1；而偏向原點的曲線則代表混合毒性效應增強，其混合毒性單位則小於 1。



Isobologram



圖 3.3.1 Isobologram 示意圖

第四章 實驗設備與方法

4.1 儀器與藥品

(1) 純水製造設備：

依序包括過濾(0.3 μm filter column, Millipore; 飲水機用過濾器, 原廠), 逆滲透(Mill-RO Plus 10, Milipore), RO 儲水桶(60L container, Nalgene), 蒸餾裝置(Aquatron A4S, Bibly), 蒸餾水儲水桶(60L, container, Milipore), 以及去離子水製造機(Milli-Q Plus, Milipore, outflow resistivity 18.2 M Ω cm)

(2) Microtox 毒性試驗之設備及試劑：

1. 微毒測量儀(Microtox Model 500, Microbics corp.)：此儀器為進行 Microtox 毒性試驗的主要設備，主要由 30 個培養槽(incubator)、1 個 reagent well、1 個 read well 以及控溫和螢光偵測裝置所組成的，實驗時將 30 個培養槽控制於 15⁰C，而 reagent well 則維持 5⁰C，read well 則是利用螢光偵測裝置，來偵測 *photobacterium phosphoreum* 的螢光發光值。
2. Microtox reagent：螢光菌(*photobacterium phosphoreum*)冷凍乾燥而成之試劑，存放於-20⁰C 之冷凍庫中。
3. Microtox Reconstitution Solution：此溶液為經處理過之無菌水，用於活化還原冷凍乾燥之螢光菌，冷藏保存。
4. Microtox Osmatic Adjusting Solution(MOAS)：此滲透壓調節液為 22%之 NaCl 溶液，用途在於調節樣品之 NaCl 濃度至 2%，使其滲

透壓與螢光菌的滲透壓相等，冷藏保存。

5. Microtox Diluent Solution：此溶液為 2%之 NaCl，作為樣品稀釋時之稀釋液，亦冷藏保存。
6. Microtox test cuvettes：為 Microtox 毒性試驗專用之小試管，使用後拋棄不回收，Microbics 製。
7. Micropipette：此實驗中轉移螢光菌、試劑及樣品所用之 Micropipette 分別為 Transferpette 1-5 mL，Transferpette 0-1 mL，Transferpette 0-200 μ L，Transferpette 0-100 μ L，Transferpette 0-10 μ L 五種。

(3) 有機藥品：

1. 丙烯腈類

Acrylonitrile

(純度：99.9%，廠牌：Alfa Aesar，供應商：友和)

Methacrylonitrile

(純度：99%，廠牌：Merck，供應商：Merck)

Methoacrylonitrile

(純度：95%，廠牌：TCI 東京化成工業，供應商：景明)

3-Ethoxyacrylonitrile

(純度：98%，廠牌：TCI 東京化成工業，供應商：景明)

2-Chloroacrylonitrile

(純度：99%，廠牌：TCI 東京化成工業，供應商：友和)

3-Dimethylaminoacrylonitrile

(純度：95%，廠牌：ACROS，供應商：Merck)



2. 醛類

Formaldehyde

(純度：37%，廠牌：Merck，供應商：Merck)

Propionaldehyde

(純度：100%，廠牌：Fluka，供應商：友和)

Butyraldehyde

(純度：99%，廠牌：ACROS，供應商：Merck)

Glutaraldehyde

(純度：50%，廠牌：Fluka，供應商：友和)

3-Hydroxybenzaldehyde

(純度：99%，廠牌：Merck，供應商：Merck)

(4) 定量分析：

利用 TOC (Total Organic Carbon) 針對化學物質做濃度之定量。



4.2 Microtox 單一及混和毒性試驗方法

在單一物質毒性試驗部分，首先對於選取之有機毒性物質，查閱文獻之 EC_{50} 值已供配藥時參考，若無法查得，則進行 range finding 的試驗，以 10 倍的稀釋倍率，求取 EC 值所在的可能範圍，之後再將毒性物質配製成適當的濃度進行分析。

Microtox 毒性試驗的操作步驟基本上是遵循原廠公司(Microbics Corp.)所推薦之標準方法(Microtox operation manual)，並以等倍率的方式將毒性物質稀釋。以下將簡單說明之：

1. 如圖 4.2.1 所示，微毒測量儀上有 30 個培養槽(incubators)、1 個 reagent well 及 1 個 read well，實驗時除了控制組之外，將做六管等倍稀釋溶液取代標準方法之四管等倍稀釋溶液，以得到最小百分之九十五的 EC₅₀ 可信賴區間。
2. 實驗前須先開機使溫度達穩定方能作業，首先將一瓶乾燥冷凍之螢光菌以 1mL 之再生液活化後，置於 reagent well；在 A1-A4 及 C1-C2 加入 1mL 之 diluent solution，B1-B5 及 D1-D2 則加入 0.5mL 之 diluent solution 及 10μL 的 reagent，待 15 分鐘後紀錄其 I₀ 值(初始螢光值)，而 C2 則加入 2.5mL 的樣品溶液及 250μL 的 MOAS。
3. 將 C2 中的樣品與 MOAS 均勻混合後，從 C2 中取出 1mL 加入 C1，C1 中再取出 1mL 加入 A5，以此方式用等倍率方法稀釋至 A2，A1 則為控制組。
4. 將 B1-B5 及 D1-D2 放入 read well 讀取螢光發光值，紀錄 0 分鐘之初始螢光值(I₀)，之後分別由 A1-A5 及 C1-C2 各取 0.5mL 加入 B1-B5 及 D1-D2，並分別在 5 及 15 分鐘紀錄 B1-B5 及 D1-D2 之螢光發光值(I₅ 及 I₁₅)。

實驗結束後，利用 Control 組將螢光菌(*photobacterium phosphoreum*)之螢光存活率 Q(不反應分率，non-response fraction)修正為：

$$Q = \frac{\frac{A_x I_t}{A_x I_0}}{\frac{A_0 I_t}{A_0 I_0}}$$

上式中，

A_{xIt} ：實驗組在時間 t 的螢光讀值

A_{xI0} ：實驗組在時間 0 的螢光讀值

A_{oIt} ：控制組在時間 t 的螢光讀值

A_{oI0} ：控制組在時間 0 的螢光讀值

螢光發光值數據主要是紀錄各個稀釋倍率的樣品和控制組於實驗剛開始時和十五分鐘後的發光值，代入上式計算螢光存活率之後，再以 Probit 模式來求得各毒性物質對於螢光菌螢光發光值造成 50%抑制時所需要的濃度，此值即為該毒性物質之 EC_{50} 值。

而混合毒性試驗部分，則事先求得各單一有機毒性物質之 EC_{50} 值之後再將兩種有機毒性物質以毒性單位 1:1 的方式混合，每次混合試驗時，都先進行各別的單一毒性試驗，以得到最能代表當次毒性試驗條件的毒性試驗結果，以修正不同瓶螢光菌試劑的差異。若需繪製 Isobologram 時，則兩種有機毒性物質分別以毒性單位 1:0、3:1、1:1、1:3 及 0:1 的比例混合。

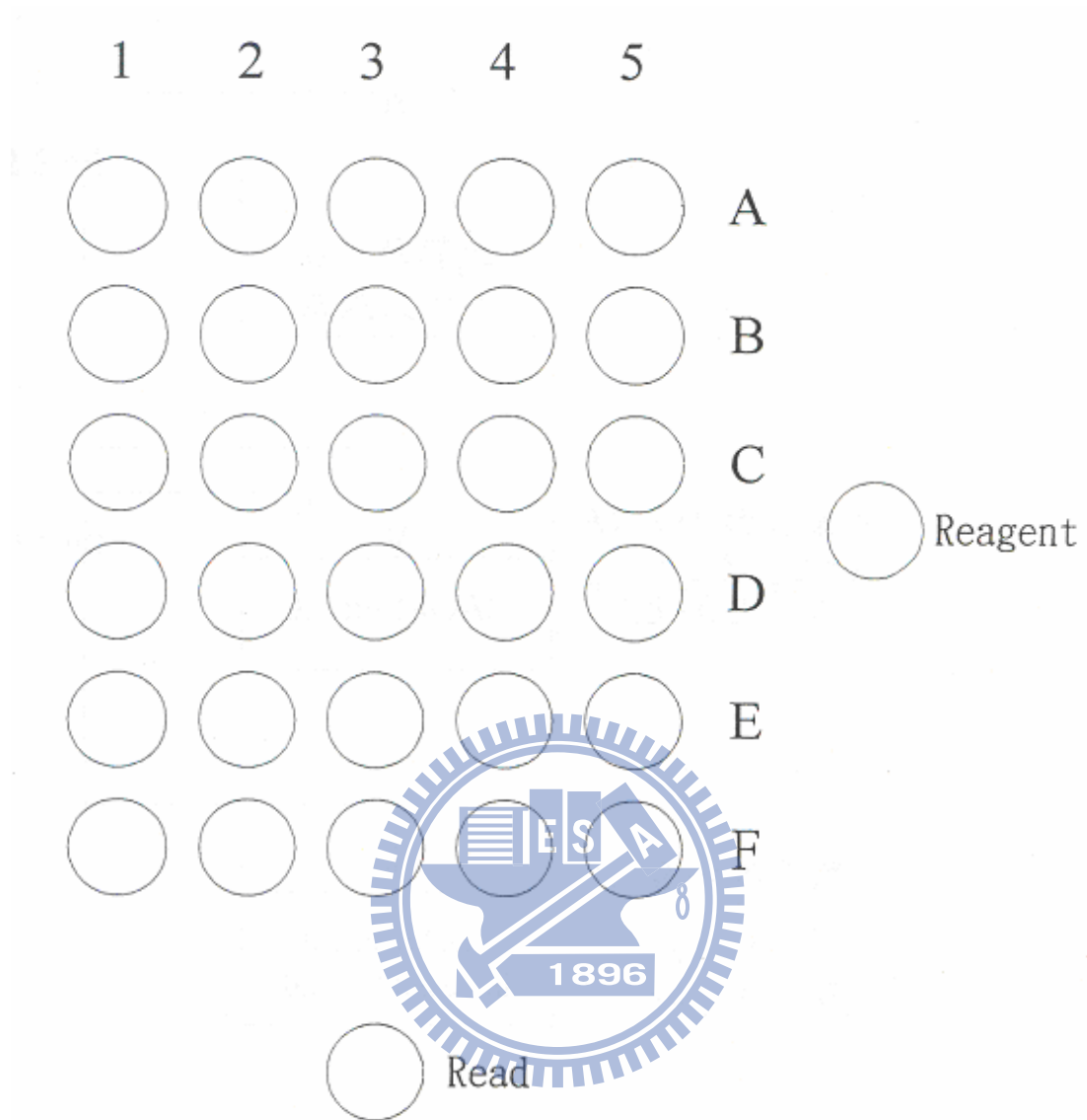


圖 4.2.1 Microtox 螢光快速分析儀 32 個槽相關位置圖

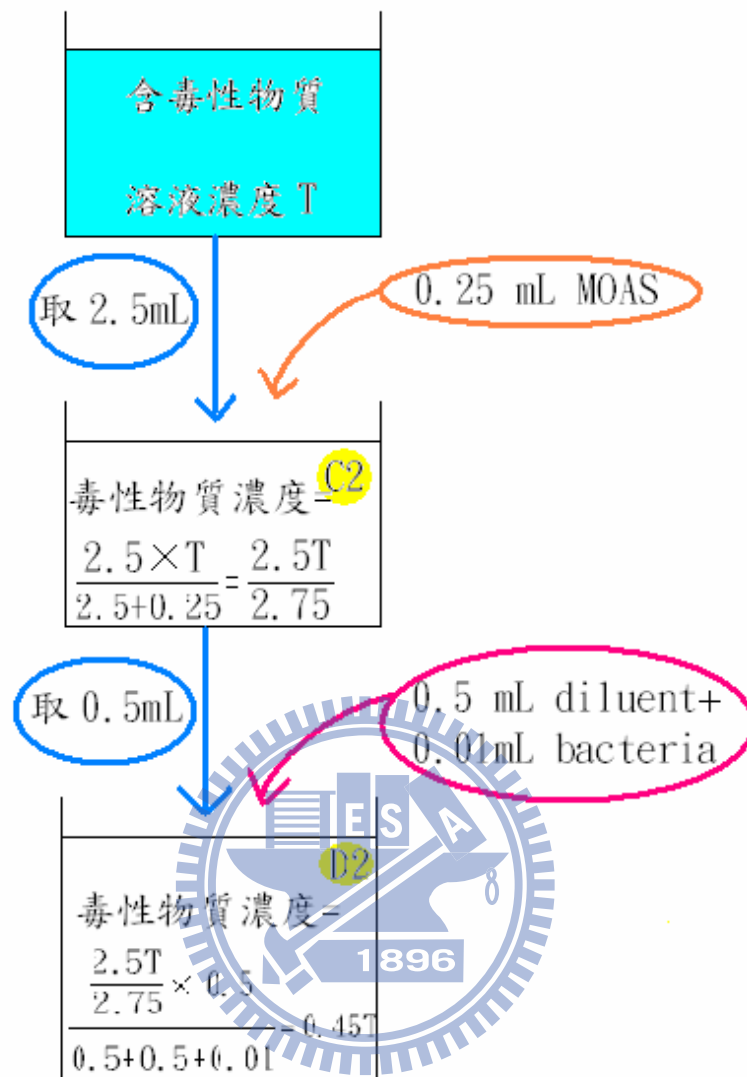


圖 4.2.2 Microtox 標準分析程序之濃度稀釋圖

4.3 數據處理

4.3.1 Probit 模式

此模式主要是用來計算毒性物質之 EC_{50} 值，在 Microtox 試驗時，經由前述之計算式，算出螢光菌暴露於各個不同的毒性物質濃度下之 15 分鐘螢光存活率，之後再將各個毒性物質濃度及其所對應之螢光存活率鍵入 Probit 模式中，即可求出該毒性物質之 EC_{50} 值。



4.3.2 混合毒性單位

混合毒性試驗結果，如上述之模式分析其造成 50%抑制率的混合濃度，求得造成 50%抑制反應的混合毒性單位(Toxic unit)及毒性單位的 95%可信賴區間(confidence interval)。

一般而言，當混合毒性單位大於 1，混合毒性效應為拮抗作用(antagonistic)；而混合毒性單位等於 1 時，為相加作用(additive)；反之，若混合毒性單位小於 1 則為協同作用(synergistic)。本研究採用一更嚴謹之方式，若由 Probit 模式求得之 EC_{50} 值之 95%可信賴區間所推得之混合毒性單位包含 1，則判定為毒性相加作用；若 95%可信賴區間均大於 1 裁判

定為拮抗作用；反之，95%可信賴區間均小於 1 才判定為協同作用。

4.4 HPLC 儀器分析

(1) 前處理：

HPLC 開機後，進行校正程序，去除幫浦管線中之氣泡，以減少誤差。

(2) HPLC 操作步驟：

本實驗所使用之 HPLC 之偵測器為 RI (Refractive Index Detector)，使用管柱為 C₁₈（型號：SymmetryShieldTM RP₁₈, 5mm, 4.6×150mm Column），開機後使用乙腈(acetonitrile)與水體積比 40%：60%之配製溶液以流速 0.2 mL/min 流洗至少 3 小時，待 RI 完全穩定後方可進行實驗。實驗進行時，在 RI 之設定上，其溫度控制在高於室溫 5°C，敏感度設定為 512。

實驗操作時，所選用之滯留時間(Run time)為 10 分鐘(滯留時間隨不同分析物質改變而改變)，樣品注射量為 10μL，mobile phase 流速為 1mL/min，所有化學樣品之濃度皆為 500 mg/L，僅 Butyraldehyde 之濃度為 1000mg/L。

在進行實驗時，於電腦上輸入所要分析之毒物與日期。利用注射針頭取出樣品打進注入孔中，開始進行分析。分析結束後，即可在電腦螢幕上

觀測脈衝(Peak)之變化情形，則可以進一步得知樣本中所含物質之種類及濃度。對照單一毒性物質樣本與混合之毒性物質樣本，即可觀測毒性物質混合後之變化之情形。

實驗結束後同樣使用乙腈(acetonitrile)與水體積比 40%:60%之配製溶液以流速 0.2 mL/min 流洗約 1 小時後方可關閉。待流洗完成後，再將儀器及電腦關閉。



第五章 結果與討論

5.1 Microtox 單一物質毒性試驗結果

在進行 Microtox 混合毒性試驗時所同時進行單一毒性物質之毒性試驗之歷次結果，以 Probit 模式表示，包含歷次試驗所得之 EC_{50} 及轉換式斜率皆列於表 5.1.1，從表 5.1.1 中可以發現，丙烯腈類就毒性方面而言，以 2-Chloroacrylonitrile 毒性最強，Methoxyacrylonitrile 毒性最弱；醛類則以 Glutaraldehyde 毒性最強，Propionaldehyde 毒性最弱。而圖 5.1.1 至圖 5.1.6 為 6 種丙烯腈類單一試驗結果之劑量-反應曲線圖，圖 5.1.7 至圖 5.1.11 則為 5 種醛類的單一試驗結果之劑量-反應曲線圖。

在丙烯腈類的單一毒性結果中，以 2-Chloroacrylonitrile 毒性最強，並可發現其毒性遠遠超過其他丙烯腈類，而已歐盟所訂定之毒害標準分類來看，其被分類為 toxic to aquatic life，這也表示當其出現在環境水體時，對生態的影響也是較為嚴重的，而其他丙烯腈類則在毒性試驗中對於物種不具特別明顯之強烈毒性，但其在危害分類中仍屬於第六類之毒性化學物質，且丙烯腈類對哺乳類動物具有較強的毒性傷害^[4]，因此也是我們不可忽略之一環。

另外，也可發現丙烯腈類及醛類，其劑量-反應曲線之斜率皆偏小；而 Chen & Lu^[21] 研究中也指出，針對劑量-反應曲線斜率小的腈類物質與同是劑量-反應曲線斜率小之醛類相混時，會出現協同作用的現象，因此，在對於皆屬於小劑量-反應曲線斜率之丙烯腈類與醛類之混合反應，若出現在水體中時，更值得被密切監測注意的。

針對 Microtox 單一毒性實驗回歸分析結果加以統計，其標準偏差約在

0.04 到 0.22 左右如表 5.1.1 所示。有機物毒性實驗再現性不佳，主要的因素在於有機物具有揮發性高及溶解度低的特性，造成有機物極易從水溶液中逸失之現象，因此毒性試驗中操作過程的微小差異皆可能影響實驗結果，而 Microtox 試驗為非密閉式的實驗環境，更助長了此一趨勢。

表 5.1.1 單一毒性物質資料表

Toxicants	n ^a	EC ₅₀ ^b (mg/L)	SD ^c (mg/L)	CV ^d (%)	Slope
Acrylonitrile	3	900.47	36.18	4.01	1.58
2-Chloroacrylonitrile	6	2.89	0.63	22.13	1.28
Methacrylonitrile	6	1062.4	140.84	13.25	1.48
Methoxyacrylonitrile	4	1423.85	70.95	4.98	1.30
3-Ethoxyacrylonitrile	4	393.40	40.86	10.38	1.16
3-Dimethylaminoacrylonitrile	4	341.77	32.06	9.38	1.20
Formaldehyde	5	5.29	0.71	13.49	1.43
Propionaldehyde	5	239.31	42.02	17.55	1.71
Butyraldehyde	5	109.53	11.89	10.85	1.85
Glutaraldehyde	7	3.27	0.61	18.58	1.49
3-Hydroxybenzaldehyde	5	11.87	0.64	5.38	1.15

