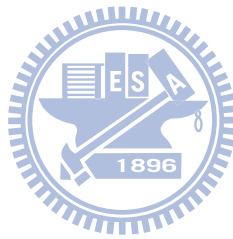


國立交通大學
環境工程研究所
碩士論文

反應性醛腈與極性麻醉含鹵素取代基苯胺之混合毒性試驗

**Combined toxic effects of reactive toxicants and
polar narcotic toxicants - halogen - anilines**



研究生：廖庭宇

指導教授：陳重元教授

中華民國九十九年七月

反應性醛腈與極性麻醉含鹵素取代基苯胺之混合毒性試驗

學生：廖庭宇

指導教授：陳重元

國立交通大學環境工程研究所

摘要

本研究針對反應性類毒性物質-醛類與腈類，以及極性麻醉毒性物質-含鹵素取代基苯胺，以 Microtox 生物試驗進行混合毒性試驗，實驗結果顯示，此兩類不同機制的毒性物質混合後，在劑量反應曲線之斜率較小與斜率較大的毒化物混合結果部份，呈現拮抗的毒性效應；而在劑量反應曲線之斜率較小的毒化物互相混合結果部份，則大部分產生相加或拮抗的毒性效應，其交互作用主要為相加以及拮抗作用。

根據非交互作用混合毒性理論 (Non-interactive multiple toxicity theory; Christensen & Chen, 1989)，不同機制且具平緩劑量-反應曲線之毒化物混合應產生協同作用之混合效應，本研究所得之結果與上述理論有明顯差異。推測本研究毒化物的混合可能產生化學物質間的交互作用 (Interactive)，因此進一步使用高效率層析儀分析混合試驗的毒性化學物質，並參考相關文獻的探討。而在高效率層析儀的分析方面，發現 Glutaraldehyde 以及 4-Chloroaniline 的混合組別分析中，與 4-Chloroaniline 的單一分析比較，4-Chloroaniline 的訊號值大幅下降；相關文獻中也發現醛類和苯胺類容易產生縮合化學反應，生成亞胺(imine)類物質；isobologram 中也發現 4-chloroaniline + 甲醛、3-chloroaniline + 戊二醛、3,4-dichloroaniline + 戊二醛的混合呈現不符合非交互作用理論的圖形，以及在質譜儀的分析方面，也發現混合後的毒性物質產生了新的分子量，因此推斷本研究的混合試驗化學物質間有可能產生化學性的交互作用而使得毒性呈現拮抗或相加。

本研究的混合毒性試驗中，得到了大部分為毒性下降以及相加性的結果，即此兩類機制毒化物混合後對環境的衝擊減小或和個別單一存在時對環境的衝擊相同。而在非交互作用理論之下的混合毒性預測和試驗結果不

完全符合之情況下，混合毒性的探討也要將兩毒化物間的交互作用納入考量，這使得毒化物的混合呈現更複雜的混合效應。



Combined toxic effects of reactive toxicants and polar narcotic toxicants - halogen - anilines

Student : Ting-Yu Liao

Advisor : Dr. Chung-Yuan Chen

Institute of Environmental Engineering
National Chiao-Tung University

Abstract

The combined toxic effects of reactive organic toxicants (aldehydes or nitriles) and polar narcotic halogenated anilines were evaluated using the Microtox test. The effects of the mixtures of the above compounds, which contain different mechanisms of toxicity, were investigated using equit-toxic-ratio tests and isobologram analyses. Both less-than-additive and additive effects were observed from the above mixtures.

According to Non-interactive multiple toxicity theory (Christensen & Chen, 1989), greater- than-additive (synergistic) effects will perform when toxicants have different mechanisms and flat concentration-response curves mixed. The toxicity test results of this research are not corresponding with the Non-interactive multiple toxicity theory. Due to the different toxicity effects, here assume that the interactive effect exist. HPLC (High-performance liquid chromatography), isobologram and MS (Mass Spectrometry) were used to analyze the toxic mixtures. The analysis results indicate there may be interactive effect among the toxic mixtures of this research.

Most of the mixtures evaluated by the present study revealed antagonistic or additive effects; which indicates that the impact to the environment from the aforementioned mixtures are expected to be less severe or the same compared with the toxicants existed alone.

