

國立交通大學
環境工程研究所
碩士論文

反應性醛與極性麻醉氯酚之混合毒性試驗

**Combined toxic effects of reactive and
polar narcotic toxicants**



研究生：陳欣妤
指導教授：陳重元教授

中華民國九十八年七月

反應性醛與極性麻醉氯酚之混合毒性試驗

學生：陳欣妤

指導教授：陳重元

摘要

本研究以反應性醛與極性麻醉物氯酚針對 Microtox 進行混合毒性試驗，並引用 Christensen & Chen 混合毒性理論預測其混合毒性變化。Microtox 混合毒性實驗結果大致符合非交互作用混合理論。實驗結果發現不同機制的物質混合，小斜率的物質產生毒性增強的機率極高，斜率較大的物質混合則以相加及拮抗作用為主。

實驗中發現三組混合毒性不符合交互作用理論：2,3-DP+丙醛、2-CP + 丙醛、4-CP + 丁醛，且丙醛的 isobologram 中更出現了 complex joint action 的現象，推測兩化合物間產生了化學反應，故利用 HPLC 作進一步分析，發現混合後面積大為減少。

許多混合毒性文獻皆指出 CA 模式的預測力較 IA 佳，不過這是基於當 $\rho=0$ 的情形下成立，本研究特別考慮了當 $\rho=-1$ 時的 IA 模式。實驗發現當化合物具小斜率的劑量-反應關係曲線時，以 IA 模式所預測的結果較為嚴重；反之，若混合毒物的斜率較大時則應選擇 CA 模式較為保守。

Combined Toxicity of Reactive and Polar Narcosis Toxicants to Microtox

Student: Xin Yu Chen

Advisor: C. Y. Chen

Abstract

The joint action of reactive aldehydes and polar narcosis chlorophenols was analyzed using the Microtox test. The experimental results were compared with the predictive model. The results of this research agree with the non-interactive combined toxicity theory. The majority of synergistic joint actions observed were related to reactive toxicants having different mechanisms of toxicity and flat concentration-response curves.

There was three interactive multiple toxicity cases : 2-CP + propionaldehyde, 2,3-DP+ propionaldehyde, and the 4-CP+butyraldehyde. The complex joint action could be found between the propionaldehyde and the chlorophenol, indicated that interactive action happened. To study the chemical interactions, here uses the HPLC for analyze.

Many toxicologists thought that concentration addition (CA) had a higher predictive power than independent action (IA). But they just ignored the condition of $\rho = -1$. In this study, we find that if the slope parameter is lower than 2, the IA model predicts a higher effect than CA. On the contrary, if the chemical has the sharp concentration-response curve, CA is more conservative than IA.

誌謝

感謝恩師陳重元教授這兩年來悉心的指導與教誨，多虧有老師的指引，我才能夠順利的完成研究論文，並且感謝計畫書審核與口試期間，林志高教授、趙木榮教授及董瑞安教授委員們提供了許多實用的建議與指教，使得本論文能夠更加完整並嚴謹。除此之外，更加感謝趙木榮教授提供 LC-MS 借我們使用，並為我們解答許多有關 HPLC 方面的疑惑。

在這兩年研究所生活當中，感謝學姊詔茶以及學長哲偉、冠良、俊竹在學習過程中所給予的幫助，還有百珊、介華與學弟妹庭宇、心渝、聖然，不論在生活上或是實驗上都給予我極大的幫忙，使得我能夠順利地完成我的論文，感謝大家。除此之外，更要感謝庭宇及賴明俊幫我潤飾英文 paper。

最後，更要感謝一值支持與關心我的家人們，不論我做什麼決定他們總是無條件的支持著我；另外還有元智、肥呆、小雞、姿吟、yoan、千王、馬路等好友，陪我逛街、陪著我打球、陪著我大吃大喝，豐富我的研究所生活。

目 錄

第一章 前言

1.1 研究動機.....	1
1.2 研究內容.....	2

第二章 文獻回顧

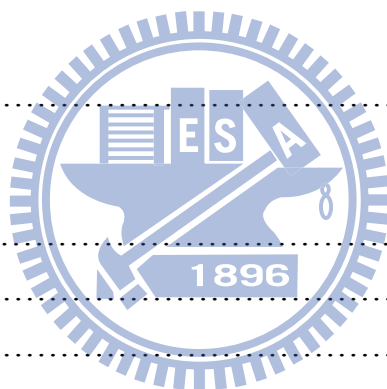
2.1 常用的物種試驗.....	3
2.2 Microtox 毒性試驗概論.....	4
2.3 螢光反應過程.....	5
2.4 單一毒性	
2.4.1 有機物毒性作用機制.....	6
2.5 混合研究之重要性	
2.5.1 非交互作用(Non-interactive) 及交互作用(Interactive).....	11
2.5.2 混合毒性研究之重要性.....	13
2.6 毒性物質—氯酚介紹	
2.4.1 氯酚化合物的特性及來源.....	16
2.4.2 氯酚化合物的毒性與危害.....	17
2.5 毒性物質—醛類介紹.....	18

第三章 基本理論

3.1 QSARs	
3.1.1 非反應性有機物毒性機制.....	20
3.1.2 反應性有機物毒性機制.....	21

3.2 毒性物質劑量—反應模式	
3.2.1 常用的單一毒性模式.....	21
3.3 混合毒性理論	
3.3.1 Isobologram	24
3.3.2 混合毒性指標.....	25
3.3.3 非交互作用混合毒性模式.....	26
3.3.4 交互作用混合毒性模式.....	27
3.3.5 混合毒性效應參數 ρ 和 λ 值.....	27
第四章 實驗設備與方法	
4.1 實驗設備	
4.1.1 基本原理.....	30
4.1.2 儀器構造.....	31
4.1.3 基本配備.....	33
4.1.4 標準分析程序.....	33
4.1.5 Microtox 毒性試驗環境因子.....	34
4.2 試驗毒物.....	35
4.2.1 有機藥品配製.....	36
4.3 實驗數據之處理.....	37
4.4 儀器操作原理、步驟與設定條件	
4.4.1 總有機碳分析儀(TOC)	37
4.4.2 高效能液相層析儀.....	38
4.5 混合方式.....	40

第五章 結果與討論	
5.1 Microtox 單一毒性實驗.....	41
5.2 混合毒性試驗結果分析	
5.2.1 混合毒性單位分析.....	50
5.2.2 混合模式推估(CA、IA)	54
5.2.3 混合毒性效應參數.....	63
5.3 化學分析.....	64
第六章 結論與建議	
6.1 結論.....	76
6.2 建議.....	77
參考文獻.....	78
附錄一	84
附錄二	93
附錄三	101



表目錄

表 2.6.1 氯酚化合物之物化特性.....	16
表 2.6.2 氯酚化合物之合成及用途.....	17
表 3.3.1 基本四種混合效應定義.....	29
表 4.2.1 有機化學物質其基本特性.....	35
表 4.4.1 HPLC 相關規格與設定.....	38
表 4.5.1 混合毒性濃度配製.....	40
表 5.1.1 :試驗毒物之 Microtox 毒性試驗數據.....	43
表 5.2.1 : 反應性醛與極性麻醉物氯酚之混合毒性(TU=1:1)	51
表 5.2.2 : 混合結果總計.....	52
表 5.2.3 基本四種混合效應定義.....	60
表 5.2.4 不同模式的預測力比較.....	61
表 5.2.5 不同模式的預測力整理.....	62
表 5.2.6 反應性醛混麻醉性氯酚之毒性效應參數探討.....	63
表 5.3.1 HPLC 結果整理.....	75

圖目錄

圖 2.4.1 有機毒物的分類.....	7
圖 2.4.2 非特定型反應的化學品.....	9
圖 2.4.3 特定型反應的化學品.....	10
圖 3.2.1 不同斜率的劑量反應關係.....	22
圖 3.3.1 isobologram 示意圖.....	25
圖 3.3.2 兩毒性物質相關度之關係圖.....	28
圖 4.1.1 微毒測試儀.....	32
圖 4.1.2 Microtox 螢光快速分析儀的 32 個槽其相關位置圖.....	32
圖 4.4.2 本實驗中 HPLC 操作步驟及其設定.....	39
圖 5.1.1 Formaldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線.....	44
圖 5.1.2 Propionaldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線.....	44
圖 5.1.3 Butyraldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線.....	45
圖 5.1.4 Glutardialdehyde 之 Microtox 劑量反應曲線.....	45
圖 5.1.5 2-Chlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線.....	46
圖 5.1.6 3-Chlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線.....	46
圖 5.1.7 4-Chlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線.....	47
圖 5.1.8 2,3-Dichlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線.....	47
圖 5.1.9 2,4-Dichlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線.....	48
圖 5.1.10 3,4-Dichlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線.....	48
圖 5.1.11 2,4,6-Dichlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線.....	49
圖 5.1.12 Pentachlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線.....	49

圖 5.2.1 甲醛與 2,3-DP 之 isobologram.....	55
圖 5.2.2 甲醛與 2,4-DP 之 isobologram.....	55
圖 5.2.3 丙醛與 2-CP 之 isobologram.....	56
圖 5.2.4 丙醛與 2,3-DP 之 isobologram.....	57
圖 5.2.5 丁醛與 2,3-DP 之 isobologram.....	58
圖 5.2.6 丁醛與 2,4-DP 之 isobologram.....	58
圖 5.2.7 戊醛與 2-CP 之 isobologram.....	59
圖 5.2.8 戊醛與 2,4-DP 之 isobologram.....	59
圖 5.3.1 乙腈的 HPLC 結果圖.....	70
圖 5.3.2 (乙腈+水)的 HPLC 結果圖.....	70
圖 5.3.3 (乙腈+水)的 HPLC 結果圖.....	70
圖 5.3.4 2-CP (DT=7.507)的 HPLC 結果圖.....	71
圖 5.3.5 戊醛(DT=2.507)的 HPLC 結果圖.....	71
圖 5.3.6 戊醛(DT=2.47)混 2-CP (DT=7.394)的 HPLC 結果圖.....	71
圖 5.3.7 丙醛(DT=2.73)的 HPLC 結果圖.....	72
圖 5.3.8 2,3-DP(DT=14.56)的 HPLC 結果圖.....	72
圖 5.3.9 丙醛(DT=2.73)混 2,3-DP(DT=13.97)的 HPLC 混合結果圖.....	72
圖 5.3.10 丙醛(DT=2.907)的 HPLC 單一結果圖.....	73
圖 5.3.11 2-CP (DT=7.507)的 HPLC 結果圖.....	73
圖 5.3.12 丙醛(DT=2.865)混 2-CP(DT=7.435)的 HPLC 混合結果圖.....	73
圖 5.3.13 丁醛(DT=3.78)的 HPLC 結果圖.....	74
圖 5.3.14 4-CP(DT=10.46)的 HPLC 結果圖.....	74
圖 5.3.15 丁醛(DT=4.21)混 4-CP(DT=10.58)的 HPLC 結果圖.....	74

第一章 緒論

1.1 研究動機

近年來台灣的水污染問題日益嚴重，在一般家庭污水、事業廢水、地表水和地下水等一般水體大多含有毒性有機物質，而所含的物質種類並非僅有一種，而是多種毒性物質的綜合體，也因此當生物暴露於其中，所遭受到的是毒性物質危害也是綜合性的。然毒物在單一毒性上和混合毒性上的表現是不相同，如 Wong *et al.* 針對乾淨水體中的藻類進行金屬混合毒性實驗中，結果顯示當十種毒物個別存在時對藻類並不會有毒性，但是當十種毒物以相同的濃度混合時，卻會對藻類有毒性。由上述例子可知毒性物質在單一狀態和混合狀態所呈現的毒性效應是不同，毒性物質混合後其毒性為何和現行只考慮單一物質的毒性的國內污染管制標準及環境品質標準是否足夠，這兩者問題皆需由進一步的研究與確認。

毒性效應分析必須花費大量的時間與財力才可得知，這也使得毒性評估的目標變的遙不可及，為了減少大量資源投入毒性試驗中，因此有了預測混合毒性變化方面的研究產生，環境毒物學大多選用 Concentration addition(CA)及 Independent action(IA)兩種模式作用預測混合毒性的工具。本研究中也將利用此模式作為混合毒物的預估模式，並將文獻未考慮的部份作進一步的修正。目前許多有關混合毒性的研究，皆著重在相同機制內的混合，較少探討到不同機制的混合效應。因此本研究即選定不同機制的有機物進行實驗，一類為具高反應性的醛類(reactive, aldehyde);另一類則為環境中常見的污染物質—極性麻醉性氯酚(polar narcosis, chlorophenol)。

1.2 研究內容

本論文利用 Microtox 來進行單一及混合毒性試驗之研究，主要內容為以下所示：

- (1) 現有多種有機物的混合毒性試驗，大多探討同種毒性機制內的混合效應，至於不同毒性機制間的混合研究則較為少見，因此本研究選用兩類不同機制的毒物(reactive V.S.polar narcosis)作其混合試驗，以探討混合後毒性的變化情形。
- (2) Christensen & Chen 於 1989 年所發展的預測模式，可藉由單一毒性物質的 probit 分析結果來預測兩種毒性物質混合後的毒性變化情形。因此本研究將利用模式預測的結果與實際混合實驗的結果相比較。
- (3) 若試驗結果與模式不符，則進一步藉由 HPLC 分析兩兩毒物間是否發生化學反應或者形成中間產物。



第二章 文獻回顧

2.1 常用的物種試驗

現今各標準行生物毒性試驗方法中，所用的試驗物種眾多，以 U.S. EPA 所訂定的標準方法為例，其列舉的試驗物種就包含有植物性浮游生物、動物性浮游生物、珊瑚、甲殼類、無脊椎動物、水體昆蟲及軟體動物等。本研究選用 Microtox 作為測試物種，以下針對各物種進行簡單地描述：

1. Microtox： 測試原理為利用螢光菌 (*Photobacterium phosphoreum*) 的發光性遭受毒性物質的抑制來求得毒性。就目前檢驗環境樣品的十幾種細菌性毒性分析法(bacteria toxicity assays)之中，以 Microtox 最被廣泛使用且其已被商業化。
2. Fathead minnow^[1]：本方法主要係以鱥魚為測試生物，以流動式 (flow-through) 生物毒性試驗方法，檢測水樣之急毒性，並以 96 小時半數致死濃度(LC₅₀)表示之。
3. Polytox^[2]： 為 U.S.EPA 所公告的標準方法，利用十二股好氧菌(Polybac Corporation, Bethlehem Pa)搭配呼吸儀(Comput-OX Respirometer)和反應槽 (詳細裝置可參見 *Cadena et al.*^[3]) 來進行試驗，屬便宜的試驗法，且常被用於測試排放水的毒性。
4. Activiated sludge^[4]、*Nitrosomonas*、*Tetrahymena pyriformis*^[5] 和 *Virbrio fischer*^[6]：以上實驗皆屬於批次式試驗，其中亞硝化菌和梨型四膜蟲是由活性污泥分離出來，這些方法發展的目地是為了監測活性污泥池的入流污水的毒性。
5. Shkl^[7]：由美國田納西州環境生物技術中心發展而來，於活性污泥篩選出經基因改良具有冷光特性的菌種 (luminescent bacterium)，藉由發光性的強弱來判定出毒性的大小。

6. Spirotox^[8]：利用 2~3 mm 長的大型旋口蟲(*Spirotomum ambiguum*)來進行急毒性實驗，藉由觀察該原生動物在毒物中的畸形(deformations)和致死(lethality)反應來判定毒性大小。
7. *Daphnia magna*：為靜水式生物毒性試驗方法，以水蚤為試驗物種，監測水樣之急毒性，並計算 48 小時之半致死濃度(LC50)。本方法適用範圍為事業、都市放流水及其他廢污水之急毒性試驗。Kaiser *et al.*^[9]實驗結果認為 *Daphnia* 為敏感性很高的物種。

2.2 Microtox 毒性試驗概論

以上所提的水體生物均為毒性試驗的生物種類，不過在實驗的時效性、代表性、敏感性及便利與否等方面的考量下，每種測試物種各具優缺點。以魚類實驗為例，其具有相當高的代表性與敏感性，且是水體中最值得保護的生物，然而魚類的實驗時間一般定在 96 小時，在實驗操作上需要大量的人力成本；至於藻類試驗，在實驗操作上比起魚類是較為簡便且不需龐大的人力，但在時間方面，仍需兩天的試驗時間。至於其他水體的生物一樣具有優缺點，故在選擇一適當試驗物種時仍須顧及各面。

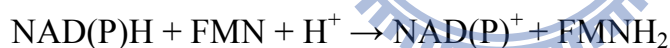
在很多的環境汙染事件當中，時效性及經濟成本上的考量是最主要的因素，而細菌類的毒性測試多具快速便利，培養容易，分布普及成本較低的優點，但細菌類對毒性物質的容忍度較高，故其毒性試驗普遍有敏感度低的缺點，70 年代開始，貝克曼公司(Beckman, Inc.)以螢光菌的發光抑制作為毒性的測試方法，發現螢光菌是一種具高敏感物之物種，故之後常被用做生物毒性管制的篩選試驗(screening test)，並將此試驗稱為「Microtox」。

Microtox 因具有細菌試驗的優點，故到 80 年代已被作為毒性的篩選試驗方式之一，90 年帶更擴大了其運用於各種廢水及污染物質的毒性依

據。螢光菌的毒性測試能廣泛的被採用的原因之一，乃在於具有較佳的敏感度。除此之外，就單一毒性物質而言，螢光菌與魚類的毒性數據具有高度的相關性。螢光菌的運用上由許多的文獻可瞭解到其在環境的毒性試驗上具有重要性，比起其他的毒性試驗具操作迅速簡單方便，高敏感度及高再現性的優點，Microtox 被廣泛的應用在廢水毒性監測及學術研究上。除上述特性，充足的學術研究文獻及研究成果實用的潛力，亦為本研究採用 Microtox 毒性試驗方法的重要考慮。

2.3 螢光反應過程

螢光的發光反應途徑一直是許多生物學家感到興趣的部份，藉由此可了解其他生物發光的相似處，McElroy and Green^[10]從他們的研究得到結論，發光反應進行時，有一長鏈醛與 FMNH₂ 參與; Cormier et al.^[11]則指出此發光反應有一酵素的參與; McElroy^[12]更進一步分別指出發光反應的進行組成是被還原的 FMN、一長鏈醛、氧分子以及細菌發光酶。其反應式如下:



上式中的 FMNH₂ 為還原態的 flavin mononucleotide，RCHO 則為醛類物質，故許多研究藉由長鏈醛類的加入以增加螢光的反應，FMN 為氧化態的 flavin mononucleotide，RCOOH 為低分子有機酸，luciferase 即為螢光反應所需的酵素。由其他文獻得知，Luciferase 具備一特殊的合成調節方法，稱為自動誘導機制(autoinduction)^[13]，螢光菌會產生一個特殊物質 -autoinducer，在生長時累積在培養液中，當 autoinducer 的量達到一個 critical level，則 luciferase 的誘導即開始。有關於 *Vibrio fischeri* 的 autoinducer 則被鑑定為 N-β-Ketocaproylhomeserine lactone。

2.4 單一毒性

由混合毒性文獻中，大多探討麻醉毒性物質間的毒性變化，故本研究選許較少討論的反應性毒物與麻醉性毒物之混合毒性。在此針對有機物間的作用機制分類作一介紹。

2.4.1 有機物毒性作用機制

在水體毒理學中針對現在的有機物性質分類出多種機制，而大多數的分類法是將化學物質分成可逆非特定型(reversible non-specific or general)和不可逆特定型(irreversible specific)^{[29][30]}兩類型。可逆非特定型之化學物質所造成的毒性又可分為非極性麻醉型(nonpolar narcotic)和極性麻醉型(polar narcotic)，這類物質會以非特定的型式造成細胞膜出現孔洞，導致毒性物質可以進入細胞膜內產生毒性反應，圖 2.4.2 為其作用示意圖，而特定型毒性是由反應性物質(reactive compound)所造成，追究其致毒性的原因為細胞的受體位置(receptor site)遭受毒物攻擊，該位置的官能因為化學物質的作用而崩潰，圖 2.4.3 為其作用示意圖。圖 2.4.1 是最常見的有機物分類方式，由辛醇-水係數來進行歸類：

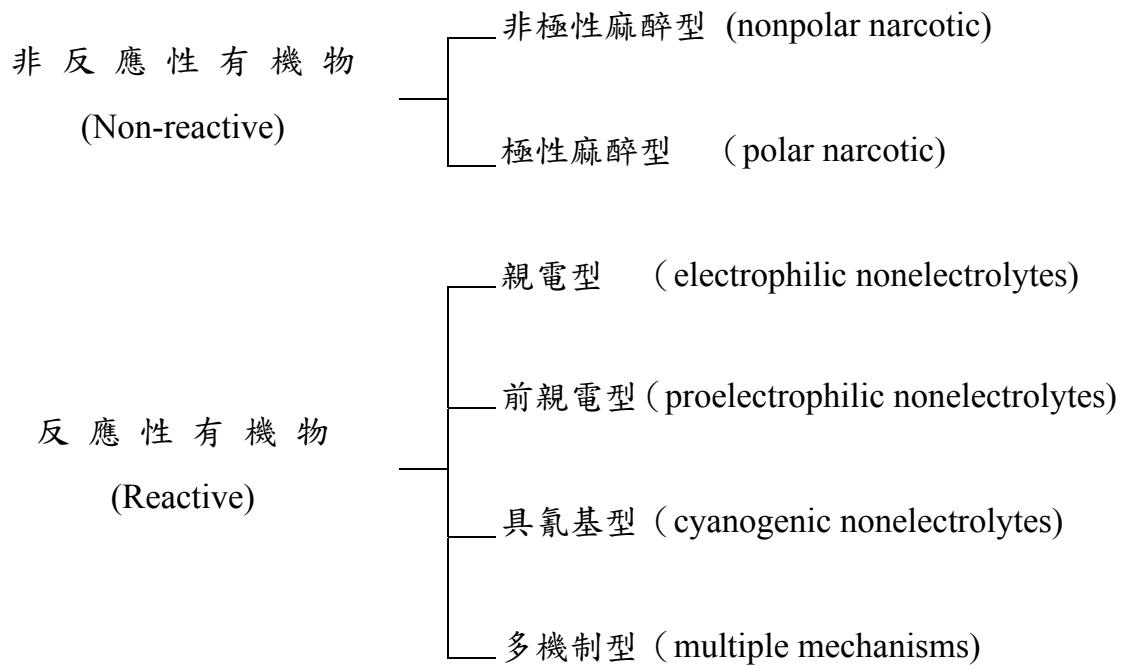


圖 2.4.1 有機毒物的分類

1. 非反應有機物(Nonreactive)毒性機制

一般又可稱為麻醉效應毒性 (Narcosis Effect)，本機制符合辛醇-水係數模式，即與親脂性有關，而親脂性屬於物理作用，其描述生物暴露於某一程度的劑量內，當毒性物質移去，生物原有抑制反應因此消失，毒性呈現可逆反應，該現象也可稱為可逆性生理效應 (reversible physiological effect)，在 Veith *et al.* [31] 的 *fathead minnow*(鱥魚)針對屬非極性麻醉型工業化學物質的急毒性試驗中，就觀察到這類可逆型的效應，該效應產生通常與非共價鍵交互作用 (non-covalent interactions) 有關，即細胞膜內的脂質、蛋白質或兩者間的凡得瓦爾力的交互作用 (van der Waals interactions) 瓦解有關 [32]。

現今工業中所使用的有機化學物質大多是屬於麻醉型式(narcotic mode)毒性物質，且又以非極性麻醉型有機物占的量又最多 [33] [34] [35]，下列針對麻醉型有機物進行分類探討：

- 非極性麻醉型 (Nonpolar narcotic or Narcosis I)

Schultz *et al.*^[36] 實驗結果發現，屬於這類型的化學物質所觀測到的毒性會與 QSAR 模式之辛醇-水係數所預測到的毒性有良好的相關性，換句話說，其毒性與辛醇與水分佈係數成正比，顯示毒性作用主要來自親脂性，藉由覆蓋於細胞膜上造成生化通徑阻塞，或造成細胞膜的「非極化」而形成毒性，因此我們可稱這類型有機物為「非極性麻醉」型。此外因為這類型毒物的毒性與辛醇-水係數迴歸有較佳相關性的毒性，且毒性較與其它類型毒物還要低，學者便將其定義成基線毒性 (baseline toxicity)，而常見化學物質有烷類、醇類、醚類、苯類或帶有鹵素取代基等製藥業、農藥和染料等工業常用的物質。Cronin^[37] 由其弧菌實驗中，發現此類物質不發生生物性的反應，它們的毒性強弱和在作用位置 (site of action or reaction site) 的濃度有關。

- 極性麻醉型 (Polar narcotic or Narcosis II)

Ren and Frymier^[38] 認為這類型的化學物質毒性會較 Narcosis I 的毒性要高一些，而常見的毒物包含了苯胺類、硝基苯類及本研究選用的氯酚類。由於這類毒物毒性較 baseline toxicity 高，原因推測可能與其取代基的不同或是取代基的數目有關。Jawecki and Sawicki^[50] 則指出這類型毒物主要是含有可強烈釋放電子的氨基或氫氧根的芳香族，其表現的毒性約為 nonpolar narcotic compounds 的 2 倍以上，Liao *et al.*^[39] 則認為其稍高的毒性可能和電荷有關。

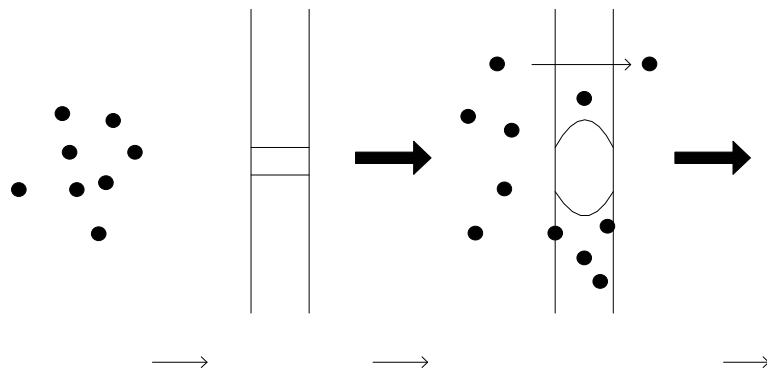


圖 2.4.2 非特定型反應的化學品^[40]

Membr

2. 反應有機物(Reactive)毒性機制

這類型有機物除了具有非反應有機物毒性機制外，其官能基和生物體內所產生之化學變化為主要之毒性來源，通常此類有機物質的毒性超過基線毒性，比非反應有機物還要毒。Verhaar *et al.*^[41]發現 reactive compounds 的毒性會大於 baseline toxicity 有數個 order 以上。

反應性有機物其官能基具有親電性 (Electrophile) 能與生物體內之酵素、反應位址之氨基及硫基產生鍵結、取代、錯合等之化學變化，促使養分吸收、物質傳遞等新陳代謝循環之生化路徑因而受到破壞，造成生命功能損壞。由於有機物質及生物體內之反應位址皆已產生化學變化，無法像非反應有機物具有可逆性的效應，因此反應性有機物質是屬於「不可逆毒性」。Lipnick^[42]將反應性有機物分為四類，分別為反應性親電型毒性 (Electrophilic toxicity)、反應性前親電型毒性 (Pro-electrophilic toxicity)、反應性具氰基型毒性 (Cyanogenic toxicity) 和反應性多機制型毒性 (Multiple toxicity)，而這四類代表生化作用如下：

Membr

- Electrophilic toxicity: 主要由於有機物擁有的親電基(Electrophilic group)和生物體內大型分子上的硫氧基等親核部分(Nucleophilic moiety)，產生取代或相加反應而造成毒性。
- Pro-electrophilic toxicity: 由於該類有機物經由一連串生化作用，將原來物質轉變為 Electrophilic toxicity 的物質。
- Cyanogenic toxicity: 由於毒物由水解或酵素活化放出氰酸離子而造成毒性。
- Multiple toxicity: 這類物質的毒性作用機制較為複雜，可能是因為毒性的產生是必須經過數階段或多重作用而形成毒性的。