^a n = sample size

^b EC₅₀ = Microtox 15-min EC₅₀ values

^c SD = standard deviation of EC₅₀

^d CV = percent coefficient of variation of EC₅₀

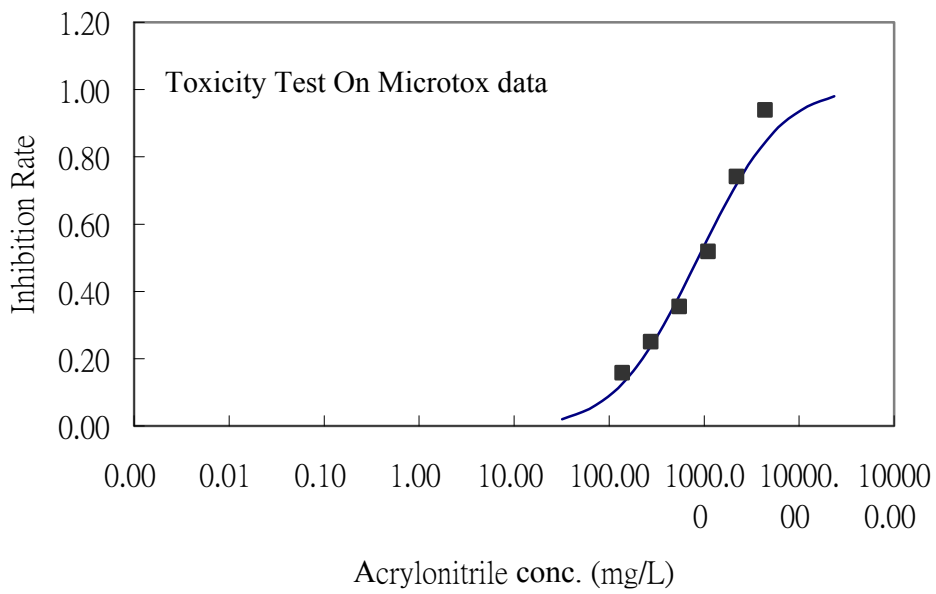


圖 5.1.1 Acrylonitrile 之劑量-反應曲線

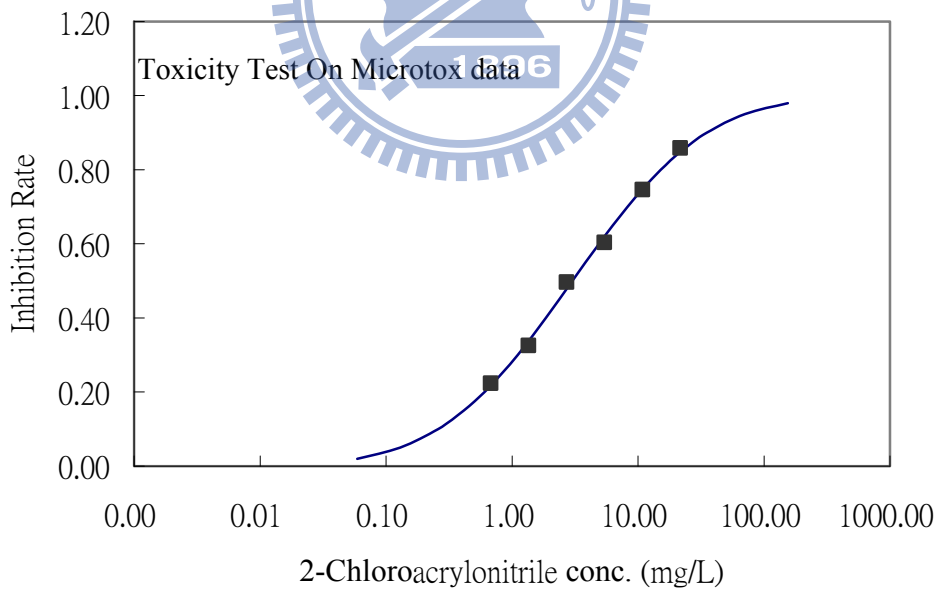


圖 5.1.2 2-Chloroacrylonitrile 之劑量-反應曲線

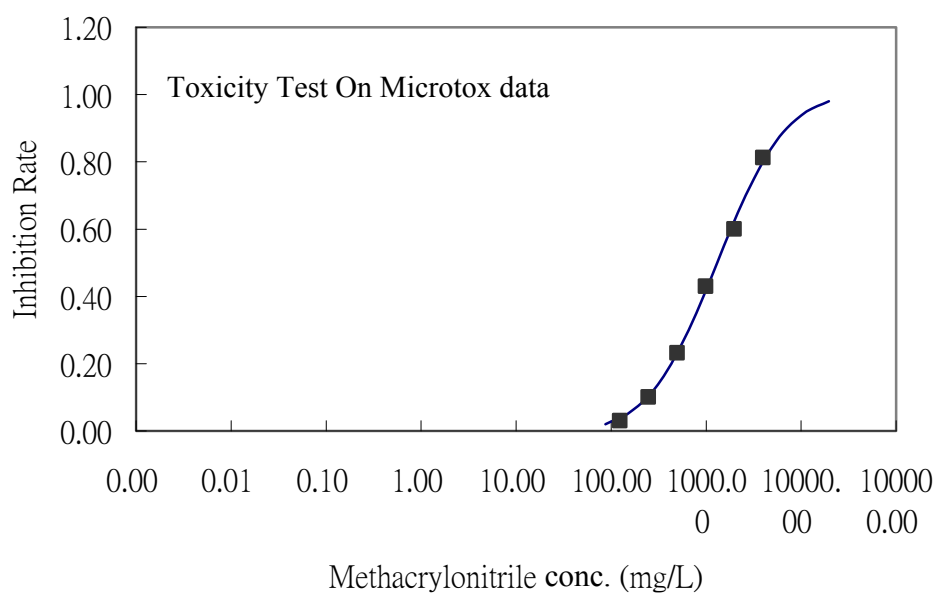


圖 5.1.3 Methacrylonitrile 之劑量-反應曲線

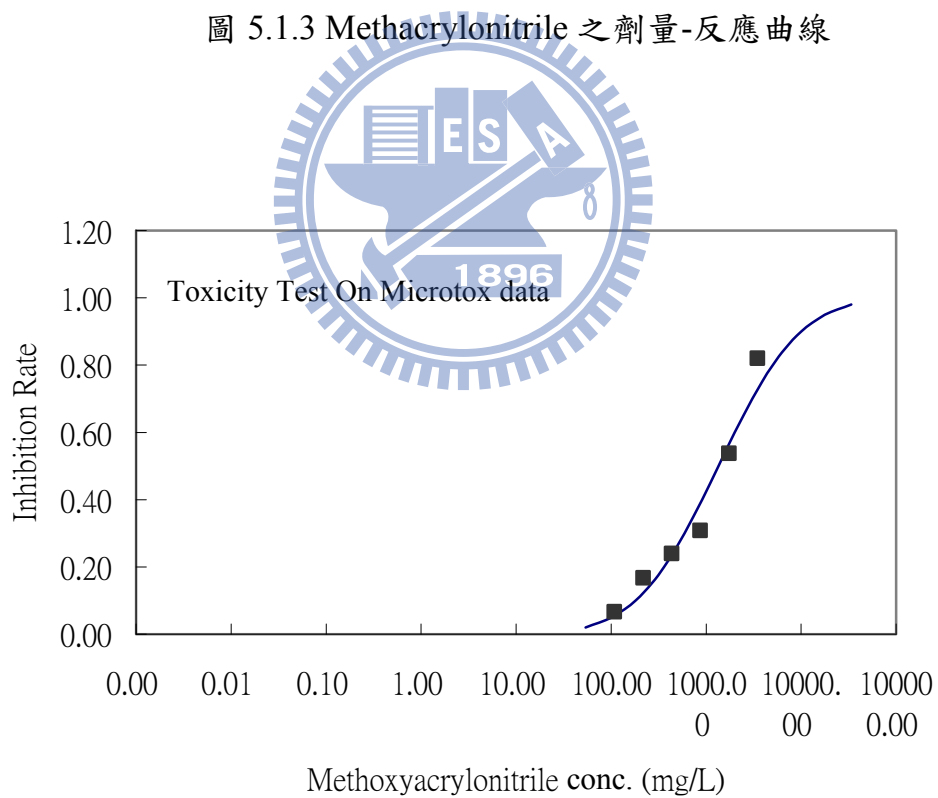


圖 5.1.4 Methoxyacrylonitrile 之劑量-反應曲線

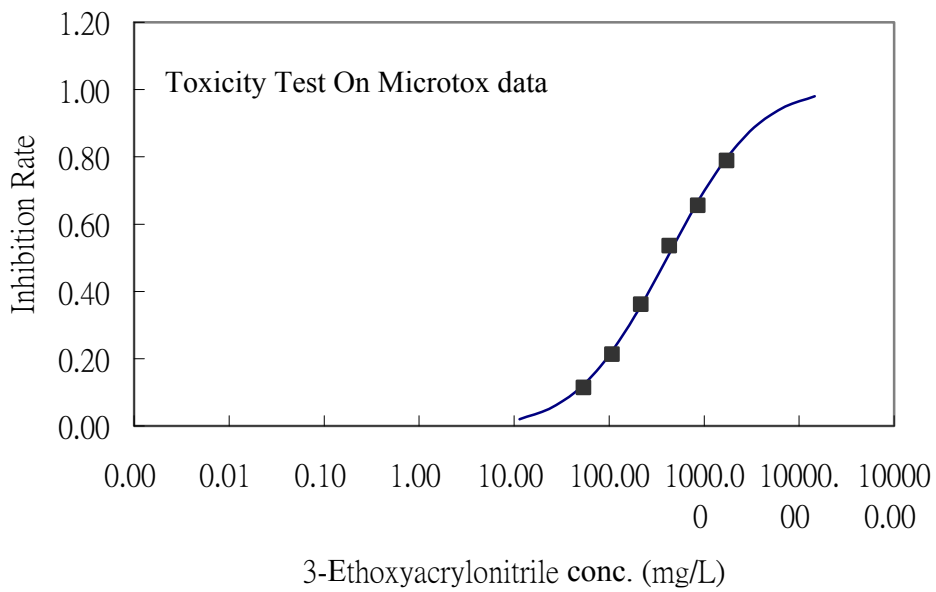


圖 5.1.5 3-Ethoxyacrylonitrile 之劑量-反應曲線

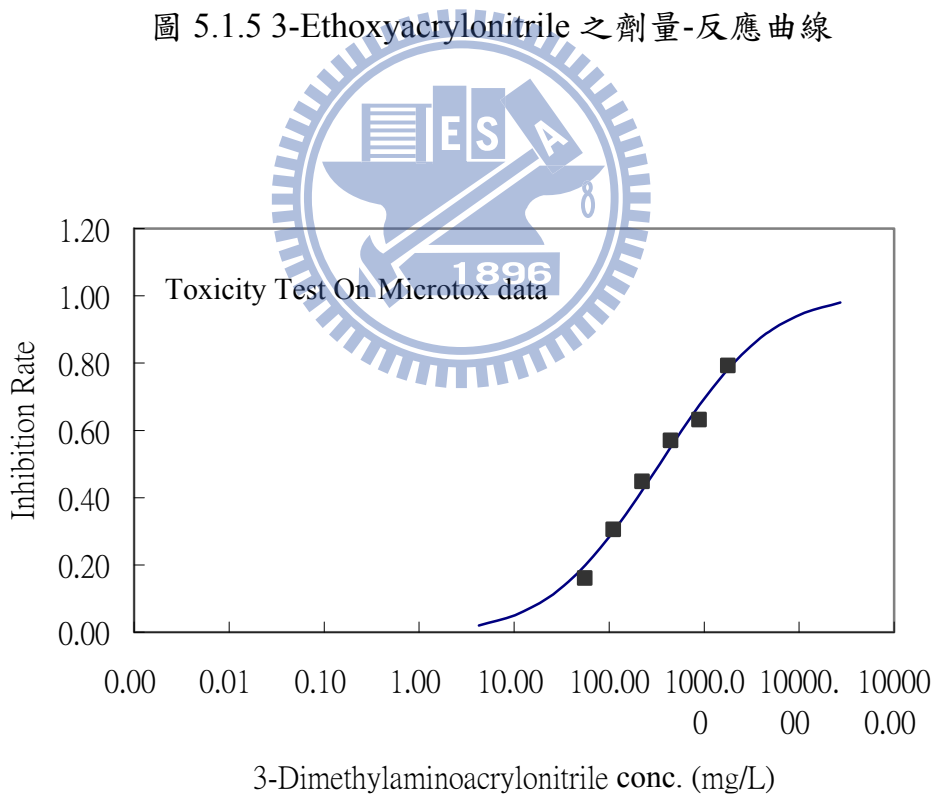


圖 5.1.6 3-Dimethylaminoacrylonitrile 之劑量-反應曲線

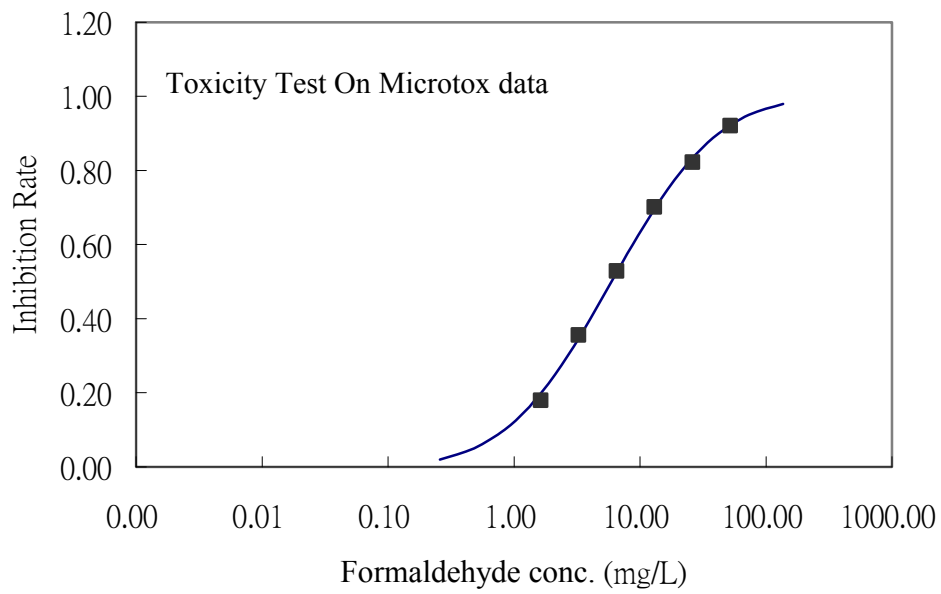


圖 5.1.7 Formaldehyde 之劑量-反應曲線

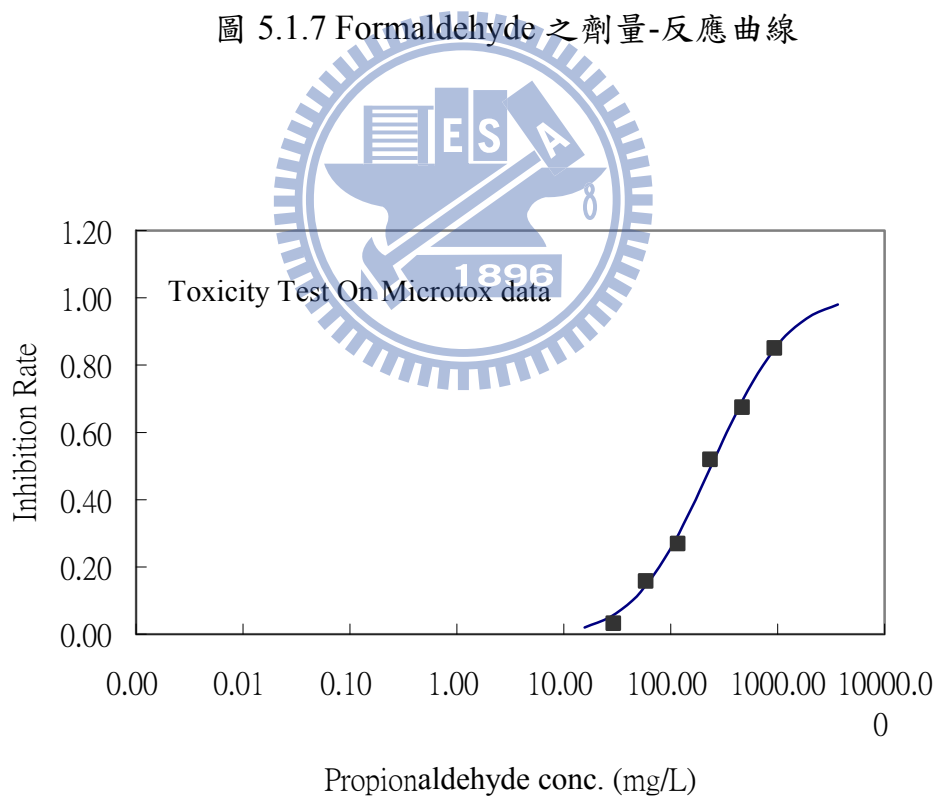


圖 5.1.8 Propionaldehyde 之劑量-反應曲線

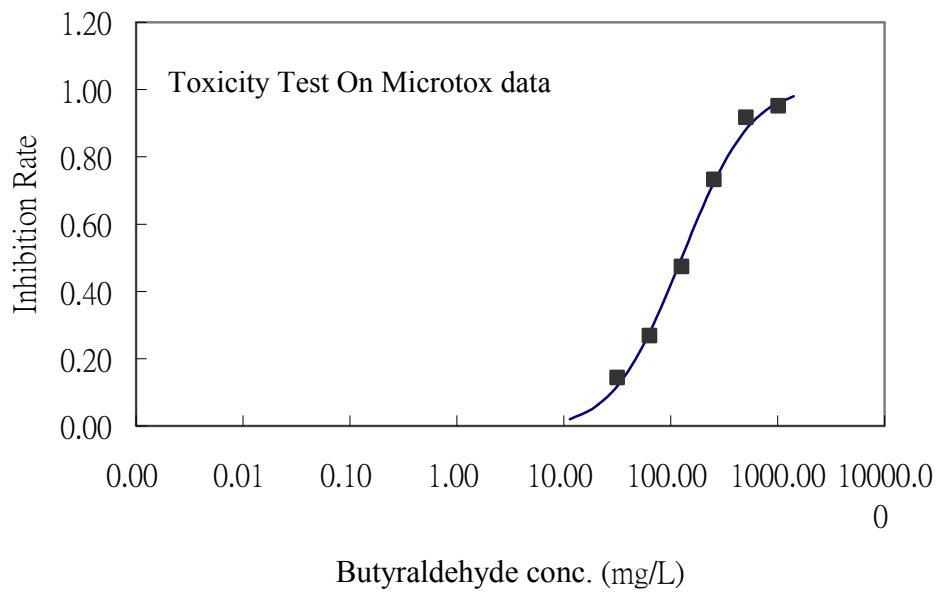


圖 5.1.9 Butyraldehyde 之劑量-反應曲線

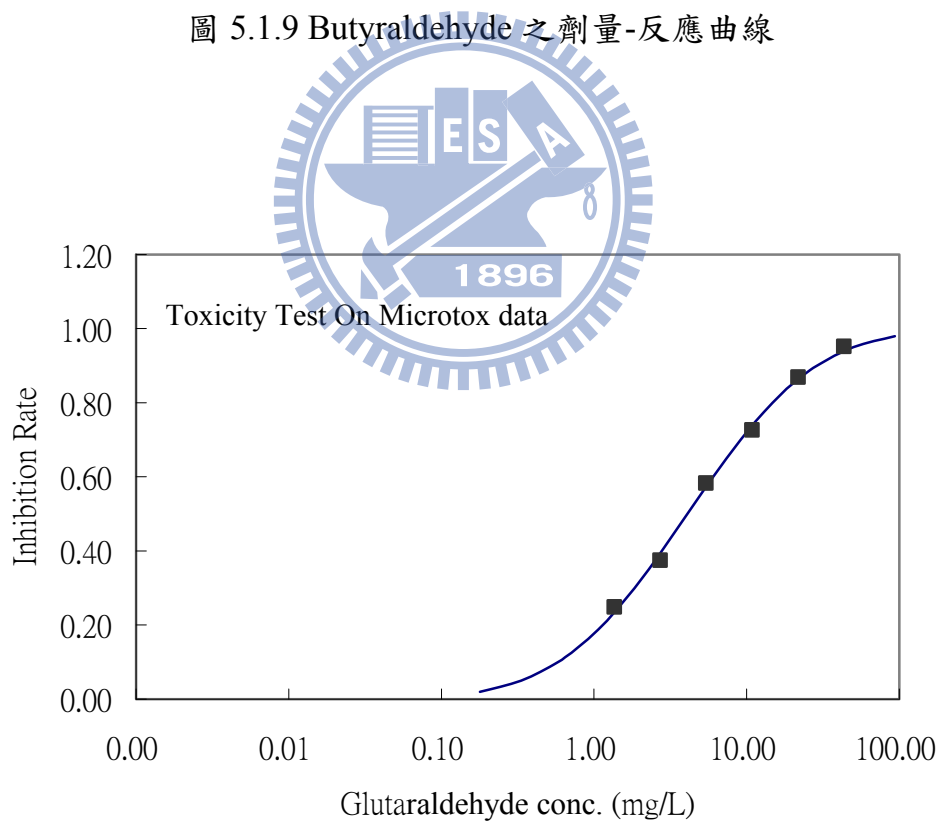


圖 5.1.10 Glutaraldehyde 之劑量-反應曲線

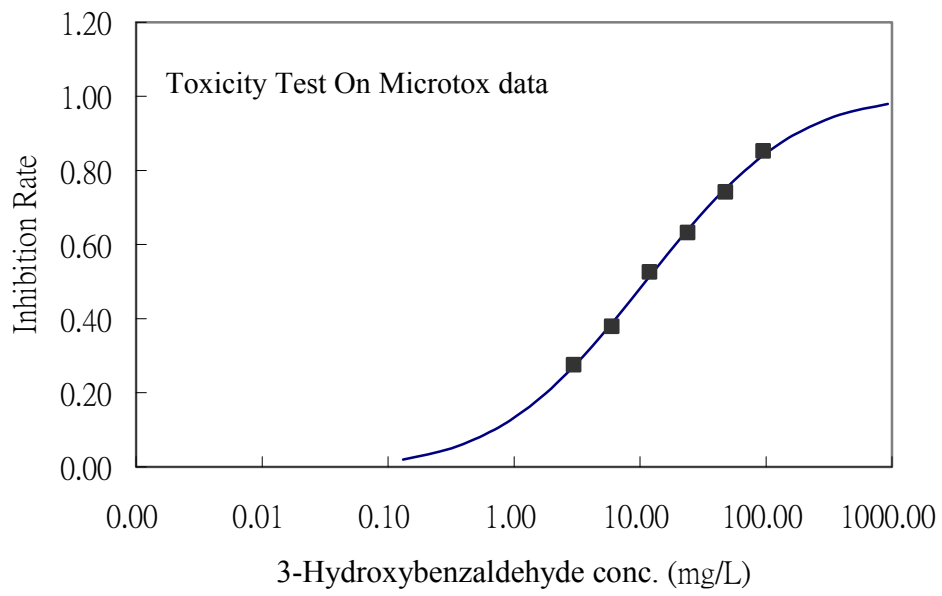


圖 5.1.11 3-Hydroxybenzaldehyde 之劑量-反應曲線



5.2 Microtox 混合物質毒性試驗結果

5.2.1 混合毒性單位分析

丙烯腈類反應性有機物與其作用機制不同之反應性有機物醛類以毒性單位 1:1 的比例相混後，其毒性結果列於表 5.2.1；就總體而言，在這 30 組的混合毒性效應中，如表 5.2.2 所示，共有 22 組顯示毒性增強、5 組顯示毒性相加而剩下 3 組則呈現毒性減弱之情形。由此可發現，丙烯腈類與醛類混合時，呈現協同作用之比例高達 73%，由於混合毒性增強意味著單一混合毒性的相加作用會低估實際的水體污染狀況，而導致更嚴重的環境危害，因此是非常值得注意的現象。

若仔細觀察表 5.2.1，則可進而得知，當丙烯腈類與 Formaldehyde、Butyraldehyde 及 Glutaraldehyde 混合時，皆產生協同之作用情形；進而比較之，我們可以發現，協同作用又以丙烯腈類與 Glutaraldehyde 混合時最為明顯，其次為 Butyraldehyde 及 Formaldehyde，而 Glutaraldehyde 更常被使用在研究、醫藥學等^[33]之領域，雖然其並非直接的污染排放物，但因具有與其他化合物混合後毒性增強的特性，故是值得被特別注意的；反之，當丙烯腈類與 Propionaldehyde 及 3-Hydroxybenzaldehyde 混合時，則出現了相加或拮抗之作用情形。

另外，就丙烯腈而言，我們可以發現，不同的取代基也會造成其混合之後毒性的影響，由表 5.2.1 我們可以明顯的發現，丙烯腈中 3-Dimethylaminoacrylonitrile 與醛類混合時，其協同的作用更明顯提升，尤其與 Propionaldehyde 混合時，其他丙烯腈類主要呈現相加或拮抗之作用，唯獨 3-Dimethylaminoacrylonitrile 有毒性增強之趨勢。

觀察幾個混合毒性加強組別的 isobologram(圖 5.2.1 至圖 5.2.6)，可以

發現與 Glutaraldehyde 混合的 Acrylonitrile、Methacrylonitrile 及 2-Chloroacrylonitrile(圖 5.2.1 至 5.2.3)皆是明顯的毒性增強的情況，其結果更比 RA model 預測之毒性明顯強烈許多。3-Dimethylaminoacrylonitrile 和 Propionaldehyde 混合時(圖 5.2.4)，在不同毒性單位比例的情況下，其毒性增強的現象更勝於毒性單位 1:1 時所造成之毒性。而 Methoxyacrylonitrile 與 Butyraldehyde 混合情況則發現(圖 5.2.5)，當其混合毒性單位比例為 3:1 時，呈現一相加之作用，顯示當 Butyraldehyde 貢獻較多毒性單位之情形下，可能造成毒性較強的現象。另外，3-Dimethylaminoacrylonitrile 與 3-Hydroxybenzaldehyde 雖然在毒性單位比例為 1:1 的情況下呈現協同之作用，但在不同比例情況下卻趨近於相加作用。

至於毒性減弱情況之 isobologram，其結果為圖 5.2.7 及圖 5.2.8。Methacrylonitrile 和 Propionaldehyde 混合之結果是偏向毒性減弱的(圖 5.2.7)，而在 Methacrylonitrile 和 Propionaldehyde 混合比例 3:1 的情形下，混合之毒性反應則為相加作用。最後圖 5.2.8 為 3-Ethoxyacrylonitrile 與 3-Hydroxybenzaldehyde 的 isobologram，有趣的是，由圖 5.2.8 可以發現，3-Ethoxyacrylonitrile 與 3-Hydroxybenzaldehyde 在不同毒性單位比例情況混合下，不僅呈現毒性減弱的狀況，甚至可觀察到具有 complex joint action 之情形的出現。complex joint action 的特性主要為：(1)在任何的毒性單位比例下均呈現混合毒性減弱之效應，(2)在不同的毒性單位比例下，其毒性減弱的強度也會有所不同，這也表示在某一毒性單位比例下會有較明顯的毒性減弱情況發生，(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具有解毒之作用。一般而言，complex joint action 的現象主要出現在毒性物質之劑量-反應曲線斜率差異較大時才發生，針對 3-Ethoxyacrylonitrile 與 3-Hydroxybenzaldehyde 之劑量-反應曲線斜率差異小，卻發生此一現象，其原因有待進一步研究。