誌謝

這兩年的研究所生涯，真的說長不長，說短，好像也經歷了不少事情，學到了不少新的觀念，也成長了不少。

首先要感謝老師，陳重元教授兩年以來的教導，讓我在研究的領域上開闢了另一片視野，也學到了許多做研究應有的態度，以及在我的論文上給予許多意見和指導，讓我能順利完成我的研究。並感謝我的口試委員趙木榮教授以及林志高教授給予的許多寶貴意見和建議，對論文後續的研究有很大的幫助，尤其感謝趙木榮老師和助理黃小姐細心協助並提供我使用MS分析，使我的論文能更加完整。以及要感謝董瑞安教授給予我化學分析方面的知識和指引，讓我的研究有更多資訊可以參考。

也要感謝實驗室的學姊詔棻、欣妤、百珊，學長介華，給我的指導和幫助，讓我可以順利地在實驗室學習實驗手法和研究。也謝謝我的同學心渝和聖然，在研究所學習的日子總是常常一起討論一起思考，也一起解決問題。以及謝謝學妹萱芳，學弟家祥、思宏，在我做實驗時給我很多協助，也度過很多愉快的時間。

當然還要感謝我的家人，包括爸爸、媽媽、奶奶、弟弟、所有兄弟姐妹，幫助我解決的很多困難，作為我的支柱和活力的泉源。還有在研究所期間常常一起上課和聊天的育安學姊，伶秀學姊，以及給予我非常多化學分析方面幫助的姿吟學姐和小雞學姊，文彬學長、可韻、宛珊、俞如，都十分感謝！

這段求學的期間雖然有辛苦但也有很多收穫，不但學習到很多東西，也培養我有獨立思考和自我規劃的能力，我心中很感激有這樣的機會。

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
誌謝.....	iv
目錄.....	v
表目錄.....	vii
圖目錄.....	viii
第一章 前言.....	1
1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究目的.....	2
1.3 研究內容.....	2
第二章 文獻回顧.....	4
2.1 細菌性生物毒性試驗.....	4
2.2 Microtox 毒性試驗概論.....	5
2.3 Microtox 螢光反應.....	5
2.4 有機物毒性作用機制.....	6
2.5 混合毒性.....	9
2.5.1 非交互作用(Non-interactive)及交互作用(Interactive).....	9
2.5.2 混合毒性研究之重要性.....	12
2.5.3 混合毒性研究之模式.....	12
2.6 毒性物質—苯胺類的介紹.....	14
2.6.1 苯胺類化合物的基本特性.....	14
2.6.2 苯胺類化合物的毒性與危害.....	16
2.7 毒性物質—醛類的介紹.....	17
2.8 毒性物質—腈類的介紹.....	18
第三章 基本理論.....	20
3.1 QSARs(Quantitive Structure Activity Relationship)毒性作用分類 :20	
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-反應模式及常用的單一毒性模式.....	21
3.3 混合毒性理論.....	23
3.3.1 混合毒性試驗指標.....	23
3.3.2 非交互作用混合毒性模式.....	24
3.3.3 交互作用混合毒性模式.....	24
3.3.4 混合毒性效應參數 ρ 和 λ 值.....	25
3.3.5 Isobologram.....	27
第四章 實驗設備與方法.....	28
4.1 基本實驗設備.....	28
4.2 Microtox 毒性試驗.....	28

4.2.1 基本原理	28
4.2.2 儀器構造	29
4.2.3 基本配備	30
4.2.4 標準分析程序:	30
4.2.5 Microtox 毒性試驗環境因子	31
4.3 試驗毒物	32
4.3.1 有機藥品配製	33
4.4 實驗數據處理	34
4.5 藥品混合方式	34
4.6 高效率液相層析儀(HPLC)分析	35
4.6.1 HPLC 原理	35
4.6.2 儀器型號以及設定	36
4.6.2 操作步驟	36
4.7 質譜儀(MS)分析	37
4.7.1 MS 原理	37
4.7.2 基本分析程序	37
4.7.3 儀器型號以及設定	37
第五章 結果與討論	38
5.1 Microtox 單一毒性實驗	38
5.2 混合毒性試驗結果	48
5.3 初步化學分析及探討	53
5.3.1 苯胺類與醛類相關反應	54
5.3.2 HPLC 分析	56
5.4 Isobologram 分析	64
5.5 質譜儀分析	68
第六章 結論與建議	72
6.1 結論	72
6.2 建議	73
參考文獻	74
附錄一 單一毒性原始數據	81
附錄二 混合毒性原始數據	91
附錄三 HPLC 分析之檢量線	99

