

第二章 文獻回顧

2.1 低毒性影響

化學物質的存在，給現代社會的發展帶來了極大的好處。但化學物質固有的危險性也對人類健康和環境造成了嚴重的威脅和損害，引起世界各國的高度重視。尤其是具有毒性的化學物質在其生產、運輸和使用過程中，發生過多起嚴重的污染和傷害事故，對人民生命財產、環境造成很大危害。

所以，對於毒性化學物質除了需要了解其基本的化學性質之外，也須針對其與環境生態之間的相互影響做環境風險評估。以往對於化學物質的環境風險評估中，是利用造成超過半數致死亡濃度(LC₅₀)或者影響濃度(EC₅₀)來做為影響的判斷，但是化學物質對於環境或生物體的影響會隨著時間的增加而增加。因此，目前對於毒性化學物質的環境風險的評估中，通常是針對該毒性化學物質對環境危害的程度做計算，或者是預測其對環境不會產生影響的最低限度為何。故大多數毒性試驗研究的目的，是為了獲得毒性化學物質對環境造成低毒性或無毒性影響，然後利用此結果做為風險評估或者環境品質標準發展以及風險管理的指南^[1]。

而化學物質對於環境影響的評估所選擇的低濃度指標 (Endpoint)，會隨著使用者所認同的參數不同而有很大的差異性，目前大部分實驗對環境危害評估於常用的低濃度指標 (Endpoint) 有以下四種：有影響濃度 (Effect Concentrations, EC_x)，無明顯影響濃度 (No Observed Effect Concentrations, NOEC)，最低觀測影響濃度 (Lowest Observed Effect

Concentration, LOEC) 以及無影響濃度 (No Effect Concentrations, NEC) 等等。不同的低濃度指標參數，其基本的計算方法與理論皆不同，EC_x 以及 NEC 是使用回歸分析方法 (Regression methods) 所求得的，而 NOEC 及 LOEC 則是利用變數分析方法 (ANOVA-type data or Hypothesis testing) 獲得。這些指標參數各有其優點及缺點，Nelly Van Der Hoeven^[2] 將其整理如表 2.1.1 所示，為比較不同參數的優缺點。

Table 2.1.1 Summary of the positive and negative aspects of several measures for (almost) no effect

	NOEC	EC _x	EC _{<x}	NEC
Simplicity	++	-	+	--
Accepted	++	-	--	+
Statistically correct	--	+	+	+
Model independent	++	-	0	--
Confidence interval	-	+	-	+
Independent of arbitrary value	-	-	--	+
Independent of sample size	--	+	-	+
Application factor	--	+	++	+
Larger with bad data	--	+	++	+
Independent of test concentrations	--	++	-	+

來源 Nelly Van Der Hoeven (1997)^[2]

2.1.1 無明顯影響濃度 (No Observed Effect Concentrations, NOEC)

NOEC 是指在統計的比較下和控制組平均反應無顯著性差異的最高濃度。由於其推廣使用已久，所以目前已被廣泛的使用在環境毒性試驗中並為一重要反應終點，例如：21 天水蚤的再生試驗，已訂定為毒性試驗的標準方法之一 [3-5]。而美國環保署 [6] 也定義 NOEC 為放流水或測試物質對測試生物體的存活率，再生率或其生長狀態和控制組比較無顯著不同(95% confidence level)的差異。

NOEC 是利用數學統計變數分析方法所衍生出的檢定方法，包括了 Dunnett、Williams test 等方法 [7-9]，其為利用和控制組之間的比較有無統計上的差異性而決定其值。優點為計算方式簡單，容易了解並且在化學物質危害及放流水危險評估中佔有重要的意義 [11-12]。

但有些學者 [1,3,13-16] 認為利用變數分析法所求的 NOEC 是不可靠的，不足以用來當作毒性評估的最低限值。因為其受到實驗時的濃度選擇、重複組組數的關係以及實驗的設計所影響，除此之外，並無法求得 NOEC 的信賴區間且有時並不一定能求得其值。而在 2000 年時，Crane 及 Newman [17] 兩位學者也對於 NOEC 整理出四大缺點：