另外，若以有機化學的角度來看丙烯腈類與醛類之反應，主要會發生

親核的加成反應，而原因是由於腈類具有 $C\equiv N$ 鍵，在 N 上面的孤對電子 (lone pair) 就形成 nucleophilic center 而容易去攻擊 electrophile 之物質；反之，醛類主要之官能基為 $C=O$ 鍵，其中 O 因為具有高電負度，喜好拉電子，易將 π 鍵拉向自己，故醛類屬於 electrophile 之物質，因此腈類中的 N 就容易與醛類 $C=O$ 鍵上之 C 結合而發生反應而形成 cyanohydrin [34]。

本研究中丙烯腈類與 Glutaraldehyde 混合後毒性作用最為強烈，這可能與 Glutaraldehyde 具有兩個 $C=O$ 鍵有關，因為這也表示 $C\equiv N$ 與 $C=O$ 的反應位置增加，可能藉此導致毒性的增強。而至於與預測較為不符合的部分，以 3-Hydroxybenzaldehyde 來看，可發現 3-Hydroxybenzaldehyde 主要帶有一個苯環，而苯環其實屬於一較穩定之官能基，因此腈類在與 3-Hydroxybenzaldehyde 反應時，主要仍是以和醛基(-CHO)反應為主，但是 3-Hydroxybenzaldehyde 除了-CHO 之官能基外，主要還帶有-OH 之官能基，而-OH 由於陰電性強喜歡與帶陽性的 C 反應，因此當丙烯腈類與 3-Hydroxybenzaldehyde 混合時，除了 $C\equiv N$ 與-CHO 的反應外，可能還需考慮與-OH 反應所產生之副產物，而這也可能是導致實驗結果出現不符合預測之原因。

以化學鍵能來看，Formaldehyde 與 Propionaldehyde 是相對來說鍵能較小者，而鍵能小者之化學物質，相較之下較為不穩定。在 Formaldehyde 中含有少量穩定劑與甲醇用來防止氧化與聚合，並且 Formaldehyde 水合溶液屬於較穩定物質，因此相較之下 Propionaldehyde 由於較不穩定，推測其反應應較為劇烈；另外，加成反應的產物為不穩定的，因此可能繼續進行反應，而碳基也會影響鄰近它或與它相接之各種基的化學反應，如此一連串的反应，是否導致丙烯腈類與 Propionaldehyde 造成加成作用之原因是有待後續研究的。

表 5.2.1 不同機制之反應性物質混合毒性效應

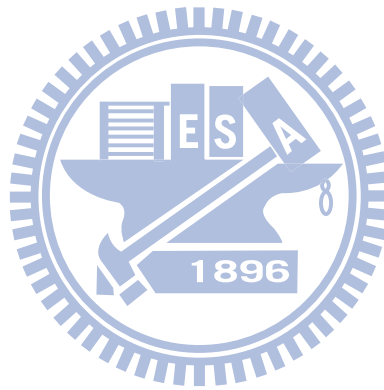
Toxicant 1	Toxicant 2	M (95%CI)	Effect (obs/pred)
Formaldehyde	Acrylonitrile	0.613 (0.507-0.756)	S / S (0.70)
	2-Chloroacrylonitrile	0.891 (0.826-0.967)	S / S (0.63)
	Methacrylonitrile	0.583 (0.493-0.700)	S / S (0.69)
	3-Dimethylaminoacrylonitrile	0.402 (0.246-0.785)	S / S (0.63)
	3-Ethoxyacrylonitrile	0.571 (0.433-0.785)	S / S (0.58)
	Methoxyacrylonitrile	0.780 (0.668-0.927)	S / S (0.63)
Propionaldehyde	Acrylonitrile	1.081 (0.919-1.308)	+ / S (0.77)
	2-Chloroacrylonitrile	1.029 (0.816-1.376)	+ / S (0.71)
	Methacrylonitrile	1.334 (1.270-1.403)	A / S (0.75)
	3-Dimethylaminoacrylonitrile	0.653 (0.533-0.800)	S / S (0.69)
	3-Ethoxyacrylonitrile	0.900 (0.715-1.180)	+ / S (0.65)
	Methoxyacrylonitrile	0.765 (0.608-1.007)	+ / S (0.71)
Butyraldehyde	Acrylonitrile	0.527 (0.459-0.609)	S / S (0.80)
	2-Chloroacrylonitrile	0.431 (0.377-0.496)	S / S (0.74)
	Methacrylonitrile	0.370 (0.305-0.449)	S / S (0.78)
	3-Dimethylaminoacrylonitrile	0.458 (0.316-0.709)	S / S (0.72)
	3-Ethoxyacrylonitrile	0.509 (0.369-0.759)	S / S (0.69)
	Methoxyacrylonitrile	0.314 (0.242-0.417)	S / S (0.74)
Glutaraldehyde	Acrylonitrile	0.416 (0.300-0.596)	S / S (0.72)
	2-Chloroacrylonitrile	0.444 (0.318-0.635)	S / S (0.65)
	Methacrylonitrile	0.329 (0.249-0.439)	S / S (0.70)
	3-Dimethylaminoacrylonitrile	0.394 (0.323-0.489)	S / S (0.64)
	3-Ethoxyacrylonitrile	0.306 (0.249-0.373)	S / S (0.60)
	Methoxyacrylonitrile	0.426 (0.370-0.492)	S / S (0.66)
3-Hydroxybenzaldehyde	Acrylonitrile	1.549 (1.370-1.772)	A / S (0.63)
	2-Chloroacrylonitrile	1.132 (0.947-1.304)	+ / S (0.55)
	Methacrylonitrile	0.491 (0.377-0.653)	S / S (0.60)
	3-Dimethylaminoacrylonitrile	0.676 (0.515-0.942)	S / S (0.53)
	3-Ethoxyacrylonitrile	1.342 (1.084-1.717)	A / S (0.50)
	Methoxyacrylonitrile	0.659 (0.487-0.961)	S / S (0.56)

A : antagonistic S : synergistic + : additive

M : 混合之毒性單位 95% CI 則為其信賴區間值

表 5.2.2 各個毒性效應占總混合毒性效應之比例關係

	Overall	
	No. of case	%
Synergism	22	73
Addition	5	17
Antagonism	3	10
Total	30	100