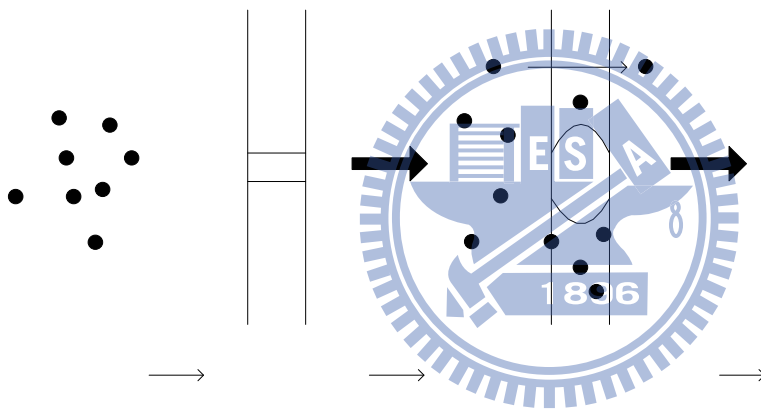
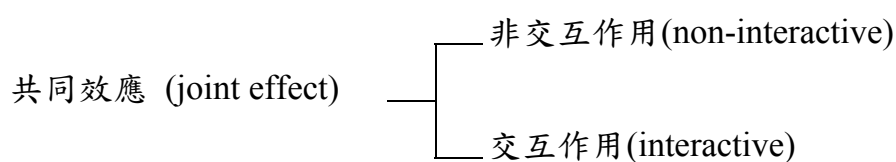


圖 2.4.3 特定型反應的化學品^[43]

2.5 混合毒性

2.5.1 非交互作用(Non-interactive) 及交互作用(Interactive)

Markin 曾說過混合毒性的研究只討論化學物質與生理系統間的作用，而不討論化學物質間的作用，當只討論兩種化學物質共同導致反應的發生，即可稱此特殊的反應為共同效應(joint effect)，而此 joint effect 可分為二類：



回顧過去大多數的生態毒理學家大多以魚類為試驗物種針對兩種或多種以上的化學物質進行實驗，進行 joint effect 的探討，而在這門領域的先驅者為 Bliss^[44]，其首先提出辨別混合毒性作用的量化方法，針對單一毒性物質配合 probit 模式(常態分布函數)得到劑量-反應曲線，依照曲線的平行與否來判定化學物質的混合毒性，理論中將生物體對於毒性物質的容忍度相關性定義在 0 至 1 之間($\rho=0 \sim 1$)，當 $\rho=1$ 時表示兩毒物具有平行的劑量-反應曲線及呈現完全正相關的毒性容忍度，而當 $\rho=0$ 則指反應獨立和零相關。此外 Bliss 將毒性作用分成二種：

1. 簡單相似作用(Simple similar action, simple joint action or concentration/dose addition)：用來描述非交互作用(Non-interactive)的狀況，混合過程中化學物質間不會交互影響，且各化學物質各會提供等比例的毒性單位，可用於了解同分異構物(isomer)和結構相似物(analogue)。
2. 簡單非相似作用(Simple dissimilar action, simple independent action or response addition)：指化學物質間不會影響彼此的在生物反應位置(reaction site)產生的反應，活體動物所受的毒性是各混合物的總和，而反應相加(response addition)指生物產生的毒性反應必須等到毒物的劑量大於生物容忍度才會顯現出來。

Plackett and Hewlitt (1952)^[45]提出的理論為擴充 Bliss 毒性容忍度至負值，並使用二維的常態分布函數計算，其明確的定義出四種反應作用的型式：

1. 以兩化學品首要反應的作用位置和型式的相同和不同可分為相似(similar)和不相似(dissimilar)
2. 在兩化學品前提下，其中一個化學品是否會或者不會去干擾另一化學品所引發的生化反應，而可分為交互作用(interactive) 和非交互作用(Non-interactive)

一般而言，研究混合毒性的基本假設皆為非交互作用(Non-interactive)，這是因為交互作用牽涉到化學反應及生化反應太過複雜，故較少探討。然而從最近文獻中，發現有越來越多研究專門從化學及生化反應方面解釋混合毒性的變化情形。Chen^[19]研究發現 malonitrile 與反應性醛混合時，會產生明顯的協同情形；Lin et al.^[46]將 Chen 的研究結果作進一步分析，並利用 HPLC 作為偵測儀器，發現當 malonitrile 與長鏈醛同時存在時，醛易被 O₂ 氧化形成 carboxylic acids，此種生成物 pH 值極低，造成 Microtox 的抑制率上升，使得混合結果為協同現象。至於在生化反應的部份，Petroutsos^[47] 等學者使用 HPLC 及電噴灑游離質譜儀(ESI-MS)，研究發現海洋性藻類 *Tetraselmis marina* 能夠將 4-Chlorophenol 降解成毒性較低的化學物質。由以上文獻我們了解到，混合毒性是個非常複雜的研究，它不僅牽涉到化學物與化學物之間更包含了化學物與環境間的反應，故預測混合毒性的變化情形需考慮多方面的因素。

2.5.2 混合毒性研究之重要性

許多環境法規對於水質標準的規範，係根據單一毒性物質對於水中生物做毒性試驗後而訂定。然後在真實水體環境中，通常承受不同污染源所排放的多種毒性物質，毒性物質彼此間可能產生交互作用，導致混合後的毒性產生變化。因此，以單一毒性試驗結果作為法規訂定的標準是不足夠的。Wong(1982) 研究顯示，在管制標準內的十種毒性物質，當各別存在水體時，並不會造成任何毒害作用。但是當十種毒物同時存在，則明顯對四種主要藻類造成抑制作用。基於上述情形，有必要針對毒性物質混合後，其毒性的變化作一深入研究，以制定更完善的水體水質標準，確實達到保護水中生物之目的。

水體混合毒性對生態造成的影響已有幾十年的研究歷史^{[14][15]}，目前採用的混合毒性理論源自於藥理學，此兩個基礎理論為：

1. Concentration addition (CA) - 混合的毒物機制相同，作用位置一樣，CA

的觀念可用數學式子表示：
$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{xi}} = 1。$$

2. Independent action (IA) - 相互混合的毒物機制不同且作用位置不一

樣，其若以數學式子表示則為： $E_{mix} = 1 - \prod [1 - E(c_i)]。$

在預測有機物的混合毒性這領域上，許多學者認為 Concentration addition(CA)模式擁有較高的預測能力，至於 IA model 則往往會低估混合毒性。尤其對於劑量-反應關係中曲線斜率大於 1.25 的毒物，在風險評估上，利用 CA 模式來預測其混合毒性較為保守^[16]。

Broderius et al.^[20]以 fathead minnow 作為混合毒性試驗物種，並以混合結果為依據，比較 CA 與 IA model 的預測能力。結果發現當反應物質與其他作用機制毒物混合時，CA 預測出的抑制率較符合實際實驗的結果，此結論與其他文獻結果一致，皆認為 CA 是個較恰當的預測模式。此外作者

亦發現當混合毒物的數量越多，IA 的預測能力也大為提升，幾乎與 CA 一致。Backhaus et al.^[48]針對除草劑作一系列混合毒性試驗，發覺當毒物的單一劑量-反應曲線(Weibull model)斜率落在 2.3 左右時，IA 的預測能力幾乎與 CA 一模一樣，這是因為自然對數 10 正等於 2.3 ($\ln 10 = 2.3$)，此例為數學上的特例，與混合毒物機制沒有一定的關聯。Cedergreen et al.^[49]利用殺真菌劑 (Fungicide) 與殺蟲劑 (insecticide) 的混合毒性結果，評估 CA 及 IA model 的預測能力。與其他文獻不同的是，Cedergreen^[49]多考慮了相似係數 (λ)，其比較結果發現，當毒物的劑量-反應關係曲線斜率落在 1.25 (sigmoid log-logistic dose-response curve) 時 IA 與 CA 的預測能力幾乎相同；若斜率小於 1.25，IA 預測力較佳，反之，CA 則為較適當的預測模式。

早期的研究者多選用相同機制的毒物作為混合毒性實驗。1997 年 XU 與 Nirmalakhandan^[17]兩位學者選擇 66 種非反應性有機物質，分別取六個、八個以及十個毒物混合，結果大致呈現毒性相加(additive)。故在麻醉性物質間的混合，過去早期的研究皆指出其混合毒性效應偏向毒性相加。

至於在不同機制毒物間的混合試驗，Chen and Chiou^[18]對 13 種非反應性及 4 種反應性有機物，以 Microtox 做混合毒性研究。其結果發現，非反應性有機物彼此的混合，若此兩種有機物具有近似平行的劑量-反應曲線，則發生毒性減弱的機率最大；至於以非反應性和反應性有機物混合時，由於有機物間兩種機制毒性貢獻比重不同，毒性反應位置差別大，故其實驗結果大致上為毒性消滅作用(antagonism)。

Chen and Yeh^[19]針對反應性有機物的混合情形做研究，並將反應性有機物依毒性作用機制的不同再細分為四大類。研究結果發現，若機制相同之反應性有機物混合時，以發生毒性相加及毒性減弱為主；若不同機制且兩種反應有機物的劑量-反應曲線斜率甚小時，則出現毒性加強(synergism)的機率很高，此表示對生態系統極具威脅。而當此兩種反應有機物中有一者

其劑量-反應曲線斜率為高時，易呈現毒性減弱的效應。

Broderius et al.^[20]利用相同機制的毒物做混合試驗，結果與其他學者相似，同一機制的毒物混合後，其毒性相加(addition) 的機率較大，主要因為相同機制的毒物相互扮演著稀釋的角色，因而混合結果為個別毒物的毒性相加。此篇研究同時也以不同機制的毒物混合，實驗結果發現產生拮抗作用(less than additive)的機率較大。此部分的結果與 Chen and Chiou^[18]的結果相符。

綜合以上的研究結論，歸納出四個主要預測混合作用之關鍵:

1. 非反應性毒物之混合效應為毒性相加或減弱，而當兩化學物質的劑量-反應曲線相互平行的話，往往表現出毒性相加的情形;若兩毒性物質的劑量-反應關係斜率差別很大時，則毒性減弱的情況較明顯。
2. 相同作用機制的反應性物質混合時，通常大部分表現出毒性相加或減弱的情形，在這類的混合中並無明顯的毒性加強效應產生。
3. 有機物質具有小斜率的劑量-反應曲線時，表現出毒性增強的機率較多，而當斜率大時，大部分為毒性減弱。
4. 反應性有機物與麻醉性有機物的混合毒性，由於其毒性作用位址不相同，故其主要為毒性減弱作用。

在本研究中，選取較少被探討的反應性與麻醉性物質相混合，並利用上述預測混合毒性準則，比較實驗結果是否吻合。於反應性物質中選用反應性高、且具高比例協同作用的醛類作研究；極性麻醉物則選擇最具代表性、環境中最常見的氯酚。

2.6 毒性物質—氯酚介紹

2.6.1 氯酚化合物的特性及來源

氯酚類化合物為含氯芳香族化合物，具毒性、不易揮發、比水重、且具穩定化學特性之化合物，能長久存在於環境中，且其為一種難分解物質，在環境中常藉由食物鏈形成累積，而增加其污染程度。其物化特性可見表 2.6.1，而其合成方式及用途則見表 2.6.2。

表 2.6.1 氯酚化合物之物化特性

毒性物質	Log P	pKa	分子量 (g/mol)	比重	溶解度 (g/L)	物化特性
2-Chlorophenol	2.29	8.3	128.6	1.241	28.5	液體，微溶於水， 易溶於鹼性溶液
3-Chlorophenol		8.8	128.6	1.245	26	液體，微溶於水， 易溶於鹼性溶液
4-Chlorophenol	2.53	9.2	128.6	1.306	27.1	結晶狀固體、微溶 於水，易溶於醇、醚
2,4-Dichlorophenol	3.20	7.8	163.0	1.383	4.50	針狀晶體，難溶於水 易溶於醚、苯、醇
2,4,6-Trichlorophenol	3.67	6.0	197.5	1.49	0.80	白色粉末，難溶於水 易溶於醚、苯、醇
Pentachlorophenol	5.02	4.7	266.4	1.987	0.014	白灰色粉末，加熱有 刺激味，可溶於鹼中 不溶於水

表 2.6.2 氯酚化合物之合成及用途

毒性物質	合成方式	主要用途
2-Chlorophenol	酚直接氯化	有機物合成
3-Chlorophenol	酚直接氯化	有機物合成
4-Chlorophenol	酚直接氯化	製造 2,4-Dichlorophenol
2,4-Dichlorophenol	酚直接氯化	作防腐劑及殺蜘蛛劑
2,4,6-Trichlorophenol	酚直接氯化	製造五氯酚
Pentachlorophenol	酚或氯酚直接氯化	用作木材防腐劑、除草劑、殺蟲劑

目前將近有 15000 種氯酚化合物在環境中所使用，造成在淡水及海水中時常可見到氯酚此種污染物，其污染來源主要為除草劑、殺菌劑與殺蟲劑的噴灑，以及木廠中為了防止木頭腐蝕使用之防腐劑、紡織廠及皮革製品中皆會釋放氯酚類有機物進入環境中。此外造紙工廠漂白製成之廢水中也可發現其存在。另一部分的氯酚來源也可能由環境中其他化合物經生物轉化作用而形成，例如五氯酚可由六氯苯經生物轉化而產生^[21]。隨著藥劑的生產及使用所排放出含大量氯酚類的廢水，若流入水體中將是一大污染。雖然水體具有基本的自淨能力，然而在氯酚類大量的使用下，早已超出其自淨能力範圍。

2.6.2 氯酚化合物的毒性與危害

氯酚化合物對生物體造成的毒性主要由於親脂性高，易覆蓋於生物細胞上，使得物質無法進出細胞而導致生物的死亡。除此之外，部分酚類會和微生物體內某一特定組織產生鍵結而阻斷電子之傳送，如此，即造成微生物生長的抑制。氯酚對不同營養階層的生物皆會造成毒性，且是種難分解化合物，甚至某些氯酚會造成生物累積現象(bioaccumulation)。由於以上種種原因，環境中的氯酚一直是學者關注、研究的物質。

Boyd^[22]等學者曾利用細菌 *P.fluorescens* 對一系列之氯酚類進行生物毒性試驗，發現氯酚類對試驗物種之毒性隨著其鍵結氯的數量增加而增強，對酚類而言，辛醇與水係數(log P)越大其毒性也越強。此外氯酚化合物的毒性也因氯原子的所在位置而不同，通常以 *para* (對位) 位置的氯酚化合物毒性最高，其次為 *meta*(間位)及 *ortho*(鄰位)。除了以上所述因素會影響氯酚的毒性之外，環境中的 pH 值也是個重要因素，若 pH 大於毒性物質的 pKa，此時氯酚會以解離態存在於環境中，通常未解離態的氯酚毒性較強。因此為了降低 pH 因素的干擾，實驗的 pH 最好皆控制在 pH=6.5 左右。

氯酚化合物主要會破壞生物體內參與新陳代謝化合物的結構以及未鍵結磷酸酯化作用的進行，並抑制 ATP 和其他許多酵素的活性，使人體產生過量的熱，造成中樞神經失調、呼吸困難和心臟衰竭的症狀(蘇，2001)^[23]。氯酚會因吸入、皮膚接觸及誤食或經食物鏈累積進入人體，對人類健康的危害可分成急性及慢性兩部份。在急性部份會造成皮膚的紅腫、眼睛接觸會刺激結膜、吞食會造成口及食道組織壞死;至於在慢性的危害部份，長期的暴露會傷害肝臟及腎臟，並產生支氣管炎。

2.7 毒性物質—醛類介紹

醛類化合物為含有-OH 官能基的碳氫化合物，本研究中選取甲醛、丙醛、丁醛及戊醛作混合毒性試驗。醛類具毒性、易揮發、不利長久貯存等化學特性且具有高反應性的有機毒物。醛在環境中是個普遍存在的汙染物，使用十分地廣泛，在化學製品方面，常被用作人造樹脂的原料;也可用在殺蟲劑、除草劑、除臭劑及滅菌劑，在木材工業方面常以醛類化合物做黏著劑，部分醛類也被運用在照片顯影劑當中，除此之外，在橡膠合成廠也有醛類化合物的蹤影。除了工業用途外，醛類也運用在醫療院所病理組織切片固定及保存、醫院解剖大體的保存等。在醛類大量的使用下，若流

入水體生態將會對環境造成嚴重的傷害。

在毒性資料方面，進入人體的醛能和蛋白質的氨基結合，使蛋白質變性，擾亂人體細胞的代謝，對細胞具有極大的破壞作用。同樣的，醛對人體的危害也可分為急性及慢性兩部份，在急性部份，皮膚接觸醛類化合物會刺痛、變色及產生過敏反應，眼睛碰觸時則會發痛、流淚。而長期暴露在含有醛的空氣下則會造成慢性氣管炎，並且部分醛類(如甲醛)會傷害生物體的 DNA，並且被國際癌症研究機構(IARC,1995)確定為可疑致癌物及致突變物。



第三章 基本理論

本研究選用的有機毒物依照 QSAR 模式的分類，將有機物分成反應性有機物與非反應有機物兩大類。而處理毒物數據的模式，一般有三種：Probit 模式、Weibull 及 Logit 模式，根據 Chen and Chiou(1995)^[18]對螢光菌的毒性分析，發現 Probit 及 Logit 模式較適合螢光菌的毒性分析，因此本實驗中數據的處理選用 Probit 模式。此外，本章節並就混合毒性作一簡單介紹。

3.1 QSARs(Quantitive Structure Activity Relationship):

由於各種化學物質的大量出現，且在醫學的領域上，人工合成的藥物更是不斷的出現，因此其對生物體的毒性為何，也相對地變的更為複雜，而運用模式去預測毒物與生物體之間的反應為何，也因應而生。QSAR 即為一例，其主要意義在於以化學物質的物理或化學性質，去推測其對生物體生化活動造成干擾的程度。在毒性物質的影響大小(如毒性數據)與毒物的物化特性(如分子鍵結與分子形態)之間，建立一定的關係，如此在具有相似物化特性的毒物間，即可去預測其對生物的生化活性反應如何。

利用 QSAR 模式來分類毒性機制，可將有機物分成兩大類，一為反應性(reactive)有機物，另一則為非反應性(non-reactive)有機物，將其分述如下：

3.1.1 非反應性有機物毒性機制：

非反應性有機分子進入生物體內後，並不參與生化反應，其毒性主要來自於有機物的親脂性(lipophilicity)。有機物的親脂性促使有機分子覆蓋在細胞膜上而造成生化路徑的阻塞，使得細胞無法正常的代謝，而形成生化反應的抑制。此種毒性反應類似吸附的行為，故為可逆的毒性。屬於這

類的有機物通常為一些簡單的非電解質有機物，而這類的毒性作用由於其反應的類型又稱為「麻醉效應」(narcosis toxicity mechanism)，一些簡單無複雜官能基的醇類、酯類、酮類及醚類皆屬之。麻醉作用機制又可分為極性(Polar)以及非極性(Non-Polar)，實驗中選用的氯酚類皆屬於 Polar Narcosis。Verhaar(1992)認為極性與非極性麻醉毒性效應的差異在於氫鍵鍵結提供酸性的強弱不同，極性麻醉化合物通常比非極性麻醉物質活潑，因此導致麻醉性物質的毒性比非麻醉性物質來的高。

3.1.2 反應性有機物毒性機制:

對於許多有機物，當其以辛醇與水分配係數去描述時，由於常呈現出比所預估的毒性反應更激烈，此種有機物為模式的”outlier”部分，其具有超額毒性(exceed toxicity)，此類具有超額毒性的有機物將之歸納為反應性有機物。反應性有機物其毒性機制為化學物質直接參與生物體內之生化反應，奪取其他物質反應的位置，藉由阻絕生化作用來造成毒性。由於生物體內反應位址均已產生化學變化，故其毒性反應為不可逆。醛類則屬反應性有機物。

3.2 毒性物質劑量-反應模式

3.2.1 常用的單一毒性模式

當毒性物質對受體生物發生作用時，受體生物所受影響或死亡的百分率，隨著毒性物質濃度而有所影響。通常毒性物質劑量對於受體生物反應劑量會呈現成 S 曲線關係，稱之為劑量-反應曲線圖。若已知毒物進入生物體內的量，則可稱為劑量反應關係，其中 x 軸為有機物濃度，而 y 軸為反應百分比。在毒性試驗過程中，受測生物受毒性影響造成 50%抑制或死亡，則稱為 EC_{50} (Effect Concentration 50%) 或 LC_{50} (Lethal Concentration 50%)，不同的生物體對於不同的毒性物質有不同的斜率大小的劑量反應關係如圖 3.2.1 所示。

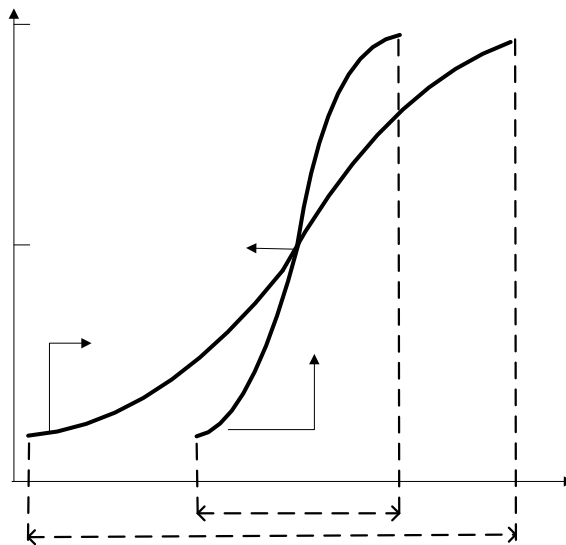


圖 3.2.1 不同斜率的劑量反應關係

由於利用 S 型曲線求取 EC_{50} (半致死濃度) 並不容易。因此必需藉由數學關係式將 S 型轉為直線型以便求取。其中最常見的毒性物質劑量-反應模式有 Probit、Weibull 及 Logit 三種，Christensen 曾經對這三種模式做比較；發現這三種模式是依據不同的假設發展而成；Weibull 模式是假設毒性物質與受體生物間產生化學鍵結，至於 Logit 模式則為假設毒性反應形式如同某種酵素反應。下列為常用模式之解釋：

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

$$Y = NED + 5$$

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

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

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

2. Weibull：為機率-反應機制基礎 (Mechanistic-Probability basis) 模式，發展根據毒性物質分子與受測試生物之受體分子間化學鍵關係所推演而來，logit 模式相同皆假設毒性物質會在生物體內受體產生化反應。
3. Logit：由人口成長研究所發展而出的另一種模式，描述毒性反應中的某種酵素反應 (Enzyme Reaction)，適用於自催化 (autocatalysis) 之化學反應。



3.3 混合毒性理論

3.3.1 Isobologram

Isobologram 由 Loew^[24]於 1926 年所提出用以描述兩種毒性物質混合後，毒性變化的圖形表示法。「isobole」的觀念發展主要是為了評估了解混合毒性作用而發展，就「isobolo」字而言，起源於「isos」意謂著相等的意思，而就「bolo」字而言，其意謂著混合效應的圖形中有向內凹 (strike) 和向外凹 (bolw) 的情形發生。混合毒性試驗中之兩種毒性物質取不同毒性單位比例加以混合，在一個固定的抑制率或死亡率下(如 EC₅₀ 或 LC₅₀)，按不同的混合比例畫出一個等抑制率或死亡率曲線，此一圖形稱為 Isobologram，為指標值理論的基礎。

Isobologram (見圖 3.3.1)，圖中所有曲線均以 50% 抑制率為基準線，若畫出之曲線為通過 (1,0) 及 (0,1) 的直線，及無論任何毒性單位比例相混合其毒性單位均為 1，則判定混合毒性效應為毒性相加(Addition)；若為凹向原點之曲線，則判定為毒性加強(synergistic)；若曲線偏離原點，則為毒性減弱(antagonistic)。實驗中繪製 isobologram 所選用的毒性單位為 3:1、1:1、1:3。

在繪出 Isobologram 時，有時會發現所繪曲線會跳出由 (1,0) 及 (0,1) 所界定出的正方形範圍中即跳出 Isobologram 所能描述的非交互作用(non-interactive)現象中，呈現強烈的 antagonism，該現象稱為複合式的共同反應 (complex joint action)。而 complex joint action 的主要特性如下：(1) 在任何毒性單位比例下，均呈現混合毒性減弱現象。(2) 不同毒性單位比例，有毒性效應減弱現象發生。(3) 對於劑量-反應曲線斜率較大之毒性物質，其在毒性單位較小時，對另一種毒性物質有解毒作用。

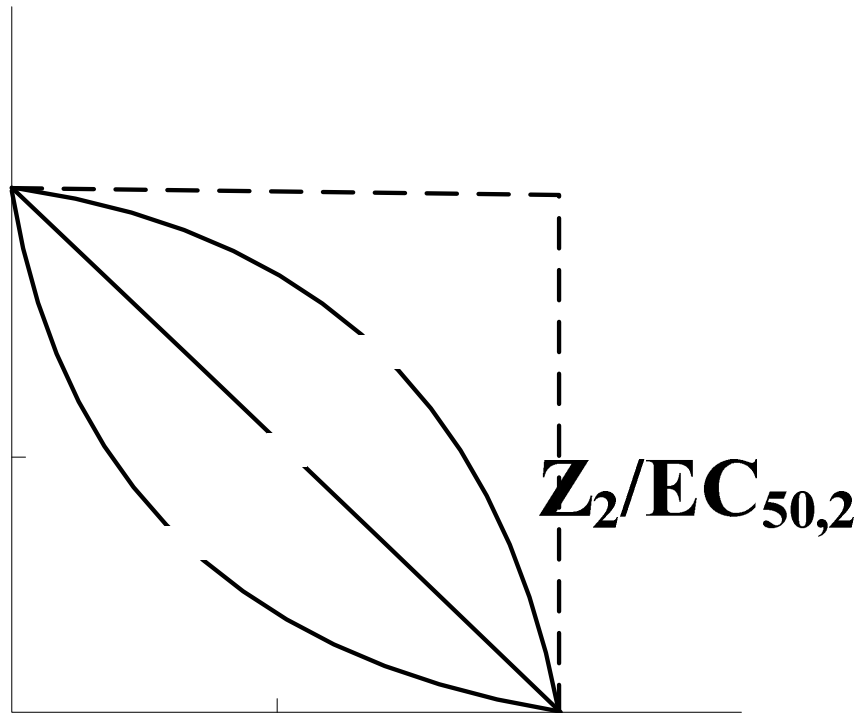


圖 3.3.1 isobologram 示意圖



1.0

3.3.2 混合毒性指標

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

$$M = \frac{Z_1}{EC_{501}} + \frac{Z_2}{EC_{502}}$$

其中 M : sum of toxic units 相加係數

Z_1 : 毒性物質 1 的濃度

Z_2 : 毒性物質 2 的濃度

Z_1+Z_2 : 造成 50% 的抑制

EC_{501} : 毒性物質 1 的 EC_{50} 毒性容忍度

EC_{502} : 毒性物質 2 的 EC_{50} 毒性容忍度

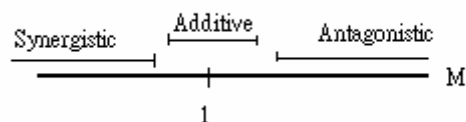
0.5

本實驗利用 TU 作為混合的毒性單位，至於判別混合的結果則以 95% 信賴區間為依據。

其中 $M < 1$ ：混合結果為協同(greater than additive, 毒性增強)。

$M = 1$ ：(95%信賴區間包含 1) 毒性相加(addictive)。

$M > 1$ ：拮抗作用(less than additive, 毒性減弱)。



3.3.3 非交互作用混合毒性模式

Hewlett & Packett 於 1959 年^[16]提出非交互作用混合毒性，此為 2 維模式，其限制條件為毒性物質間不能有交互作用，後經多位學者研究補充，Christensen & Chen 於 1985 年^[17]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預測混合毒性之應用程式(Multox)。