表目錄

表 2.6.1 苯胺類化合物之物化特性.....	15
表 2.6.2 苯胺類化合物之來源和用途.....	16
表 3.3.4.1 四種基本混合效應.....	26
表 4.3.1 反應性有機化學物質基本資料.....	32
表 4.3.2 麻醉性有機化學物質基本資料.....	33
表 4.5.1 混合毒性 1:1 濃度配製.....	35
表 5.1.1 試驗毒物之 Microtox 毒性試驗數據.....	39
表 5.2.1 Formaldehyde 及 Glutaraldehyde 和苯胺類之混合毒性結果 (TU=1:1) 之 1.....	49
表 5.2.2 Formaldehyde 及 Glutaraldehyde 和苯胺類之混合毒性結果 (TU=1:1) 之 2.....	50
表 5.2.3 Propionaldehyde 及 Butyraldehyde 和苯胺類之混合毒性結果 (TU=1:1).....	51
表 5.2.4 Acetonitrile 及 Malononitrile 和苯胺類之混合毒性結果(TU=1:1)	52
表 5.5.1 MS 分析結果整理.....	71



圖目錄

圖 2.4.1 有機毒物的分類.....	7
圖 4.2.2.1 Microtox 螢光快速分析儀的 32 個槽其相關位置圖.....	29
圖 5.1.1 Formaldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線.....	41
圖 5.1.2 Propionaldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線.....	41
圖 5.1.3 Butyraldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線.....	42
圖 5.1.4 Glutaraldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線.....	42
圖 5.1.5 Acetonitrile 之 Microtox 劑量反應曲線.....	43
圖 5.1.6 Malononitrile 之 Microtox 劑量反應曲線.....	43
圖 5.1.7 3-Chloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線.....	44
圖 5.1.8 4-Chloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線.....	44
圖 5.1.9 2,4-Dichloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線.....	45
圖 5.1.10 2,5-Dichloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線.....	45
圖 5.1.11 2,6-Dichloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線.....	46
圖 5.1.12 3,4-Dichloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線.....	46
圖 5.1.13 3,5-Dichloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線.....	47
圖 5.1.14 2-Bromoaniline 之 Microtox 劑量反應曲線.....	47
圖 5.3.1.1 亞胺生成反應結構圖.....	55
圖 5.3.2.1 去離子水之 HPLC 分析圖.....	61
圖 5.3.2.2 戊二醛之 HPLC 分析圖.....	61
圖 5.3.2.3 MOAS 之 HPLC 分析圖(DT=1.652).....	62
圖 5.3.2.4 4-chloroaniline 之 HPLC 分析圖(DT=4.102).....	62
圖 5.3.2.5 4-chloroaniline(含 MOAS)之 HPLC 分析圖(DT=4.111).....	63
圖 5.3.2.6 4-chloroaniline 混合戊二醛之 HPLC 分析圖(DT=4.153).....	63
圖 5.3.2.7 4-chloroaniline 混合戊二醛(含 MOAS)之 HPLC 分析圖 (DT=4.214).....	64
圖 5.4.1 3-chloroaniline + 甲醛之 isobologram 分析圖	65
圖 5.4.2 4-chloroaniline + 甲醛之 isobologram 分析圖.....	65
圖 5.4.3 3-chloroaniline + 戊二醛之 isobologram 分析圖.....	66
圖 5.4.4 4-chloroaniline + 戊二醛之 isobologram 分析圖.....	66
圖 5.4.5 3,4-dichloroaniline + 戊二醛之 isobologram 分析圖.....	67
圖 5.5.1 3-chloroaniline + 甲醛(F) 之 MS 分析圖.....	68
圖 5.5.2 4-chloroaniline + 甲醛(F) 之 MS 分析圖.....	69
圖 5.5.3 3-chloroaniline + 戊二醛(G) 之 MS 分析圖.....	69
圖 5.5.4 4-chloroaniline + 戊二醛(G) 之 MS 分析圖.....	70
圖 5.5.5 3,4-dichloroaniline + 戊二醛(G) 之 MS 分析圖.....	70