isobologram

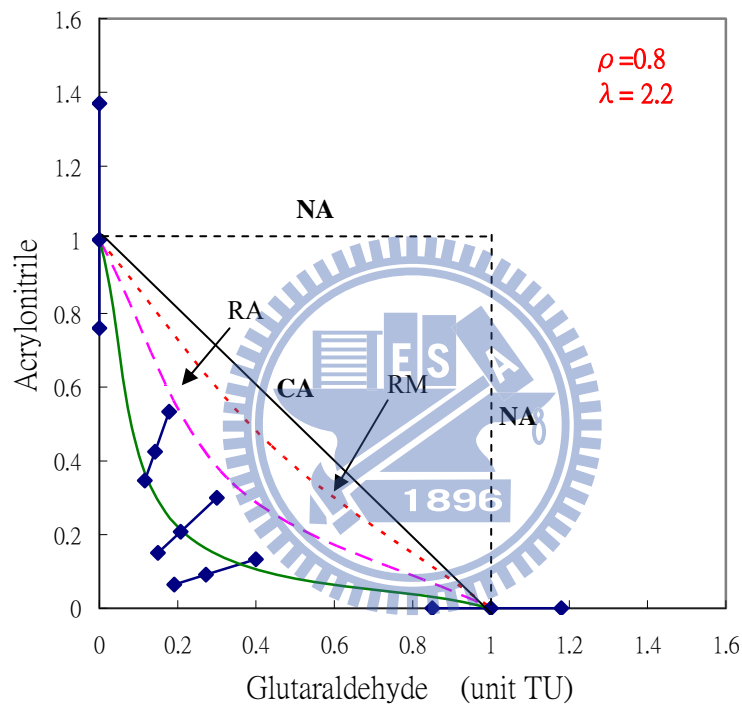


圖 5.2.1 不同 model 預測

Acrylonitrile and Glutaraldehyde

混合毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖

isobologram

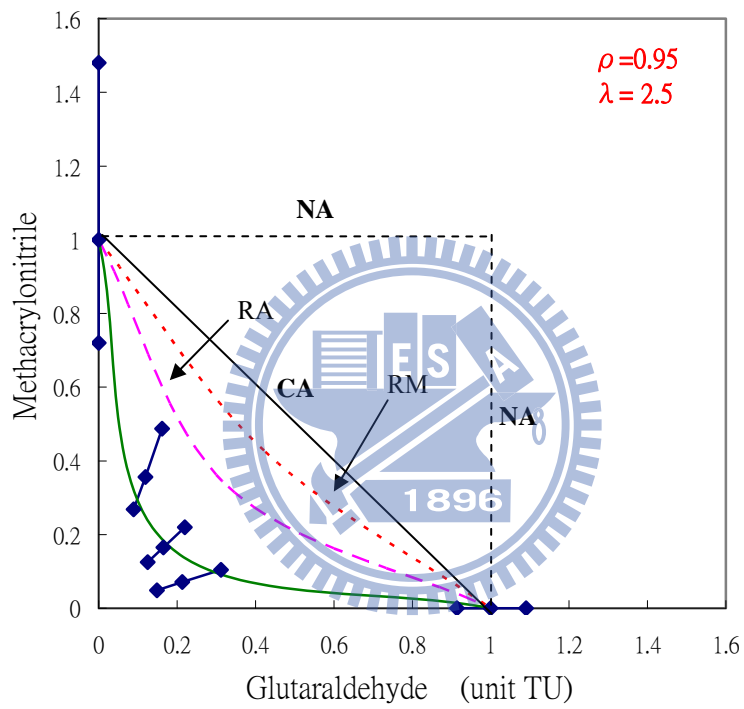


圖 5.2.2 不同 model 預測

Methacrylonitrile and Glutaraldehyde

混合毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖

isobologram

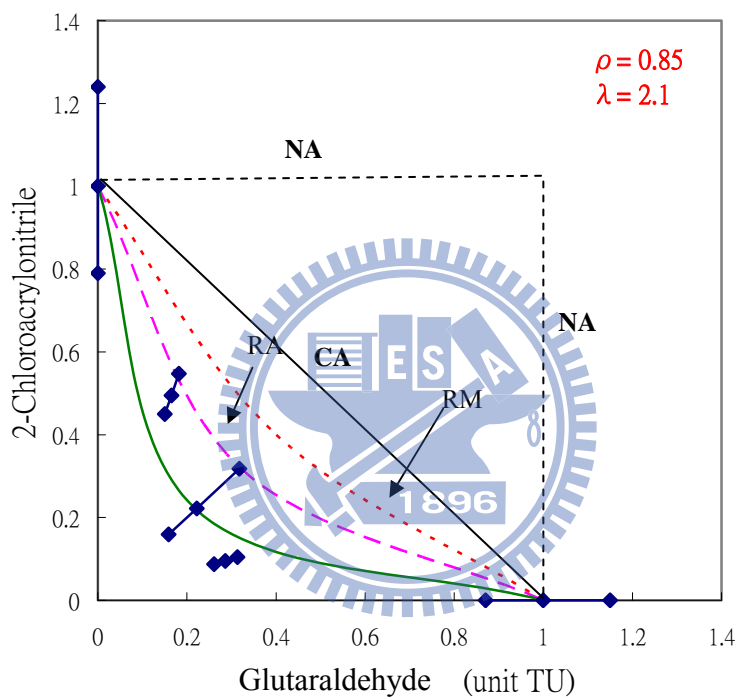


圖 5.2.3 不同 model 預測

2-Chloroacrylonitrile and Glutaraldehyde

混合毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖

isobologram

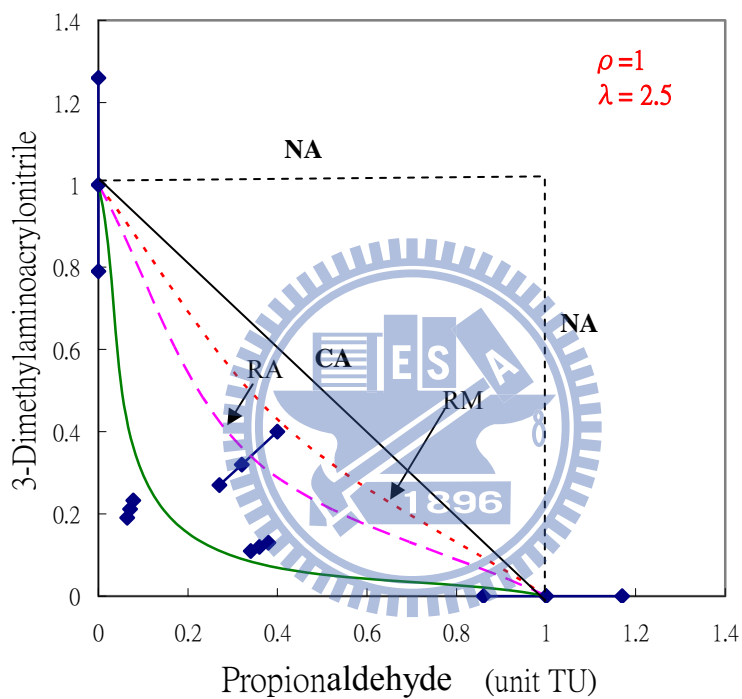


圖 5.2.4 不同 model 預測

3-Dimethylaminoacrylonitrile and Propionaldehyde

混合毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖

isobologram

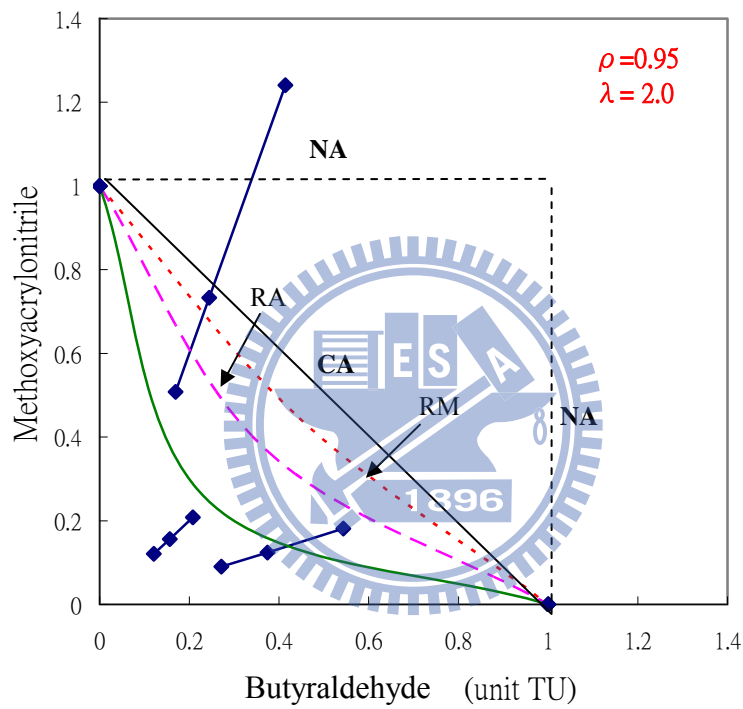


圖 5.2.5 不同 model 預測

Methoxyacrylonitrile and Butyraldehyde

混合毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖

isobologram

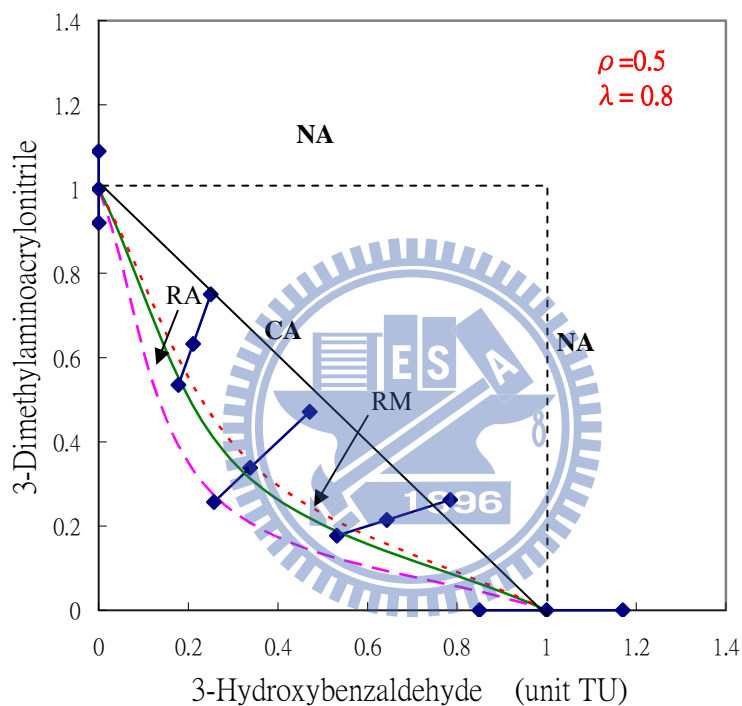


圖 5.2.6 不同 model 預測

3-Dimethylaminoacrylonitrile and 3-Hydroxybenzaldehyde

混合毒性與實際結果之 isobologram 繪製圖

isobologram

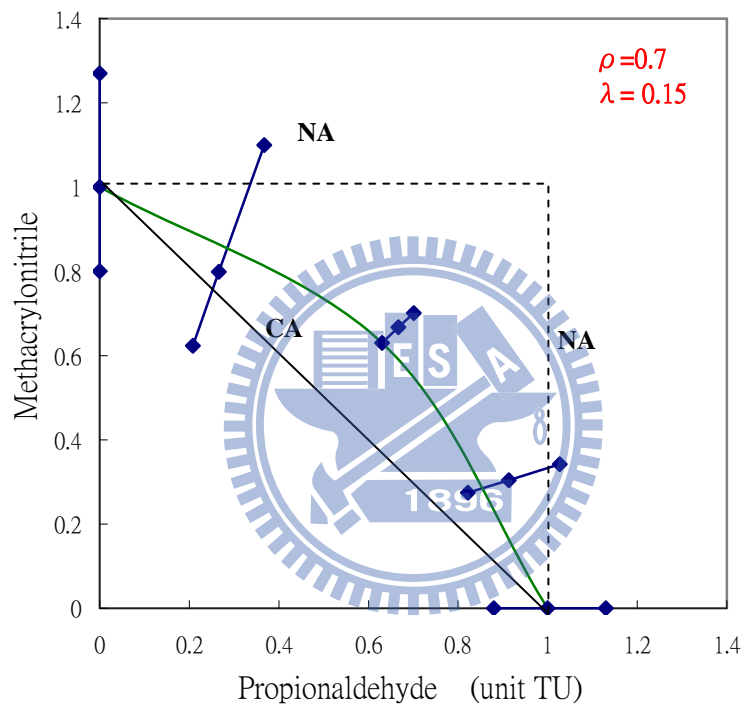


圖 5.2.7 Probit Isobologram of Methacrylonitrile and Propionaldehyde

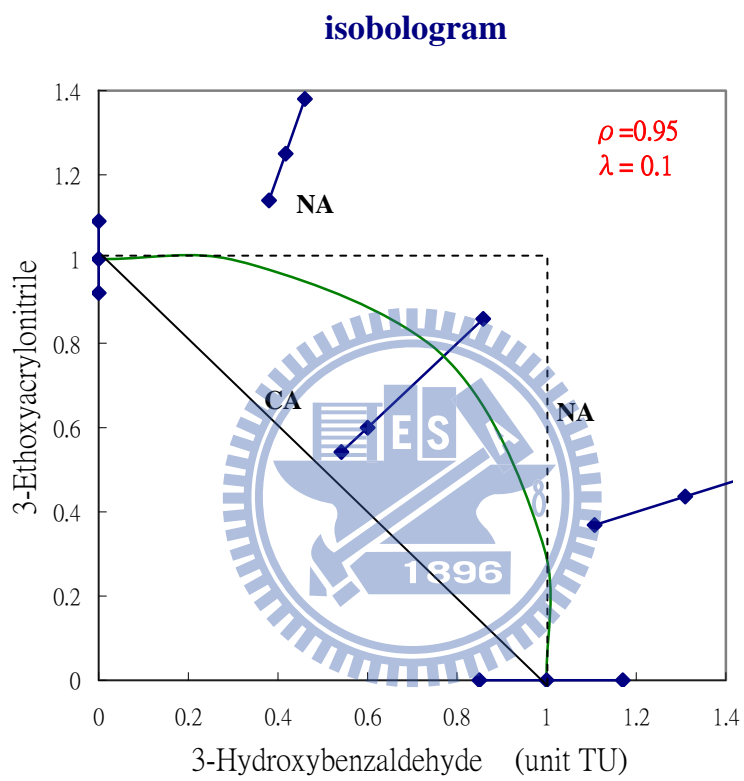


圖 5.2.8 Probit Isobologram of
3-Ethoxyacrylonitrile and 3-Hydroxybenzaldehyde

5.2.2 醛類與丙烯腈類作用機制與混合毒性理論的關係

根據 Hewlett & Plackett^[13] 的非交互作用混合毒性理論，相關係度， ρ 等於 1 代表完全正相關，等於 0 代表完全不相關，等於 -1 則代表完全負相關；相似係數 λ 則代表混合毒性作用位置(reaction sites)相似程度， λ 等於 0 代表混合毒性作用獨立，等於 1 代表相同毒性作用位置，大於 1 則是 Hewlett 在 1969 所提出代表交互作用的產生。

由表 5.2.3 我們可以發現，在八組分析中，除了 3-Hydroxybenzaldehyde 與 3-Dimethylaminoacrylonitrile 之相關係數略低為 0.5 外，其他組之相關係數幾乎皆趨近於 1，這表示此試驗結果是符合純種生物毒性試驗相關係數趨近於 1 的假設。而丙烯腈類與醛類在 QSARs 的分類上屬於不同之作用機制，因此推斷作用位置應不相同，相似係數應該趨近於 0，但由表 5.2.3 可以發現，除了產生拮抗作用情況的 Propionaldehyde 與 Methacrylonitrile 的混合以及 3-Hydroxybenzaldehyde 與 3-Ethoxyacrylonitrile 的混合這兩組之相似係數趨近於 0 及 3-Hydroxybenzaldehyde 與 3-Dimethylaminoacrylonitrile 混合後相似係數略小於 1 外，剩下五組其相似係數皆遠大於 1，這表示此結果無法與非交互作用混合毒性理論得到良好的對應，推測可能原因是由於反應性有機物之毒性機制可能同時牽涉數個連續的生化反應，而 λ 的定義較適用於毒性機制簡單的毒性物質(如：非反應有機物)。

雖然 QSARs 反應性有機物質的作用機制與混合毒性理論的作用位置關係結合不理想，因此我們從劑量-反應曲線之斜率、相關係數及相似係數三方面來做討論，作為預測混合毒性的方向。在劑量-反應曲線斜率皆小的情況下，表示在整個劑量空間上都能產生毒性抑制作用，因此較容易出現混合毒性增強的情形。

相似係數 λ 的大小反應映在產生毒性抑制反應的積分區間上，當 λ 越大時，積分區間向未反應區移動，造成更多的生物抑制反應，因此 λ 大於 1 時傾向混合毒性加強的情形；反之，當 λ 越小時，積分區間包含了更多的未反應區間，由於未反應生物量增加，因此 λ 小於 1 時，則易造成混合毒性減弱的現象。

相關係數 ρ 的大小則是反應在生物毒性反應分布的形狀，當 ρ 由 1 走向 -1 時，以二維為例，分布區間由正向直線逐漸形成反向直線，再固定相似係數的情況下，反應量會隨之增加，形成混合毒性加強的狀況。因此當 ρ 等於 -1 的情況下，代表完全的生物毒性抑制，毫無存活率可言，但實際情況下，混合後造成如此激烈的完全生物抑制情形是不多的。

表 5.2.3 不同類反應性有機物相關及相似係數分析

Toxicant1	Toxicant2	相關係數 (ρ)	相似係數 (λ)
Propionaldehyde	Methacrylonitrile	0.7	0.15
	3-DimethylaminoAN	1	2.5
Butyaldehyde	Methoxyacrylonitrile	0.95	2
	Acrylonitrile	0.8	2.2
Glutaraldehyde	Methacrylonitrile	0.95	2.5
	2-Chloroacrylonitrile	0.85	2.1
3-Hydroxybenzaldehyde	3-Ethoxyacrylonitrile	0.95	0.1
	3-DimethylaminoAN	0.5	0.8

5.2.3 CA 與 IA model 的比較

CA 與 IA model 在預測混合毒性時最常被使用的模式，本研究群將 IA model 又細分為三類，分別是 RA (Response addition)、RM (Response multiplication)以及 NA (No addition)，一般學者們所使用的 IA model 在本研究群中的分類則為 RM model。

表 5.2.4 為混合毒性單位實際結果與 RA、RM 及 CA model 預測結果之比較表。而當預測值與實際值之差值大於 0 時，代表實際毒性較預測來的高；反之，若差值小於 0，則代表預測毒性較實際毒性來的嚴重。由表 5.2.4 可以看出，丙烯腈類與 Butyraldehyde 及 Glutaraldehyde 混合時，實際結果毒性強度皆大於預測結果，這是非常值得注意的。

表 5.2.5 表示實際結果與預測結果的效應符合度及相差程度，表中可發現，實際結果與 RA model 最為符合，30 組混合毒性試驗中，有 22 組符合 RA model 預測之效應，而符合 RM model 預測之效應則有 20 組，CA model 預測效應符合者僅 5 組，由於 RA 及 RM model 皆屬於 IA model 之理論，這表示實際結果是較符合 IA model 的。另外，實際結果與預測結果相差最少者為 RA model，共佔 19 組，而 RM model 為 5 組，其餘 6 組則為 CA model，結合 RA 與 RM model 兩者之結果，我們可以發現實際結果較符合 IA model 之比例高達 80%。

綜合表 5.2.5 之結果，我們可以了解，RA model 在預測上是三者之中最佳者，其次為 RM model，由此說明了，針對丙烯腈類與醛類的混合毒性試驗結果，主要最符合 RA model 的預測，而這不僅符合了 Backhaus *et al.*(2000)等多位學者的主張，認為在利用 CA 與 IA model 來預測混合毒性效應上時，IA model 是較符合實際情形的，更發現本研究所使用之 RA model 其預測能力更較一般學者們使用之 RM model 來的精準。

而當我們利用 CA 及 IA model 預測混合毒性效應，應用在環境風險評估上時，則很明顯的可以發現本研究的結果顯示在使用 IA model 來做環境風險評估是較 CA model 效果來得好，由表 5.2.4 中更可以觀察到，若用 CA model 來做環境風險評估的話，在此將會過分低估毒性物質混合後所造成之毒性；反之，選用 IA model 來做風險評估，則對環境的保護將具有較佳的能力。除此之外，利用 RA model 來預測混合毒性時，其預測結果也較 RM model 毒性來得強，因此在 IA model 中，RA model 對水體之保護能力將較 RM model 更佳。

此研究之結果，雖然在混合毒性結果預測能力上與其他學者一致，皆認為利用 IA model 較符合實際情形，但是在應用至環境之風險評估上，則與其他學者們有非常不一樣之結果。一般而言，大部分學者皆認為使用 CA model 預測混合毒性之結果較易高估混合之後的毒性，Arrhenius *et al.*^[29] 就主張利用 CA model 來作風險評估對環境是具有較佳的保護能力；但本研究群自 Chen & Huang^[19] 即認為當化學物質混合後產生協同效應時，RA model 比 CA model 對環境而言有更佳的保護能力，而從本研究之實驗結果也證實了利用 IA model 來作風險評估才是具有較好保護能力的，甚至同為 IA model 中的 RA model 其預測之能力也是較一般學者們所使用之 RM model 來得更好，而此一差別，主要可歸因於本研究多考慮了劑量-反應曲線之斜率與相關係數 ρ 對混合毒性效應所造成之影響。當劑量-反應曲線斜率皆小時，利用 IA model 預測之結果會呈現協同作用之反應，相對於 CA model，則 IA model 對環境有較佳之保護力；反之，當劑量-反應曲線斜率皆大時，利用 IA model 預測之結果，則會呈現拮抗之作用，此時選用 CA model 則對環境才具較佳之保護力。因此在預測混合毒性時，利用數學模式之劑量-反應曲線斜率是一個有效的方法。

表 5.2.4 不同 model 預測結果與實際結果之差值

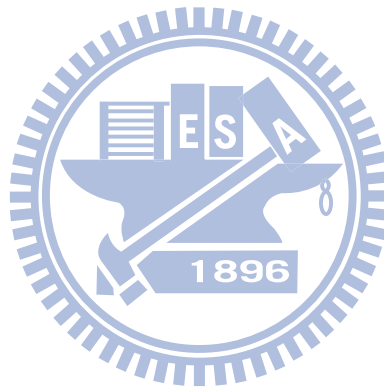
Toxicant 1	Toxicant 2	M	M (pred.)			pred. - obs.		
		Obs.	RA	RM	CA	RA	RM	CA
Formaldehyde	AN	0.61(S)	0.70(S)*	0.87(S)*	1(+)	0.09 [†]	0.26	0.39
	2-ChloroAN	0.89(S)	0.63(S)*	0.79(S)*	1(+)	-0.26	-0.10 [†]	0.11
	MethAN	0.58(S)	0.69(S)*	0.84(S)*	1(+)	0.11 [†]	0.26	0.42
	3-DimethylaminoAN	0.40(S)	0.63(S)*	0.77(S)*	1(+)	0.23 [†]	0.37	0.60
	3-EthoxyAN	0.57(S)	0.58(S)*	0.75(S)*	1(+)	0.01 [†]	0.18	0.43
	MethoxyAN	0.78(S)	0.63(S)*	0.80(S)*	1(+)	-0.15	0.02 [†]	0.22
Propionaldehyde	AN	1.08(+)	0.77(S)	0.93(+)*	1(+)*	-0.31	-0.15	-0.08 [†]
	2-ChloroAN	1.03(+)	0.71(S)	0.86(S)	1(+)*	-0.32	-0.17	-0.03 [†]
	MethAN	1.33(A)	0.75(S)	0.90(+)	1(+)	-0.58	-0.43	-0.33 [†]
	3-DimethylaminoAN	0.65(S)	0.69(S)*	0.83(S)*	1(+)	0.04 [†]	0.18	0.35
	3-EthoxyAN	0.90(+)	0.65(S)	0.82(S)	1(+)*	-0.25	-0.08 [†]	0.10
	MethoxyAN	0.77(+)	0.71(S)	0.86(S)	1(+)*	-0.06 [†]	0.09	0.23
Butyaldehyde	AN	0.53(S)	0.80(S)*	0.96(+)	1(+)	0.27 [†]	0.43	0.47
	2-ChloroAN	0.43(S)	0.74(S)*	0.89(S)*	1(+)	0.31 [†]	0.46	0.57
	MethAN	0.37(S)	0.78(S)*	0.93(+)	1(+)	0.41 [†]	0.56	0.63
	3-DimethylaminoAN	0.46(S)	0.72(S)*	0.87(S)*	1(+)	0.26 [†]	0.41	0.54
	3-EthoxyAN	0.51(S)	0.69(S)*	0.86(S)*	1(+)	0.18 [†]	0.35	0.49
	MethoxyAN	0.31(S)	0.74(S)*	0.90(+)	1(+)	0.43 [†]	0.59	0.69
Glutaraldehyde	AN	0.42(S)	0.72(S)*	0.88(S)*	1(+)	0.30 [†]	0.46	0.58
	2-ChloroAN	0.44(S)	0.65(S)*	0.80(S)*	1(+)	0.21 [†]	0.36	0.56
	MethAN	0.33(S)	0.70(S)*	0.85(S)*	1(+)	0.37 [†]	0.52	0.67
	3-DimethylaminoAN	0.39(S)	0.64(S)*	0.78(S)*	1(+)	0.25 [†]	0.39	0.61
	3-EthoxyAN	0.31(S)	0.60(S)*	0.76(S)*	1(+)	0.29 [†]	0.45	0.69
	MethoxyAN	0.43(S)	0.66(S)*	0.81(S)*	1(+)	0.23 [†]	0.38	0.57
3-Hydroxybenzaldehyde	AN	1.55(A)	0.63(S)	0.79(S)	1(+)	-0.92	-0.76	-0.55 [†]
	2-ChloroAN	1.13(+)	0.55(S)	0.71(S)	1(+)*	-0.58	-0.42	-0.13 [†]
	MethAN	0.49(S)	0.60(S)*	0.76(S)*	1(+)	0.11 [†]	0.27	0.51
	3-DimethylaminoAN	0.68(S)	0.53(S)*	0.69(S)*	1(+)	-0.15	0.01 [†]	0.32
	3-EthoxyAN	1.34(A)	0.50(S)	0.67(S)	1(+)	-0.84	-0.67	-0.34 [†]
	MethoxyAN	0.66(S)	0.56(S)*	0.72(S)*	1(+)	-0.10	0.06 [†]	0.34