- (1) NOEC 的濃度決定是基於假說檢定中為無效的情況下而判定的，即為利用 Type I error 而決定，而當無法判定時並不代表 NOEC 並不存在。
- (2) 一般來說定義數值上的顯著值 (significance) α 採用為 0.05，此為一可變動的數字。因此其認為此顯著值為 null hypothesis 所認定的，並非生物學上的顯著值。

(3) NOEC 受到實驗時濃度的選擇的嚴重影響，NOEC 及 LOEC 的值只是測試的濃度。

(4) 因為 NOEC 的值是實驗的濃度，因此無法獲得其信賴區間。

但是 Chao *et al.*^[18] 在針對密閉式藻類毒性試驗中，將 NOEC 及 EC₁₀ 做比較，發現 NOEC 可比 EC₁₀ 提供藻類更高的保護層級，其中也提到可利用中斷值(cut-off value)來判斷決定選擇用 NOEC 或者 EC₁₀ 做為建立低毒性的影響值。除此之外，Isnard P. *et al.*^[19] 對於藻類、甲殼類動物以及魚類針對 EC₀₅、EC₁₀ 及 NOEC 作比較，發現除了魚類之外其比值是無顯著不同的，所以他們認為其雖然 NOEC 具有統計學上的缺失，但其依然可當作預先警戒標準的 (Precautionary Principle) 底限 (Threshold)。



2.1.2 無影響濃度(No Effect Concentrations, NEC)及影響濃度 (Effect Concentrations, EC_x)

在自然環境中，毒性化學物質對於生物體的影響可能存在一個閾值 (Threshold)，此閾值指生物體可以容忍或抵抗毒性物質的影響最高限度，而各別的生物體有不同的容忍分布(tolerance distribution)。而 NEC 則是指此最高可抵抗的濃度值。Cox^[20] 提出了一閾值模式 (Threshold model)，接著 Bedaux 及 Kooijman^[21] 兩位學者根據此定義而提出一個假設，其假設在低於閾濃度 (threshold concentration) 下，化學物質對於我們所觀察的參數不會有所影響。在此假設之下經由閾值模式 (Threshold model) 所描述的劑量反應曲線中，NEC 為模式中的參數，是惟一可以求得的參數。閾值模式認為當被測定化合物達到或超過一定劑量後會引起毒理反應。因此、計算 NEC 主要惟一非線性模式的假設。

在前文中提到，有許多的學者認為 NOEC 並不適用於當做環境毒性風險評估的指標，他們認為使用 NEC 或 EC_x 來取代是較好的選擇。主要的原因即為這兩個低濃度指標參數是利用統計上的回歸方程式所求的值，因此其不受到上述 2.1.1 節所提到的影響限制。除此之外 Chapman *et al.*^[22] 及 OECD^[8] 也提出認為 NEC 或 EC_x 比 NOEC 更好，並且其擁有更強的統計學上的支持。而 x 所建議採用值約為 5 或 10^[23]。但是 NEC 求得方式須有良好的統計學背景基礎，因此使用上受到限制。除此之外，當實驗設計的濃度個數不足時，即可用來回歸分析的數據不足時 ($n < 3$)，或者是反應 (LOG) 濃度的線性曲線斜率的缺乏 (例如:過度平緩或回歸關係不良)，皆有可能造成 NEC 或 EC_x 的上下極限無法求得。而 EC_x 在低濃度時，會隨著所選用的劑量曲線模式不同而有所差異性，且其信賴區間會隨著濃度

越低，範圍也跟著增大。因此，要改善此情況，除了對於反應曲線的模式選擇要做最佳化的選擇外，在實驗中，低濃度的數據需增加，以減少誤差的產生^[19]。



2.2 急慢毒性比值(Acute and Chronic Ratio, ACR)