毒性實驗中的存活率 Q (non-response fraction)其關係式如下所示(以二維為例):

$$Q = \Pr(\delta_1^{\frac{1}{\lambda}} + \delta_2^{\frac{1}{\lambda}} \leq 1)$$

其中 Q : 生物不反應率(non-response fraction, 及為存活率)。 Q 值決定於機率分布函數內積分區間的大小。

\Pr : 機率分布函數，其函數值由括弧內積分區間定義式 $\delta_1^{\frac{1}{\lambda}} + \delta_2^{\frac{1}{\lambda}} \leq 1$ 決定。

λ : 相似係數(similarity parameter for the action of two toxicants on two biological systems)。用來描述兩藥物作用位置的相似程度，且 $0 < \lambda < 1$ ， λ 越接近 1，表示毒性作用位置越相似。

$$\delta_i = \frac{Z_i}{\overline{Z_i}}$$

Z_i ：毒性物質 i 的濃度。

$\overline{Z_i}$ ：單一生物體對毒性物質 i 的毒性容忍濃度。

3.3.4 交互作用混合毒性模式

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 則提出交互作用混合毒性模式欲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，於是將非交互作用模式之 λ 的限制消去， λ 可為 0 到無限大， λ 介於 0 到 1 之間為毒性減弱作用， 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積分區間定義式為：

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

3.3.5 混合毒性效應參數 ρ 和 λ 值

本實驗混合毒性效應的指標為相關係數 (correlation coefficient, ρ) 和相似係數 (similarity coefficient, λ)，以下為 ρ 和 λ 兩參數的介紹：

1. Correlation Coefficient:

最早由 Hewlett & Plackett (1959) 提出，其假設兩毒性物質的機率分佈函數為二維常態分佈 (bivariate normal 即 Bivariate Probit) 而其毒性容忍相關係數為 ρ ，即描述單一生物體對毒性物質 1 ($EC_{50,1}$) 和毒性物質 2 ($EC_{50,2}$) 毒性容忍濃度的相關性； ρ 值範圍介於 -1 至 1 之間， $\rho=1$ 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，如圖 3.3.2 所示。

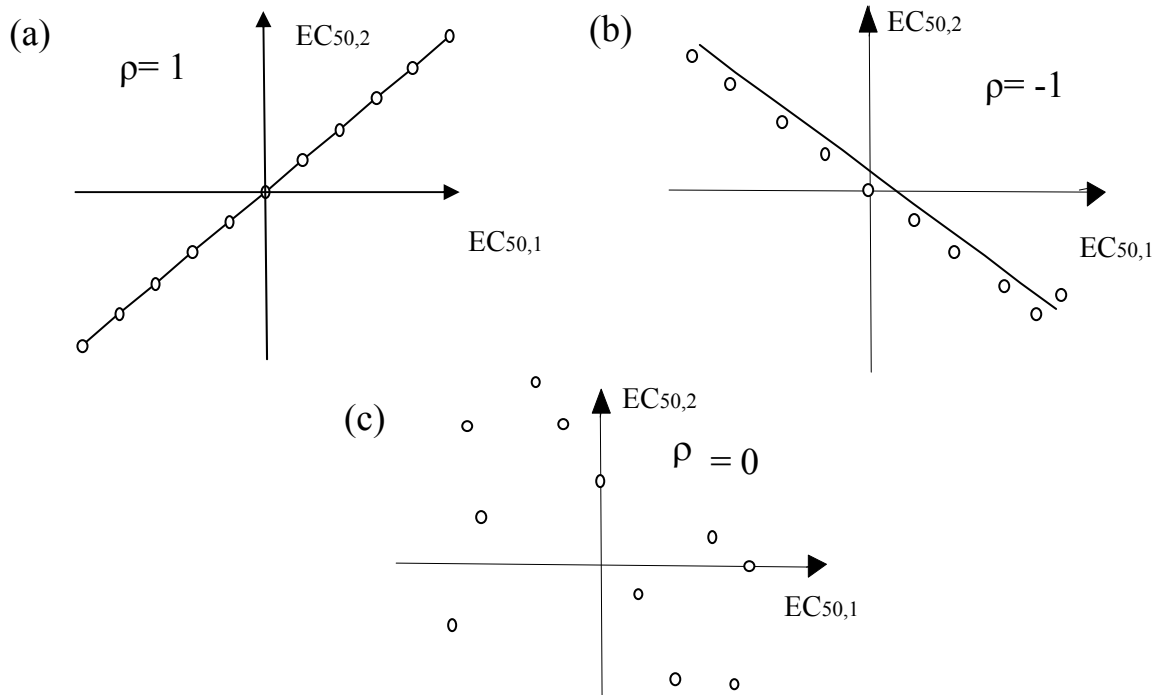


圖 3.3.2 兩毒性物質相關度之關係圖(a)正相關， $\rho = 1$ (b)負相關， $\rho = -1$
(c)不相關， $\rho = 0$

2. Similarity Coefficient

描述兩毒性物質作用在生物體的位置或生化系統(biological system)相似程度的度量指標，範圍為 $0 < \lambda < 1$ ，當 λ 越接近 1，表示毒性物質的作用位置越相近，在 λ 為 1 時，代表兩種毒性物質共同作用在同一個 biological system，在此情形的反應下可通稱為相似型式的共同作用 (similar joint action)。當 λ 為 0 時，則代表兩種毒性物質作用在不同的生化系統上，在此情形的反應下可通稱為獨立型式的共同作用 (independent joint action)，在混合效應鑑別方面，當 λ 介於 0 到 1 之間時，為毒性減弱 (Antagonism)， λ 等於 1 為毒性相加作用 (additivity)。

3. Combine ρ with λ

將相似係數 λ 與相關係數 ρ 相對配對下，混合效應模式的 action mode 主要有四種，如下所示

- 當兩種毒物反應完全相關則 $\rho = 1$ ，機制完全相同反應位置一樣則 $\lambda =$

1，稱為濃度相加 (Concentration Addition, CA)

- 當兩種毒物的反應完全相關，毒性機制完全不同，其 $\rho=1$ 和 $\lambda=0$ ，稱為非相加 (No Addition, NA)
- 當兩種毒性物質的反應完全無關，毒性機制也完全不同時， $\rho=0$ 和 $\lambda=0$ ，稱為多重反應 (Response Multiplication, RM)
- 當兩種毒物反應為負相關，且毒性機制完全不同，其 $\rho=-1$ 、 $\lambda=0$ ，稱為反應相加 (Response Addition, RA)

這四種不同的組合。四種不同混合效應模式的 action mode 整理如表 3.3.1 所示，包含各種 action mode 的反應；其中較特殊的情形為當相關係數 $\rho=-1$ (負相關) 時，由理論的數學推導發現其劑量-反應曲線之斜率同樣很小，會有毒性加強之協同效應產生。本研究當中，在預測混合毒性的模式分析上，選擇 Response addition。

表 3.3.1 基本四種混合效應定義

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

第四章 實驗設備與方法

4.1 實驗設備

1. 純水製造設備

實驗中清洗容器及藥品配置用水皆為自來水依次經過過濾、離子交換、蒸餾然後再經超過濾(Milli-Qplus) 處理之水。

2. 微毒測試儀

實驗基本設備為 Microtox Model 500，由 Micobics 所製(圖 4.1.1)。

3. pH 測量儀

使用 Sontex 公司，型號 SP-7 之 pH 測定儀。其精確度為 ± 0.01 。用以測量 stock solution 之 pH 值，並將之控制在中性範圍。

4. 冰箱

乾燥菌種貯存於 -20°C 之冰箱，至於 MOAS、稀釋水及活化液則存放於 Whirpool 之冰箱(4°C)。

5. TOC

毒性物質濃度的分析使用廠牌為 Jena 的總有機碳分析儀(TOC)。

6. 高效能液相層析儀(High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

使用 Waters 公司，型號為 LC ModuleI。使用之 column 材質為 C18。主要用以分析混合毒物中其個別濃度的消滅情形，並藉此觀測兩毒物間是否產生化學反應。

4.1.1 基本原理

Microtox 偵測毒性強弱之基本原理，在於利用一種海底發光菌(*Vibrio fischeri*; 學名為 *Photobacterium phosphorium*) 此菌本身具有自然發射螢光的特性，一旦螢光菌受毒性物質的侵害，將會抑制螢光的發光強度。因此藉由螢光被抑制的情形即可判斷毒性之強弱。

4.1.2 儀器構造

儀器主要由培養槽(incubator)、控溫設備及螢光偵測裝置所組成。

(1)培養槽及控溫設備:培養槽位於儀器右上方，共有 35 個(如圖 4.1.2)，用以儲放試驗用小試管，左側 30 個培養槽用於分析樣品時使用，其溫度皆維持 15°C 以保持實驗時維持一定溫度狀態。右側標明 Reagent 培養槽則供儲放螢光菌使用，其溫度則維持 4°C 以保持螢光菌最佳活性。下方 Read 培養槽則為讀取螢光訊號時使用。

(2)螢光偵測裝置:螢光偵測裝置位於 Read 槽下方，偵測時僅需按 Read 鍵，即可自動將上方小試管拉下加以偵測螢光訊號。

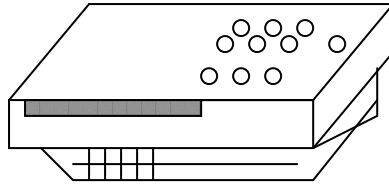


圖 4.1.1 微毒測試儀

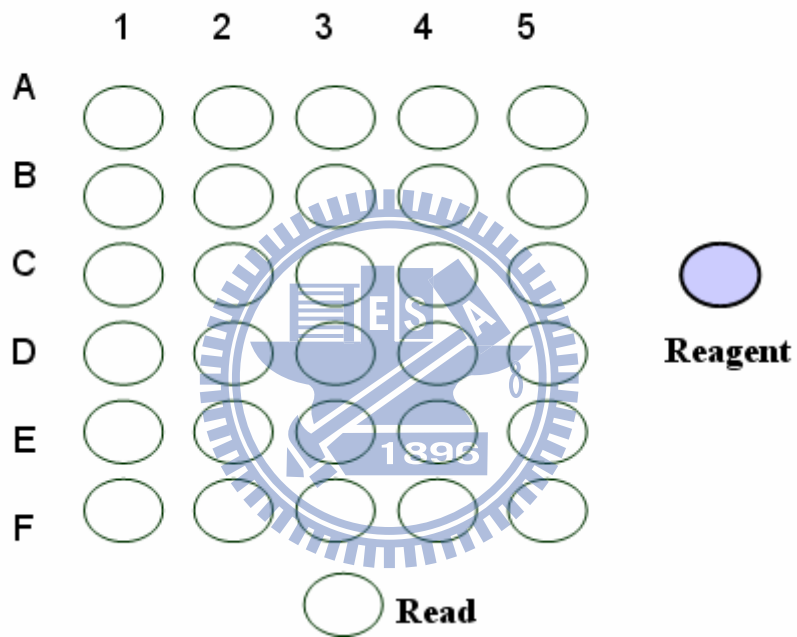


圖 4.1.2 Microtox 螢光快速分析儀的 32 個槽其相關位置圖

4.1.3 基本配備

Microtox 基本配備共計下面數種，均由美國原廠提供。

- (1)稀釋液(Diluent solution):稀釋液主要成分為含 2%濃度之 NaCl 無毒溶液，功用為稀釋樣品。
- (2)活化液(Reconstitution solution):活化液為經過特殊處理的無毒無菌蒸餾水，功用在於活化冷凍乾燥狀態下的螢光菌。
- (3)滲透壓調節液(Microtox Osmosis Adjustment Solution ; MOAS):其成分為含 22%NaCl 濃度之無毒無菌溶液，功能在於調整樣品的 NaCl 濃度達到 2%左右，以與螢光菌的滲透壓相等，用量多寡和取用樣品體積成下列關係：

X 毫升的樣品 $\times 0.1 =$ 所需的滲透壓調節液體積

- (4)小試管(Cuvette):小試管經特殊處理以維持無毒性狀態，形狀為圓形以符合培養槽的形狀，主要功能為盛裝樣品及螢光菌。由玻璃所製成，使用後拋棄不重覆使用，以避免實驗誤差。
- (5)螢光菌:螢光菌生長於海底，經過處理成冷凍乾燥狀態，在零下 20°C 的環境可維持一年。
- (6)Micropipette: 作為實驗進行中轉移螢光菌、solution、及樣品用。

4.1.4 標準分析程序:

- (1) 加 1000 μ l 的活化液至 reagent 培養槽。緊接著自冷凍庫中取出螢光菌並加入 reagent 槽中的活化液，等待 5 分鐘。
- (2) 將小試管放入 A1 至 A5、B1 至 B5，隨即加 500 μ l 稀釋液至 B1-B5，並加 1000 μ l 稀釋液至 A1-A4。
- (3) 抽取 10 μ l 的螢光菌分別加入 B1~B5，並以移液器將之混合均勻。等待 15 分鐘使螢光菌發光達穩定狀態。

- (4) 加 250 μ l 滲透壓調節液及 2500 μ l 樣品至 A5。以連續 2 被稀釋方式 由 A5 抽 1000 μ l 至 A4、A4 抽 1000 μ l 至 A3、 A3 抽 1000 μ l 至 A2。自 A2 抽取 1000 μ l 拋棄。
- (5) 將 B1-B5 放入 read well 中讀取其儀器顯示的螢光值，此時即為 0 分中之螢光值(I_0)，隨即以移液器將 A1-A5 中各取 500 μ l 加入 B1-B5，等待 5，15 分鐘並分別記錄其螢光值(I_5 、 I_{15})。

4.1.5 Microtox 毒性試驗環境因子

(1) 毒性試驗時間

螢光菌在取出冷凍庫活化後，由於生物本身的衰減，發光值減低，故每次的試驗時間需控制在三小時以內，若試驗時間超過兩個小時，就必須以標準毒物 phenol 做校正(reference control)。總而言之，每次的實驗約進行 12 組的毒性物質，需時兩小時至三小時，此時螢光菌正好將近用完，此為確保生物質製劑品質，所做的時間控制。

(2) pH 值干擾

從文獻中可了解，環境中的 pH 若超過 6~8 此範圍將會影響到螢光菌的活性(ISO,11348; Microtox,1992)^[27]。因此為了降低此因素的干擾，研究試驗有機物的 pH 值，皆有落在此範圍內，並不會影響毒性試驗。

(3) 吸光光譜干擾

由於 Microtox 活體營光發光光譜最大波長值約 494nm，如果毒性物質在此波長附近能吸收此光譜，則螢光讀值會較實際螢光發光值低，此時必須進行色度校正。將研究的有機物質以 450 至 500 nm 光譜掃描結果，並無吸光現象，故無須作色度校正。

4.2 試驗毒物

本試驗所選用的有機物包含反應性及麻醉性物質,均為環境水體中常見的污染物質,其基本的物化特性如表 4.2.1 所示。

表 4.2.1 有機化學物質其基本特性

毒性作用機制	化學物質	分子式	分子量 [g/mole]
electrophile nonelectrolytes	formaldehyde	CH ₂ O	30.03
	propionaldehyde	C ₃ H ₆ O	58.08
	butyraldehyde	CH ₃ (CH ₂) ₂ CHO	72.11
	glutardialdehyde	OCH(CH ₂) ₃ CHO	100.1
polar narcosis effect	2-Chlorophenol	C ₆ H ₅ ClO	128.6
	3-Chlorophenol	C ₆ H ₅ ClO	128.6
	4-Chlorophenol	C ₆ H ₅ ClO	128.6
	2,3-Dichlorophenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163.0
	2,4-Dichlorophenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163.0
	3,4-Dichlorophenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163.0
	2,4,6-Trichlorophenol	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197.4
	Pentachlorophenol	C ₆ HCl ₅ O	266.4

表 4.2.1 有機化學物質其基本特性(續)

毒性物質	Log P ^a	pKa	廠牌	純度 %
formaldehyde	0.35		Merck	37%
propionaldehyde			Fluka	100%
butyraldehyde	0.83		Acros	99%
glutardialdehyde	-0.61		Fluka	50%
2-Chlorophenol	2.29	8.3	Aldrich	99%
4-Chlorophenol	2.53	9.2	Aldrich	99%
3-Chlorophenol	2.49		Aldrich	98%
2,3-Dichlorophenol	3.26	7.6	Aldrich	98%
2,4-Dichlorophenol	3.2	7.8	Aldrich	99%
3,4-Dichlorophenol	3.17		Aldrich	99%
2,4,6-Trichlorophenol	3.67	6	Aldrich	99%
Pentachlorophenol	5.02	4.7	Aldrich	99%

a: 辛醇與水分配係數(n-octanol / water partition coefficient)

4.2.1 有機藥品配製

氯酚類隨著氯含量增加，其溶解度會降低，因此 2-CP、4-CP、2,3-DP 及 2,4-DP 直接以去離子水配製，而三氯酚及五氯酚的配製則參考 Boyd et al.(2000)^[28]，在強鹼(0.1N NaOH)下進行配製，待有機物質完全溶解後再以酸(0.1N H₃PO₄)將 pH 調回中性。實驗中的濃度皆為名義濃度。

所有的藥品配製分為兩大類：

(1) 儲備溶液(stoke solution):量多,濃度高,保存時間長。

錐形瓶內裝 60mL 純水並加入適量有機物，蓋上瓶蓋並封緊，劇烈搖晃 30 秒而後置於恆溫震盪儀內搖晃至隔夜，以確保有機物完全溶於水。考慮有機物的高揮發性，使用過兩次便必須重配。

(2) 測試溶液(test solution):量少，濃度低，配置後馬上進行實驗。

用 pipette 取少量毒性物質至裝有純水的錐形瓶中，迅速蓋上瓶蓋封緊，劇烈搖晃使之混合均勻，作為而後進行毒性試驗之毒性樣本。

4.3 實驗數據之處理

將螢光菌的 Luminescence Test 所求得的存活率 Q (不反應分率, non-response fraction) 以下式表示：

$$Q = \frac{ItTt/IoTo}{IcTt/IcTo}$$

上式中的符號表示如下：

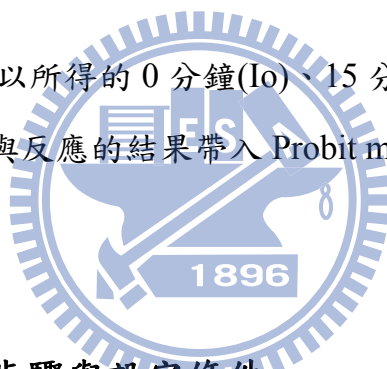
$ItTt$ ：實驗組在時間 t 時的螢光讀值

$IoTo$ ：實驗組在時間 0 時的螢光讀值

$IcTt$ ：控制組在時間 t 時的螢光讀值

$IcTo$ ：控制組在時間 0 時的螢光讀值

螢光抑制的剩餘率以所得的 0 分鐘(I_0)、 15 分鐘(I_{15})帶入上式計算，求得 Q 值後，再將濃度與反應的結果帶入 Probit model，求得螢光抑制 50% 的 EC_{50} 值。



4.4 儀器操作原理、步驟與設定條件

試驗需先進行有機物定量，所有的試驗毒物皆以總有機碳分析儀(TOC)定量。並利用高效能液相層析儀、LS-MS 以及分光光度計分析毒物間是否產生交互作用。以下分別就儀器的原理及實驗步驟分別描述。

4.4.1 總有機碳分析儀(Total organic carbon, TOC)

有機物的濃度以其主要元素--碳表示之，即稱為總有機碳。TOC 主要利用高溫，將溶液中的有機物氣化燃燒，生成 CO_2 ，接著通過紅外線分析儀，測定其生成的 CO_2 量，即可知總有機碳量，最後利用有機物的結構式及分子量，反推其總濃度。

4.4.2 高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

1. 原理：

HPLC 是利用樣品與動相、靜相介面間大小不同之作用力所造成之速度差導致於樣品中物質之分離。不同的分析物質及 Column 種類會不同的移動相，有的物質較易和動相介面結合，其通過 Column 時速度較其他物質快，因此由於此時間差，使其較先被偵測器偵測到，隨後其他的物質再一一被偵測到；反之較容易和靜相介面結合的物質，則較慢出現在偵測器上。當偵測器偵測到物質時，觀測螢幕上會出現一個波峰 (Peak Shape)，依照波峰出現的時間點和標準品比較則可以得知此物質之種類，並可以計算波峰面積之大小以得之其濃度等數據。理想中的脈衝為高斯曲線 (Gaussian Curve)。本實驗相關規格及設定的內容如表 4.4.1。

表 4.4.1 HPLC 相關規格與設定

項 目	規 格 與 設 定 條 件
型號 (type)	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector Waters 最新型折射率偵測器(RI) Waters 515 HPLC Pump
分離管柱 (column)	C18 - 4.6 \times 150 mm (Type :T91971L)
迴路容量 (loop volume)	20 μ l
沖提相 (mobile phase)	組成：40%乙腈 + 60%去離子水 流速：1.0 ml/min
管柱壓力 (pressure)	約 650 psi
偵測波長 (λ)	190nm ~ 350nm
滯留時間(run time)	2 min ~ 20 min

2. HPLC 操作步驟：

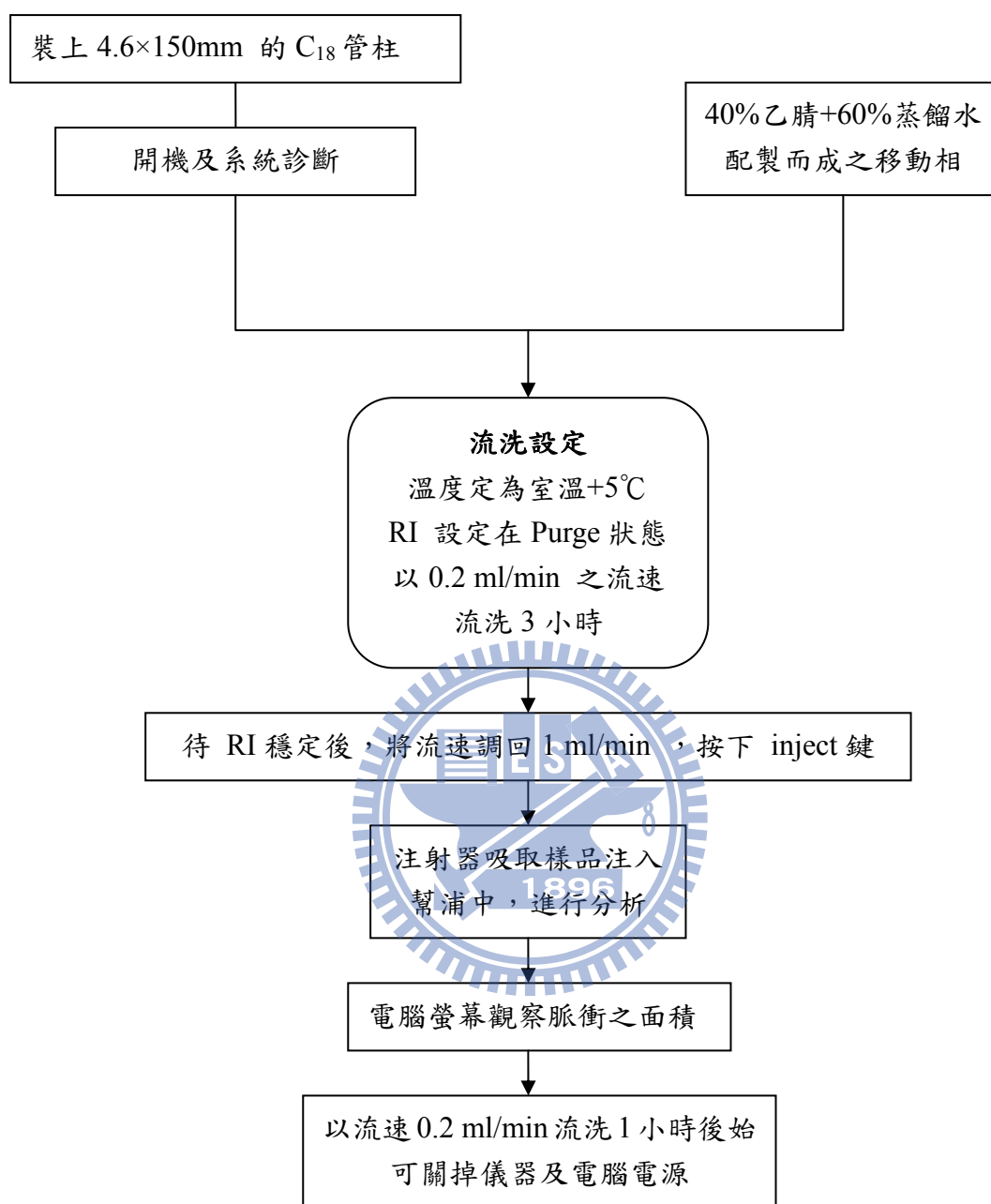


圖 4.4.2 本實驗中 HPLC 操作步驟及其設定

4.5 混合方式

進行兩種有機物的交叉混合的實驗的最主要是為了求得共同加入系統導致 50% 的受測生物體產生抑制反應的毒性物質 1 (Z_1) 和毒性物質 2 的濃度 (Z_2)，爾後帶入 M 值中進行 joint effect 的判定。混合方式主要是根據混合毒性單位比例而定，如下所示：

$$TU_1 : TU_2 = \frac{X_1}{EC_{50,1}} : \frac{X_2}{EC_{50,2}}$$

X_i ：混合試驗時，毒性物質 i 加入系統的的濃度

$EC_{50,i}$ ：單一生物體對毒性物質 i 的毒性容忍濃度

本實驗中共進行五種混合比例的試驗，分別為 1:0、3:1、1:1、1:3 及 0:1。首先先進行 1:1 的混合，利用在單一毒性試驗得到之 $EC_{50,i}$ ，分別配置毒性物質 1 及毒性物質 2 的 stock solution： $4.44 \times EC_{50,1}$ 以及 $4.44 \times EC_{50,2}$ 。取毒性物質 1、2 等體積混合，則螢光菌承受兩種毒性物質濃度比例為：

$$\frac{X_1}{EC_{50,1}} : \frac{X_2}{EC_{50,2}} = \frac{4.44EC_{50,1} \times 0.45}{EC_{50,1}} : \frac{4.44EC_{50,2} \times 0.45}{EC_{50,2}} = 2:2$$

表 4.5.1 混合毒性濃度配製

STEP	1	2	3	4	5	6
M	4	2	1	0.5	0.25	0.125
TU ₁	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
TU ₂	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625

此外本實驗並以不同的 TU 值 3:1、1:1、和 1:3 互相混合，將結果繪製成 Isobologram 進一步了解混合效應。

第五章 結果與討論

5.1 Microtox 單一毒性實驗

本研究為利用 15 分鐘的螢光抑制 Microtox 毒性試驗方法針對不同機制的有機物進行實驗。其中反應性物質 (reactive toxicant) 包含甲醛 (Formaldehyde)、丙醛 (Propionaldehyde)、丁醛 (Butyraldehyde) 及戊二醛 (Glutardialdehyde)；極性麻醉性有機物包括 2-Chlorophenol (2-CP)、3-Chlorophenol (3-CP)、4-Chlorophenol (4-CP)、2,3-Dichlorophenol (2,3-DP)、2,4-Dichlorophenol (2,4-DP)、3,4-Dichlorophenol (3,4-DP)、2,4,6-Trichlorophenol (2,4,6-TP)、Pentachlorophenol (PCP)。上述有機物皆屬揮發性，且 Microtox 為一非密閉式的實驗環境，當有機物為高揮發性時，任何配藥，亦或實驗操作過程中的微小差異，都可能造成每一次的實驗結果有所差異。因此每次在從事混合毒性研究前，首要工作需先針對所欲混合的毒性物質，求取其單一毒物的 EC_{50} 值，而後才能依據 EC_{50} 值以不同比例混合作試驗。