AN : acrylonitrile

* : 實際結果與預測相符合者 † : 實際結果與預測結果相差最小者

表 5.2.5 實際結果與預測結果符合度之比例關係

預測之 Model	實際效應符合預測 之組數(百分比)	實際結果與預測結果 相差最小組數(百分比)
RA	22 (73%)	19 (63%)
RM	20 (67%)	5 (17%)
CA	5 (17%)	6 (20%)



5.3 Microtox 與藻類毒性試驗混合毒性結果之比較

根據龔^[35]之藻類毒性試驗之混合毒性(以 DO 為試驗終點)與 Microtox 試驗結果比較如表 5.3.1 所示，從表 5.3.1 中可以發現，當丙烯腈類與 Glutaraldehyde 混合時，在兩試驗物種皆呈現協同之作用；反之，在 Formaldehyde 及 3-Hydroxybenzaldehyde 的混合時，兩試驗物種則不具一致性。

選取 Microtox 試驗與藻類毒性試驗結果中，其混合後總毒性單位差異最大的組別為例，Formaldehyde 與 3-Ethoxyacrylonitrile 混合時，如表 5.3.2 顯示，對藻類毒性試驗而言屬於拮抗之作用，混合毒性單位為 6.38；反之，對 Microtox 試驗而言則屬於協同之作用，混合毒性單位為 0.57，若將混合毒性單位換算成兩種毒性物質個別所需的濃度，則發現藻類毒性試驗所需之 Formaldehyde 與 3-Ethoxyacrylonitrile 濃度分別為 4.85 及 58.86 mg/L，而在 Microtox 試驗結果則為 1.51 及 112.12 mg/L，由此可發現，Formaldehyde 所需之濃度在藻類毒性試驗上較 Microtox 來得高，而 3-Ethoxyacrylonitrile 則剛好相反。

由此可以得之，因為 Microtox 與藻類毒性試驗在進行混合毒性試驗時，是以兩個試驗對於毒性物質各別之單一毒性試驗的 EC_{50} 為配製混合溶液的依據，此種方法造成了兩種試驗在毒性物質濃度比例上的差異，這也許是導致 Microtox 與藻類毒性試驗結果相關係不佳的原因之一。另外，以數學模式推估毒性時，利用 Probit model 來做分類，劑量-反應曲線斜率小於 2 者我們稱之為小斜率物質；反之，劑量-反應曲線斜率大於 2 者則稱為大斜率物質。對 Microtox 試驗而言，丙烯腈類與醛類皆屬於劑量-反應曲線斜率偏小之毒性物質，因此主要產生協同之作用，而針對藻類毒性試驗而言，Formaldehyde 等則屬於較大劑量-反應曲線斜率之物質，因此

在屬於小劑量-反應曲線斜率之毒性物質與屬於大劑量-反應曲線斜率之毒性物質混合時，其作用情形就需要多加以探討，而這也可能是造成兩試驗物種其相關性不佳的原因之一。

而在表 5.3.1 中我們還可觀察到，針對不同試驗物種其混合之毒性單位與利用 MTOX Model 預測之混合毒性單位作比較，在 Microtox 試驗上與預測結果較為符合，但就藻類而言，在 Formaldehyde 與丙烯腈類混合的實際結果與預測結果則是大相逕庭的，推測其可能原因主要是來自於劑量-反應曲線之斜率差異，導致預測與實際結果不符。另外，丙烯腈類與 Glutaraldehyde 混合時，不僅在兩試驗物種上皆呈現毒性加強之作用，也發現在與預測值比較時，其實際毒性是較預測值來得高的。

雖然 Microtox 與藻類毒性試驗在混合毒性試驗的結果上一致性並不高，但我們仍可發現，針對丙烯腈類與 Glutaraldehyde 相混合時，對於兩個試驗物種皆呈現明顯的協同作用，而在所有的醛類中與丙烯腈類之混合毒性，也屬 Glutaraldehyde 與丙烯腈類混合後之毒性最強，而 Glutaraldehyde 又是常常在使用在醫療、研究等領域中，加上藻類屬於初級生產者，而 *Photobacterium phosphoreum* 則屬於細菌類，皆是食物鏈中的最底層，若在食物鏈的底層就造成如此大的危害，經由生物濃縮累積甚至是生物放大之作用後，其在自然環境中所造成的影響將更趨嚴重，而對人類的影響也相對較大，因此這是值得我們特別重視的。

表 5.3.1 Microtox 與藻類毒性試驗之混合毒性試驗結果比較

Toxicant1	Toxicant2	Microtox	<i>P.subcapitata</i>
Slope (M., P.)	Slope (M., P.)	M / Pred (Effect)	M / Pred (Effect)
Formaldehyde (1.43, 2.83)	Acrylonitrile (1.58, 1.14)	0.61 / 0.70 (S / S)	1.64 / 0.88 (A / S)
	Methacrylonitrile (1.48, 1.11)	0.58 / 0.69 (S / S)	1.54 / 0.86 (A / S)
	Methoxyacrylonitrile (1.30, 0.67)	0.78 / 0.63 (S / S)	0.75 / 0.74 (+ / S)
	3-Ethoxyacrylonitrile (1.11, 0.65)	0.57 / 0.58 (S / S)	6.38 / 0.73 (A / S)
	3-DimethylaminoAN (1.24, 0.98)	0.40 / 0.63 (S / S)	1.34 / 0.84 (A / S)
	Methacrylonitrile (1.48, 1.11)	0.33 / 0.70 (S / S)	0.31 / 0.63 (S / S)
Glutaraldehyde (1.49, 1.61)	Methoxyacrylonitrile (1.30, 0.67)	0.42 / 0.66 (S / S)	0.23 / 0.48 (S / S)
	3-Ethoxyacrylonitrile (1.11, 0.65)	0.30 / 0.60 (S / S)	0.32 / 0.46 (S / S)
	3-DimethylaminoAN (1.24, 0.98)	0.39 / 0.64 (S / S)	0.32 / 0.59 (S / S)
	2-Chloroacrylonitrile (1.28, 2.57)	1.13 / 0.55 (+ / S)	1.42 / 1.17 (A / A)
3-Hydroxybenzaldehyde (1.14, 3.3)	2-Chloroacrylonitrile (1.28, 2.57)	1.13 / 0.55 (+ / S)	1.42 / 1.17 (A / A)

表 5.3.2 Fromaldehyde 與 3-Ethoxyacrylonitrile 之混合毒性單位下，兩者所需各別之濃度

	Fromaldehyde	+	3-Ethoxyacrylonitrile
藻類毒性試驗，混合毒性單位 6.38	4.85 mg/L		58.86 mg/L
Microtox 試驗，混合毒性單位 0.57	1.51 mg/L		112.12 mg/L



5.4 化學分析結果

針對混合毒性試驗之結果，本研究利用 HPLC 分析方法，試圖探討其混合後所造成的改變與結果的關聯性。由表 5.4.1 我們可以發現屬於協同作用反應的 Methacrylonitrile + Formaldehyde 及 3-DimethylaminoAN + Butyraldehyde，由分析結果顯示，其混合後濃度並無大量的改變；反之，在實驗結果屬於拮抗作用反應的 Acrylonitrile + 3-Hydroxybenzaldehyde 混合時，由 HPLC 之結果可以明顯發現混合後濃度大量改變，而大幅的濃度下降，使得 Microtox 毒性試驗結果呈現一毒性減弱的情況。

Lin^[22]曾利用 cyanogenic toxicants 與 aldehydes 混合後做 HPLC 之分析研究，在其研究中發現 malononitrile 與 ρ -nitrobenzaldehyde 會產生 ρ -nitrobenzoic acid，但在本研究中，並無發現新物質的產生，推測可能原因主要是由於 Lin 在做 HPLC 之分析前，先利用 CTMAB 這種陽離子膠體粒子加速兩化學物質之間的反應，且反應時間為 24 小時，而溫度控制則為 $30\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，並利用 HCl 將 pH 值調至 2.5，最後利用 $0.45\mu\text{m}$ 濾紙過濾後才進行實驗。但由於 Microtox 試驗時間短暫僅 15 分鐘，且 pH 呈現中性，而在溫度上的控制則為 15°C ，因此本研究在 HPLC 分析上，配藥過程與實際實驗時雷同，並無添加助反應劑。

圖 5.4.1 至圖 5.4.12 則為 HPLC 分析結果之圖形，而表 5.4.1 則為所有 HPLC 分析之結果，圖 5.4.3 為 Methacrylonitrile + Formaldehyde 混合後之結果圖形，與 Methacrylonitrile(圖 5.4.1)及 Formaldehyde(圖 5.4.2)之單一結果做比較，可發現並無新脈衝(Peak)產生，但是由表 5.4.1 中可以發現 Methacrylonitrile + Formaldehyde 混合後其與單一濃度對照後，衰減量並不明顯；另外，圖 5.4.9 則為 Acrylonitrile + 3-Hydroxybenzaldehyde 混合後之結果圖形，與 Acrylonitrile(圖 5.4.7)及 3-Hydroxybenzaldehyde(圖 5.4.8)

之單一結果做比較，雖然並無其他的新的脈衝(Peak)出現之情形，但由表 5.4.1 中可發現，其混合後濃度與單一濃度對照下，卻發現濃度大幅的減低。而在分析中，雖然無法看出新的脈衝出現，但由於醛類需要較高的濃度方可出現脈衝，因此導致即使出現新的物質，也容易因為原來毒性物質之脈衝過大，而將新物質之脈衝覆蓋，但針對造成 Acrylonitrile + 3-Hydroxybenzaldehyde 與 Methacrylonitrile + Propionaldehyde 混合時造成其濃度大幅降低的切確原因仍是我們需要繼續進行實驗方可得之。

Makemson^[34]使用 cyanide 與 C₁₀ aldehyde(decanal)對發光菌做抑制試驗，針對其結果顯示 cyanide 與 decanal 反應後主要會形成 cyanohydrin，而 cyanohydrin 在水中則可反應成 alpha hydroxyl acid or amide 並與 luciferase intermediate II 鍵結，抑制 bioluminescence 和 intermediate II 反應，但是就 cyanide 與 C₈ 及 C₁₂ aldehyde 混合時，其螢光抑制反應則較慢。因此，針對丙烯腈類與醛類的混合，其在生物體中的反應，也是值得後續研究的。



表 5.4.1 HPLC 分析結果

Chemical [*]	D T (min)	面積	減少百分比 (%)
Methacrylonitrile	4.152	3822506	
Formaldehyde	1.722	5254829	
Methacrylonitrile +	4.141	3680420	3.71%
Formaldehyde	1.715	5144878	2.09%
3-DimethylaminoAN	2.922	12695574	
Butyraldehyde ¹	3.924	3033308	
3-DimethylaminoAN +	3.197	12214783	3.79%
Butyraldehyde	4.108	2964501	2.27%
Acrylonitrile	2.931	3298377	
3-Hydroxybenzaldehyde	3.585	8372547	
Acrylonitrile +	2.860	2577575	21.8%
3-Hydroxybenzaldehyde	3.508	7586508	9.39%
Methacrylonitrile	3.898	3908606	
Propionaldehyde	2.935	903978	
Methacrylonitrile +	3.874	3186226	18.5%
Propionaldehyde	2.787	814365	9.91%