第一章 前言

1.1 研究緣起

近數十年來，越來越多毒性物質混合後之毒性效應研究一直在進行中，這也反映出，來自工業廢水、家庭污水中不同來源且含有複雜非單一有機毒性物質的廢污水，對水資源環境的影響及污染應被重視。這些複雜的毒性物質，所呈現在水資源環境以及生物體中的毒性效應是綜合性的，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。而對於這些放流污水的污染管制，國內現行只針對單一毒性物質的放流濃度作為污染管制標準，但複雜成分的污水中潛在的混合毒性效應，可能導致共同放流時的毒性濃度增強。假設水中之生物對兩種符合法規濃度的毒性化學物質分別存在於水體時，並無受到毒害作用，表示這兩種單一毒化物的濃度在水體生物的容忍範圍中，但當這兩種毒化物在水體共存時，可能會發生毒性變化(相加、協同、拮抗)。如此一來，並不能確定兩種毒化物共存於水體的情況不會對水體生物造成毒害。因此對於這種非單一性化學物質釋放至環境中所牽涉的污染管制標準，應需考慮其適用性是否足夠，而不同的毒性物質混合後的效應也須加以研究及確認。

由於毒化物種類繁多，彼此的分類機制也大不相同，其中牽涉的生化反應也相當複雜，因此要了解混合毒性效應，必須做大量的混合毒性分析，累積毒性資料，花費大量的時間與財力才可得知。為了減少大量資源投入毒性試驗中，環境毒物學在預測混合毒性變化方面有了許多研究產生，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，來和實際實驗結果做比較以及討論。而由於毒性化學物間有可能產生交互作用，或是化學物與生物間產生複雜的作用，針對無法符合預測模式的混合毒性物質，也將進行其反應機制或是交互作用的分析以及探討。

在過去關於混合毒性的研究當中，大部分皆以探討非極性麻醉性毒化物之交互作用為主，對於反應性物質與極性麻醉性物質之交互作用鮮少討論，因此本研究選定了此兩類不同機制的有機物進行二元混合毒性實驗，並探討不同毒性作用機制類別的有機毒化物在 Microtox 混合毒性試驗中呈現的毒性作用變化，以及混合毒性作用對環境的衝擊變化。本研究選定的反應性的毒化物，包括具強烈親電性的醛類(reactive electrophilic aldehyde)，以及含有氰基的腈類(reactive cyanogenic nitrile);而極性麻醉性毒化物則選定工業中常使用合成染料、農藥以及藥物的化學藥劑—極性麻醉性含鹵素取代基苯胺(polar narcosis, chloroaniline / bromoaniline)。

1.2 研究目的

本研究主要之研究目的為：取得反應性醛類及腈類混合急性麻醉性苯胺類對 Microtox 之單一以及混合毒性試驗數據，以提供混合毒性結果予毒性資料庫作為參考數據，並可作為毒性風險評估之參考資料。



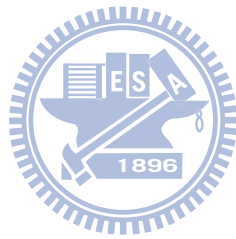
1.3 研究內容

本論文利用 Microtox 來進行單一及混合毒性試驗之研究，希望藉由實驗結果和混合毒性理論的預測結果來做進一步的比較和探討，以作為環境毒化物污染規範的參考，主要內容如以下所示：

- (1) 承續本實驗室對不同毒性作用機制之有機物的混合毒性試驗研究，本研究選用兩類不同機制的毒物，反應性(reactive)，以及極性麻醉性(polar narcosis) 作其混合試驗，以探討混合後毒性的變化情形，並了解此類化學混合物對於水體環境之衝擊變化。
- (2) 根據 Christensen & Chen (1989) 所發展的毒性預測模式，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。本研究將利用模式預測的結果與實際 Microtox 混合毒性實驗之結

果相比較，探討其預測之能力。

- (3) 實驗結果與毒性預測模式預測的結果不符合之處，進一步藉由使用高效率液相層析儀器、isobologram，以及質譜儀來分析其毒化物混合之後是否產生化學反應及其他化學物質，並從實驗毒性化學物相關的文獻來探討。