表 5.1.1 為 4 種反應性物質及 8 種麻醉毒物之單一實驗數據，經由 Probit 模式分析所得的結果，數據中包含試驗次數 n 、 EC_{50} 值、 EC_{50} 值的變異係數及劑量-反應曲線之斜率。圖 5.1.1 至 5.1.12 為 12 種有機物的劑量反應曲線。由表 5.1.1 可看出氯酚類的物質其毒性大致上隨著鍵結的氯數增加而增強，毒性最弱者為 2-Chlorophenol，毒性最強則為五氯酚。

Kobayashi^[51] 曾解釋因為鍵結的氯原子越多，將會增加累積在生物表面的氯酚量，而造成毒性上升。另一方面，Kobayashi 提出當氯原子的取代基位置在鄰位時，其氯酚的毒性較低。Boyd^[22] 更進一步說明當含氯數一樣

時，具有 *para* (對位)位置的氯酚化合物毒性最高，其次為 *meta* (間位)及 *ortho* (鄰位)。觀察本研究的結果，當含氯數 1 時，其毒性變化情形 4-CP (*para*) > 3-CP (*meta*) > 2-CP (*ortho*)，至於在二氯酚部份則為：3,4-DP (*para, meta*) > 2,4-DP (*para, ortho*) > 2,3-DP (*meta, ortho*)。此結果與 Kobayashi 及 Boyd 的結論一致。會有此現象的發生，主要因為當取代基為鄰位時，氯原子會搶奪 OH 官能基上的氫電子，造成電性減弱以致於毒性下降。

至於醛類的單一毒性部分則無一定的趨勢，但由表 5.1.1 中可發現 Glutardialdehyde 的毒性最強，EC50 值為 3.24 mg/L;而 Propionaldehyde 的毒性最弱，EC50 值為 225 mg/L。值得注意的是，醛類的 EC50 值變動較大，變異係數(percent coefficient of variation)範圍約在 15-25 %，比起麻醉性氯酚的 0.6-18 %高出許多，此結果與 Chen and Chiou 在 1995 的實驗結果一致。推測其原因，主要因為 Microtox 為一開放式的毒性試驗系統，且醛類物質的揮發性較高，造成有機物極易從水溶液中逸失，特別當有機物濃度甚低時，任何實驗操作上的微小差異，皆會造成此現象。

由表 5.1.1 發現本研究中選用的試驗毒物其劑量-反應曲線皆屬中小斜率，並可看到一有趣的現象，對於麻醉物質而言，所含氯原子越多之氯酚其劑量-反應關係曲線斜率也越大(斜率大於 2 者為 2,4,6-TCP 及 PCP)，由文獻中得知^{[22] [51]}含氯數越多，毒物的親脂性越大(及辛醇與水係數越大)，對於生物體造成的毒性也越強。因此生物體對這類的化合物容忍度較小(2,4,6-TCP 及 PCP)，只要濃度發生微小的變化，抑制率即大幅提升許多。這極有可能是造成三氯酚及五氯酚擁有較大斜率的主因。

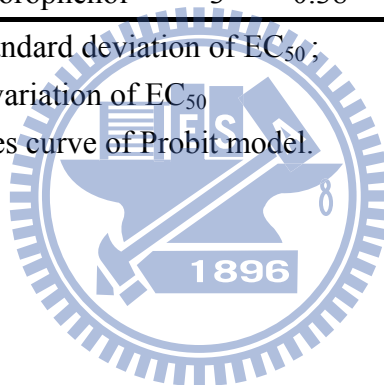
表 5.1.1 :試驗毒物之 Microtox 毒性試驗數據

Classifications	chemical	n	EC ₅₀ (mg/L)	SD (mg/L)	CV (%)	slope
reactive	Formaldehyde	7	4.42	1.11	25.1%	1.48
	Propionaldehyde	6	225	40.7	18.1%	1.65
	Butyraldehyde	6	115	24.4	21.2%	1.41
	Glutardialdehyde	7	3.24	0.48	14.8%	1.51
Polar narcosis	2-Chlorophenol	4	15.4	1.97	12.8%	1.30
	4-Chlorophenol	3	1.12	7.7×10^{-2}	6.88%	1.28
	3-Chlorophenol	2	6.22	1.01	16.2%	1.18
	2,3-Dichlorophenol	4	4.33	0.82	18.9%	1.29
	2,4-Dichlorophenol	4	2.57	0.19	7.39%	1.52
	3,4-Dichlorophenol	2	0.71	0.11	15.3%	1.32
	2,4,6-Trichlorophenol	3	1.37	0.8×10^{-2}	0.59%	2.35
	Pentachlorophenol	3	0.38	3.3×10^{-2}	8.68%	2.09

n: number of data ; SD: standard deviation of EC₅₀;

CV: percent coefficient of variation of EC₅₀

Slope: from the dose-responses curve of Probit model.



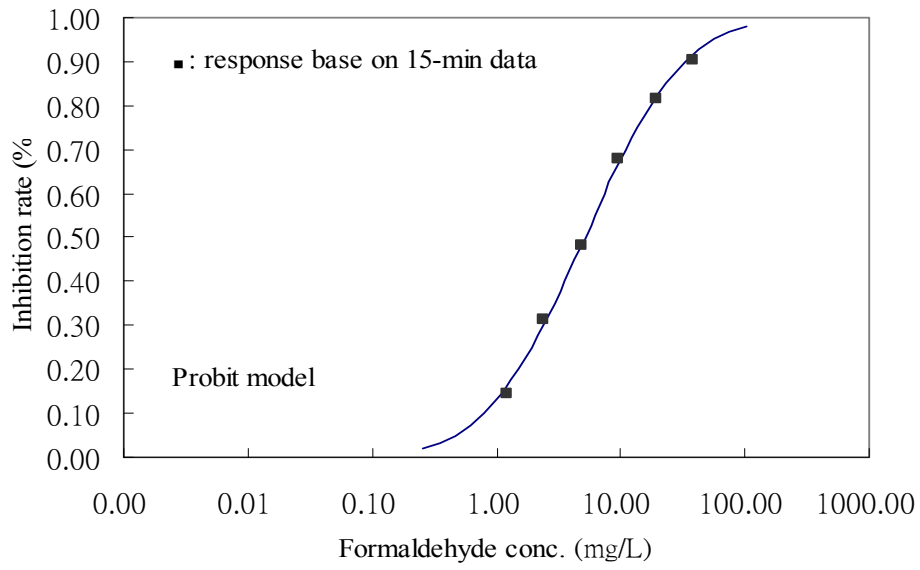


圖 5.1.1 Formaldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線

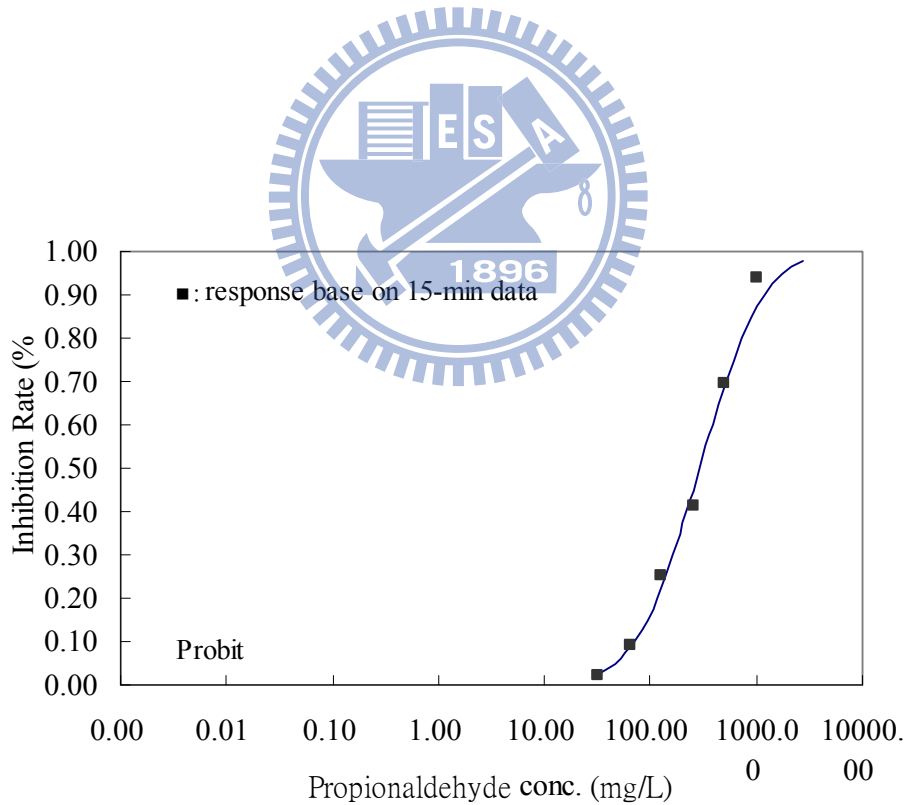


圖 5.1.2 Propionaldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線

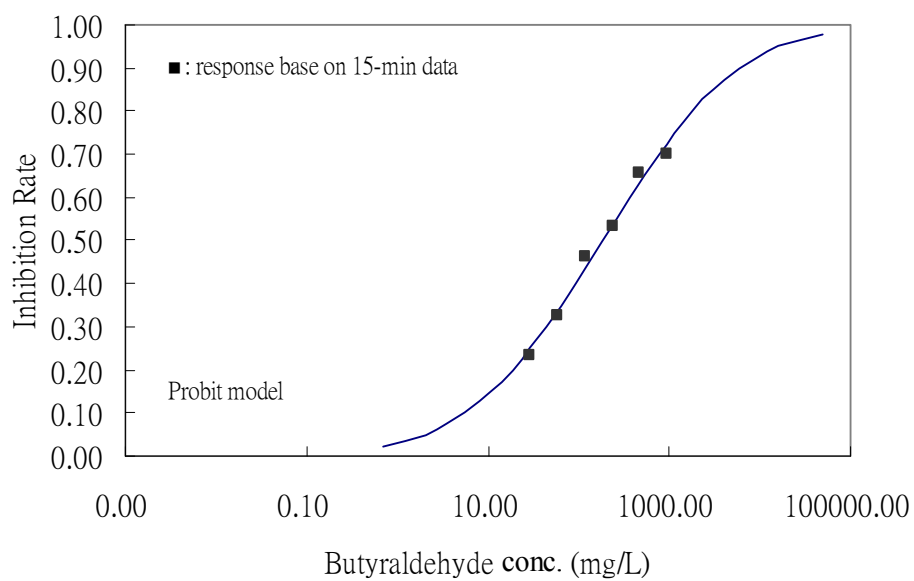


圖 5.1.3 Butyraldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線

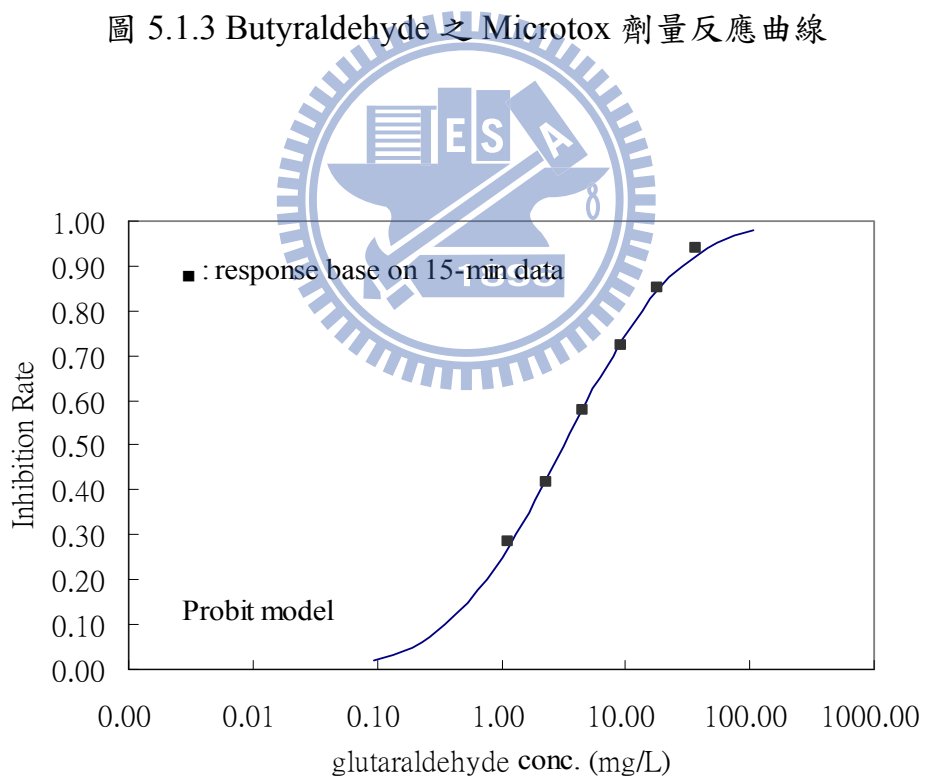


圖 5.1.4 Glutardialdehyde 之 Microtox 劑量反應曲線

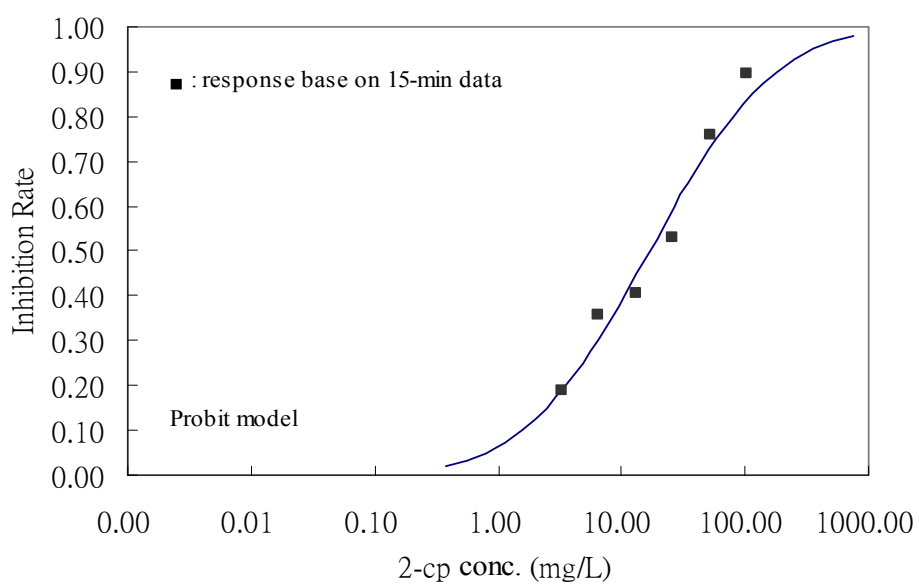


圖 5.1.5 2-Chlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線

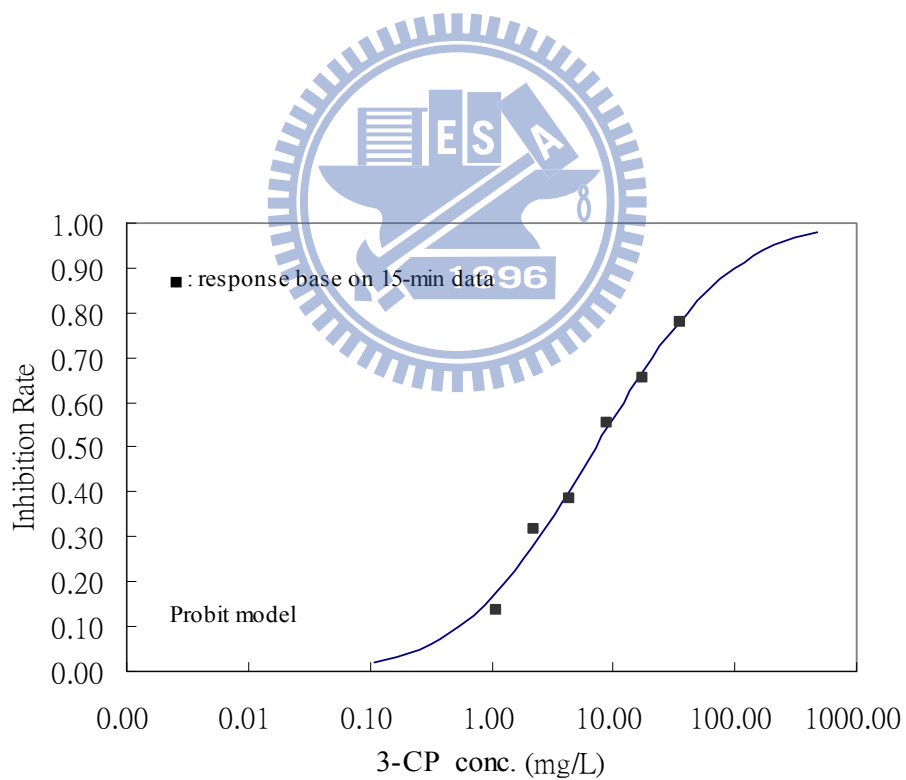


圖 5.1.6 3-Chlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線

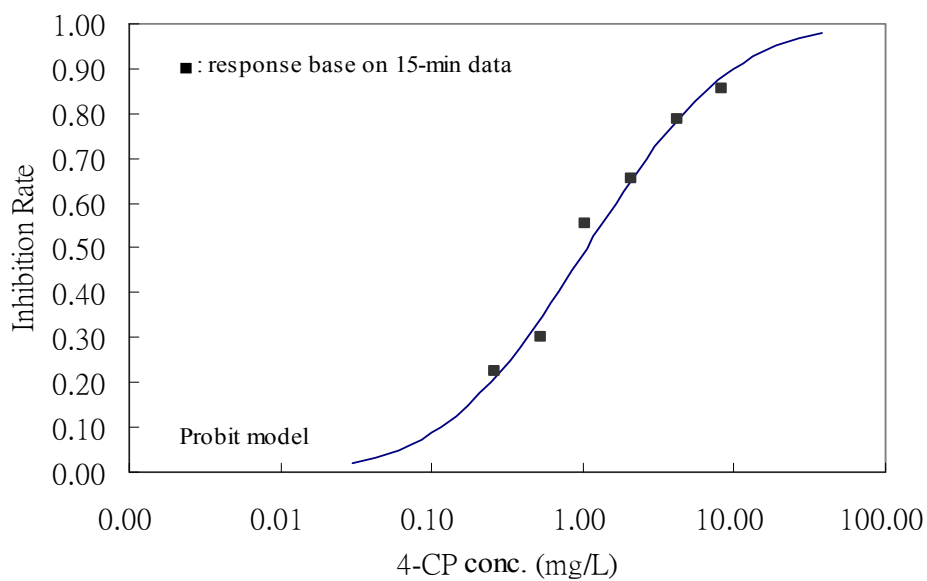


圖 5.1.7 4-Chlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線

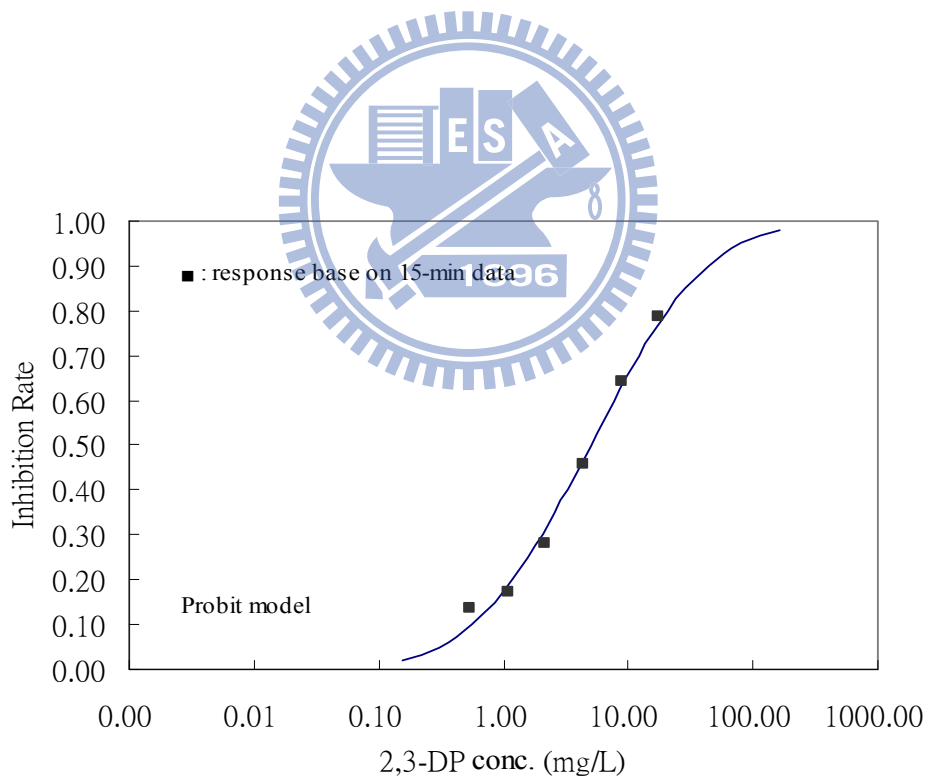


圖 5.1.8 2,3-Dichlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線

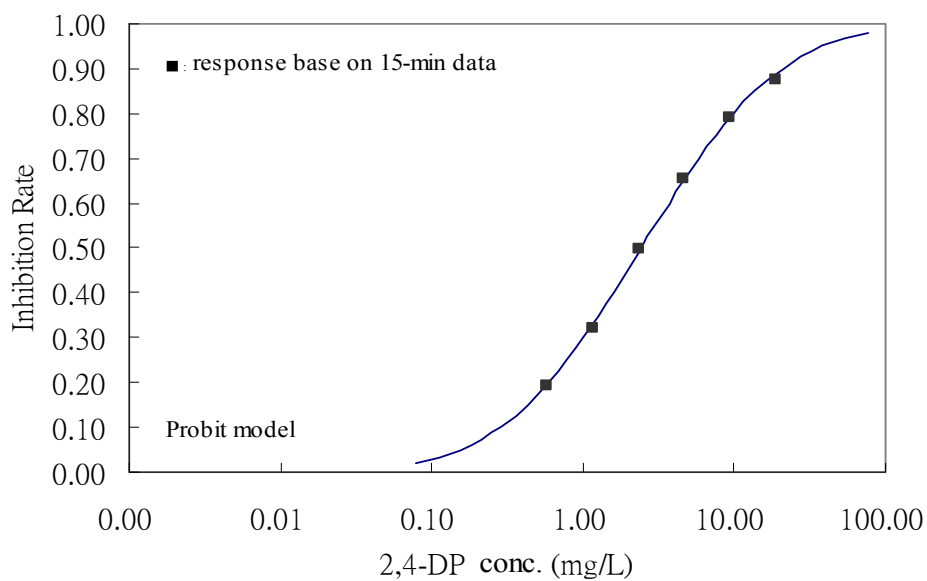


圖 5.1.9 2,4-Dichlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線

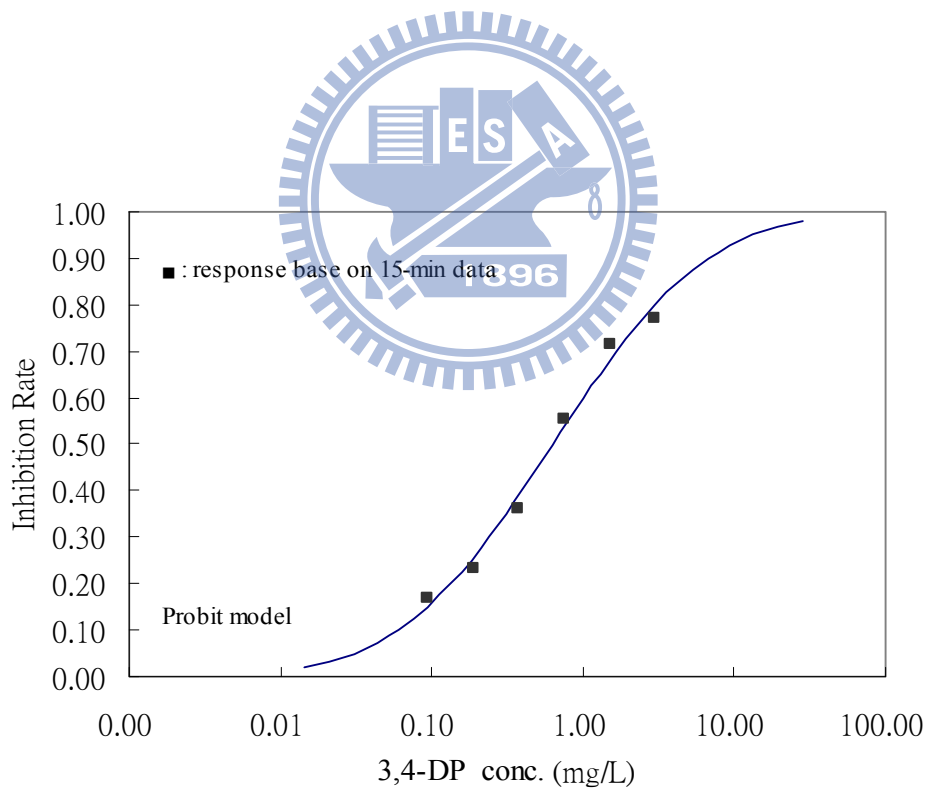


圖 5.1.10 3,4-Dichlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線

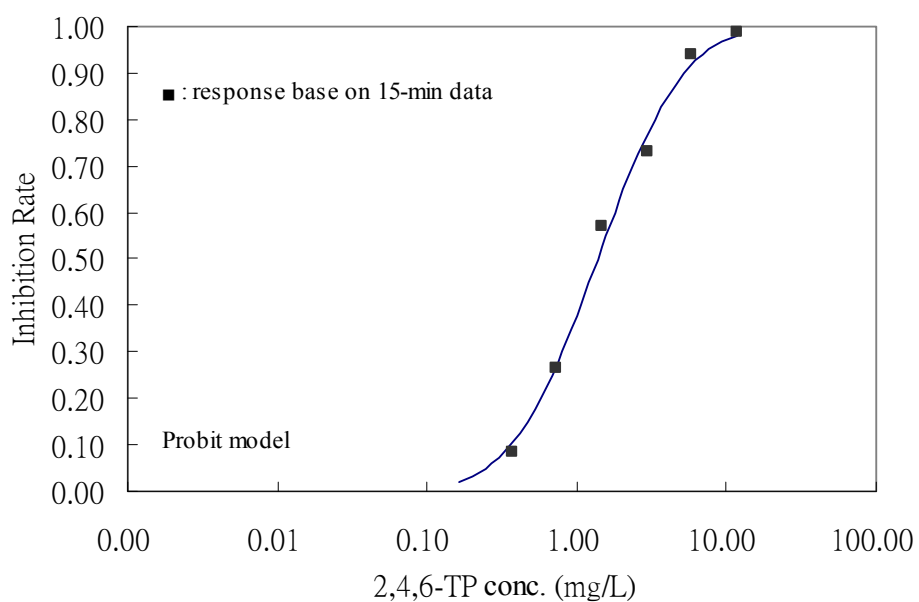


圖 5.1.11 2,4,6-Dichlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線

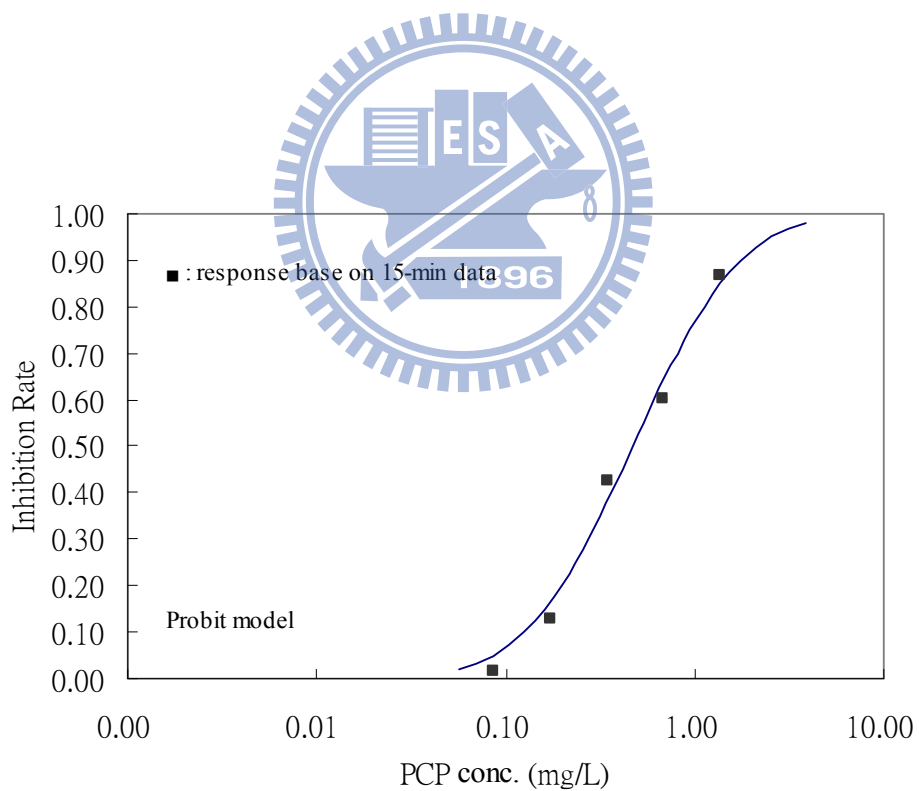


圖 5.1.12 Pentachlorophenol 之 Microtox 劑量反應曲線

5.2 混合毒性試驗結果分析

5.2.1 混合毒性單位分析

在文獻回顧中曾提及當機制不同的毒物混合，其實驗結果大致為毒性削減作用(Antagonism)^{[18][20]}，但又有其他學者指出不同的觀點^[19]，若不同機制且兩種反應有機物的劑量-反應曲線斜率甚小時，則出現毒性加強(Synergism)的機率很高。因此本節研究主要目的在於探討反應性物質與極性麻醉性有機物混合所呈現的效應。主要考量上述兩種角度，第一種角度依照化學物的機制混合，以反應性物質(reactive)加麻醉性物質(polar narcosis)配對之形式進行混合毒性試驗，觀察混合結果是否與文獻一致，大部分呈現毒性減弱的現象。第二種角度則根據單一試驗時所得到的劑量-反應關係斜率(β)，探討斜率大小對 Microtox 造成的影響為何，並利用 Christensen & Chen 於 1989 年所發展的預測模式，以 RA 模式($\rho = -1, \lambda = 0$)來預測兩種毒性物質混合後的毒性變化情形。