* : 所有 Chemical 濃度皆為 500 mg/L

¹ : Butyraldehyde 其濃度為 1000 mg/L

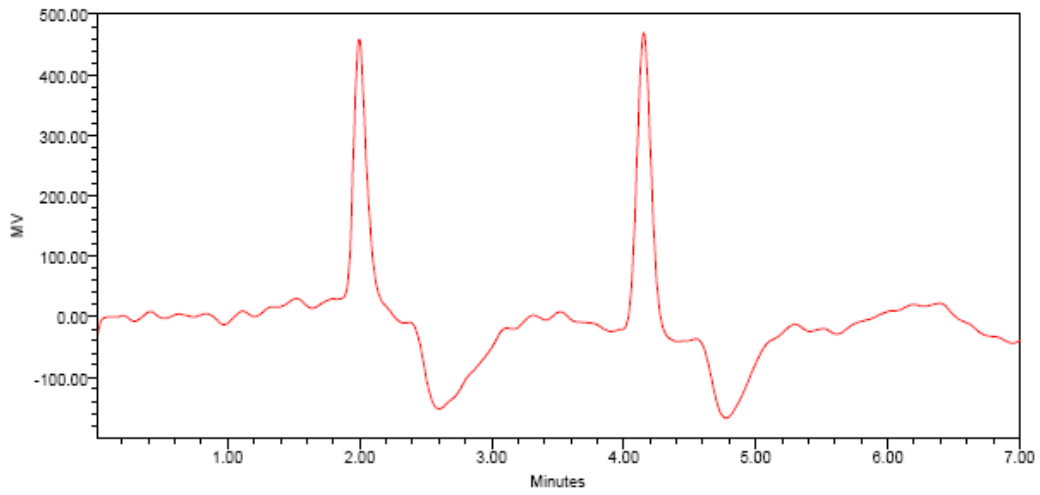


圖 5.4.1 Methacrylonitrile 之 HPLC 分析圖

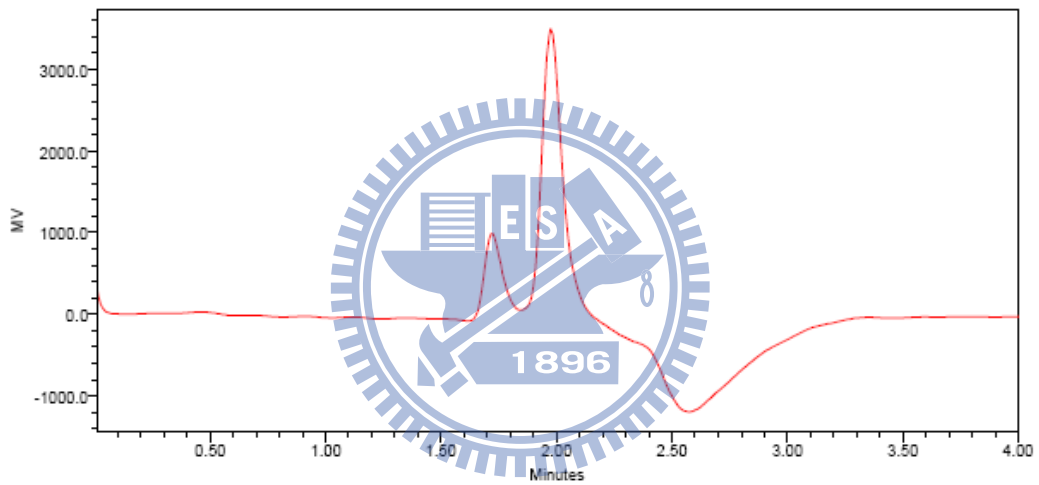


圖 5.4.2 Formaldehyde 之 HPLC 分析圖

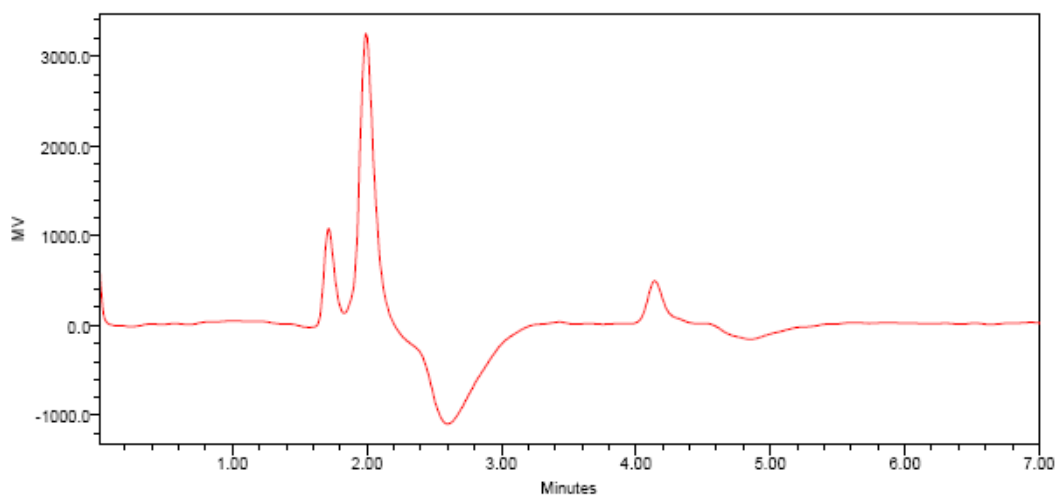


圖 5.4.3 Methacrylonitrile + Formaldehyde 之 HPLC 分析圖

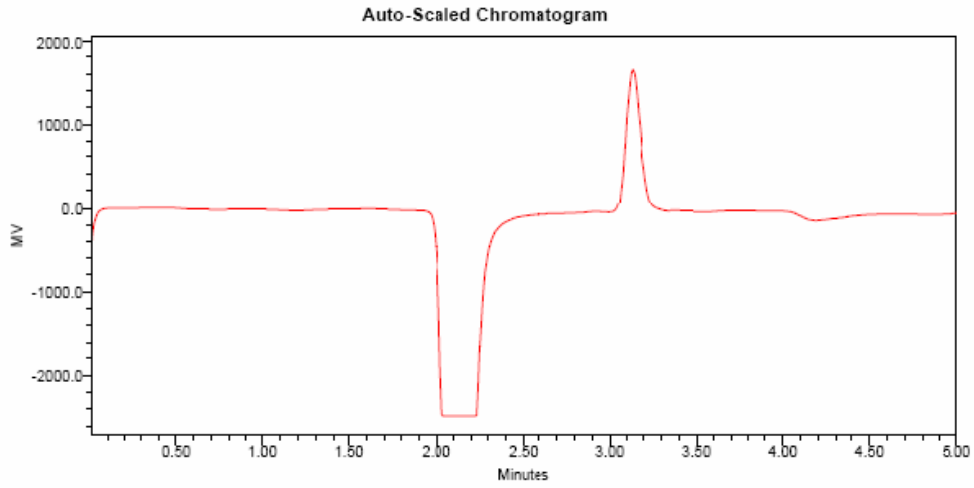


圖 5.4.4 3-Dimethylaminoacrylonitrile 之 HPLC 分析圖

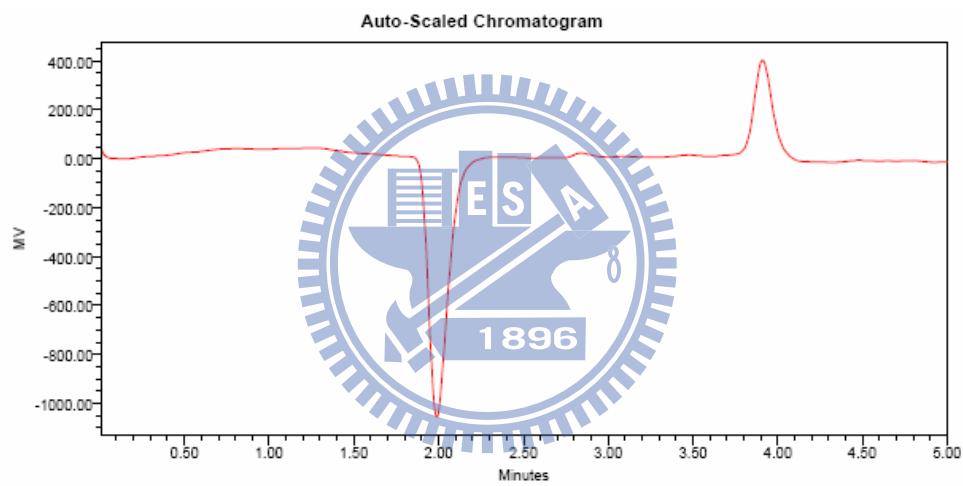


圖 5.4.5 Butyraldehyde 之 HPLC 分析圖

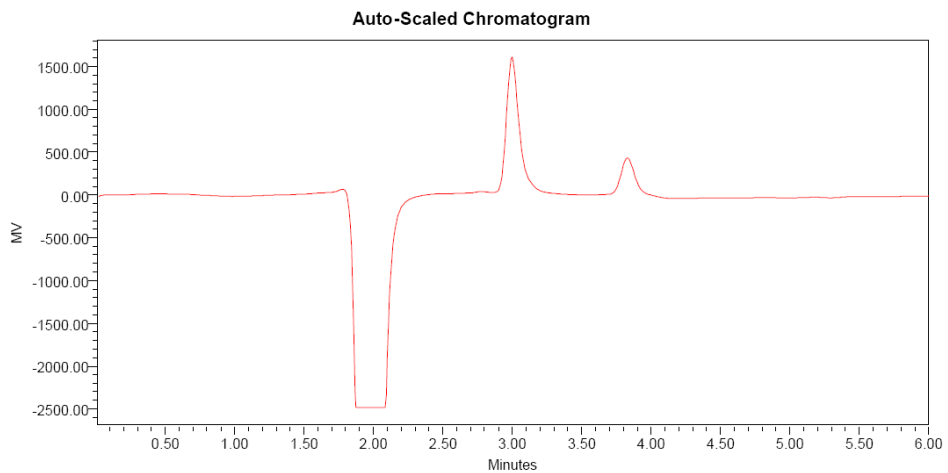


圖 5.4.6 3-Dimethylaminoacrylonitrile + Butyraldehyde 之 HPLC 分析圖

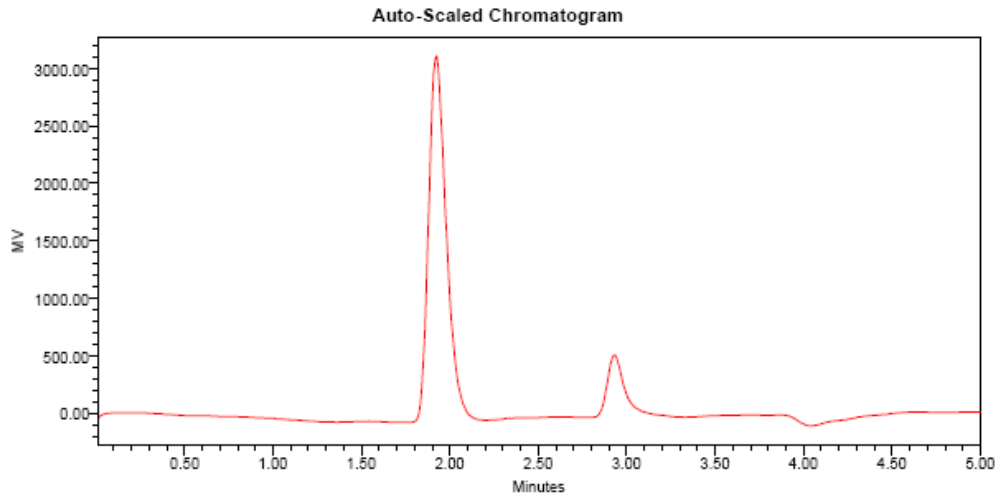


圖 5.4.7 Acrylonitrile 之 HPLC 分析圖

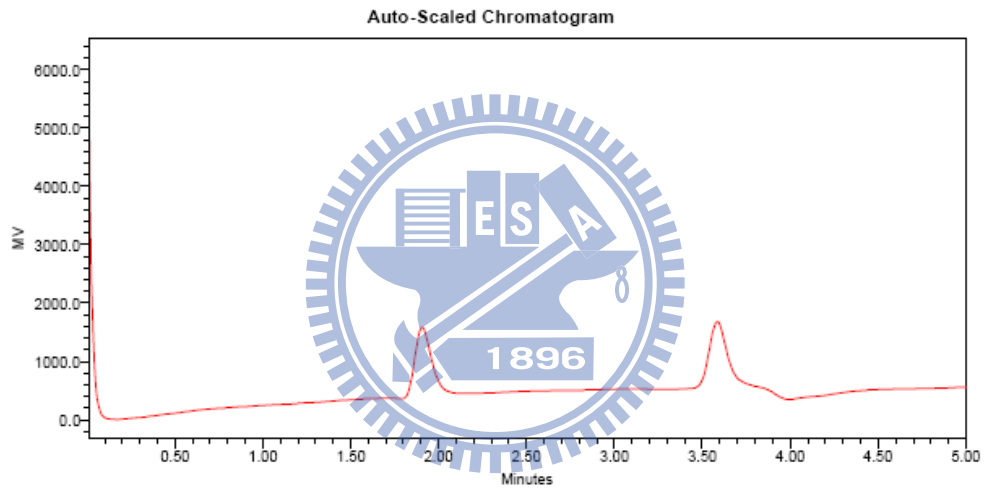


圖 5.4.8 3-Hydroxybenzaldehyde 之 HPLC 分析圖

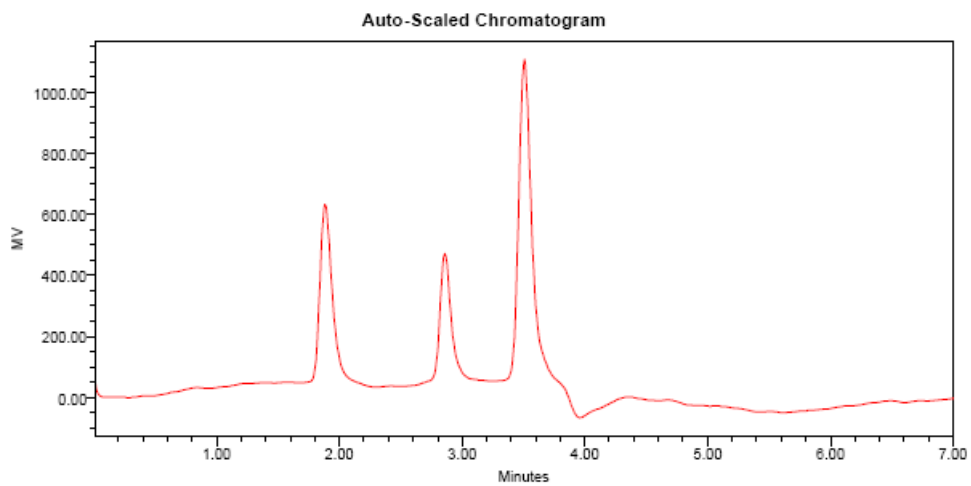


圖 5.4.9 Acrylonitrile + 3-Hydroxybenzaldehyde 之 HPLC 分析圖

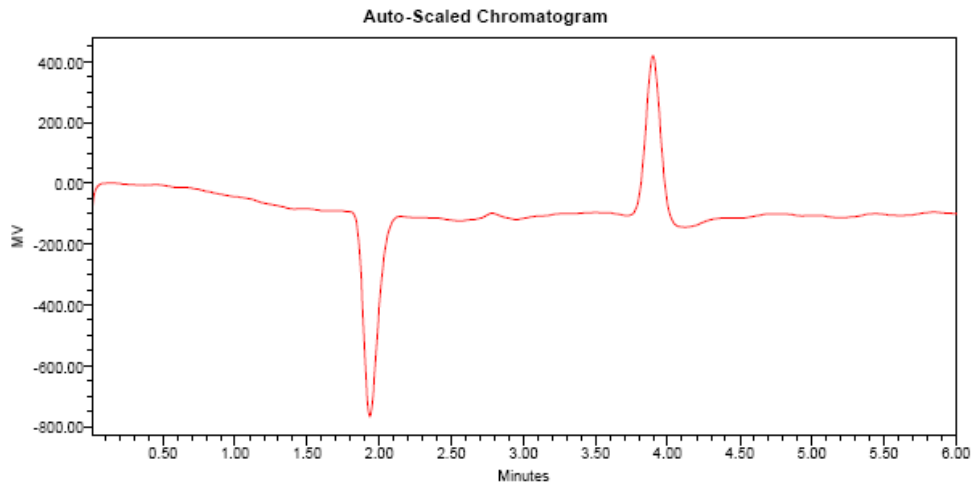


圖 5.4.10 Methacrylonitrile 之 HPLC 分析圖

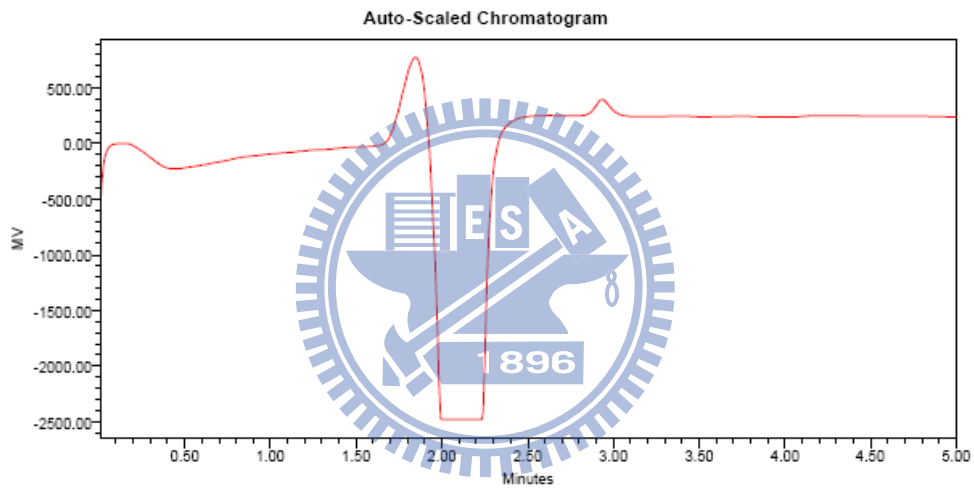


圖 5.4.11 Propionaldehyde 之 HPLC 分析圖

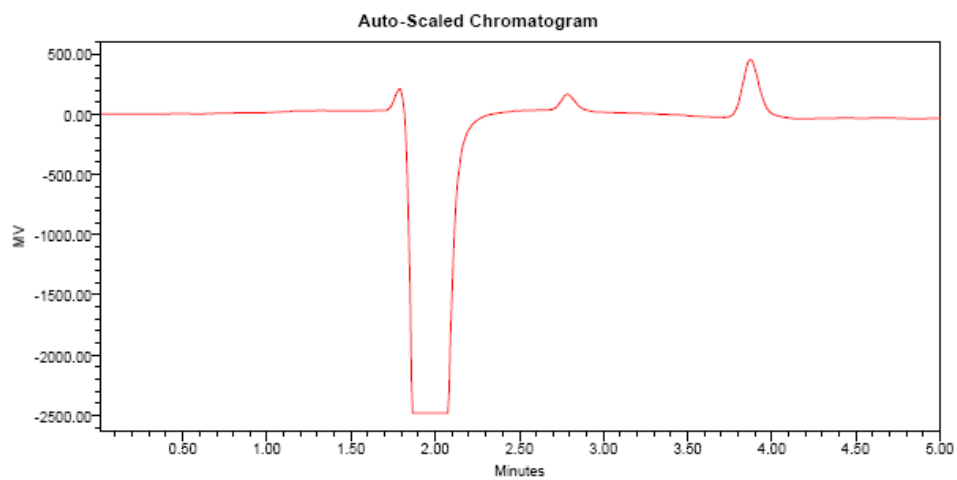


圖 5.4.12 Methacrylonitrile + Propionaldehyde 之 HPLC 分析圖

第六章結論與建議

6.1 結論

1. 本實驗所採用之丙烯腈類與醛類在劑量-反應曲線上皆屬於小斜率物質，因此發生混合毒性加強的機率高達 73%。而當丙烯腈類與 Glutaraldehyde 混合時，其協同作用最為強烈，因此針對 Glutaraldehyde 對環境水體的危害是值得注意的。
2. 反應性有機物利用 QSARs 做毒性作用機制分類，與混合毒性理論的相似係數 λ 兩者並無一致之相關性。而實驗採用純種生物來進行毒性試驗，相關係數 ρ 則是符合結果而趨向完全正相關。
3. 利用 CA & IA model 預測混合毒性來作環境之風險評估，不同以往學者們認為 CA model 的預測情形對環境較具保護力，IA model 才具有較佳之保護力。而造成此一現象是由於本研究在混合毒性的預測中，多探討了劑量-反應曲線之斜率以及物種的相關係數 ρ 。
4. Micotox 試驗與藻類毒性試驗的相關性不甚佳，但在與 Glutaraldehyde 混合時，都能呈現明顯的協同作用，因此需要重視其混合後所造成之影響。
5. 使用 HPLC 分析結果可發現，針對產生協同效應部分之毒性物質，其混合後濃度並無太大之變化，反之，在產生拮抗作用之毒性物質，混合後濃度則大幅下降。

6.2 建議

1. 在丙烯腈這方面的研究中，對於其衍生物之文獻是相當稀少的，因此可嘗試多種物種，為丙烯腈這一類之化學物質建立一個較完整毒性評估的水體資料庫。
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是否產生新的化學物質，或嘗試不同的分析方法希望藉以得之切確的結果來供探討。



參考文獻

1. **Microbics Corp. 1992.** Microbics Corp. Microtox manual : Detailed protocols. 2nd ed. Volume 2. Microbics Corp.
2. **Chen, C. Y. and Yeh J. T. 1996.** Toxicity of Binary Mixtures of Reactive Toxicants. *Environmental Toxicology and Water Quality : An International Journal*, 11, 83-90.
3. **M. T. Madigan, J. M. Martinko.** *Biology of microorganisms* (Brock).
4. **H. A. Khan, A. S. Alhomida, I. A. Arif, 2009.** Neurovestibular Toxicities of Acrylonitrile and Lminodipropionitrile in Rats : A Comparative Evaluation of Putative Mechanisms and Target Sites. *Toxicological Sciences*, 109(1), 124-131.
5. Guidelines for the distribution of acrylonitrile (ceife), 2003.
6. **Z. Tong, Z. Huailan, J. Hongjun, 1996.** Chronic Toxicity of Acrylonitrile and Acetonitrile to *Daphnia magna* in 14-d and 21-d Toxicity Tests. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57, 655-659.
7. **Z. Tong, Z. Huailan, J. Hongjun, 1996.** Quality Criteria of Acrylonitrile for the Protection of Aquatic Life in China. *Chemosphere*, 32(10),

2083-2093.

8. **Z. Tong, J. Hongjum, 1997.** Use of Duckweed (*Lemna minor L.*) Growth Inhibition Test to Evaluate the Toxicity of Acrylonitrile, Sulphocyanic Sodium and Acetonitrile in China. *Environmental Pollution*, 98(2), 143-147.
9. **Z. Tong 1999.** Study on Fish and Amphibian Embryo-Larval Toxicity Test. *Environmental Monitoring and Assessment* 55, 363–369.
10. **M. C. Liu, C. M. Chen, H. Y. Cheng, H. Y. Chen, Y. C. Su, T. Y. Hung, 2002.** Toxicity of Different Industrial Effluents in Taiwan: A Comparison of the Sensitivity of *Daphnia similis* and Microtox. *Environ. Toxicol.* 17, 93–97, 2002.
11. **G. M. Rand, S. R. Petrocelli.** *Fundamentals of Aquatic Toxicology.*
12. **Bliss CF. 1939.** The Toxicity of Poisons Applied Jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585-591.
13. **Hewlett P. S., Plankett R. L. 1959.** A United Theory for Quantal Responses to Mixtures of Drugs: Non-Interactive Action. *Biometrics.* 15, 591-610.
14. **Christensen E. R, Chen C. Y. 1985.** A General Noninteractive Multiple Toxicity Model Including Probit, Logit, and Weibull Transformations.

Biometrics 41, 711-725.

15. **Lipnick R.L. 1991.** Outliers : Their Origin and Use in Classification of Molecular Mechanisms of Toxicity. *Sci. Tot. Environ.* 109/110, 131-153.
16. **Mark T. D. Cronin¹, T. Wayne Schultz. 1998.** Structure–Toxicity Relationships for Three Mechanisms of Action of Toxicity to *Vibrio fischeri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39, 65-69.
17. **Z. Lin, P. Zhong, K. Yin, D. Zhao, L. Wang, H. Yu, 2004.** Use of the IC₅₀ for Predicting Joint Toxic Effects of Mixtures. *Environ. Contam. Toxicol.* 72, 571-578.
18. **Chen, C. Y., and Chiou, Y. S. 1995.** Toxicity of Binary Mixtures of Organic Chemicals. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10, 97-106.
19. **C. Y. Chen, C. F. Huang, 1996.** Toxicity of Organic Mixture Containing Cyanogenic Toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (9), 1464-1469.
20. **C. Y. Chen, S. L. Chen, 2005.** Individual and Combined Toxicity of Nitrile and Aldehydes to *Raphidocelis Subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24 (5), 1067-1073.
21. **C. Y. Chen, C. L. Lu, 2002.** An Analysis of Combined Effects of Organic Toxicants. *The Science of the Total Environment* 289, 123-132.