第二章 文獻回顧

2.1 細菌性生物毒性試驗

在眾多的標準生物毒性試驗物種當中，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，都是常見的試驗物種。但是在時間的耗費上，細菌性的生物毒性試驗和上述的試驗物種相比，不但較為迅速，並且操作較為簡便。舉例來說，Farre & Barcelo (2003) 文獻中提到魚類的毒性試驗常以 fathead minnow 或 rainbow trout 作為試驗物種，實驗需時 96 小時，並且需要有較大較特定的流水式實驗裝置，毒性以半致死濃度(LC₅₀)表示；而甲殼類常選用 *Daphnia magna* 或 *Ceriodaphnia dubia* 來作靜水式的生物毒性試驗，需時 24-48 小時，毒性以半致死濃度(LC₅₀)表示。而 Parvez *et al.* (2006) 文獻中也提到雖然魚類和甲殼類作為生物毒性試驗的物種具有相當高的代表性和敏感性，但太耗費實驗暴露時間，實驗裝置和人力的需求也較為龐大。因此細菌性的生物試驗憑藉著暴露時間的大幅縮短，被選為許多毒化物和放流水毒性試驗中的試驗物種。

細菌性的生物毒性試驗方法利用細菌的生命現象作為毒性試驗指標，包括酵素活性、攝氧量、基質分解效率、ATP 含量等。Dalzell *et al.* (2002) 文獻中對毒性化學物和工業廢水放流水進行了五種快速的細菌性毒性試驗來比較其相對的敏感性，包括了有硝化作用的抑制、呼吸作用的測定、ATP 的發光測定、酵素的抑制、螢光菌的發光抑制。實驗結果中發現，以螢光菌的發光抑制作為毒性試驗指標的敏感性為最高，並且在實驗的進行時間方面，螢光菌的發光抑制試驗是最為迅速便利的。在很多的環境污染事件當中，時效性及經濟成本上的考量是最主要的因素，而細菌性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。

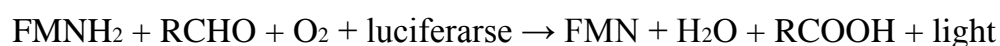
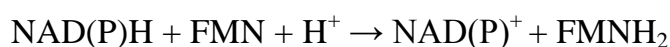
2.2 Microtox 毒性試驗概論

Patoczka & Johnson (1995) 文獻中提到，Microtox 為一種生物毒性試驗的方法，其是以螢光菌的發光抑制作為毒性試驗終點的測試方法，毒性暴露時間為 5-15 分鐘。此試驗方法發展於 70 年代後期，並在 80 年代早期開始商業化販售作為毒性的篩選試驗方式之一。

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。而 Microtox 使用的螢光菌是一種具高敏感物之物種，具有細菌試驗的優點，且具有較佳的敏感性，除此之外，在 90 年代，Microtox 與其他生物呼吸抑制的毒性試驗數據的相關性也被論證，更擴大了其運用於各種廢水及污染物質的毒性依據 (Patoczka & Johnson, 1995)。螢光菌的運用由文獻中可瞭解到其在環境的毒性試驗上具有重要性，和其他的毒性試驗比較起來，具操作迅速簡單方便、敏感度佳及再現性良好的優點，因此 Microtox 被廣泛地應用在廢水毒性監測及學術研究上 (Parvez *et al.*, 2006)。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參考。

2.3 Microtox 螢光反應

Microtox 主要的原理即是利用螢光菌的發光反應機制作為毒性試驗指標，而藉由了解螢光的發光反應途徑，可了解其他生物發光的相似處。從 McElroy & Green (1955) 的研究中發現，發光反應進行時，有一長鏈醛與 FMNH₂ 參與; Cormier *et al.* (1956) 文獻中則指出此發光反應有一酵素的參與; McElroy & Green (1956) 文獻中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 Neelson *et al.* (1977) 之文獻得知，Luciferase 具備一特殊的合成調節方法，稱為自動誘導機制(autoinduction)，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-Ketocaproylhomoserine lactone。

2.4 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)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；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(Gunatilleka & Poole, 1999; Akers *et al.*, 1999)。Dawson *et al.* (2006) 以 Microtox 對 10 種軟親電性化學物質做混合毒性試驗，對可逆以及不可逆的毒性作用反應做了整理探討，此文獻中也指出在 Microtox 的試驗中，可逆反應為毒化物進入到細胞模雙脂層中，螢光菌細胞並未死亡，只是導致細胞功能出現障礙，引起了螢光反應的削減，而不可逆反應的毒性則為毒化物導致螢光菌細胞的死亡而造成。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：