混合毒性試驗分成兩步驟進行，第一步驟先以毒性單位 (ΣTU_i or M) 1:1 混合，獲得初步毒性交互作用(interaction)結果後，為了進一步了解混合的效應型式，則進行第二步驟 1:0、3:1、1:1、1:3 與 0:1 五種毒性單位比交叉混合，繪製 EC_{50} 的 Isobologram，並經由 Multox 程式迴歸，求出兩有機物之混合毒性模式的相關係數 (correlation coefficient, ρ) 和相似係數 (similarity coefficient, λ) 值。表 5.2.1 即為所有以 1:1 毒性單位相混的實驗結果及以模式預測的結果。Observation 為實際實驗所得的結果；至於在 Prediction 部分則是利用 RA 模式預測所得之結果。實驗依據 95% 信賴區間來判定混合效應， M 大於 1 時，混合毒性效應為毒性減弱 (Antagonism effect); M 等於 1 則為毒性相加作用 (Additive effect); M 小於 1 時，混合毒性為毒性加強作用 (Synergism effect)。

表 5.2.1：反應性醛與極性麻醉物氯酚之混合毒性(TU=1:1)

Chemicals [slope]	Formaldehyde [1.48]		Propionaldehyde [1.69]	
	Observation	Prediction	Observation	Prediction
2-Chlorophenol [1.3]	0.494 [S] 0.45 -0.54	0.65 [S]	1.426 [A] 1.17-1.88	0.70 [S]
4-Chlorophenol [1.28]	0.716 [S] 0.63 -0.82	0.64 [S]	0.846 [+] 0.64-1.07	0.70 [S]
2,3-Dichlorophenol [1.29]	0.392 [S] 0.18-0.63	0.65 [S]	1.499 [A] 1.19-1.97	0.70 [S]
2,4-Dichlorophenol [1.52]	0.605 [S] 0.53 -0.69	0.71 [S]	0.675 [S] 0.61-0.74	0.76 [S]
2,4,6-Trichlorophenol [2.35]	0.383 [S] 0.27 -0.50	0.89 [S]	1.387 [A] 1.27-1.52	0.93 [+]
Pentachlorophenol [2.09]	0.760 [+] 0.54 -1.13	0.82 [S]	1.056 [+] 0.92-1.22	0.88 [S]

Chemicals [slope]	Butyraldehyde [1.41]		Glutardialdehyde [1.51]	
	Observation	Prediction	Observation	Prediction
2-Chlorophenol [1.3]	0.614 [S] 0.50-0.75	0.62 [S]	0.350 [S] 0.28-0.43	0.66 [S]
3-Chlorophenol [1.18]	0.670 [S] 0.50-0.97	0.60 [S]	0.388 [S] 0.31-0.50	0.62 [S]
4-Chlorophenol [1.28]	1.494 [A] 1.32-1.74	0.62 [S]	0.402 [S] 0.34-0.48	0.64 [S]
2,3-Dichlorophenol [1.29]	0.409 [S] 0.35-0.48	0.62 [S]	0.537 [S] 0.37-0.81	0.66 [S]
2,4-Dichlorophenol [1.52]	0.455 [S] 0.31-0.79	0.68 [S]	0.219 [S] 0.17-0.29	0.72 [S]
3,4-Dichlorophenol [1.32]	0.510 [S] 0.40-0.67	0.63 [S]	0.537 [S] 0.45-0.64	0.66 [S]
2,4,6-Trichlorophenol [2.35]	0.381 [S] 0.29-0.51	0.87 [S]	0.772 [S] 0.67-0.90	0.89 [S]
Pentachlorophenol [2.09]	0.434 [S] 0.38-0.49	0.81 [S]	0.641 [S] 0.53-0.78	0.84 [S]

S: synergism ; +: addictive ; A: antagonism

The predicticve results were based on RA model($\rho = -1$, $\lambda = 0$).

首先，以有機物作用機制的角度來探討混合毒性變化情形。由表 5.2.1 觀察到在 28 組的混合結果中，產生拮抗結果的組數只有 4 組。換句話說，在本研究中當不同機制毒物混合時，發生拮抗的機率只有 14.3%，但協同發生的比例卻高達 75% (表 5.2.2)。這一部分的結果與文獻相互抵觸，由文獻中我們曉得，Broderius^[20] 這位學者在 2005 年，利用 4 種屬不同機制化合物以相同的毒性單位混合，且其試驗物種為 fathead minnows，實驗結果皆為毒性減弱作用。Broderius 認為由於 4 種有機物間機制毒性貢獻比例不同，毒性反應位置差別大，導致結果產生毒性削減作用 (Antagonism)。

探討本研究結果與其他文獻不符之處，可能原因在於使用的試驗物種不同，不同的物種對於毒物的容忍度理所當然會呈現不一樣的結果。儘管 Broderius 在其研究中並無列出化合物的劑量-反應關係曲線斜率，但是一般而言，fathead minnows 的斜率比起其他物種來說相對較大，這有可能是造成拮抗作用產生的主因。我們認為，儘管化學物質的作用機制會影響混合的結果，單一毒物的劑量-反應關係曲線其斜率仍然是影響混合效應的一個重要因素。故接下來則以劑量-反應關係曲線斜率的角度來討論毒性的變化情形。

表 5.2.2：混合結果總計

	組數數目	發生比例
毒性增強(Synergism)	21	75.0 %
毒性相加(Addition)	3	10.7 %
毒性減弱(Antagonism)	4	14.3 %
Total	28	100 %

由表 5.2.1 中可以清楚得看到，本研究的化合物中除了 2,4,6-TP 及 PCP 為大斜率有機物，其餘皆屬小斜率物質(斜率小於 2)。根據本研究群的混合毒性發展，我們認為當有機物具有小斜率的劑量-反應曲線時，表現出毒性增強的機率較大；至於當有機物斜率大時，則以毒性減弱為主。由表 5.2.1 中可看出，大斜率的氯酚(2,4,6-TP 及 PCP)與斜率較大的醛(丙醛)，混合後的結果大致呈現毒性相加及減弱的情形；反之其餘 26 組小斜率物質混合，發生毒性增強的機率高達 81%。由本篇研究的混合實驗結果，更加證實了本研究群預測混合毒性準則之適用性及其準確性。

本研究的毒物大部分具小斜率的劑量反應關係曲線，故其產生毒性增強的比例極高。在毒物的風險評估方面，混合毒性加強是最值得注意的現象，極容易低估了實際的水體污染狀況，而造成更嚴重的生物抑制。然而在 26 組小斜率的毒性物質混合當中，有三組結果為拮抗作用，分別為丙醛+2-CP、丙醛+2,3-DP 以及丁醛+4-CP，明顯看出與預測不符。在研究中所選用的預測模式為 RA，此模式乃基於 non-interactive 的假設下成立，故此三組化合物也許彼此間產生了交互作用(interactive)，導致實驗結果不如預期。至於這三組產生毒性減弱的真正原因，在下一節中有進一步的探討。

接著探討不同毒性單位比的混合情形，繪製的 isobologram 如圖 5.2.1 至圖 5.2.8 所示。圖 5.2.1 及圖 5.2.2 分別為甲醛與二氯酚的混合結果，不論是在哪一個混合比例皆為明顯的協同作用；接著為丙醛與氯酚的 isobologram，雖然百分之九十五可信賴區間過大，不過仍然可看出混合呈現毒性相加乃至減弱之趨勢。由圖 5.2.3 及 5.2.4 中發現，當氯酚比例較多，毒性上升，混合後的結果約略為相加(additive)，隨著丙醛濃度增高，毒性減弱的情況更為明顯。值得注意的是，丙醛混氯酚的兩個 isobologram 中，皆發現曲線落在 TU=1 的虛線外，Chen 曾定義此種類似的圖形，並將之稱

為 complex joint action，有可能因為兩毒物間產生了交互作用(interactive)而導致此圖形的產生。正好丙醛混氯酚的這兩組 isobologram 皆為與預測結果不符的實驗組別。這一部分將在下節當中做進一步地探討。圖 5.2.5 與 5.2.6 為丁醛與氯酚混合之 isobologram，在不同的比例下皆為毒性增強的情況。最後兩個 isobologram 圖則為戊醛與氯酚的混合結果，圖形與原點十分接近，且其 95%信賴區間極小，代表混合結果為強烈的毒性增強。且由表 5.2.1 中發現戊醛的實驗結果 M 值比起預測值普遍低了許多，換句話說，戊醛混合的實際結果比模式預測更毒。若運用到風險評估上，戊醛將會是個棘手的物質，很容易因為低估其混合毒性而造成更嚴重的生物迫害。

5.2.2 混合模式推估(CA、IA)

由文獻回顧中了解到，許多毒物學家認為 CA 模式預測出的混合結果較為嚴重，至於 IA 所預測的結果大部分為毒性減弱(Antagonism)^{[16][20]}。故毒物學家們建議，若要運用到風險評估上，使用 CA 模式較為保守。這些文獻所提出的結論其實僅侷限在 $\rho=1$ 的情況下，在 $\rho=1$ 時 CA 所預測的結果一定會比 IA 來的嚴重。我們曉得毒性容忍相關係數 ρ 的範圍介於-1 至 1 之間，但文獻中的預測模式皆未考慮到 ρ 的變異；除此之外，斜率的變動亦會影響模式預測混合毒性的結果(RM 及 RA)，然而其他毒物學家在使用 CA 及 IA 模式時並未將斜率此項因素納入考量。因此在本節研究中在使用預測模式推估實際混合結果時，將會把 ρ 值及毒物的斜率納入考慮。

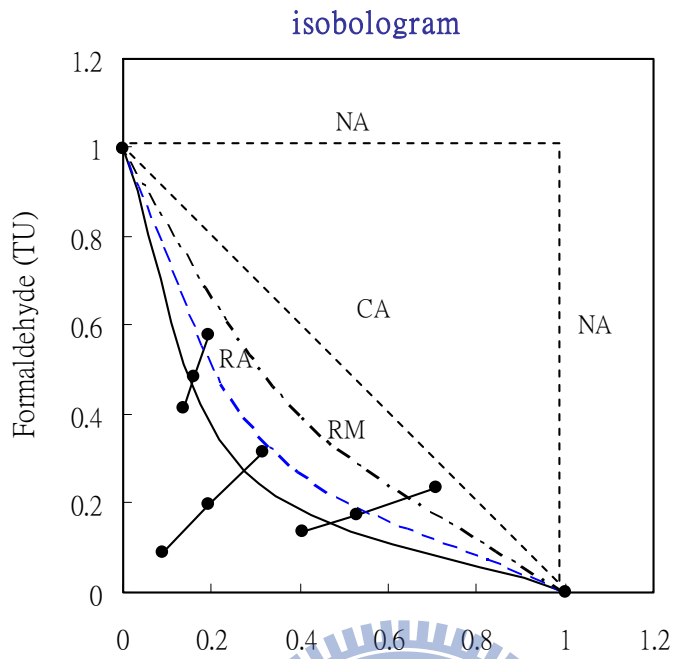


圖 5.2.1 甲醛與 2,3-DP 之 isobologram

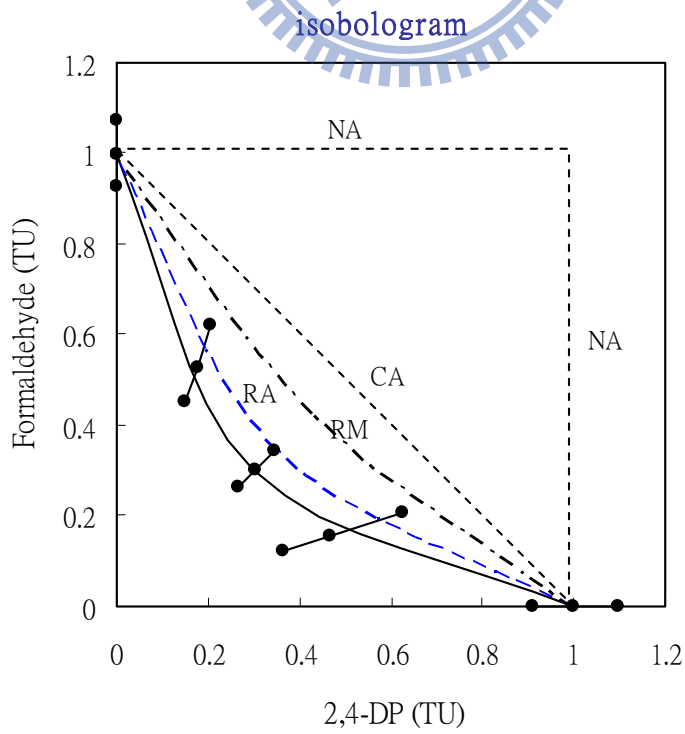


圖 5.2.2 甲醛與 2,4-DP 之 isobologram

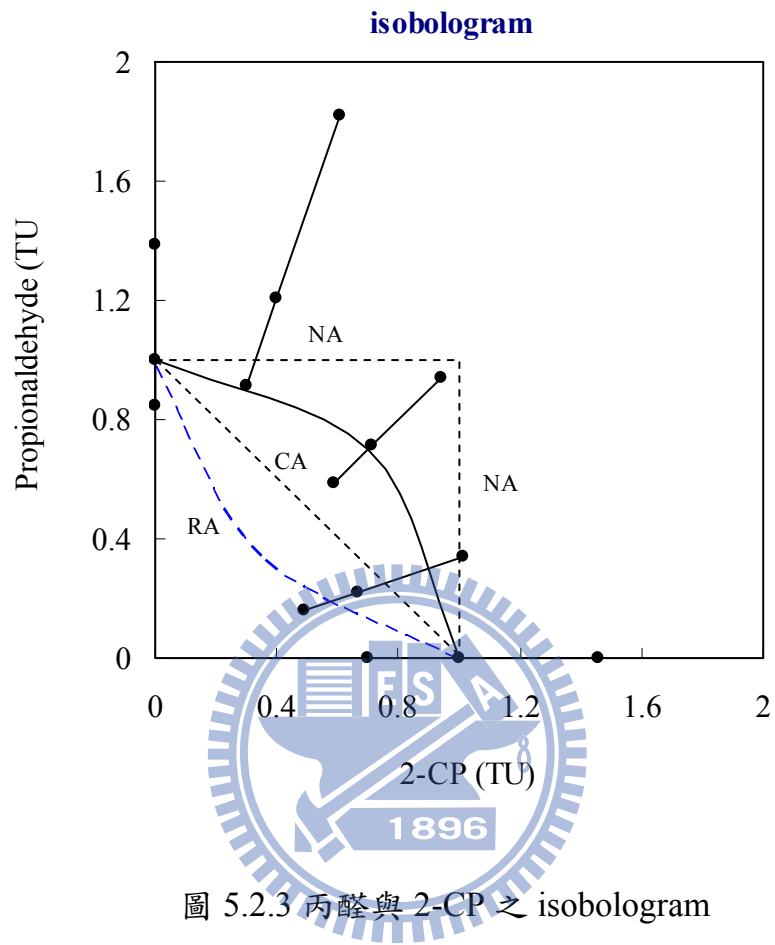


圖 5.2.3 丙醛與 2-CP 之 isobologram

isobologram

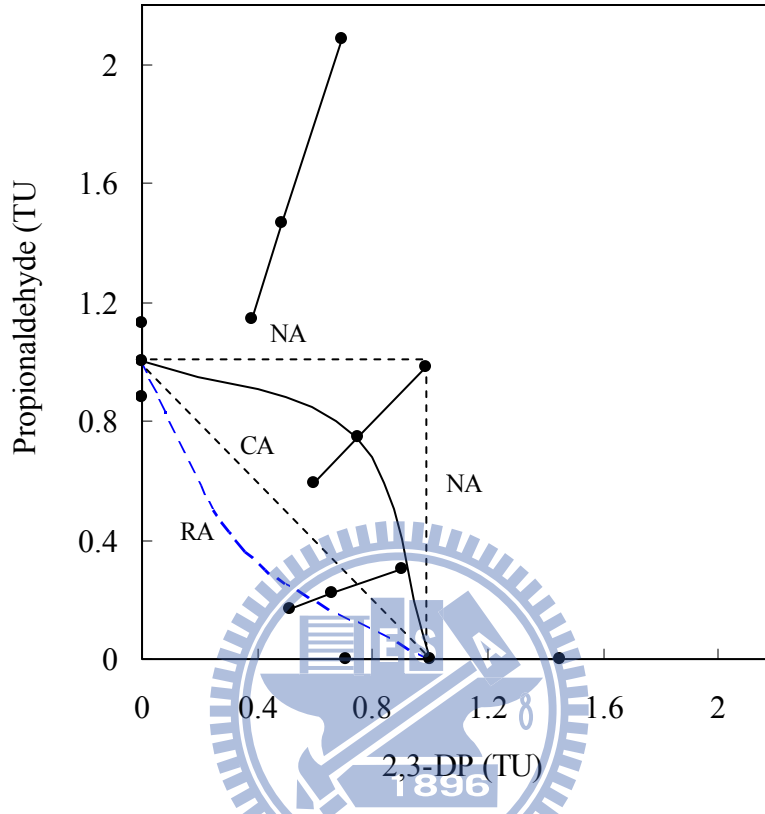


圖 5.2.4 丙醛與 2,3-DP 之 isobologram

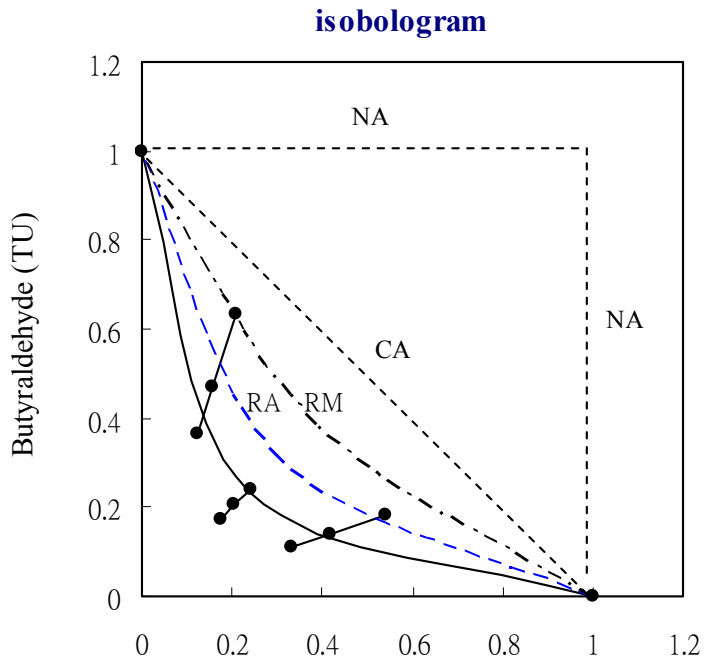


圖 5.2.5 丁醛與 2,3-DP 之 isobologram

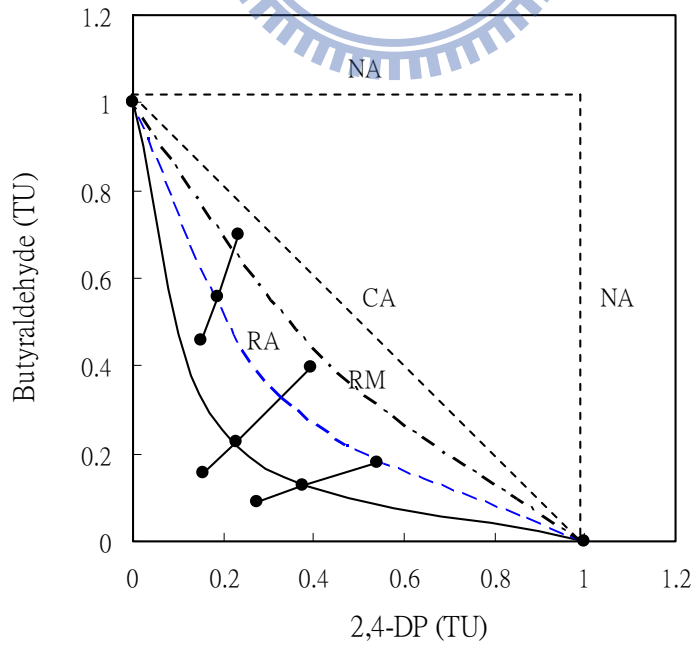


圖 5.2.6 丁醛與 2,4-DP 之 isobologram

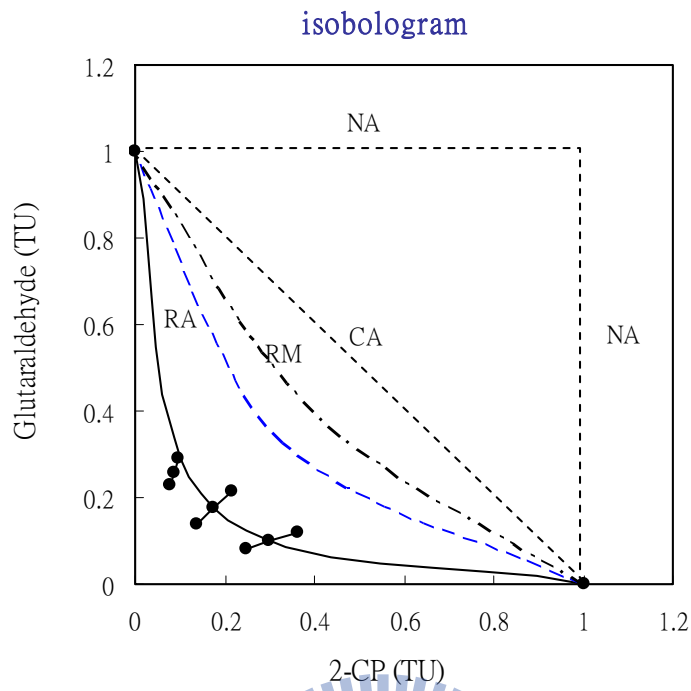


圖 5.2.7 戊醛與 2-CP 之 isobologram

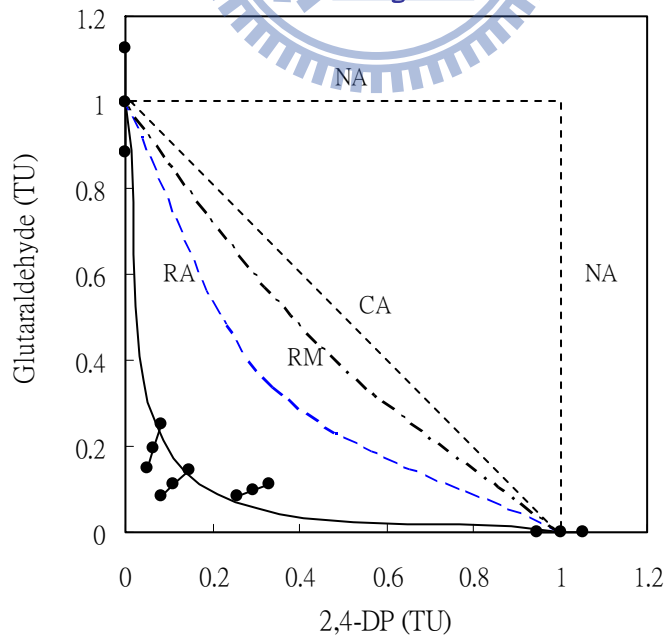


圖 5.2.8 戊醛與 2,4-DP 之 isobologram

表 5.2.3 基本四種混合效應定義

Parameter		Type of action		Response	Effect
ρ	λ				
1	1	CA	CA	$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{xi}} = 1$	Additive
1	0	NA	IA	$\max(P_1, P_2)$	Antagonistic
0	0	RM	IA	$1 - (1 - P_1)(1 - P_2)$	-
-1	0	RA	IA	$\min(1, P_1 + P_2)$	-

由 5.2.3 的表格中可瞭解到當 $\lambda = 0$ 時 (作用位址不同) 存在三種不同情形的獨立作用 (Independent action, IA)：NA、RM 及 RA，但文獻中使用的 IA model 僅為一種： $\rho = 0$ 、 $\lambda = 0$ 的 RM 模式；故於此比較 CA、RM 及 RA 三種不同模式預測能力的準確度。比較的結果如表 5.2.4，由表中可看出，當毒物皆具小斜率時，以 RA model 所預測出的結果最為嚴重，也最接近實驗的結果；當混合毒物的斜率較大 (如 2,4,6-TP+甲醛、2,4,6-TP+丙醛、PCP+丙醛)，此時 CA 所預測出的結果比 IA (RM) 來的嚴重；同時，由表中也可發現 RA 模式預測結果與實驗結果最為相近，其差值最小。此外，將模式預測出的結果與實驗結果比較並整理於表 5.2.5 中，發現以 RA 模式與實驗結果最為符合，符合的百分比高達 75%，且與實驗結果差值最小者仍為 RA 模式，故我們可由表中得知，模式預測力的準確度為：RA > RM > CA。由各個模式的比較結果可發現，針對本研究毒物而言，IA model 較 CA model 適用，推測原因，也許與試驗物種有關，本研究中選用的螢光菌屬 bacteria 類，由文獻中得知，IA 模式針對 bacteria 及 algae 物種擁有較佳的預測能力^[53]，此部分結果與文獻一致。