毒性化學物質在環境危害的評估過程當中，缺乏長時間暴露的毒性試驗研究數據。經常必須使用急毒性試驗來預測環境中慢毒性的影響。因此，根據不同物質而定義的急慢毒性比值(Acute and Chronic Ratio, ACR)是必需要存在的。U.S. EPA 使用 ACR 的幾何平均值或一可替代利用的 ACR 值 (a subset of available ACRs) 來計算周遭水體慢毒性的標準。ACR 值的計算可經由物種的急毒性結果 (LC₅₀) 除以慢毒性結果 (NOEC or LOEC)。計算方式如下：

$$ACR = \frac{\text{Acute toxicity}}{\text{Chronic toxicity}}$$

一般而言，ACR 的計算是基於一個實驗結果而得到的。而若缺乏慢毒性實驗結果時，一般會採用 ACR 為 10，利用急毒性的結果推估慢毒性的值。

在過去中，已有許多學者根據不同的數值方法來得到急慢毒性比值。在 1982 年，Kenaga^[24]對於不同種的魚類及水中無脊椎動物建立了 LC₅₀ 及慢毒性 MATC 之間的關係。進而從中發現了，工業有機化學物質的 ACR 值比一般農藥及重金屬的值要來的低。而此相似的結果也於 1994 年，Mayer *et al.*^[25]的實驗中發現，使用魚類的急毒性數據可預測其 NOEC 及 MATC 的值。而在 European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemical (ECETOC) 中，他們對於大部分的物質(包含:無機物、有機金屬以及殺蟲劑)和多數的物種所做的結果，其認為百分之九十的 ACR 值是介於 27 至 40 之間的，而平均 ACR 值則介於 4.2 至 22 之間^[26]。Persoone 及 Janssen^[27]

兩位學者則認為 ACR 的變化隨著物種和化學物質的不同從 1 到 20000 皆有可能，而絕大部份的 ACR 則是低於 1000，一般來說是低於 50。Länge *et al.*^[28] 收集不同物種及化學物質的數據所做出的結果認為對於所有的物種和化學物質來說急慢毒性比值採用 73 就足以安全的預測 90% 物質的慢毒性 NOEC 值了，而一般工業有機化學物質則建議採用 12-25 亦足以預測其慢毒性 NOEC 值了。

然而，大部分的毒性化學物質在環境中，對於其所作用的目標皆有屬於自己的作用機制，如之前 2.2 節所提到的。因此，若將全部的毒性化學物質皆使用同一個 ACR 定值來表示急慢毒性之間的關係，而不考慮物種的生活史及慢毒性對其生活史的影響，如此一來，將會產生高估或低估了現地中，毒性化學物質的毒性。

Roex *et al.*^[29] 在 2000 年時，根據不同作用機制的毒性化學物質分類做比較，其發現極性麻醉性的化學物質，其擁有較高急慢毒性比值 (ACR)，約為 9.8 ± 11.8 ，而非極性麻醉性的化學物質則較低，約為 2.58 ± 1.57 。在其它文獻中^[30]，有對於兩種不同水蚤的 Thee-brood test 極性麻醉性及非極性麻醉性化學物質的急慢毒性比值分別為 7.66 ± 2.74 及 2.37 ± 0.69 。即代表了在不同的作用機之分類下，ACR 的值應會有差異性。除此之外，物種的不同也有可能會影響急慢毒性的比值。

2.3 定量結構活性關係 (Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR)

毒性化學物質的毒性為毒化物和生物體進行物化作用後的結果。因此，毒物的物理化學性質、毒物結構和毒性有關，此觀念即 SAR 或是 QSAR 的基本發展基礎。所謂 SAR (Structure Activity Relationship) 為利用毒物的物理 (如分子體積) 或化學性質 (如分子反應性) 或毒物結構，來預測毒物對生物的毒性。QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) 則進一步建立當毒物的物化性質經過量化後 (例如利用某指標代表毒物的某些物化性質) 和生物毒性間 (如 EC_{50}) 的迴歸關係。