22. **Z.F. Lin, K.D. Yin, P. Shi, L.S. Wang, and H.X. Yu, 2003.** Development of QSARs for Predicting the Joint Effects between Cyanogenic Toxicants and Aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 1365-1371.
23. **Nakamura. T, and Matsuda. K, 1971.** Studies on Luciferase form *Photobacterium phosphoreum*. Purification and Physicochemical Properties. *J. Biochem.* 70. 35-44.
24. **N. Cedergreen, P. Kudsk, S. K. Mathiassen, H. Sørensen, J.C. Streibig, 2006.** Reproducibility of Binary-Mixture Toxicity Studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1), 149-156.
25. **Y. H. Zhang, S. S. Liu, X.Q. Song, H. L. Ge, 2008.** Prediction for The Mixture Toxicity of Six Organosphorus Pesticides to The Luminescent Bacterium *Q67*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71,880-888.
26. **M. Faust, R. Altenburger, T. Backhaus, H. Blanck, W. Boedeker, P. Gramatica, V. Hamer, M. Scholze, M. Vighi, L. H. Grimme, 2003.** Joint Algal Toxicity of 16 Dissimilarly Acting Chemicals Is Predictable by the Concept of Independent Action. *Aquatic Toxicology*, 63 43-63.
27. **T. Backhaus, R. Altenburger, W. G. Boedeker, M. Faust, M. Scholze, 2000.** Predictability of the Toxicity of A Multiple Mixture of Dissimilarly Acting Chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and*

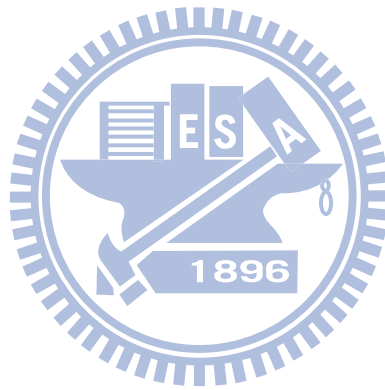
Chemistry, 19 (9), 2348-2356.

28. **A. W. Olmstead, G. A. Leblanc, 2005.** Joint Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Predictive Modeling of Sublethal Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 75 253-262.
29. **Å. Arrhenius, T. Backhaus, F. Grönvall, M. Junghans, M. Scholze, H. Blanck, 2006.** Effect of Three Antifouling Agents on Algal Communities and Algal Reproduction: Mixture Toxicity Studies with TBT, Irgarol, and Sea-Nine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 335-345.
30. **H. L. Martin, C. Svendsen, L. J. Lister, J. L. Gomez-Eyles, and D. J. Spurgeon, 2009.** Measurement and Modeling of The Toxicity of Binary Mixtures in The Nematode *Caenorhabditis elegans*-A Test of Independent Action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28 (1) , 97-104
31. **N. Cedergreen, A. Kamper, J. C. Streibig, 2006.** Is Prochloraz a Potent Synergist Across Aquatic Species? A Study on Bacteria, Daphnia, Algae and Higher Plants. *Aquatic Toxicology*, 78 243-252.
32. **Streibig, J. C., Rudemo, M., Jensen, J. E., 1993.** Dose-Response Curve and Statistical Models. In: Streibig, J. C., Kudsk,P. (Eds.), *Herbicide Bioassay*. CRC Press, Boca Raton, pp. 29-55.
33. **C. Boillot, Y. Perrodin, 2008.** Joint-action Ecotoxicity of Binary Mixtures of Glutaraldehyde and Surfactants Used in Hospitals : Use of The

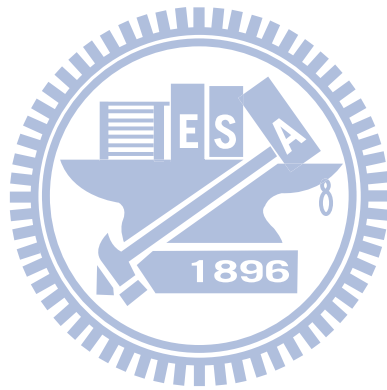
Toxicity Index Model and Isobogram Representation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 252-259.

34. **J. C. Makemson, 1990.** A Cyanide-Aldehyde Complex Inhibits Bacterial Luciferase. *Journal of Bacteriology*, 172 (8) , 4725-4727.

35. 龔俊竹，以密閉式藻類毒性試驗評估丙烯腈類個別毒性及與醛類之混合毒性效應，國立交通大學環境工程研究所碩士論文，民國九十七年。



附 錄



Microtox試驗原始數據

Toxicant : Acrylonitrile

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	93.05	83.20	0.894	1
4392	94.95	5.17	0.054	0.061
2196	93.12	21.57	0.232	0.259
1098	94.24	40.60	0.431	0.482
549	93.45	53.86	0.576	0.645
274.5	97	65	0.670	0.749
137.25	93	70	0.753	0.842

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	80.51	85.06	1.057	1
4312	91.29	15.68	2	0.163
2156	100.73	30.41	0.302	0.286
1078	103.19	49.08	0.476	0.450
539	101.66	71.48	0.703	0.666
269.5	94	76	0.809	0.765
134.75	91	81	0.890	0.842

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	90.92	87.24	0.960	1
4189.5	103.04	3.33	0.032	0.034
2094.75	91.59	19.56	0.214	0.223
1047.40	102.82	48.38	1	0.490
523.70	96.53	67.05	0.695	0.724
261.85	95	76	0.800	0.834
130.93	95	84	0.884	0.922

Toxicant : 2-Chloroacrylonitrile

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	93.82	84.91	0.905	1
22.5	100.09	4.54	0.045	0.050
11.25	86.99	12.49	0.144	0.159
5.62	103.98	25.12	0.242	0.267
2.81	90.89	38.42	0.423	0.467
1.41	96	51	0.531	0.587
0.70	97	60	0.619	0.683

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	89.55	69.09	0.772	1
22.02	85.22	7.30	0.086	0.111
11.01	71.17	13.34	0.187	0.243
5.50	80.66	22.30	0.276	0.358
2.75	84.32	30.17	0.358	0.464
1.38	89	42	0.472	0.612
0.69	85	51	0.600	0.778

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	98.03	93.67	0.956	1
21.96	100.89	7.73	0.077	0.080
10.98	86.68	18.98	0.219	0.229
5.49	101.67	35.61	0.350	0.367
2.74	98.74	50.46	0.511	0.535
1.37	106	80	0.755	0.790
0.69	89	78	0.876	0.917

4

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	91.01	86.59	0.951	1
22.16	84.92	10.20	0.120	0.126
11.08	86.47	22.95	0.265	0.279
5.54	85.11	35.97	0.423	0.444
2.77	84.55	47.27	0.560	0.588
1.39	92	60	0.652	0.685
0.70	90	62	0.689	0.724

5

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	80.66	68.52	0.849	1
21.69	96.93	11.65	0.120	0.141
10.84	94.62	20.38	0.215	0.254
5.42	91.57	30.84	0.337	0.396
2.71	84	35.93	0.428	0.504
1.36	82	47	0.573	0.675
0.68	88	58	0.659	0.776

6

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	91.37	84.91	0.9297	1
22.18	96.2	9.67	0.101	0.108
11.09	95.5	23.08	0.242	0.260
5.55	100.33	41.31	0.412	0.443
2.77	99.17	50.67	0.511	0.550
1.39	99	57	0.576	0.620
0.69	97	65	0.670	0.721

Toxicant : Methacrylonitrile

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	88.36	76.83	0.870	1
4644	86.19	7.17	0.083	0.096
2322	96.75	17.83	0.184	0.212
1161	91.92	41.12	0.447	0.514
580.5	91.79	50.38	0.549	0.631
290.25	87	58	0.667	0.767
145.13	89	65	0.730	0.840

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	98.41	75.50	0.767	1
3952.8	95.50	13.69	0.143	0.187
1976.4	108.38	33.19	0.306	0.399
988.2	107.93	47.21	0.437	0.570
494.1	105.18	61.99	0.589	0.768
247.05	116	80	0.690	0.899
123.53	117	87	0.744	0.969

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	87.40	81.31	0.930	1
4320	86.77	8.10	0.093	0.100
2160	76.84	23.85	0.310	0.334
1080	82.70	39.09	0.473	0.508
540	89.39	55.32	0.619	0.665
270	96	65	0.677	0.728
135	94	73	0.777	0.835

4

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	91.40	79.31	0.868	1
4356	96.77	14.10	0.146	0.168
2178	90.84	30.85	0.340	0.391
1089	93.70	39.09	0.417	0.481
544.5	101.39	61.32	0.605	0.697
272.25	96	65	0.677	0.780
136.13	94	73	0.777	0.895

5

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	109.74	84.99	0.774	1
4392	94.35	9.54	0.101	0.131
2196	102.80	29.50	0.287	0.371
1098	98.37	40.31	0.410	0.529
549	98.31	47.00	0.478	0.617
274.5	109	61	0.560	0.723
137.25	98	66	0.673	0.870

6

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	100.56	82.48	0.820	1
4716	96.87	2.69	0.028	0.034
2358	103.53	19.17	0.185	0.226
1179	90.21	39.32	0.436	0.531
589.5	97.48	54.80	0.562	0.685
294.75	93	61	0.656	0.800
147.38	101	75	0.743	0.905

Toxicant : Methoxyacrylonitrile

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	83.94	70.84	0.844	1
3474	80.60	12.20	0.151	0.179
1737	82.41	32.13	0.390	0.462
868.5	81.08	47.31	0.583	0.691
434.25	77.92	50.00	0.642	0.760
217.13	84	59	0.702	0.832
108.57	80	63	0.788	0.933

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	94.88	84.89	0.895	1
4302	104.36	18.76	0.180	0.201
2125	98.82	39.77	0.402	0.450
1075.5	99.68	55.25	0.554	0.620
537.75	94.43	58.55	0.620	0.693
268.88	90	63	0.700	0.782
134.44	96	69	0.719	0.803

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	88.94	74.13	0.833	1
3478.6	88.46	15.92	0.180	0.216
1739.3	81.27	30.87	0.380	0.456
869.65	79.94	47.07	0.589	0.706
434.82	86.04	56.18	0.653	0.783
217.41	84	59	0.702	0.843
108.71	89	70	0.787	0.944

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	87.27	76.05	0.871	1
3506.4	88.46	17.7	0.200	0.230
1753.2	82.45	35.42	0.430	0.493
876.6	83.08	50.60	0.609	0.699
438.3	85.29	57.90	0.679	0.779
219.15	96	70	0.729	0.837
109.75	102	77	0.755	0.866



Toxicant : 3-Ethoxyacrylonitrile

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	101.50	93.94	0.926	1
1306.8	94.73	18.42	0.194	0.210
653.4	94.35	33.02	0.350	0.378
326.7	108.91	44.95	0.413	0.446
163.35	94.58	60.20	0.636	0.688
81.68	95	77	0.810	0.876
40.84	89	81	0.910	0.983

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	94.44	84.84	0.898	1
1724.4	97.67	18.55	0.190	0.211
862.2	89.23	27.63	0.310	0.345
431.1	94.87	39.60	0.417	0.465
215.55	98.22	56.37	0.574	0.639
107.78	99	70	0.707	0.787
53.89	93	74	0.796	0.886

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	88.77	74.71	0.842	1
1298.7	91.45	21.61	0.236	0.281
649.35	88.74	29.69	0.335	0.398
324.68	90.47	38.22	0.422	0.5021
162.34	84.93	54.91	0.647	0.768
81.17	88	64	0.727	0.864
40.59	90	68	0.756	0.898

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	91.34	76.48	0.837	1
2193.75	84.08	12.42	0.148	0.176
1096.88	78.33	22.99	0.294	0.351
548.44	85.61	31.64	0.370	0.441
274.22	91.68	42.37	0.462	0.552
137.11	96	59	0.6145	0.734
68.56	93	61	0.656	0.783



Toxicant : 3-Dimethylaminoacrylonitrile

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	105.64	81.42	0.771	1
456.3	99.53	32.53	0.327	0.424
228.15	93.25	40.92	0.439	0.569
114.08	88.55	47.61	0.538	0.698
57.04	99.15	61.42	0.619	0.804
28.52	91	59	0.648	0.841
14.26	94	64	0.681	0.883

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	90.17	76.48	0.848	1
2775.6	77.65	7.16	0.092	0.109
1387.8	81.53	14.37	0.176	0.208
693.9	81.14	25.95	0.320	0.377
346.95	87.21	37.13	0.426	0.502
173.48	97	49	0.505	0.560
86.74	95	58	0.611	0.720

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	92.76	88.73	0.957	1
2196	93.48	11.50	0.123	0.129
1098	78.73	20.78	0.264	0.276
549	85.96	29.57	0.344	0.360
274.5	82.47	42.96	0.521	0.545
137.25	87	68	0.782	0.817
68.63	83	76	0.916	0.957

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	89.65	79.07	0.882	1
1778.4	88.45	16.19	0.183	0.208
889.2	84.88	27.56	0.325	0.368
444.6	85.59	32.45	0.379	0.430
222.3	86.19	41.92	0.486	0.551
111.15	98	60	0.612	0.694
55.58	100	74	0.740	0.839



Toxicant : Formaldehyde

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	97.01	80.99	0.835	1
43.42	131.89	7.19	0.0545	0.065
21.71	110.54	11.46	0.104	0.124
10.86	115.76	24.21	0.209	0.251
5.43	99.95	33.48	0.335	0.401
2.72	98	49	0.500	0.599
1.36	101	70	0.693	0.830

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	81.53	70.84	0.869	1
21.825	76.26	11.56	0.152	0.174
10.9125	75.04	22.75	0.303	0.349
5.45625	78.02	37.10	0.476	0.547
2.728125	74.60	43.82	0.587	0.676
1.3640625	87	57	0.655	0.754
0.68203125	86	64	0.744	0.856

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	90.19	70.06	0.777	1
52.14	84.37	5.20	0.062	0.079
26.07	83.31	11.51	0.138	0.178
13.035	92.10	21.35	0.232	0.298
6.5175	84.75	31.05	0.366	0.472
3.25875	84	42	0.500	0.644
1.629375	91	58	0.637	0.8203

4

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	87.66	64.82	0.739	1
52.38	91.78	8.21	0.089	0.121
26.19	78.42	13.12	0.167	0.226
13.095	75.55	19.64	0.260	0.352
6.5475	82.29	28.98	0.352	0.476
3.27375	101.83	45.37	0.446	0.603
1.638875	97.09	52.85	0.544	0.736

5

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	94.72	74.67	0.788	1
38.71	102.56	7.91	0.077	0.097834946
19.35	94.97	13.73	0.144	0.183391684
9.68	89.84	22.73	0.253	0.320941021
4.84	86.74	35.47	0.409	0.518725154
2.42	96	52	0.542	0.687112182
1.21	89	60	0.674	0.855178516

Toxicant : Propionaldehyde

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q mg/L
Control	95.1.	93.64	0.985	1
888.75	73.09	3.28	0.045	0.046
444.38	87.28	20.71	0.237	0.241
222.19	89.03	41.56	0.467	0.474
111.1	96.98	62.39	0.643	0.653
55.5	110	87	0.791	0.803
27.78	119	105	0.882	0.896

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	93.25	80.95	0.868	1
729.8	94.73	21.76	0.230	0.265
364.49	98.20	31.73	0.323	0.372
182.45	85.21	51.61	0.606	0.698
91.23	97.35	69.13	0.710	0.818
45.62	120	90	0.750	0.864
22.81	89	73	0.820	0.945

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	97.07	76.47	0.788	1
1015.2	94.46	4.39	0.046	0.059
507.6	87.34	20.94	0.240	0.304
253.8	81.15	37.50	0.462	0.586
126.9	93.92	55.32	0.589	0.748
63.45	105	75	0.714	0.907
31.73	100	77	0.770	0.977

4

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	100.94	88.32	0.875	1
931.5	93.69	12.2	0.130	0.149
465.75	83.13	23.65	0.284	0.325
232.88	91.92	38.63	0.420	0.480
116.44	116.17	74.27	0.639	0.731
58.22	110	81	0.736	0.842
29.11	98	83	0.847	0.968

5

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	87.32	76.12	0.872	1
921.6	91.68	10.43	0.114	0.131
460.8	92.14	23.37	0.254	0.291
230.4	86.94	39.52	0.455	0.521
115.2	88.87	52.32	0.589	0.675
57.6	92	65	0.707	0.810
28.8	96	71.896	0.740	0.848

6

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	94.22	90.47	0.960	1
868.4	95.00	15.60	0.164	0.171
434.2	99.31	28.26	0.285	0.296
217.1	98.67	48.93	0.496	0.516
108.55	89.26	63.26	0.709	0.738
54.28	87	70	0.805	0.838
27.14	83	72	0.867	0.903

Toxicant : Butyraldehyde

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	97.06	93.07	0.959	1
695.52	98.13	7.80	0.079	0.083
347.76	101.26	18.90	0.187	0.195
173.88	98.89	37.12	0.375	0.391
86.94	105.32	56.45	0.536	0.559
43.47	98	70	0.714	0.745
21.74	75	57	0.760	0.793

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	96.07	84.74	0.882	1
998	91.30	3.18	0.035	0.039
499	85.53	6.89	0.081	0.091
249.5	88.00	22.78	0.259	0.293
124.75	94.49	45.78	0.484	0.5499
62.38	100	60	0.600	0.680
31.18	93	60	0.645	0.731

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	112.02	76.11	0.679	1
838.4	96.36	2.97	0.031	0.045
419.2	86.20	3.38	0.039	0.058
209.6	90.52	6.65	0.073	0.108
104.8	94.56	37.93	0.401	0.590
52.4	91	48	0.527	0.776
26.2	90	54	0.600	0.883

4

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	91.54	66.13	0.722	1
1012.5	96.82	3.39	0.035	0.048
506.25	91.70	5.48	0.060	0.083
253.12	97.00	18.72	0.193	0.267
126.56	96.75	36.76	0.380	0.526
63.28	87	46	0.529	0.732
31.64	97	60	0.619	0.856

5

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	93.72	76.13	0.812	1
864.56	91.08	1.27	0.014	0.017
432.28	99.65	3.81	0.038	0.047
216.14	84.41	16.53	0.196	0.241
108.07	100.99	38.96	0.386	0.475
54.04	98	52	0.531	0.653
27.02	100	74	0.740	0.911

Toxicant : Glutaraldehyde

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	110.96	103.24	0.930	1
43.4	94.40	4.21	0.045	0.048
21.7	95.37	11.6	0.122	0.131
10.85	96.35	24.48	0.254	0.273
5.42	95.36	36.97	0.388	0.417
2.71	98	57	0.582	0.625
1.36	93	65	0.699	0.751

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	96.72	99.01	1.024	1
23.32	89.54	8.31	0.092	0.091
11.66	88.44	19.86	0.225	0.219
5.83	90.28	35.37	0.392	0.383
2.92	96.21	59.80	0.622	0.607
1.46	91	68	0.747	0.730
0.73	99	84	0.848	0.829

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	97.68	86.22	0.883	1
21.66	93.06	2.96	0.032	0.036
10.83	101.39	11.35	0.112	0.127
5.42	88.33	23.45	0.265	0.301
2.71	101.42	42.45	0.419	0.474
1.36	103	62	0.602	0.682
0.68	119	76	0.639	0.724

4

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	96.94	73.1	0.7545	1
28.62	78.74	5.38	0.068	0.091
14.31	120.87	11.73	0.097	0.129
7.155	95.08	20.01	0.210	0.279
3.58	84.23	27.78	0.330	0.437
1.79	113	51	0.451	0.599
0.89	114	68	0.596	0.791

5

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	103.64	88.32	0.852	1
23.06	91.63	5.70	0.062	0.073
11.53	95.22	15.50	0.163	0.191
5.76	95.43	28.55	0.299	0.351
2.88	101.44	47.94	0.473	0.555
1.44	104	60	0.577	0.677
0.72	99	68	0.687	0.806

6

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	92.83	76.67	0.826	1
25.84	95.72	6.89	0.072	0.087
12.92	96.53	14.62	0.151	0.183
6.46	93.21	23.01	0.247	0.299
3.23	89.50	40.78	0.456	0.552
1.62	94	53	0.564	0.683
0.81	93	62	0.667	0.807