表 5.2.4 不同模式的預測力比較

Toxicant	Toxicant	Obs.	RA ^a	RM	CA	pred. - obs.		
						RA	RM	CA
Formaldehyde	2-CP	0.50 [S]	0.65 [S]*	0.80 [S]*	1 [+]	0.15*	0.3	0.5
	4-CP	0.72 [S]	0.64 [S]*	0.80 [S]*	1 [+]	0.08*	0.08*	0.28
	2,3-DP	0.39 [S]	0.65 [S]*	0.80 [S]*	1 [+]	0.26*	0.41	0.61
	2,4-DP	0.61 [S]	0.71 [S]*	0.84 [S]*	1 [+]	0.1*	0.23	0.39
	2,4,6-TCP	0.38 [S]	0.89 [S]*	1.02 [+]	1 [+]	0.51*	0.64	0.62
	PCP	0.76 [+]	0.82 [S]	0.98 [+]*	1 [+]*	0.06*	0.22	0.24
Propionaldehyde	2-CP	1.43 [A]	0.70 [S]	0.84 [S]	1 [+]	0.73	0.59	0.43*
	4-CP	0.85 [+]	0.70 [S]	0.84 [S]	1 [+]*	0.15	0.01*	0.15
	2,3-DP	1.50 [A]	0.70 [S]	0.84 [S]	1 [+]	0.8	0.66	0.5*
	2,4-DP	0.68 [S]	0.76 [S]*	0.90 [+]	1 [+]	0.08*	0.22	0.32
	2,4,6-TCP	1.39 [A]	0.93 [+]	1.06 [+]	1 [+]	0.46	0.33*	0.39
	PCP	1.06 [+]	0.88 [S]	1.02 [+]*	1 [+]*	0.18	0.04*	0.06
Butyraldehyde	2-CP	0.61 [S]	0.62 [S]*	0.78 [S]*	1 [+]	0.01*	0.17	0.39
	3-CP	0.67 [S]	0.60 [S]*	0.77 [S]*	1 [+]	0.07*	0.1	0.33
	4-CP	1.49 [A]	0.62 [S]	0.78 [S]	1 [+]	0.87	0.71	0.49*
	3,4- DP	0.51 [S]	0.63 [S]*	0.80 [S]*	1 [+]	0.12*	0.29	0.49
	2,3-DP	0.41 [S]	0.62 [S]*	0.78 [S]*	1 [+]	0.21*	0.37	0.59
	2,4-DP	0.46 [S]	0.68 [S]*	0.84 [S]*	1 [+]	0.22*	0.38	0.54
	2,4,6-TCP	0.38 [S]	0.87 [S]*	1.00 [+]	1 [+]	0.49*	0.62	0.62
	PCP	0.43 [S]	0.81 [S]*	0.96 [+]	1 [+]	0.38*	0.53	0.57
Glutaraldehyde	2-CP	0.35 [S]	0.66 [S]*	0.80 [S]*	1 [+]	0.31*	0.45	0.65
	3-CP	0.39 [S]	0.62 [S]*	0.78 [S]*	1 [+]	0.23*	0.39	0.61
	4-CP	0.40 [S]	0.64 [S]*	0.79 [S]*	1 [+]	0.24*	0.75	0.6
	2,3-DP	0.54 [S]	0.66 [S]*	0.80 [S]*	1 [+]	0.12*	0.46	0.46
	2,4-DP	0.22 [S]	0.72 [S]*	0.86 [S]*	1 [+]	0.5*	0.64	0.78
	3,4- DP	0.54 [S]	0.66 [S]*	0.80 [S]*	1 [+]	0.12*	0.46	0.46
	2,4,6-TCP	0.77 [S]	0.89 [S]*	1.02 [+]	1 [+]	0.12*	0.25	0.23
	PCP	0.64 [S]	0.84 [S]*	0.98 [+]	1 [+]	0.2*	0.34	0.36

*: 模式與實際結果相符者亦或模式與實際結果差值最小者

^a: 因為模式預測結果無 95 C.I.,故將 0.9-1.1 定為相加作用

表 5.2.5 不同模式的預測力整理

模式種類	與實驗結果符合組數	符合百分比	實驗差值最小者
RA	21	75%	22 (76%)
RM	17	61%	4 (14%)
CA	3	11%	3 (10%)

接著以 isobologram 的圖形來說明模式的預測力，圖 5.2.1-5.2.8 為醛與氯酚在不同 TU 比混合下的 isobologram，圖中實線代表實驗所得的曲線，是利用最適解 ρ 、 λ 值 (Best Fit) 繪圖而得。至於 CA、NA、RM 及 RA 係根據表 5.2.3 中 ρ 與 λ 值的定義繪圖而得，從圖中可看出 RA 及 RM 模式隨著化合物的斜率不同而改變其曲線；CA 及 NA 則否，無論毒性物質的斜率為何其曲線皆相同。在甲醛及丁醛混氯酚的 isobologram 中，IA 模式所預測出的曲線與實驗曲線較符合，其中以 RA 曲線的抑制情形更為嚴重也更接近實驗曲線，同時這也代表著 RA 模式預測混合毒性變化的準確性；丙醛的部份，因為此兩組混合正好為與預測不符的情形，而導致 CA 模式較符合實際實驗的情形；在戊醛的混合結果中則發現實驗曲線凹向原點，混合毒性劇烈增加，且與 IA 的預測曲線相距甚遠，不過兩相比較下，IA 仍比 CA 具較佳的預測能力。

從這八個 isobologram 中，我們發現 IA (RA 及 RM) 的預測力較 CA 好，換句話說，本研究中的毒物以 IA 模式預測較適合。IA 的定義即為相互混合的毒物機制不同且作用位置不一樣，本研究選用的毒物為反應性醛及麻醉性氯酚，毒物機制完全不同故使用 IA 較適合。如上所述，RA 及 RM 模式預測的結果隨著毒物的斜率變動而不同：當物質具小斜率時以毒性增強為主；反之，預測結果則為毒性減弱。故運用在風險評估上，若化

合物皆為小斜率，此時以 IA 模式所預測的結果較為嚴重；相反地，當物質具大斜率的劑量-反應曲線時應選擇 CA model 較為保守。本試驗結果與 Cedergreen^[47]結論相似。

5.2.3 混合毒性效應參數

根據基本理論中的非交互作用混合理論章節，相關係數 ρ 代表生物群體對於兩個以上毒性物質容忍度所呈現分布的相關程度， ρ 等於 1 代表完全正相關，等於零則為完全不相關， $\rho = -1$ 代表完全負相關；相似係數 λ 表示混合毒物作用位址(reaction sites)的相似程度， $\lambda = 0$ 表示混合毒性作用獨立， $\lambda = 1$ 則為毒性作用位置相同， λ 大於 1 的意義後來則擴充為交互作用的產生(Hewlett, 1969)。

本節研究目的主要探討針對不同的混合效應模式，對於毒性容忍度的關係為何，分別選取產生協同效應(synergism) 以及拮抗作用(antagonism) 的組別，進行觀察探討，同時進行 Model 分析，證明是否如混合毒性理論中所預估的，協同效應的產生主要是由負相關(negative correlation) 的兩毒性物質所造成，也就是所謂的 response addition 現象(即 $\rho = -1$ ， $\lambda = 0$)。

表 5.2.6 反應性醛混麻醉性氯酚之毒性效應參數探討

混合毒物一	混合毒物二	相關係數, ρ	相似係數, λ	Min. Chi-square, χ^2
Formaldehyde	2,3-DP	-0.9	1.05	0.032602
Formaldehyde	2,4-DP	-0.99	1.1	0.002337
Propionaldehyde	2-CP	0.9	0.3	0.007684
Propionaldehyde	2,3-DP	0.9	0.1	0.021485
Butyraldehyde	2,3-DP	-0.99	1.5	0.020399
Butyraldehyde	2,4-DP	-0.7	1.5	0.044912
Glutardialdehyde	2-CP	-0.95	2	0.005945
Glutardialdehyde	2,4-DP	-0.75	2.4	0.036761

表 5.2.6 為實驗中所有 isobologram 的最適 ρ 及 λ 值，其以最小的 χ^2 值為選擇依據。由表中觀察到一現象，當混合結果為毒性加強時(甲醛、丁醛及戊醛)，其相關係數皆趨近於-1(-0.7~-0.99)，相當符合純種生物毒性試驗相關係數接近 1 或-1 的假設，且與 RA 模式中 $\rho = -1$ 的假設十分吻合。接著考慮協同作用的相似係數(λ)，根據 QSARs 的作用機制理論，本研究中分屬不同毒性機制的兩毒物，因其作用位置相異，故相似係數應趨近於零，然而由表 5.2.6 中卻未看到此趨勢，反而與此假設背道而馳，協同作用的 λ 值非但未趨近於零反而皆大於 1，且隨著協同作用越明顯其 λ 值也越大。最後探討發生拮抗作用的兩組 isobologram—丙醛，其相關係數皆為 0.9，也符合純種生物的假設；相似係數則趨近於 0，丙醛這兩組混合結果也與 RA 不吻合，反而較接近 NA model($\rho=1, \lambda=0$)。

由於上述以 model 的角度探討，發現 λ 並未符合模式的假設，故接著以數學的角度來解釋 λ 對於毒性變化的影響情形。相似係數 λ 的大小反映在產生毒性抑制反應的積分區間上；當 λ 越大時，積分區間往未反應區移動，造成更多的生物抑制反應，因此當 λ 大於 1 時傾向混合毒性加強的情形；反之， λ 越小，積分區間囊括更多的未反應區間，未反應生物量增加，因此 λ 小於 1 時，容易造成毒性減弱的現象發生。這一部份即與實驗結果幾乎完全吻合。

5.3 化學分析

一般來說混合毒性理論均以非交互作用為主要假設，這是因為混合毒性一旦牽涉到混合毒物的交互作用，產生化學反應，情況將更為複雜，勢必難以單純的相關係數來加以描述與代表混合毒物所產生的交互作

用。在文獻回顧中曾提及，Lin^[46]這位學者利用交互作用的角度成功地解釋為何 malononitrile 與長鏈醛存在時，造成毒性增強的情形。上節中丙醛+2-CP、丙醛+2,3-DP 及丁醛+4-CP 這三組毒性減弱的物質，我們認為有可能混合的有機物間產生化學反應，或者是二次產物的出現，而造成了與預測結果不符的現象。由文獻回顧中，我們曉得在化學分析時，大多數的學者選用 HPLC 及 ESI-MS 作用分析的儀器，在本研究中則選用 HPLC 作為偵測儀器。

選用 HPLC 主要是利用其定性的原理：同一種化合物，在相同的設定條件下，波峰(peak)出現的停留時間應為一致。在本節中選取的實驗方法為分別分析單一毒物及混合毒物的結果，觀察與預測不符的混合物質其 HPLC 結果是否出現第三個產物的 peak。圖 5.3.1-5.3.13 為偵測器 RI 之 HPLC 結果圖，由結果圖可發現 RI 有個特殊的特性，會將溶劑的 peak 同時也顯現出來，故為了降低 solvent peak 所造成的影響，一般來說針對 RI 而言，溶樣品的 solvent 我們選擇使用移動相(乙腈+水=40%:60%)。首先，必須先了解 solvent 的出現時間，並在分析樣品時將 solvent peak 當成背景脈衝。由圖 5.3.1 及 5.3.2 的結果可知 solvent 出現的時間約在 2 分鐘及 4 分鐘左右，故當 sample 的結果出現在此時即可將之視為背景 peak 而忽略之。在 HPLC 的分析中，理論上醛類與氯酚的分析濃度應比照實驗濃度 (TU=1:1)，不過在 RI 的偵測濃度限制下，只能夠以清楚地看到波峰的最低濃度為準，故在 HPLC 的化學分析當中，將醛類的分析濃度皆定為 1000 mg/L，至於氯酚則為 200 mg/L。單一化合物的結果如圖 5.3.3-5.3.8 所示，至於混合毒物的 HPLC 則為接下來的圖 5.3.9-5.3.12。

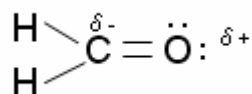
一開始，我們以為與模式不符的三組混合毒物，應當是產生了交互作用生成較不毒的物質，而導致實際結果與預測不符。若生成第三個物質照

理而言會在 HPLC 結果上顯現第三個 peak，然而由圖 5.3.11-5.3.13 中並未出現預期中的第三支 Peak。儘管未發現新物質的波峰，但並不表示此三組混合毒物無化學反應的發生，有可能因為本分析條件(如移動相、column、流速等等)只適用於醛類及氯酚，但其實並不適合新物質，故管柱無法將新物質分離並顯示於結果圖中；亦或者生成的新物質停留時間與原本毒物太近，以至於波峰被原本有機物覆蓋而無法顯現於 HPLC 的混合結果圖。因此，接下來則以混合後面積的削減情形來探討丙醛+2-CP、丙醛+2,3-DP 及丁醛+4-CP 這三組物質之間是否發生了交互作用。

表 5.3.1 為毒物單獨存在及兩兩混合時其 peak 面積的減少百分比。表中虛線上方的混合組別為 2-CP + 戊醛，此組實驗結果為協同反應，與 RA model 預估的結果一致；至於虛線下方則為產生毒性減弱的組別，也正是違背模式預測的混合毒物。由表中可發現，符合模式預測的混合毒物，混合後的面積減少量約只有 1%；與模式不符之組別面積削減量則為 10% 左右，明顯地與符合預測的組別相差甚遠，依質量不減定律，2,3-DP+丙醛、2-CP + 丙醛、4-CP + 丁醛這三組物質混合後面積減少的部份也許生成了新的物質，只是在本實驗中所使用的條件下並未偵測到第三個物質的波峰，無法直接證實此三組與模式不符的物質產生化學變化，只能夠間接地利用面積削減量推斷毒物間可能牽涉到較複雜的交互作用。

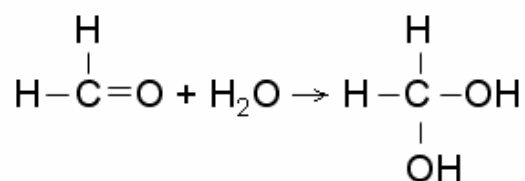
雖然並未直接偵測到新物質的存在，不過我們仍然認為 2,3-DP+丙醛、2-CP + 丙醛、4-CP + 丁醛這三組物質彼此間發生了化學反應。倘若以有機化學的角度加以解釋，則可發現醛類與氯酚產生化學反應的機率極大。醛類為具羰基($C=O$)的有機化合物，羰基在化學結構有一重要特性，因為氧的陰電性比碳原子大，羰基雙鍵的 σ 及 π 鍵電子均較靠近氧原子，而鄰近的碳原子電子密度稍減，亦即， $C=O$ 鍵是極化的。此狀況可用下式

表示：

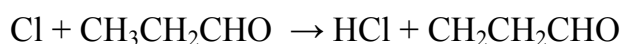
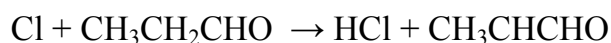
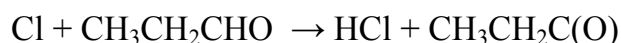


羰基碳上的正電荷特別容易接受一親核劑的攻擊。接著探討氯酚的結構，氯酚帶有具共振結構的苯環，環上接有 OH 官能基及氯原子，苯環穩定不易發生反應，因此若氯酚與醛發生反應，較有可能是氯原子解離後去攻擊醛，因為氯原子為一親核劑且其陰電性強，極易拉電子。故氯原子有可能與醛進行加成反應，生成一四面體的產物。

由 TU=1:1 的混合結果中，可發現丙醛與氯酚的混合結大多為相加或拮抗作用，明顯與模式預期不合。若以有機化角度來說，對於同一類的化合物，不論是分子間的鍵能或者焓值皆隨著分子量越大而增加。我們曉得，分子間的鍵能代表著形成分子時所需的能量，形成的能量越強，反之，要將其破壞所需的能量也越大，故鍵能越大代表物質結構越穩定。對於本研究的化合物而言，若以鍵能的角度則其穩定性如下所示：甲醛 < 丙醛 < 丁醛 < 戊二醛，由此可知，甲醛與丙醛最不穩定。不過甲醛具備一特殊性質，當其溶解於水中，會與水加成形成二氫化合物(formaldehyde hydrate)。在中性的水中，甲醛幾乎作 100% 的水合，且此水合物為一穩定的物質，不易其他化合物反應。故由此得知，研究中的丙醛為一最不穩定的物質，與其他物質發生反應的機率較高。以下為甲醛的水合反應：



除此之外，由文獻中^[52]發現氯酚的官能基(Cl)確實會與丙醛發生反應，其可能的化學反應式如下：

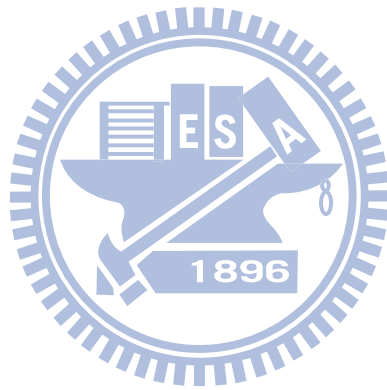


此三個化學反應式皆在室溫(25°C)下即會進行，在 Microtox 的 15 分鐘試驗中，溫度僅有 15°C，照理來說，在這麼低的溫度下發生化學反應的機率不高。不過由文獻中我們已知氯原子確實會與丙醛發生反應，極有可能螢光菌(*Vibrio fischeri*)中的某些酵素加速了上述反應的發生，以至於混合後的結果與預測不符，不過這一部分仍需未來作更進一步的研究與探討。

在文獻回顧中曾提及，Lin 在 2003 年利用 HPLC 成功地偵測到當 malonitrile 與醛類混合時，有新物質 peak 的生成，然而觀察到新物質的前提為兩毒物須作前處理。Lin 選用了 Shinkai 的方法當作前處理：將 malonitrile、aldehyde 及 CTMAB(膠體粒子,用以促進兩物質的碰撞機會)混合於 30°C 的水浴下，並搖晃 24 h。作者同時發現，當兩化合物未作前處理時，HPLC 無法偵測到新物質的蹤影。

由此文獻推及到本研究結果，在 HPLC 分析時，我們並未有複雜的前處理動作，只是單純的將兩化合物混合搖晃約 10 分鐘，因此若生成物的濃度十分稀少時，在此實驗條件下觀察不到新物質可說是十分合乎常理的。儘管由文獻中了解氯原子確實會與丙醛發生反應，但在本實驗中缺少一適當的前處理，以至於無法在 HPLC 上觀察到新物質的 peak，這一部份

有待未來更進一步地研究探討。總而言之，儘管本研究無法成功地使用 HPLC 偵測到第三個物質的生成，然而由 2,3-DP+丙醛、2-CP +丙醛、4-CP +丁醛混合後面積大為減少的情形以及化學分析的文獻，我們推論面積減少的部份也許是生成了毒性較弱的化合物，以致於實驗結果為毒性減弱而非模式預測的毒性增強。