關於 QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) 早在 19 世紀的歐洲，科學家即曾經以醇類為樣品，觀察其麻醉效應與其物性、化性及結構之間的關係。自 1960 年以來，QSAR 開始蓬勃發展。其實 QSAR 最初是應用在製藥及醫藥工業上，於 1970 年代被引入了環境的領域之中。環境毒理學家著重在有機物之毒性及其對於生物活動之抑制性；生態學家及環境工程師則是著重在有機物之分解過程及其對環境生態之影響。Hansch^[31] 建立最接近真實生物作用之模式，辛醇-水係數 (n-Octanol / Water Partition Coefficient, Log P)，作為有機物之指標 Log P 不僅可應用於水溶液，也可以應用在血液、體素等生物之體內系統，是現今最常使用之參數模式。除了辛醇-水係數外，此類物化參數還包括電子效應 (σ_x)、位阻參數、分子折射 (molar refractivity, MR) 等。

一般而言，有機毒性化學物質的作用機制根據 Verhaar *et al.*^[32] 可以分成四大類，分別為(1)非極性麻醉性 (Non-polar narcosis)、(2)極性麻醉性 (Polar narcosis)、(3)非特殊反應性 (Aspecific reactive) 及(4)特殊反應性 (Specific reactive)

(1)非極性麻醉性 (Non-polar narcosis) :此類作用機制的毒化物又稱基線毒物 (Baseline toxicity), 此類的作用模式為非活潑性的化學物質經由一非特殊的反應模式最後產生麻醉的影響效果。此麻醉形式的影響和毒性化學物質的疏水性有關。因此常藉 QSAR 的關係來預測此類化合物的毒性, 這類型機制的化學物質包括: 氯苯類、醇類、酯類、醚類以及氯烷類。

(2)極性麻醉性 (Polar narcosis) :此類型的毒性化學物質, 其作用影響也藉由麻醉效果。但其毒性較第一類的基線毒物略高, 且其毒性不單單只以疏水性表示。因為此類化合物的毒性可能和其氫鍵能力增加而增加其毒性。酚類及胺類為此種作用機制的主要兩大類化合物。

(3)非特殊反應性 (Aspecific reactive) :此類的機制由親電性的毒性化學物質組成, 此類的化學物質的反應是在大分子的酵素親核基團中的非特殊的路徑。主要的化合物為醛類及環氧化合物類。

(4)特殊反應性 (Specific reactive) :此類毒性物質有特殊的細胞受器為影響對象 (Target), 例如:不同類型的殺蟲劑、多氯聯苯以及某些多環芳香族 (PAHs) 亦屬這類。

另外 Russom *et al.*^[33] 將有機物的毒性機制分為一般的 (General) 和特異的 (Specific) 兩大類型。一般性毒物是指麻醉作用在細胞膜非特定的位置上; 而特異性毒物有又可稱為反應性毒物, 它會作用在細胞的特定位置上或抑制特定的反應。決定化合物毒性機制的有很多, 包括對鱒魚的劑量-反應評估及行為評估、混合毒性測試^[34]、魚類瞬時毒性症狀^[35]等。

因此本研究將參考以上學者以及 Akers *et al.*^[36] 所提出的毒性化學物質的反應作用機制分類方法, 將此 108 種毒性化學物質的分類為三大作用機制:

- (1) 非極性麻醉性毒性化學物質 (Non-polar narcosis) :包含了苯類、烷類、腈類、醇類、酮類以及多環芳香族(PAHs)。

(2) 極性麻醉性毒性化學物質 (Polar narcosis): 包含了酚類、苯胺類。

(3) 反應性毒性化學物質 (Reactive): 包含了醛類、農藥以及含有鹵素原子的胺類。

當 QSAR 預測的毒性和實驗所得的結果相差在 10 倍之內，則預測模式可達到相當準確性 (Accuracy) ^[37]。本研究實驗所得到的 EC₁₀、NEC、NOEC 及 LOEC 值將會與 QSAR 模式所得之預測值進行比較分析，觀察所得迴歸式可接受與否。