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	89.36	72.38	0.810	1
21.78	86.52	6.96	0.080	0.099
10.89	93.69	16.50	0.176	0.217
5.45	101.45	32.28	0.318	0.393
2.72	88.20	45.60	0.517	0.638
1.36	97	57	0.588	0.725
0.68	96	63	0.656	0.810



Toxicant : 3-Hydroxybenzaldehyde

1

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	85.43	70.88	0.830	1
66.4	92.64	14.35	0.155	0.187
33.2	80.44	21.69	0.270	0.325
16.6	84.68	31.01	0.366	0.441
8.3	84.70	40.73	0.481	0.580
4.15	93	53	0.570	0.687
2.08	103	63	0.612	0.737

2

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	93.29	67.74	0.726	1
70.84	76.74	8.4	0.109	0.150
35.42	78.15	19.82	0.254	0.349
17.71	82.08	25.93	0.316	0.435
8.86	80.08	35.18	0.439	0.605
4.43	93	46	0.495	0.681
2.22	91	51	0.560	0.772

3

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	92.92	65.08	0.700	1
95.4	92.45	9.51	0.103	0.147
47.7	90.30	16.33	0.181	0.258
23.85	88.95	22.91	0.258	0.368
11.92	93.71	31.10	0.332	0.474
5.96	104.31	45.37	0.435	0.621
2.98	98.06	49.76	0.507	0.725

4

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	92.46	87.21	0.943	1
88.56	91.41	12.06	0.132	0.140
44.28	91.98	20.05	0.218	0.231
22.14	73.07	22.66	0.310	0.329
11.07	95.04	47.07	0.495	0.525
5.54	75	47	0.627	0.664
2.77	96	78	0.813	0.861

5

Conc mg/L	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	87.61	84.76	0.967	1
65.14	91.76	17.16	0.187	0.193
32.57	92.09	28.98	0.315	0.325
16.28	99.59	41.80	0.420	0.434
8.14	95.10	50.79	0.534	0.552
4.07	98	67	0.684	0.707
2.04	87	72	0.828	0.855

Toxicant : Acrylonitrile+Formaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	95.71	84.43	0.882	1
2	99.49	23.66	0.238	0.270
1	93.08	32.74	0.352	0.399
0.5	95.81	48.47	0.506	0.573
0.25	96.63	54.56	0.565	0.640
0.125	102	71	0.696	0.789
0.0625	97	78	0.804	0.912

Toxicant : 2-Chloroacrylonitrile+ Formaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
control	96.94	89.78	0.926	1
2	102.40	36.71	0.358	0.387
1	103.53	45.42	0.439	0.474
0.5	105.19	56.95	0.541	0.585
0.25	95.23	60.37	0.634	0.684
0.125	95	69	0.726	0.784
0.0625	94	74	0.787	0.850

Toxicant : Methacrylonitrile+ Formaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	94.96	88.25	0.929	1
2	101.28	22.79	0.225	0.242
1	106	35.27	0.333	0.358
0.5	98.63	50.12	0.508	0.547
0.25	97.37	64.98	0.667	0.718
0.125	116	87	0.750	0.807
0.0625	107	86	0.804	0.865

Toxicant : Methoxyacrylonitrile+Formaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	92.12	74.41	0.808	1
2	91.34	20.80	0.228	0.282
1	91.77	33.85	0.369	0.457
0.5	87.76	44.23	0.504	0.624
0.25	102.25	59.76	0.584	0.724
0.125	96	64	0.667	0.825
0.0625	90	65	0.722	0.894

Toxicant : 3-Ethoxyacrylonitrile+Formaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	90.60	81.93	0.904	1
2	110.10	20.93	0.190	0.210
1	89.12	28.38	0.318	0.352
0.5	92.25	47.33	0.513	0.567
0.25	92.81	61.32	0.661	0.731
0.125	95.16	68.65	0.721	0.798
0.0625	94.72	72.66	0.767	0.848

Toxicant : 3-dimethylaminoacrylonitrile+Formaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	103.91	100.43	0.967	1
2	94.85	20.16	0.213	0.220
1	85.64	25.11	0.293	0.303
0.5	94.22	46.34	0.492	0.509
0.25	94.19	59.59	0.633	0.655
0.125	85.17	57.11	0.671	0.694
0.0625	106.51	74.07	0.695	0.720

Toxicant : Acrylonitrile+ Propionaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	93.00	89.08	0.958	1
2	99.12	37.83	0.382	0.398
1	105.34	48.86	0.464	0.484
0.5	99.05	62.94	0.635	0.663
0.25	96.61	69.93	0.724	0.756
0.125	100	81	0.810	0.846
0.0625	96	83	0.865	0.903

Toxicant : 2-Chloroacrylonitrile+ Propionaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	109.07	99.46	0.912	1
2	111.05	37.93	0.342	0.37
1	118.29	53.68	0.454	0.498
0.5	102.56	62.62	0.61	0.670
0.25	111.86	72.57	0.649	0.711
0.125	116	85	0.733	0.804
0.0625	107	86	0.804	0.881

Toxicant : Methacrylonitrile+Propionaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
control	98.54	89.58	0.909	1
4	100.90	19.55	0.194	0.213
2	100.95	36.41	0.361	0.397
1	100.47	53.11	0.529	0.581
0.5	93.02	63.3	0.680	0.749
0.25	103	83	0.806	0.886
0.125	97	83	0.856	0.941

Toxicant : Methacrylonitrile+Propionaldehyde (1:3)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	90.84	77.08	0.849	1
2	89.98	30.29	0.337	0.397
1	92.82	42.37	0.456	0.538
0.5	91.97	52.86	0.575	0.677
0.25	89.21	62.36	0.699	0.824
0.125	101	75	0.743	0.875
0.0625	98	78	0.796	0.938

Toxicant : Methacrylonitrile+Propionaldehyde (3:1)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	93.41	78.93	0.845	1
2	95.05	34.97	0.368	0.435
1	98.22	41.07	0.418	0.495
0.5	83.24	41.22	0.495	0.586
0.25	92.34	54.61	0.591	0.700
0.125	89	57	0.640	0.758
0.0625	111	82	0.739	0.874

Toxicant : Methoxyacrylonitrile+Propionaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	95.36	82.52	0.865	1
2	93.35	20.52	0.220	0.254
1	91.59	37.95	0.414	0.479
0.5	88.62	46.98	0.530	0.613
0.25	95.47	59.07	0.619	0.715
0.125	95	68	0.716	0.827
0.0625	87	74	0.851	0.983

Toxicant : 3-Ethoxyacrylonitrile+Propionaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	97.65	88.11	0.902	1
2	84.74	25.61	0.302	0.335
1	87.76	34.19	0.390	0.432
0.5	93.78	54.22	0.578	0.641
0.25	88.81	68.05	0.766	0.849
0.125	117	92	0.786	0.871
0.0625	98	85	0.867	0.961

Toxicant : 3-Dimethylaminoacrylonitrile+ Propionaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
control	98.36	80.72	0.821	1
4	98.25	17.55	0.179	0.218
2	87.85	22.23	0.253	0.308
1	98.84	37.86	0.383	0.467
0.5	100.56	46.11	0.459	0.559
0.25	105	54	0.514	0.627
0.125	98	60	0.612	0.746

Toxicant : 3-Dimethylaminoacrylonitrile+ Propionaldehyde (1:3)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	95.27	81.70	0.858	1
4	96.35	9.08	0.094	0.110
2	89.31	15.20	0.170	0.198
1	92.89	25.68	0.276	0.322
0.5	89.17	37.95	0.426	0.496
0.25	94	53	0.564	0.657
0.125	82	55	0.671	0.782

Toxicant : 3-Dimethylaminoacrylonitrile+ Propionaldehyde (3:1)

Conc TU	Initial light	Final light	Light ratio	Q
Control	89.41	73.83	0.826	1
4	91.07	8.58	0.094	0.114
2	92.07	16.44	0.179	0.216
1	97.82	23.50	0.240	0.291
0.5	96.67	31.65	0.327	0.396
0.25	96	41	0.427	0.517
0.125	98	52	0.531	0.643

Toxicant : Acrylonitrile+ Butyraldehyde

Conc TU	Initial light	Final light	Light ratio	Q
Control	98.08	91.33	0.931	1
2	105.08	28.16	0.268	0.288
1	103.16	39.47	0.383	0.411
0.5	99.17	47.57	0.480	0.515
0.25	106.54	61.99	0.582	0.625
0.125	92	61	0.663	0.712
0.0625	92	66	0.717	0.770

Toxicant : 2-Chloroacrylonitrile+ Butyraldehyde

Conc TU	Initial light	Final light	Light ratio	Q
Control	94.90	76.87	0.810	1
2	90.23	6.17	0.068	0.084
1	107.56	23.38	0.217	0.268
0.5	103.04	39.65	0.385	0.475
0.25	104.01	56.40	0.542	0.669
0.125	105	69	0.657	0.811
0.0625	107	78	0.729	0.900

Toxicant : Methacrylonitrile+Butyraldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	94.44	84.78	0.900	1
2	111.12	11.65	0.105	0.117
1	110.23	30.83	0.280	0.312
0.5	90.79	34.26	0.377	0.420
0.25	82.36	42.35	0.514	0.573
0.125	104	69	0.663	0.739
0.0625	87	70	0.805	0.896

Toxicant : Methoxyacrylonitrile+Butyraldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	111.38	103.29	0.927	1
2	94.53	3.60	0.038	0.041
1	100.88	23.96	0.238	0.256
0.5	99.23	39.41	0.397	0.428
0.25	99.71	51.15	0.513	0.553
0.125	87	57	0.655	0.706
0.0625	97	70	0.722	0.778

Toxicant : Methoxyacrylonitrile+Butyraldehyde (1:3)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	95.35	104.82	1.099	1
2	93.36	20.35	0.218	0.198
1	98.86	40.60	0.411	0.374
0.5	96.83	54.51	0.563	0.512
0.25	94.01	71.59	0.762	0.693
0.125	97	80	0.825	0.750
0.0625	96	84	0.875	0.796

Toxicant : Methoxyacrylonitrile+Butyraldehyde (3:1)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	90.17	87.35	0.969	1
2	92.01	28.97	0.315	0.325
1	105.42	50.92	0.483	0.499
0.5	98.47	67.82	0.689	0.711
0.25	101.52	70.94	0.699	0.721
0.125	86	70	0.814	0.840
0.0625	87	74	0.851	0.878

Toxicant : 3-Ethoxyacrylonitrile+Butyraldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	107.08	92.62	0.865	1
2	109.52	8.58	0.078	0.091
1	100.15	32.97	0.329	0.381
0.5	103.55	45.48	0.439	0.508
0.25	114.86	66.9	0.582	0.673
0.125	107	75	0.701	0.810
0.0625	119	88	0.739	0.855

Toxicant : 3-Dimethylaminoacrylonitrile+Butyraldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	91.98	84.80	0.922	1
2	85.63	15.52	0.181	0.197
1	78.76	26.25	0.333	0.362
0.5	84.47	39.35	0.466	0.505
0.25	86.64	53.08	0.613	0.665
0.125	91	62	0.681	0.739
0.0625	103	72	0.699	0.758

Toxicant : Acrylonitrile+Glutaraldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	93.90	85.45	0.910	1
4	98.88	20.55	0.208	0.228
2	90.83	32.15	0.354	0.389
1	95.33	40.95	0.430	0.472
0.5	106.14	60.13	0.567	0.623
0.25	98	61	0.622	0.684
0.125	100	66	0.660	0.725

Toxicant : Acrylonitrile+Glutaraldehyde (1:3)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	90.62	82.10	0.906	1
4	94.38	16.52	0.175	0.193
2	96.02	30.32	0.316	0.349
1	98.46	42.34	0.430	0.475
0.5	93.56	51.08	0.546	0.603
0.25	97	59	0.608	0.671
0.125	90	58	0.644	0.711

Toxicant : Acrylonitrile+Glutaraldehyde (3:1)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	80.51	77.59	0.964	1
4	96.03	21.79	0.227	0.235
2	97.08	37.20	0.383	0.398
1	98.33	53.13	0.540	0.561
0.5	92.14	57.7	0.626	0.650
0.25	96	72	0.750	0.778
0.125	95	76	0.800	0.830

Toxicant : 2-Chloroacrylonitrile+Glutaraldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	103.14	102.77	0.996	1
2	94.36	14.84	0.157	0.158
1	91.38	32.42	0.355	0.356
0.5	94.24	47.06	0.499	0.501
0.25	98.65	63.83	0.647	0.649
0.125	104	75	0.721	0.724
0.0625	111	87	0.784	0.787

Toxicant : 2-Chloroacrylonitrile+Glutaraldehyde (1:3)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	95.46	91.85	0.962	1
2	99.95	16.59	0.166	0.173
1	98.58	25.49	0.259	0.269
0.5	96.39	40.87	0.424	0.441
0.25	97.60	57.41	0.588	0.611
0.125	96	69	0.719	0.747
0.0625	82	66	0.805	0.837

Toxicant : 2-Chloroacrylonitrile+Glutaraldehyde (3:1)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	96.46	92.81	0.962	1
2	96.41	28.02	0.291	0.302
1	95.41	38.92	0.408	0.424
0.5	99.36	50.78	0.511	0.531
0.25	91.36	60.90	0.667	0.693
0.125	92	70	0.761	0.791
0.0625	91	77	0.846	0.879

Toxicant : Methacrylonitrile+Glutaraldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	139.03	115.71	0.832	1
2	101.78	9.45	0.093	0.112
1	107.47	25.75	0.240	0.288
0.5	97.47	36.87	0.378	0.455
0.25	139.48	63.24	0.453	0.545
0.125	97	58	0.598	0.718
0.0625	100	64	0.640	0.769

Toxicant : Methacrylonitrile+Glutaraldehyde (1:3)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	90.64	78.49	0.866	1
2	98.99	7.16	0.072	0.084
1	90.89	17.66	0.194	0.224
0.5	93.07	33.21	0.357	0.412
0.25	97.08	49.86	0.514	0.593
0.125	97	55	0.567	0.655
0.0625	90	58	0.644	0.744

Toxicant : Methacrylonitrile+Glutaraldehyde (3:1)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	94.25	88.90	0.943	1
2	102.96	16.07	0.156	0.165
1	94.69	33.21	0.351	0.372
0.5	95.33	47.67	0.500	0.530
0.25	97.62	53.67	0.550	0.583
0.125	94	69	0.734	0.778
0.0625	93	77	0.828	0.878

Toxicant : Methoxyacrylonitrile+Glutaraldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	98.50	87.11	0.884	1
2	92.70	10.40	0.112	0.127
1	94.85	24.43	0.258	0.291
0.5	110.64	45.49	0.411	0.465
0.25	96.85	52.52	0.542	0.613
0.125	93	69	0.742	0.839
0.0625	93	74	0.796	0.900

Toxicant : 3-Ethoxyacrylonitrile+Glutaraldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	97.39	86.43	0.887	1
2	80.13	3.02	0.038	0.042
1	70.95	12.28	0.173	0.195
0.5	89.15	29.94	0.336	0.378
0.25	98.13	44.76	0.456	0.514
0.125	100	68	0.680	0.766
0.0625	82	69	0.841	0.948

Toxicant : 3-dimethylaminoacrylonitrile+Glutaraldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	80.67	72.72	0.901	1
2	92.18	5.69	0.062	0.068
1	86.16	18.76	0.218	0.242
0.5	87.12	34.94	0.401	0.445
0.25	87.50	53.42	0.611	0.677
0.125	81	56	0.691	0.767
0.0625	100	80	0.800	0.887

Toxicant : Acrylonitrile+3-Hydroxybenzaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	106.20	97.80	0.91	1
4	104.30	33.56	0.322	0.349
2	96.36	41.25	0.428	0.465
1	98.44	50.27	0.511	0.555
0.5	101.22	63.87	0.631	0.685
0.25	98	70	0.714	0.776
0.125	100	81	0.810	0.880

Toxicant : 2-Chloroacrylonitrile+3-Hydroxybenzaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	94.74	75.41	0.796	1
2	106.45	29.39	0.276	0.347
1	74.66	35.15	0.471	0.591
0.5	98.60	51.97	0.527	0.662
0.25	92.94	61.81	0.665	0.836
0.125	106	74	0.698	0.877
0.0625	93	73	0.785	0.986

Toxicant : Methacrylonitrile+Hydroxybenzaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	81.50	70.64	0.867	1
2	85.38	24.76	0.290	0.335
1	83.83	29.53	0.352	0.406
0.5	89.51	36.57	0.409	0.471
0.25	93.87	45.56	0.485	0.560
0.125	81	49	0.605	0.698
0.0625	81	56	0.691	0.798

Toxicant : Methoxyacrylonitrile+Hydroxybenzaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	81.57	72.99	0.895	1
2	90.09	26.31	0.292	0.326
1	85.53	37.60	0.440	0.491
0.5	98.95	47.20	0.477	0.533
0.25	82.54	44.19	0.535	0.598
0.125	108	70	0.648	0.724
0.0625	99	69	0.697	0.779

Toxicant : 3-Ethoxyacrylonitrile+Hydroxybenzaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
control	93.47	82.54	0.883	1
4	103.79	27.40	0.264	0.299
2	109.79	43.40	0.395	0.448
1	101.13	49.71	0.492	0.557
0.5	94.45	57.41	0.608	0.688
0.25	95.15	62.57	0.658	0.745
0.125	91	65	0.714	0.809

Toxicant : 3-Ethoxyacrylonitrile+Hydroxybenzaldehyde (1:3)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	90.29	78.80	0.873	1
4	89.50	28.33	0.317	0.363
2	86.84	36.78	0.424	0.485
1	92.39	47.49	0.514	0.589
0.5	96.56	58.20	0.603	0.691
0.25	95	65	0.684	0.784
0.125	90	64	0.711	0.815

Toxicant : 3-Ethoxyacrylonitrile+Hydroxybenzaldehyde (3:1)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	100.20	85.68	0.855	1
4	86.87	25.19	0.290	0.339
2	93.24	37.11	0.398	0.465
1	86.83	43.94	0.506	0.592
0.5	87.21	53.14	0.609	0.713
0.25	93	67	0.720	0.843
0.125	99	75	0.758	0.886

Toxicant : 3-Dimethylaminoacrylonitrile+3-Hydroxybenzaldehyde

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	108.37	100.13	0.924	1
2	95.18	27.91	0.293	0.317
1	93.13	38.28	0.411	0.445
0.5	90.47	47.46	0.525	0.568
0.25	109.2	68.49	0.627	0.679
0.125	94	62	0.660	0.714
0.0625	97	70	0.722	0.781

Toxicant : 3-Dimethylaminoacrylonitrile+3-Hydroxybenzaldehyde (1:3)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	94.76	84.92	0.896	1
4	102.43	13.42	0.131	0.146
2	95.56	27.93	0.292	0.326
1	98.98	40.65	0.411	0.458
0.5	96.90	56.10	0.579	0.646
0.25	95	67	0.705	0.787
0.125	91	68	0.747	0.834

Toxicant : 3-Dimethylaminoacrylonitrile+3-Hydroxybenzaldehyde (3:1)

Conc TU	Initial light	Final ligh	Light ratio	Q
Control	94.87	84.62	0.892	1
4	88.07	12.97	0.147	0.165
2	89.39	25.29	0.283	0.317
1	99.23	41.31	0.416	0.467
0.5	92.78	52.99	0.571	0.640
0.25	91	62	0.681	0.764
0.125	101	74	0.733	0.821



丙醛檢量線