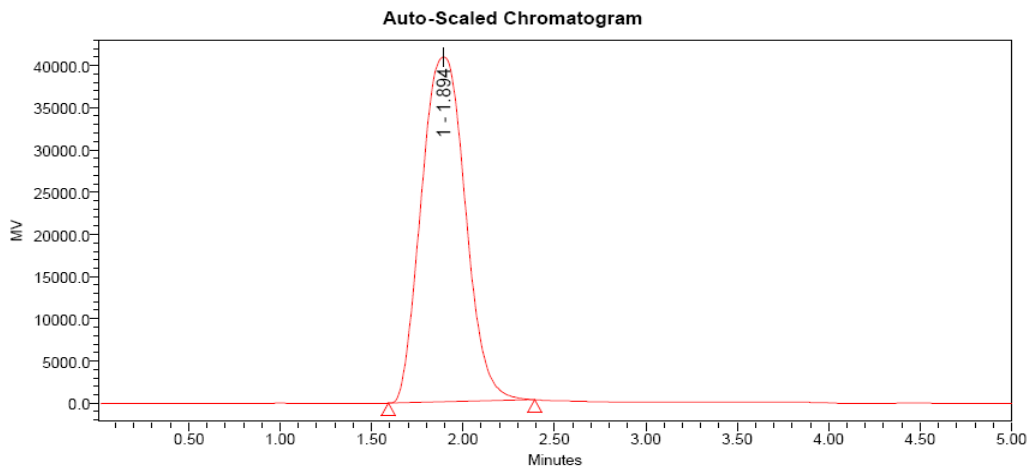


圖 5.3.1 乙腈的 HPLC 結果圖

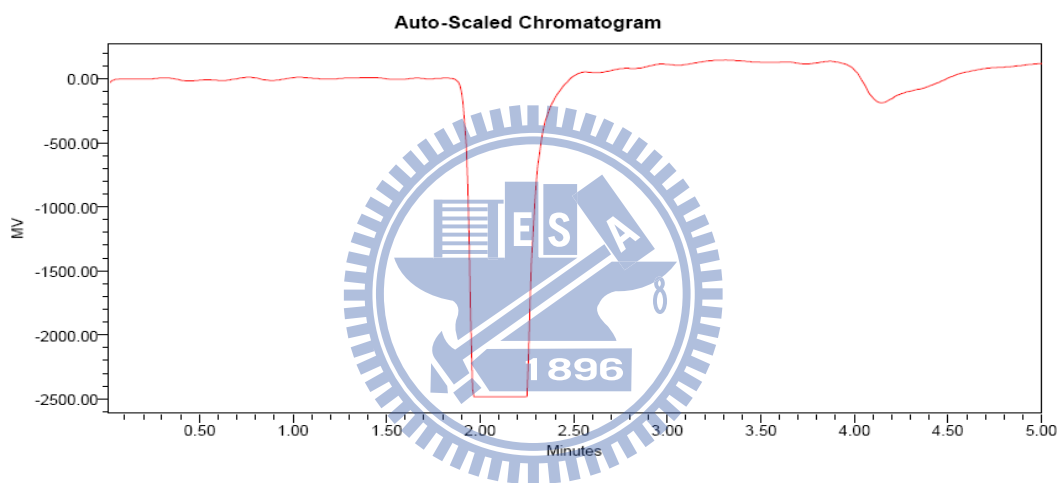


圖 5.3.2 (乙腈+水)的 HPLC 結果圖

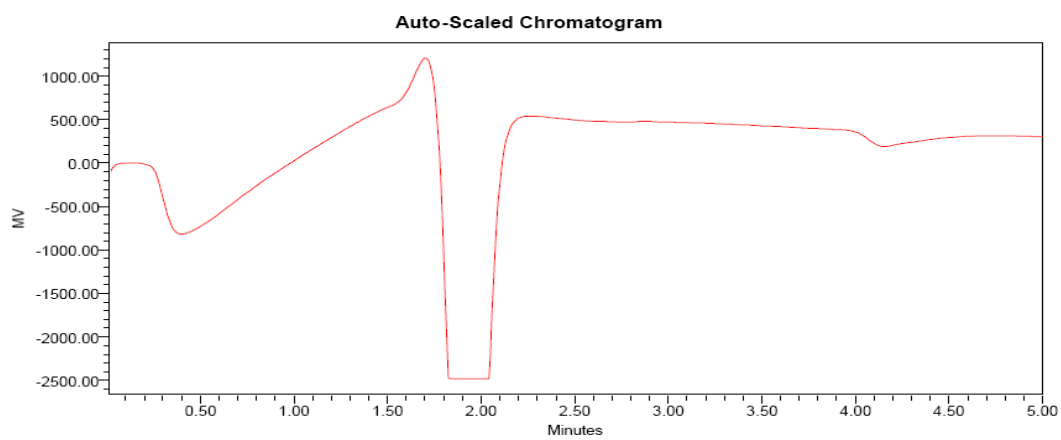


圖 5.3.3 (乙腈+水)的 HPLC 結果圖

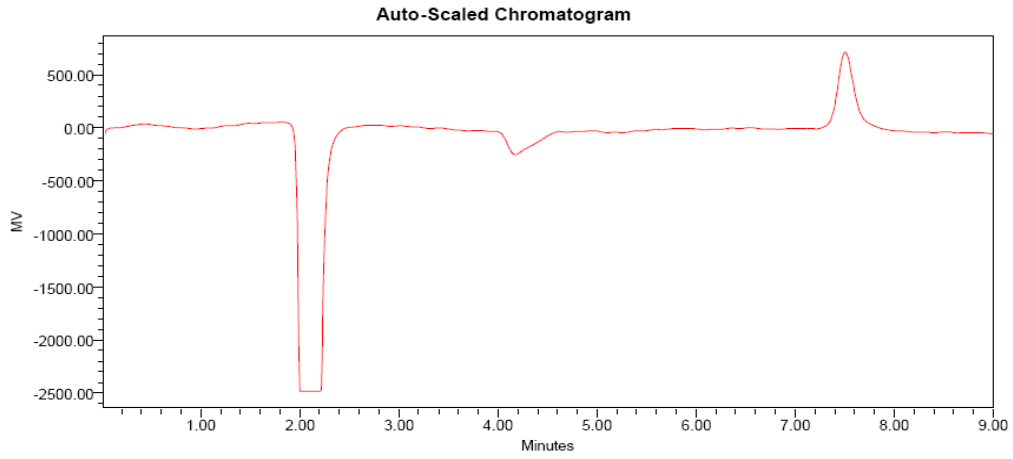


圖 5.3.4 2-CP (DT=7.507)的 HPLC 結果圖

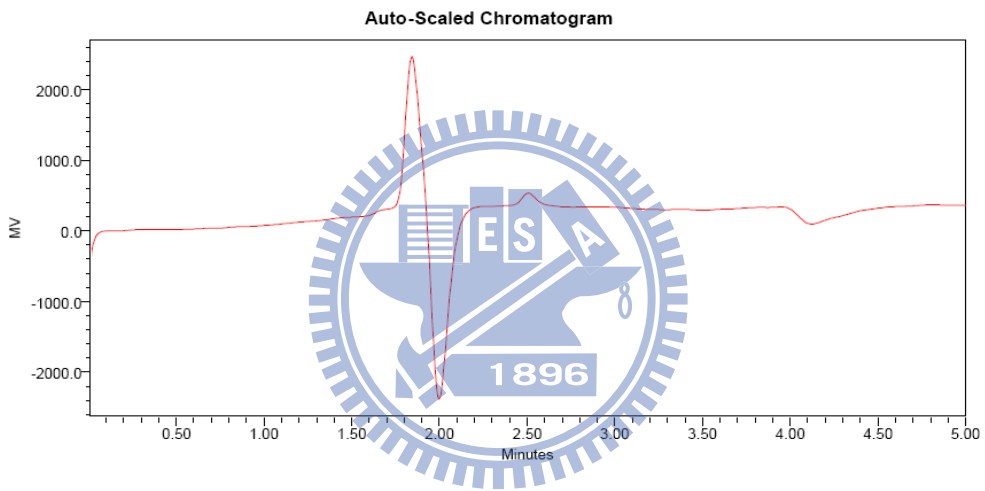


圖 5.3.5 戊醛(DT=2.507)的 HPLC 結果圖

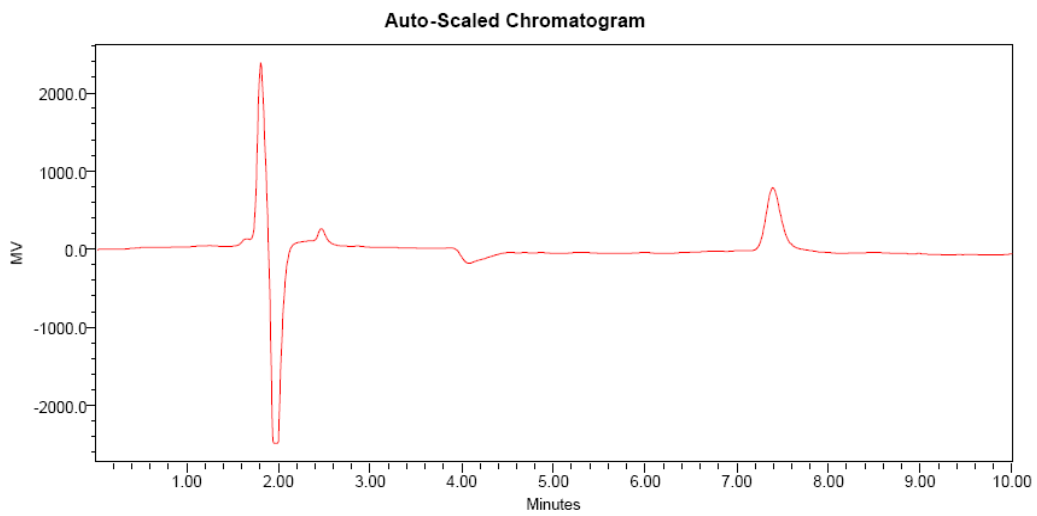


圖 5.3.6 戊醛(DT=2.47)混 2-CP (DT=7.394)的 HPLC 結果圖

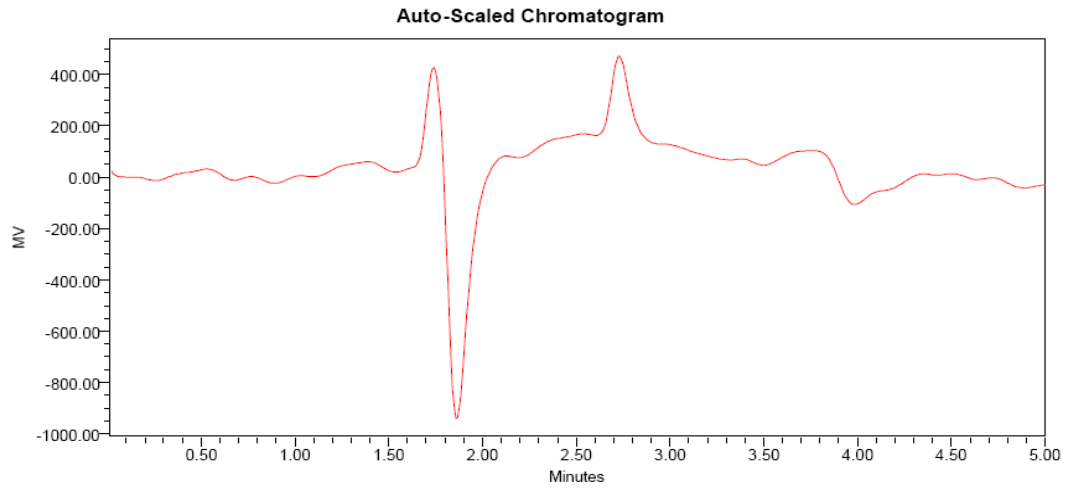


圖 5.3.7 丙醛(DT=2.73)的 HPLC 結果圖

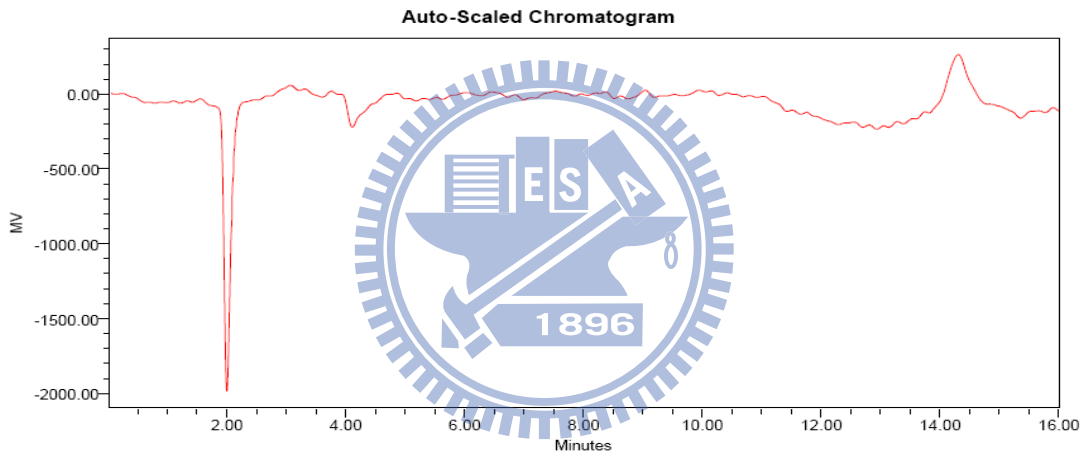


圖 5.3.8 2,3-DP(DT=14.56)的 HPLC 結果圖

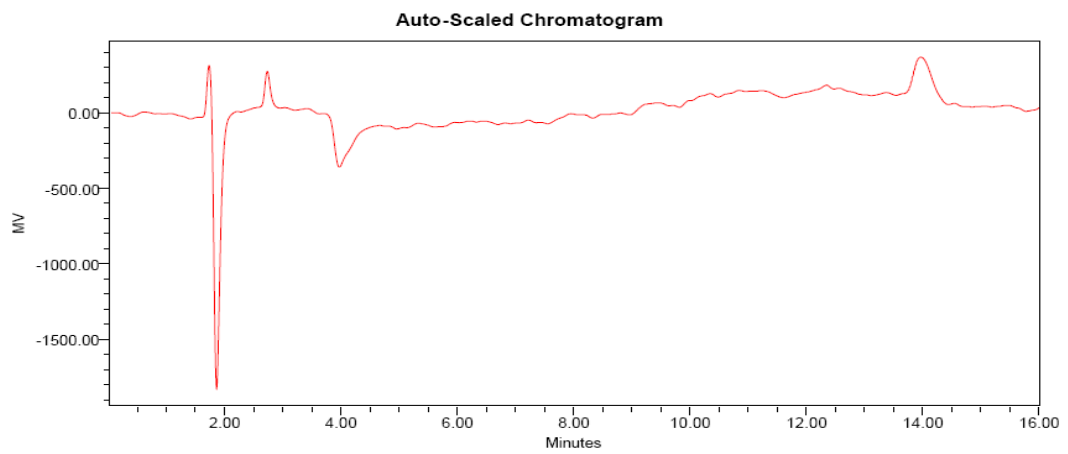


圖 5.3.9 丙醛(DT=2.73)混 2,3-DP(DT=13.97)的 HPLC 混合結果圖

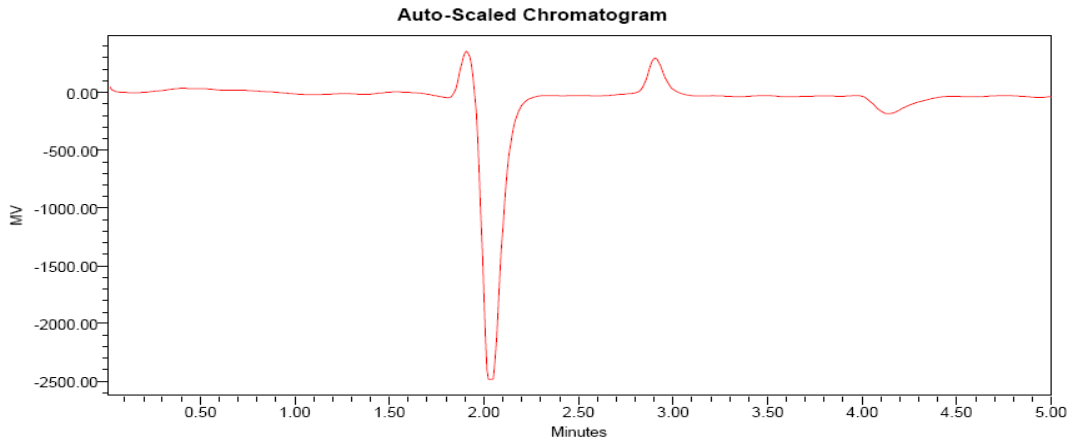


圖 5.3.10 丙醛(DT=2.907)的 HPLC 單一結果圖

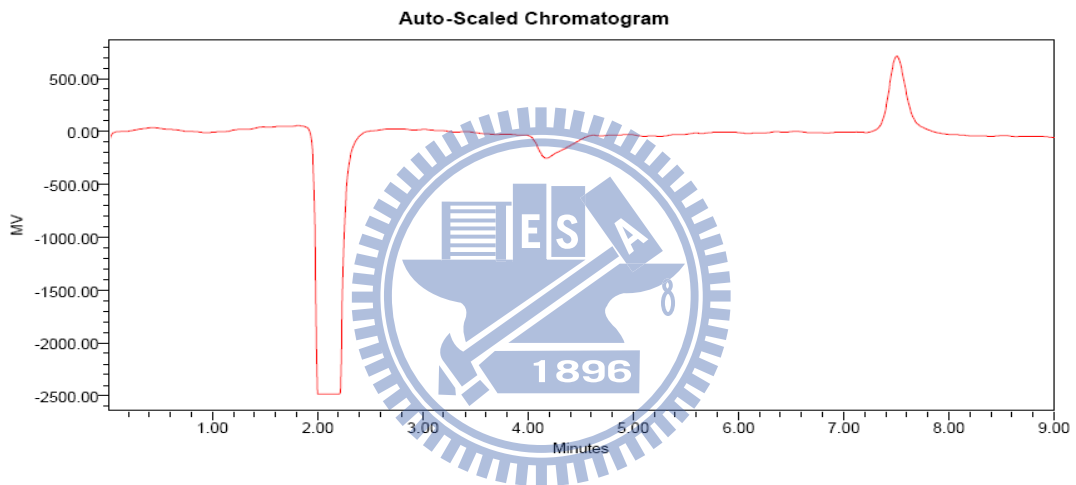


圖 5.3.11 2-CP (DT=7.507)的 HPLC 結果圖

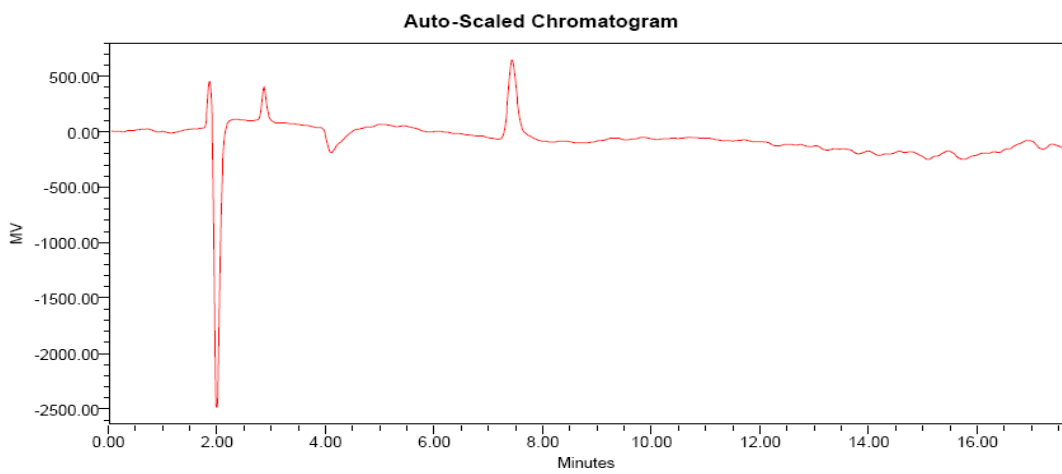


圖 5.3.12 丙醛(DT=2.865)混 2-CP(DT=7.435)的 HPLC 混合結果圖

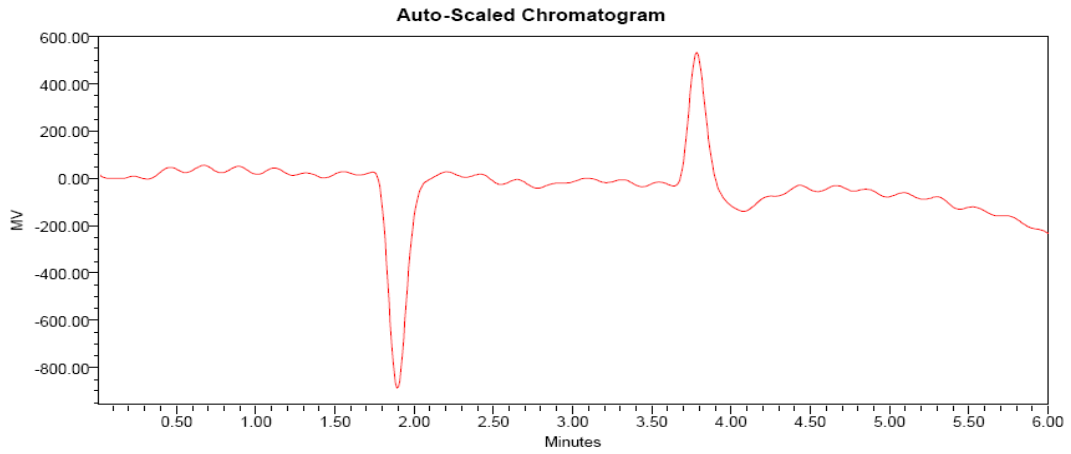


圖 5.3.13 丁醛(DT=3.78)的 HPLC 結果圖

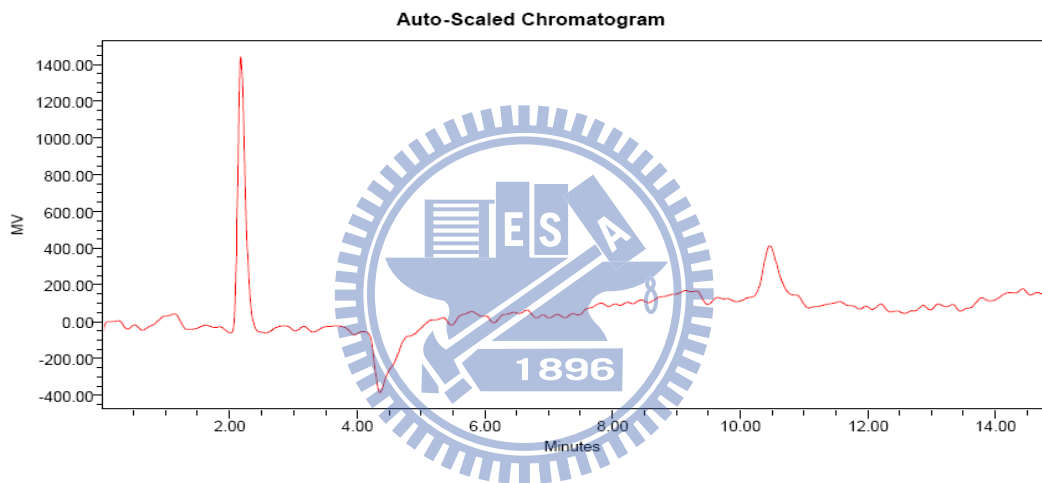


圖 5.3.14 4-CP(DT=10.46)的 HPLC 結果圖

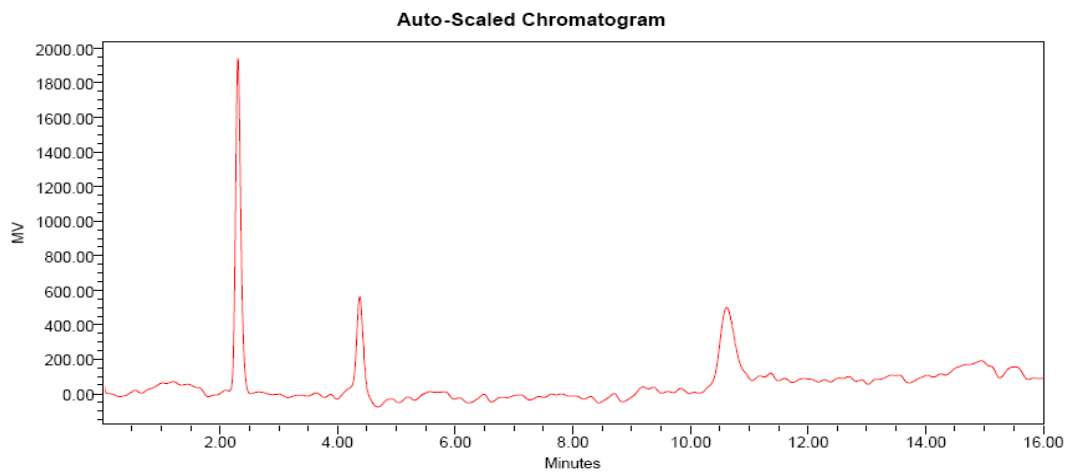


圖 5.3.15 丁醛(DT=4.21)混 4-CP(DT=10.58)的 HPLC 結果圖

表 5.3.1 HPLC 結果整理

Chemical	D T (min)	面積	減少百分比 (%)
2-CP	7.507	8892681	
戊醛	2.507	1088033	
2-CP+戊醛	7.394 , 2.47	8814813 , 1077440	0.9 % , 1.0 %
2,3-DP	14.31	6089921	
丙醛	2.729	1784090	
2,3-DP+丙醛	13.97 , 2.733	5404162 , 1550222	11.2 % , 13.1 %
2-CP	7.507	8892681	
丙醛	2.907	2008432	
2-CP + 丙醛	7.435 , 2.865	8223176 , 1777984	7.5 % , 11.5 %
4-CP	10.464	5214389	
丁醛	3.78	4201191	
4-CP + 丁醛	10.58 , 4.21	4857561 , 3671397	6.8 % , 12.6 %

註：分析時醛類濃度皆為 1000 mg/L，氣酚濃度則為 200 mg/L。



第六章 結論與建議

6.1 結論

本實驗為針對工業常用之反應性醛類有機物與極性麻醉有機物進行單一及混合毒性試驗，以下為描述本研究結論，並提出未來可進一步探討的研究方向與建議。

1. 由四個醛類及八個氯酚對 Microtox 的單一毒性試驗，結果發現氯的毒性大致上隨著鍵結的氯數增加而增強，以五氯酚的毒性最強 $EC_{50} = 0.38 \text{ mg/L}$ ；醛類的毒性則無一定的趨勢，以丙醛的毒性最弱， EC_{50} 值為 225 mg/L 。
2. 以反應性醛+麻醉性氯酚配對形式進行混合毒性實驗，發現小斜率的物質產生毒性增強的機率極高，斜率較大的物質混合則以相加及拮抗作用為主(丙醛+2,4,6-TP、丙醛+PCP)。這與 RA 模式預估結果一致，值得注意的是與戊醛混合的組別，毒性增強的情形更為顯著，因此在規範水體水質標準時須特別注意戊醛與氯酚兩類毒性物質共存時之標準訂定。
3. 由不同模式的預測準確力比較中，可發現對於本研究的混合結果而言，IA 模式(RA 及 RM)所預測出的結果比 CA 模式更為準確，其準確率比較為： $RA > RM > CA$ 。
4. 由許多毒物學文獻中發現，大部分的學者認為 CA model 比起 IA model 來的保守，這是在未考慮 ρ 值而下的定論。因此本研究中將 $\rho = -1$ 納入模式預測的考慮因素中，發現當 $\rho = -1$ 、 $\lambda = 0$ (RA，即為 IA 模式中的一種情形)為 IA 最為嚴重的特殊情形。並利用實驗的 isobologram 做探討，若化合物皆為小斜率，此時以 IA 模式所預測的結果較為嚴

重；相反地，當物質具大斜率的劑量-反應曲線時應選擇 CA model 較為保守。

5. 與模式不符的三組混合物：2,3-DP+丙醛、2-CP +丙醛、4-CP +丁醛，利用 HPLC 儀器分析，發現混合後面積大為減少，削減的比例約為 10-25%，推斷面積減少的部份也許是生成了較不毒的化合物，以致於實驗結果為毒性減弱而非模式預測的毒性增強。

6.2 建議

1. 本研究為反應性醛及麻醉性氯酚針對 Microtox 生物的混合試驗，未來若能夠以不同試驗物種進行混合試驗，證實 RA 模式預測的準確性，也許可進一步地將 RA model 運用在混合毒性的風險評估上，相信對於環境水體的保護將會更為完善。
2. 在不符合模式預測的分析部份，本實驗並未成功地直接證實新物質的生成，未來或許可以額外添加催化劑、酵素等促進新物質的生成；也可從化學物與生化系統的角度去解釋混合物與模式不符的現象。

參考文獻

- [1] **Diane JW, Blum RE.** 1991. Speece A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *Res. J.WPCF* 6:198-207
- [2] **Ren S, Frymier PD.** 2003. Use of multidimensional scaling in the selection of wastewater toxicity test battery components. *Water Res.* 37:1655-1661
- [3] **Candena F, Drohobyczer A, Beach MI, Barnes D.** 1988. *Proc. 43rd Purdue Ind. Waste Conf.*, pp. 459-467
- [4] **Trevizo C, Nirmalakhandan N.** 1999. Prediction of microbial toxicity of industrial organic chemicals. *Wat Si. Tech* 39:63-69
- [5] **Ren S, Frymier PD.** 2003. Use of multidimensional scaling in the selection of wastewater toxicity test battery components. *Water Res.* 37:1655-1661
- [6] **Ren S, Frymier PD.** 2002. Modeling the toxicity of polar and nonpolar narcotic compounds to luminescent bacterial SHK1. *Environ Toxicol and Chem.* 21:2649-2653
- [7] **Ren S, Frymier PD.** 2002. Toxicity estimation of phenolic compounds by bioluminescent bacterium. *J Environ Eng.*
- [8] **Jawecki GN, Sawicki J.** 2002. A comparison of sensitivity of spirtox biotest with standard toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 42:389-395
- [9] **Kaiser KLE, Esterby SR.** 1991. Regression and cluster analysis of the acute toxicity of 267 chemicals to six species of biota and the octanol/water partition coefficient. *Sci Total Environ.* 109/110, 499-514
- [10] **McElroy WD and Green A.** 1955. Enzymatic Properties Of Batcterial

- Luciferase. *Arch biochem. Biophys* 56 [11] **Cormier MJ, Totten, and Rostorfer HH**. 1956. Comparative studies on different bacterial luciferase preparations. *Arch biochem. Biophys* 63:414
- [12] **McElroy WD and Green A**. 1956. Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin. *Arch biochem. Biophys* 64
- [13] **Nealson K H**. 1977. Auto-induction of bacterial luciferase. *Arch. Microbiol.* 112:73-79
- [14] **Hermens J, Canton H, Steyger N, Wegman R**, 1984. Joint effects of a mixture of 14 chemicals on mortality and inhibition of reproduction of *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 5 (4), 315–322
- [15] **Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Grimme LH**. 1996. Regulations for combined effects of pollutants: consequences from risk assessment in aquatic toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 34 (11–12), 1155–1157
- [16] **Greco WR, Bravo G, Parsons JC**, 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* 47 (2), 332–382.
- [17] **XU S and Nirmalakhandan N**, 1997. Use of QSAR models in predicting joint effects in multi-component mixtures of organic chemicals. *Wat. Res.* 32
- [18] **Chen CY and Chiou YS**. 1995. Toxicity of binary mixtures of organic chemicals. *Environmental Toxicology and Water Quality* .vol. 97-106
- [19] **Chen CY and Yeh JT**. 1996. Toxicity of binary mixtures of reactive toxicants. *Environmental Toxicology and Water Quality*. Vol.83-90
- [20] **Broderius S, Kahl M, Elonen G, Hammermeister D, and Hoglund M**. 2005. A comparison of the lethal and sublethal toxicity of organic Chemical mixtures to the fathead minnow (*pimephales promelas*) *Environ*

Toxicol and Chem. Vol. 3117-3127

- [21] **Pignatello JJ, Martinson MM, Steiert J G and Crawford RL.** 1983. Biodegradation and photolysis of Pentachlorophenol in artificial freshwater stream. *Vol. 1024-1031*
- [22] **Boyd SA, and Shelton, DR.** 1984. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Appl. Environ. Microbiol. Vol. 272-277.*
- [23] **蘇家穎**，2001，微生物對毒性物質 PCP 生物分解性與膠凝沉降性之間的關係探討。私立東海大學化學工程研究所碩士論文。
- [24] **Loewe S, and Muischnek H.** 1926. Yber kombinattonswirkungan 1. mitteilung: Hilfsmittel der fragestellung naunyn-schmledebergs., *Arch Exp. Pathol. Pharmakol.* 114: 313-326.
- [25] **Hewlett PS and Plankett RL.** 1959. A united theory for quantal responses to mixtures of drugs: non-interactive action. *Biometrics.* 15: 591-610.
- [26] **Christensen ER and Chen CY.** 1985. A general non-interactive multiple toxicity model including Probit, Logit, and Weibull transformations. *Biometrics.* 41:711-725.
- [27] **Grzegorz NJ, Sawicki J.** Influence of pH on the toxicity of nitrophenols to Microtox_ and Spirotox tests. 2002. *Chemosphere* 52 : 249–252.
- [28] **Elain M, Boyd K K, Andrew A M.** 2000. Toxicity of mono-, di- and tro-chlorophenols to *lux* marked terrestrial bacterial, *Burkholderia* species *Rasc c2* and *Pseudomonas fluorescens*. *Chemosphere* 43:157-166.
- [29] **Gunatilleka AD, Poole CF.** 1999. Models for estimating the nonspecific aquatic toxicity of organic compounds. *Anal. Commun.* 36:235–242.
- [30] **Akers KS, Sinks GD, Schultz TW.** 1999. Structure- toxicity relationships for selected halogenated aliphatic chemicals. *Environ Toxicol Pharmacol*

7: 33-39

- [31] **Veith GD, Call DJ, Brooke LT.** 1983. Structure-toxicity relationships for the fathead minnow, *Pimephales promelas*: Narcotic industrial chemicals. *Can J Fish Aquat Sci* 40:743-748
- [32] **Franks NB, Lieb WR.** 1990. Mechanisms of general anesthesia. *Environ. Health Perspect.* 87
- [33] **Bradbury SP, Lipnick RL.** 1990. Introduction: Structural properties for determining mechanisms of toxic action. *Environ Health Perspect* 87:181–182.
- [34] **Veith GD, Call DJ, Brooke LT.** 1983. Structure-toxicity relationships for the fathead minnow, *Pimephales promelas*: Narcotic industrial chemicals. *Can J Fish Aquat Sci* 40:743-748
- [35] **Ferguson J.** 1939. The use of chemical potentials as indices of toxicity. *Proc R Soc Lond. B* 127:387-404
- [36] **Schultz TW, Sinks GD, Bearden AP.** 1998. QSAR in aquatic toxicology: A mechanism of action approach comparing toxic potency to *Pimephales promelas*, *Tetrahymena pyriformis*, and *Vibrio fischeri*. In Devillers J, ed, *Comparative QSAR*. Taylor & Francis, New York, NY, USA, pp 51–109.
- [37] **Cronin MTD, Schultz TW.** 1997. Validation of *Vibrio fischeri* acute toxicity data: mechanism of action-based QSARs for non-polar narcotics and polar narcotic phenols. *Sci. Total Environ.* 204:75-88
- [38] **Ren S, Frymier PD.** 2002. Modeling the toxicity of polar and nonpolar narcotic compounds to luminescent bacterial SHK1. *Environ.Toxico.and Chem.*21:2649-2653
- [39] **Liao YY, Wang LS, He YB, Yang H.** 1996. Toxicity QSAR of substituted benzenes to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bull. Environ. Contam.*

- Toxicol.* 56:460-466
- [40] **Terada H.** 1990. Uncouples of oxidative phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* 87: 213-218
- [41] **Verhaar HJM, Van Leeuwen CJ, Hermens JLM.** 1992. Classifying environmental pollutants. Structure-activity relationships for prediction of aquatic toxicity. *Chemosphere* 25:471–491.
- [42] **Lipnick RL.** 1991. "Outliers : their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity" . *Sci. Total Environ.* 109:131-153
- [43] **Terada H.** 1990. Uncouples of oxidative phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* 87: 213-218
- [44] **Bliss CI.** 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26:585-615
- [45] **Plackett RL, Hewlett PS.** 1952 Quantal responses to mixtures of poison, *J. Roy. Stat Soc* 14:141-163
- [46] **Zhifen L, Kedong Y, Ping S, Liansheng W, and Hongxia Y.** 2002 Development of QSARs for Predicting the Joint Effects between Cyanogenic Toxicants and Aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* 2003, 16, 1365-1371
- [47] **Dimitris P., Jiangxin W., Petros K., Dimitris K., Milton S., Qiang H.,**2007. Toxicity and metabolism of *p*-chlorophenol in the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Aquatic Toxicology* 85:192–201
- [48] **Backhaus T, Faust M, Scholze M, Gramatica P, Vighi M, and Grimme H.** 2004. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environ.Toxicol. and Chem.* 23(2): 258–264
- [49] **Nina C, Anja K,Jens CS.** 2006. Is prochloraz a potent synergist across

aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants.