2.4 密閉式藻類毒性試驗

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技術分成批次式及連續式^[38-40]；而在於評估毒物等的毒性時，則大多使用批次式方法。例如 U.S. EPA 所採用的 "Fresh water algae acute toxicity test"^[41]、OECD 所採用的 "Algal growth inhibition test guideline"^[42]、ISO 所採用的 "Water quality-algal growth inhibition test"^[43]、APHA 所採用的 "Toxicity testing with phyto- plankton"^[44]及 ASTM 所採用 "Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae"^[45]。

此類的批次式藻類毒性試驗常用的反應參數包括了有細胞密度 (cell density、biomass、growth rate)、產氧量、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，則常以生物量來做為反應參數，但是在於這方面的試驗程序及裝置，卻又在過程上有一定的困難點；因而又發展出以產氧量作為反應參數^[46]，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，當在研究具揮發性的有機物試驗時，還是會因裝置上的缺點，而限制了藻類毒性試驗的使用。

因此，Kuhn 及 Pattard^[47]用 *Scenedesmus subspicatus* 來試驗揮發性毒物，使用磨平的玻璃塞封住燒瓶，指出在控制組中，密閉的環境在 48 小時內對藻類不會造成衝擊，因此建議此類的試驗時間最好小於 48 小時。

除此之外, Glassi 及 Vighi^[48] 曾引用 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月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 為試驗物種進行試驗, 以一兩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 CO₂ 氣體以提供足夠之碳源, 以避免碳源匱乏而影響藻類敏感度, 但實驗中物質濃度僅由亨利定律推算, 並無真正測得溶液中實際濃度。雖然此系統也屬密閉式系統, 相對於僅 100 ml 的溶液, 上空間 (head space) 仍使得有機物有揮發, 逸散的可能性。從此試驗之後, 其他研究群逐漸正視這種系統的必要性, 慢慢地也發展出一連串模擬半密閉式或密閉式的試驗; 但是試驗成效與結果的再現性、敏感度卻是大異其趣。而 Nyholm *et al.*^[49] 提到上述這些密閉式系統仍有空間(head space)的缺點, 使得揮發性物質能會揮散至 headspace 中至液相和氣相平衡為止。

為了改善上述的缺點, Lin *et al.*^[50] 利用連續式的藻類培養方法, 配合 BOD 瓶發展出 48 小時的批次式 BOD 瓶藻類毒性試驗, 除操作更加簡單外, 在時間與成本的耗費也大幅減少, 實驗的結果有極佳的敏感度及再現性, 並讓藻類毒性試驗應用變得更為廣泛, 可同時使用在揮發性的有機物以及金屬。Hsieh *et al.*^[51] 就非急性麻醉性化學物質的實驗結果和其他物種如: 水蚤、鯨魚以及纖毛蟲比較後發現此方法的結果是較為敏感。而在 Yeh 及 Chen^[52] 對於 7 種不同的殺蟲劑的實驗中也發現使用這改良過後的密閉式藻類毒性試驗的結果是較傳統的批次式實驗方法敏感的。Chen 及 Lin^[53] 則將其結果和過去傳統藻類批次式的實驗也果作比較, 結果顯示氯酚以此試驗方法的敏感度高 1.65 至 108 倍。造成此結果的原因其認為是由於揮發性有機物質的毒性使用傳統批次式的實驗方法會低估其對浮游生物的影響。因此, 對於此類的化學物質建議採用一密閉的實驗系統做評估。

而此研究主要即為採用本研究室過去以密閉式藻類毒性試驗對於不同種類有機物, 包含苯類^[50,51]、烷類^[50]、酚類^[52,53]、腈類^[54]、醛類^[55]、苯

胺類^[56]、醇類^[50]、酮類^[50]、PAHs^[57]以及農藥^[58]共 108 種毒性化學物質所做出的原始數據重新計算整理後，獲得 NOEC，LOEC，EC₁₀ 以及 NEC 的部份在加以分別比較討論。