Aquat. Toxicol. 78 243-252

- [50] **Jawecki GN, Sawicki J.** 2002. A comparison of sensitivity of spirotox biotest with standard toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:389-395
- [51] **Kishino T and Kobayashi K.** 1996. Acute toxicity and structure-activity relationships of chlorophenols in fish. *Wat. Res.* 30(2): 387-392
- [52] **Le JP and Villenave E.** 2005. Atmospheric chemistry of propionaldehyde: kinetics and mechanisms of reactions with OH radicals and Cl atoms, UV spectrum, and self-reaction kinetics of CH₃CH₂C(O)O₂ radicals at 298 K. *J. Phys. Chem.* 109: 11837-11850
- [53] **Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H.,** 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.* 63, 43-63

附錄一 單一毒性原始數據

Formaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	91.28	68.4
86.4	77.77	0.84
43.2	69.57	2.85
21.6	92.14	7.91
10.8	87.51	13.46
5.4	90	22
2.7	97	40

Formaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	94.72	74.67
1.209	89	60
2.419	96	52
4.839	86.74	35.47
9.677	89.84	22.73
19.35	94.97	13.73
38.71	102.56	7.91

Formaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	97.01	80.99
32.56	131.89	7.19
16.28	110.54	11.46
8.14	115.76	24.21
4.07	99.95	33.48
2.04	98	49
1.02	101	70

Formaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	83.6	65.06
28.64	83.7	12.73
14.32	84	19.11
7.16	86.76	27.81
3.58	87.51	40.38
1.79	96	51
0.89	95	57

Formaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	81.53	70.84
21.83	76.26	11.56
10.91	75.04	22.75
5.456	78.02	37.1
2.729	74.6	43.82
1.364	87	57
0.682	86	64

Formaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	96	84
1.09	94	76
2.18	94	73
4.35	90.26	56
8.7	96.31	41
17.4	93.5	26
34.8	90.02	12

Formaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	90	78
32.12	91.09	10
16.06	91.15	19
8.03	91.69	31
4.01	93.23	47
2.00	95	63
1	89	70

Propionaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	95.1	93.64
888.8	73.09	3.28
444.4	87.28	20.71
222.2	89.03	41.56
111.1	96.98	62.39
55.54	110	87
27.77	119	105

Propionaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	97.07	76.47
1015.	94.46	4.39
507.6	87.34	20.94
253.8	81.15	37.5
126.9	93.92	55.32
63.45	105	75
31.73	100	77

Propionaldehyde

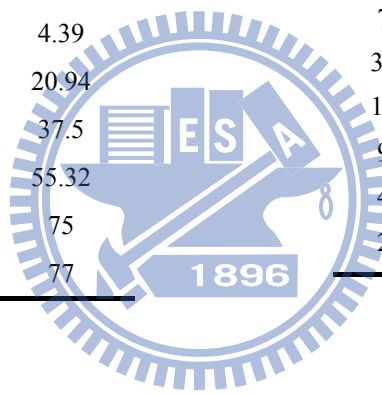
Conc	I ₀	I ₁₅
Control	93.25	80.95
729.8	94.73	21.76
364.49	98.2	31.73
182.45	85.21	51.61
91.23	97.35	69.13
45.62	120	90
22.81	89	73

Propionaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	98.75	70.02
819.3	95.38	14.18
409.7	87.76	21.77
204.8	84.71	31.77
102.4	96.24	42.8
51.2	96	56
25.6	106	66

Propionaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	100.94	88.32
931.5	93.69	12.2
456.8	83.13	23.65
232.9	91.92	38.63
114.4	116.17	74.27
58.22	110	81
29.11	98	83



Propionaldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	95.6	57.5
1234.8	94.4	12.78
617.4	93.34	16.58
308.7	89.81	22.18
154.35	92.13	29.29
77.18	81	33
38.59	81	40

Butyraldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	93.72	76.13
27.0175	100	74
54.035	98	52
108.07	100.99	38.96
216.14	84.41	16.53
432.28	99.65	3.81
864.56	91.08	1.27

Butyraldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	91.54	66.13
1012.5	96.82	3.39
506.25	91.7	5.48
253.125	97	18.72
126.56	96.75	36.76
63.28	87	46
31.64	97	60

Butyraldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	94.31	76.47
23.80	99	74
47.61	104	68
95.22	98.02	52.39
190.4	100.84	39.48
380.9	101.44	15.24
761.8	87.8	5.19

Butyraldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	95.22	61.21
945	98.9	19.1
472.5	97.07	21.36
236.3	107.16	32.21
118.1	99.97	34.44
59.06	118	51
29.5	122	60

Butyraldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	106.32	93.88
912	116.57	12.56
456	96.26	21.31
228	97.84	25.49
114	99.7	40.23
57	92	45
28.5	91	55

Butyraldehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	96.07	84.74
998	91.3	3.18
499	85.53	6.89
249.5	88	22.78
124.75	94.49	45.78
62.38	100	60
31.18	93	60

Glutardialdehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	84.67	62.97
23.85	82.42	6.44
11.92	80.22	12.71
5.96	85.4	23.68
2.98	98.93	29.29
1.49	103	54
0.745	93	58

Glutardialdehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	96.3	78.71
36.72	73.26	3.57
18.36	83.71	10.3
9.18	90	20.37
4.59	89.69	30.83
2.295	101	48
1.148	94	55

Glutardialdehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	111.78	77.17
23.85	100.8	5.84
11.93	81.59	13.3
5.96	101.75	22.83
2.98	106.16	40.91
1.49	120	67
0.75	117	77

Glutardialdehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	96.94	73.1
28.62	78.74	5.38
14.31	120.87	11.73
7.155	95.08	20.01
3.58	84.23	27.78
1.79	113	51
0.89	114	68

Glutardialdehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	110.96	103.24
43.4	94.4	4.21
21.7	95.37	11.6
10.85	96.35	24.48
5.42	95.36	36.97
2.71	98	57
1.36	93	65

Glutardialdehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	96.72	99.01
23.32	89.54	8.31
11.66	88.44	19.86
5.83	90.28	35.37
2.92	96.21	59.8
1.46	91	68
0.73	99	84

Glutardialdehyde

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	97.68	86.22
21.67	93.06	2.96
10.83	101.39	11.35
5.417	88.33	23.45
2.708	101.42	42.45
1.354	103	62
0.677	119	76

2-Chlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	97.58	60.72
104.2	95.36	6.17
52.1	87.78	13.07
26	96.88	28.22
13	104.65	38.64
6.51	110	44
3.26	107	54

2-Chlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	81.33	76.96
3.698	79.64	70.12
7.395	88.78	48.09
14.79	88.69	45.92
29.58	79.08	33.49
59.15	88.16	20.15
118.3	80.20	13.06

2-Chlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	81.33	71.08
3.9	78.46	69.71
7.8	87.26	50.93
15.6	87.68	44.75
31.2	78.07	34.27
62.4	87.15	19.2
124.8	80.10	12.72

2-Chlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	89.53	78.59
108.5	84.79	11.7
54.25	88.62	20.93
27.12	89.85	34.35
13.56	86.98	40.53
6.78	87.30	51.12
3.39	90.81	66.68

4-Chlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	98.18	77.99
0.454	106	50
0.928	96	37
1.856	99.22	31.07
3.7125	92.77	22.54
7.425	100.86	18.71
14.85	90.11	13.61

4-Chlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	104.62	93.25
8.37	118.28	15.41
4.185	113.11	21.31
2.093	110.92	34.02
1.046	122.63	48.59
0.523	97	64
0.261	100	69

4-Chlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	87.79	67.72
39.69	96.79	3.43
19.845	81.75	4.46
9.92	85.49	7.91
4.96	77.52	13.2
2.48	80.12	19.1
1.24	89.2	35.21

3-Chlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	91.54	60.1
1.1025	81	46
2.205	87	39
4.41	90.96	36.65
8.82	94.05	27.41
17.64	83.79	18.96
35.28	93.72	13.47

3-Chlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	90.32	49.72
1.24	92	41
2.47	101	35
4.95	99	29.81
9.89	86	14.53
19.8	88.7	11.21
39.59	91.87	8.77

2,3-Dichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	106.23	67.33
20.39	98.69	5.76
10.2	90.66	14.03
5.1	101.82	27.48
2.55	118	43.5
1.27	134	59
0.64	118	55

2,3-Dichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	105.16	91.41
0.5456	96	72
1.0912	89	64
2.1825	82.89	51.73
4.365	90.01	42.43
8.73	84.99	26.53
17.46	91.38	16.89

2,3-Dichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	107.01	78.57
22.05	110.93	6
11.025	103.59	13.22
5.5125	116.25	26.75
2.756	118.14	41.99
1.378	110	50
0.689	110	66

2,3-Dichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	81.94	57.08
18.5	81.12	13.47
9.26	73.93	18.64
4.63	72.64	26.68
2.32	81.19	38.89
1.16	82	45
0.58	88	50

2,4-Dichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	86.21	70.55
18.63	84.48	8.6
9.315	98.01	16.69
4.66	99.57	28.16
2.33	105.34	43.18
1.16	119	66
0.58	106	70

2,4-Dichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	92.77	74.54
0.562	106	63
1.124	95	45
2.248	98.9	31.68
4.495	98	19.21
8.99	94.83	11.57
22.81	89	73

2,4-Dichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	124.67	69.32
13.91	105.11	9.16
6.95	101.73	13.51
3.48	103.33	20.4
1.74	100.83	35.4
0.868	111	58
0.435	114	62

2,4-Dichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	93.72	67.91
8.79	91.08	4.97
4.395	99.65	6.8
2.198	84.41	15.04
1.098	100.99	31.59
0.549	100	45
0.275	98	60

3,4-Dichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	89.03	57.47
0.0938	97	52
0.188	89	44
0.375	91.98	37.8
0.75	86.73	24.93
1.5	101.56	18.74
3.0015	80.3	11.79

3,4-Dichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	90.25	50.65
0.0919	88	45
0.1834	82	38
0.3677	89.55	34.13
0.7354	84.38	23.34
1.4707	91.16	17.07
2.941	76.08	10.53

2,4,6-Trichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	96.49	50.38
11.8	94.55	0.17
5.91	87.47	1.71
2.95	93.12	8.26
1.48	96.19	26.03
0.738	89	33
0.369	89.5	46

2,4,6-Trichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	85.71	59.43
11.8	103.57	0.99
5.91	115.97	4.93
2.95	107.37	20.13
1.48	118.93	35.44
0.738	108	55
0.369	107	68

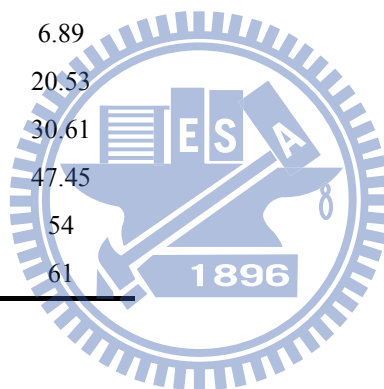
2,4,6-Trichlorophenol

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	93.74	65.75
11.91	93.08	28.98
5.96	84.71	45.18
2.98	79.87	45.26
1.49	87.42	52.56
0.74	88	57
0.37	91	60.49

Pentachlorophenol		
Conc	I ₀	I ₁₅
Control	100.65	78.84
0.702	95.38	11.3
0.351	111.26	34.75
0.176	106.7	57.68
0.088	106.69	72.52
0.0439	108.88	78.74
0.0219	92.49	71.81

Pentachlorophenol		
Conc	I ₀	I ₁₅
Control	88.35	69.37
2.655	85.55	14.74
1.328	96.17	18.78
0.664	99.53	31.47
0.332	80.73	40.85
0.166	100	68
0.083	95	75

Pentachlorophenol		
Conc	I ₀	I ₁₅
Control	89.55	55.87
1.368	82.14	6.89
0.684	83.07	20.53
0.342	85.51	30.61
0.171	87.27	47.45
0.0855	88	54
0.04275	95	61



附錄二 混合毒性原始數據

Formaldehyde+2-CP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	95.6	57.5
2	94.4	12.78
1	93.34	16.58
0.5	89.81	22.18
0.25	92.13	29.29
0.125	81	33
0.0625	81	40

Propionaldehyde+2-CP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	83.47	54.73
2	73.02	20.73
1	80.72	29.88
0.5	88.86	43.49
0.25	85.1	52.55
0.125	83	58
0.0625	90	65

Butyraldehyde+2-CP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	105.32	92.81
2	101.26	21.43
1	92.07	29.63
0.5	93.79	43.04
0.25	102.45	65.67
0.125	103	84
0.0625	87	85

Glutardialdehyde+2-CP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	94.38	83.66
2	87.36	5.99
1	80.26	17.2
0.5	85.74	30.45
0.25	87.42	49.94
0.125	82	53
0.0625	99	75

Butyraldehyde+3-CP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	93.36	89.8
0.0625	106.51	70.74
0.125	97.37	61.34
0.25	97.27	53.8
0.5	104.44	56.38
1	107.77	48.15
2	103.06	38.11

Glutardialdehyde+3-CP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	94.08	80.1
0.0625	92	64
0.125	87	55
0.25	96.62	52.72
0.5	93.58	37.17
1	103.69	24.4
2	99.92	10.66

Formaldehyde+4 -CP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	89.16	83.51
2	79.96	17.21
1	68.12	28.42
0.5	72.49	38.89
0.25	86.2	61.13
0.125	102	84
0.0625	100	88

Propionaldehyde+4 -CP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	96.64	80.93
2	98.71	21.83
1	99.2	38.79
0.5	93.7	41.24
0.25	97.89	68.5
0.125	97	74
0.0625	104	80

Butyraldehyde+4 -CP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	95.21	84.53
2	74.92	27.71
1	67.46	37.33
0.5	68.94	44.89
0.25	61.91	55.36
0.125	70	65
0.0625	71	68

Glutardialdehyde+4 -CP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	85.56	75.03
2	81.84	14.88
1	78.65	23.31
0.5	78.16	32.6
0.25	85.25	46.21
0.125	75	45
0.0625	87	60

Formaldehyde+2,3 -DP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	104.61	102.4
2	100.48	13.34
1	98.78	21.6
0.5	109.1	41.19
0.25	97.48	40.71
0.125	109	81
0.0625	108	82

Propionaldehyde+2,3 -DP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	99.35	96.04
0.125	95	85
0.25	85	71
0.5	96.18	74.27
1	89.66	56.83
2	88.59	36.46
4	96.76	18..87

Propionaldehyde+2,3 -DP (TU=1:1)

Conc	I ₀	I ₁₅
Control	124.79	70.15
2	118.05	29.53
1	109.24	38.91
0.5	116.39	44.18
0.25	119.26	62.53
0.125	135	66
0.0625	138	78

Butyraldehyde+4 -CP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	92.41	89.83
0.0625	96	66
0.125	100	67
0.25	96.55	63.09
0.5	83.65	50.5
1	89.86	43.74
2	105.09	42.38

Propionaldehyde+4 -CP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	100.93	81.1
0.125	95	75
0.25	98	71
0.5	95.74	48.62
1	98.11	32.41
2	87.48	19.03
4	91.87	10.94

Butyraldehyde+2,3 -DP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	121.63	84.53
2	124.88	11.23
1	109.24	19.73
0.5	93.99	30.77
0.25	109.82	48.89
0.125	137	76
0.0625	128	76

Glutardialdehyde+2,3-DP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	110.34	91.47
2	117.05	13.98
1	98.35	24.78
0.5	56.99	25.99
0.25	90.11	58.29
0.125	98	65
0.0625	128	76

Formaldehyde+2,4 -DP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	88.94	59.82
2	85.7	6.98
1	67.57	16.01
0.5	62.96	24.94
0.25	82.53	41.29
0.125	85	58
0.0625	78	60

Propionaldehyde+2,4 -DP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	89.88	83.23
0.125	94	76
0.25	104	69
0.5	97.32	51.23
1	91.62	34.94
2	56.99	12.61
4	80.74	11.22

Butyraldehyde+2,4 -DP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	92.51	86.02
0.0625	94	75
0.125	90	70
0.25	93.93	59.54
0.5	84.15	42.76
1	89.99	18.67
2	90.77	3.66

Butyraldehyde+2,4 -DP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	88.59	72.94
2	105.63	21.9
1	85.6	21.78
0.5	121.76	66.16
0.25	110.98	73.55
0.125	86	61
0.0625	83	61

Glutardialdehyde+2,4-DP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	97.14	87.69
2	84.05	1
1	80.08	2.08
0.5	75.67	12.9
0.25	75.79	30.58
0.125	97	59
0.0625	91	61

Butyraldehyde+3,4 -DP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	96.84	92.98
0.0625	86	65
0.125	103	70
0.25	91.35	57.72
0.5	82.49	37.28
1	74.58	29.77
2	89.79	23.53

Glutardialdehyde+3,4-DP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	94.09	62.4
0.0625	89	53
0.125	99	57
0.25	104.49	51.57
0.5	87.26	29.95
1	90.06	19.07
2	89.07	9.79

Formaldehyde+2,4,6 -TP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	99.11	94.62
2	78.36	8.43
1	90.7	18.65
0.5	82.33	30.92
0.25	70.8	34.91
0.125	85	69
0.0625	96	83

Propionaldehyde+2,4,6-TP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	94.06	77.42
2	82.91	26.69
1	87.47	42.46
0.5	92.71	61.21
0.25	85.06	65.75
0.125	108	87
0.0625	100	81

Butyraldehyde+2,4,6 -TP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	106.38	84.04
2	112.84	17.56
1	97.28	17.73
0.5	105.4	38.41
0.25	127.58	58.64
0.125	123	66
0.0625	120	72

Glutardialdehyde+2,4,6-TP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	93.9	81.73
2	90.38	14.36
1	96.74	35.54
0.5	86.83	48.83
0.25	80.45	61.7
0.125	73.55	58.37
0.0625	95	57

Formaldehyde+PCP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	96.64	80.93
2	98.71	21.83
1	99.2	38.78
0.5	93.7	41.24
0.25	97.89	68.5
0.125	104	80
0.0625	107	84

Propionaldehyde+PCP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	86.93	76
2	76.56	18.27
1	80.13	33.44
0.5	75.42	54.14
0.25	87.37	72.9
0.125	77	73
0.0625	76	73

Butyraldehyde + PCP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	88.15	63.56
2	79.71	1.33
1	81.51	1.9
0.5	76.38	20.33
0.25	82.89	53.51
0.125	81	58
0.0625	101	73

Glutardialdehyde + PCP (TU=1:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	95.19	75.16
2	83.42	11.77
1	91.88	27.45
0.5	87.12	38.85
0.25	82.97	53.46
0.125	104	70
0.0625	92	71

Formaldehyde+ 2,3-DP (TU=3:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	91.36	78.97
0.0625	91	70
0.125	91	61
0.25	89.1	50.72
0.5	83.97	36.1
1	81.88	23.88
2	88.36	14.54

Formaldehyde+ 2,3-DP (TU=1:3)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	92.98	88.31
0.0625	88	68
0.125	91	64
0.25	91.56	55.24
0.5	90.6	42.59
1	87.25	29.85
2	88.92	19.14

Formaldehyde+ 2,4-DP (TU=1:3)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	93.89	66.91
0.0625	96	62
0.125	101	55
0.25	101.2	49.85
0.5	88.15	36.57
1	86.35	26.07
2	90.78	14.27

Formaldehyde+ 2,4-DP (TU=3:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	91.98	72.56
0.125	88	59
0.25	95.46	59.06
0.5	84.69	39.75
1	98.24	30.9
2	83.46	15.8

Propionaldehyde+2-CP (TU=1:3)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	91.41	77.62
2	96.93	24.61
1	98.3	43.57
0.5	90.03	48.54
0.25	90.05	62.02
0.125	97	65
0.0625	97	73

Propionaldehyde+2-CP (TU=3:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	81.46	70
2	104.36	40.61
1	99.03	53.46
0.5	93.05	54.09
0.25	104.62	75.09
0.125	96	77
0.0625	89	73

Propionaldehyde+2,3-DP (TU=1:3)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	109.01	93.3
2	97.64	31.19
1	109.54	45.69
0.5	104.35	53.58
0.25	109.3	62.69
0.125	103	63
0.0625	103	69

Propionaldehyde+2,3-DP (TU=3:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	107.88	79.28
2	104.82	37.83
1	110.31	52.05
0.5	106.72	55.43
0.25	105.58	62.3
0.125	101	67
0.0625	93	66

Butyraldehyde + 2,3-DP (TU=3:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	90.89	84.69
0.0625	105	85
0.125	102	80
0.25	105.04	73.15
0.5	78.46	40.51
1	99.53	38.39
2	90.62	16.71

Butyraldehyde + 2,3-DP (TU=1:3)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	93.35	89.84
0.0625	100	80
0.125	103	81
0.25	86.11	54.96
0.5	101.76	49.9
1	98.13	38.97
2	106.28	23.22

Butyraldehyde + 2,4-DP (TU=3:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	97.38	83.77
0.0625	100	72
0.125	99	67
0.25	98.73	60.12
0.5	96.84	49.17
1	102.92	40.25
2	101.53	26.19

Butyraldehyde + 2,4-DP (TU=1:3)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	98.92	88.17
0.0625	103	73
0.125	105	70
0.25	104.91	62.91
0.5	101.27	49.43
1	90.32	27.73
2	101.02	19.68

Glutardialdehyde+2-CP (TU=3:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	99.09	80.8
2	124.9	19.81
1	126.36	31.27
0.5	131.92	46.11
0.25	129.64	58.68
0.125	126	69
0.0625	130	88

Glutardialdehyde+2-CP (TU=1:3)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	92.34	86.02
0.0625	92	70
0.125	93	64
0.25	93.3	50.71
0.5	86.27	36.87
1	85.68	28
2	88.69	13.19

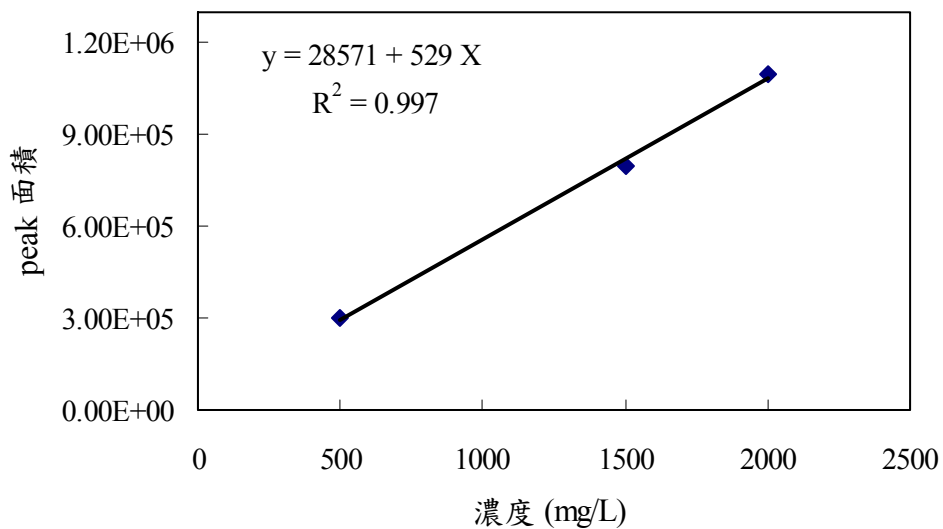
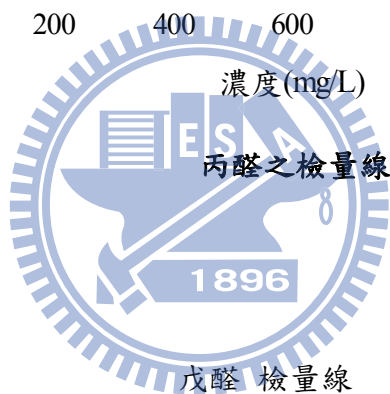
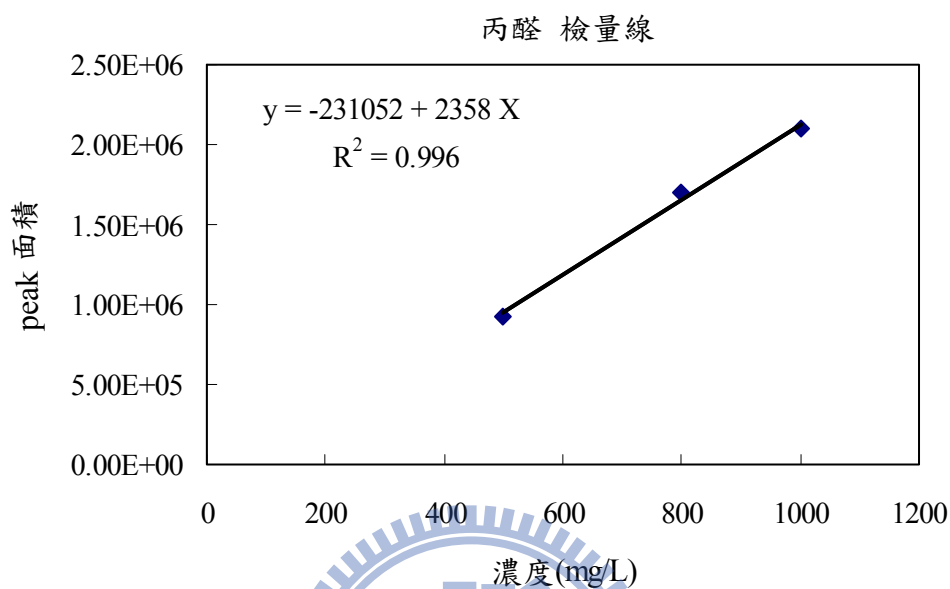
Glutardialdehyde+2,4-DP (TU=3:1)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	75.76	72.04
0.0625	80	55
0.125	100	58
0.25	92.56	46.54
0.5	91.28	35.98
1	88.68	24.05
2	108.62	12.48

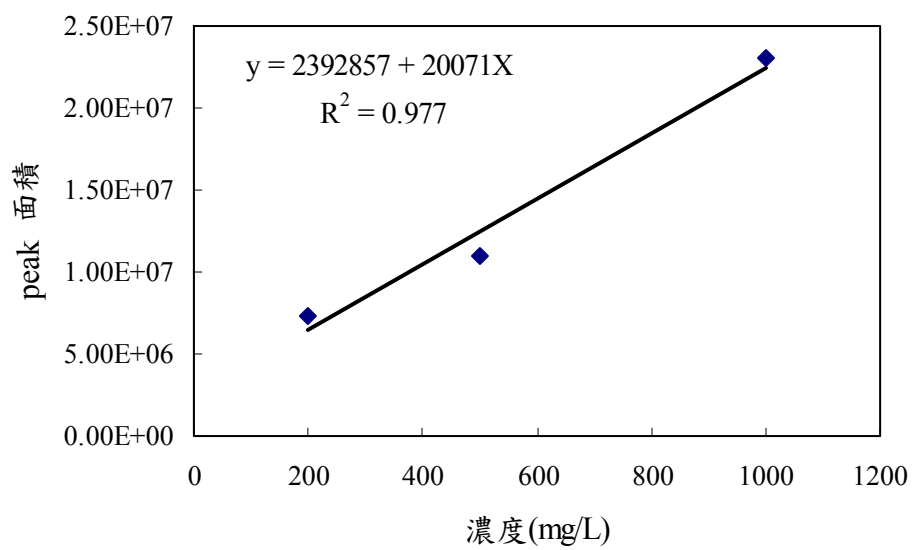
Glutardialdehyde+2,4-DP (TU=1:3)

TU	I ₀	I ₁₅
Control	93.6	73.79
0.0625	77	52
0.125	84	49
0.25	84.85	41.72
0.5	88.38	32.46
1	90.55	19.07
2	76.42	8.48

附錄三 有機物進行 HPLC 分析之檢量線



2-CP 檢量線



2-CP 之檢量線