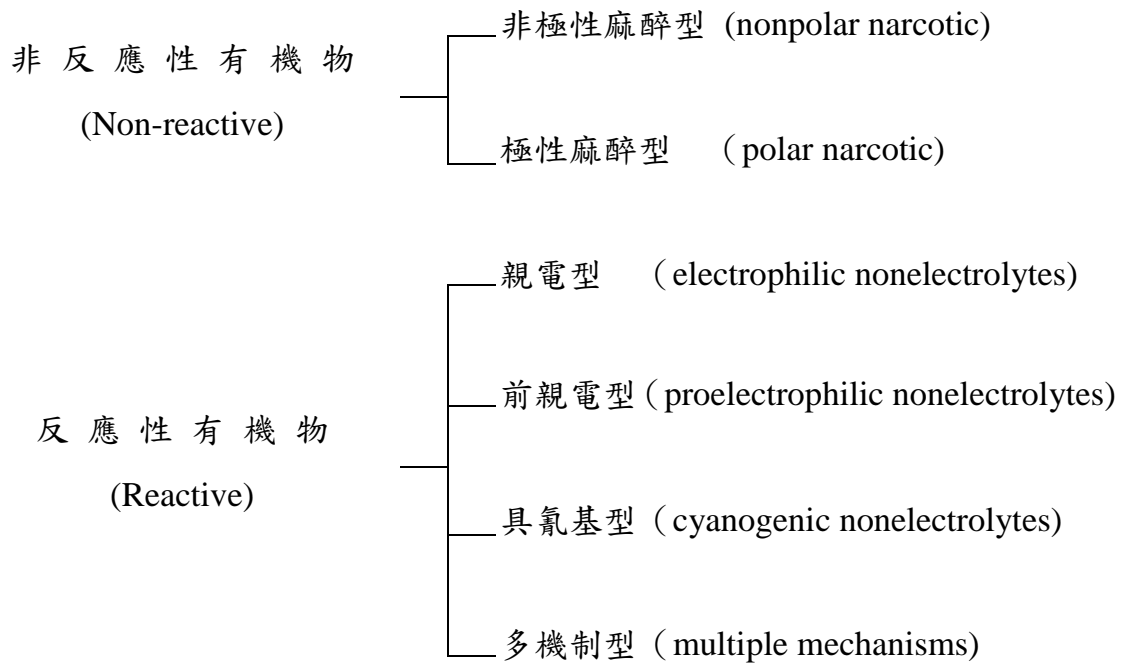


圖 2.4.1 有機毒物的分類

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。親脂性屬物理作用，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，在 Veith *et al.* (1983) 的 *fathead minnow* 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。

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，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.* (1998) 文獻中之實驗結果發現，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，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，便將其定義成基線毒性 (baseline toxicity)，而常見的化學物質有烷類、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 (Schultz *et al.*, 1998)。Cronin (1997) 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 & Frymier (2002) 研究中認為這類型的化學物質毒性會較非極性麻醉性毒物的毒性要高一些，而常見的毒物包含了氯酚類、硝基苯類及本研究選用的苯胺類。由於這類毒物毒性較基線毒性高，原因推測可能與其取代基的不同或是取代基的數目有關，Lin *et al.* (2004) 針對這類毒化物的取代基種類和取代機數目對毒性反應的影響也研究發展出相關的模式。Jawecki & Sawicki (2002) 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，其表現的毒性約為非極性麻醉性毒化物之毒性的 2 倍以上，Liao *et al.* (1996) 認為其稍高的毒性可能和電荷有關。

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，比非反應有機物的毒性還要來的劇烈。Verhaar *et al.* (1992) 研究中發現 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強烈的親電性 (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，反應鍵結能更大，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 (1991) 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：

- (1) 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。
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) Multiple toxicity：這類物質的毒性作用機制較為複雜，複合各類官能基的有機物，毒性作用機制可能是必須經過數階段或多重作用而形成毒性的。

2.5 混合毒性

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

混合毒性的研究早期由 Bliss (1939) 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，並將毒性作用分

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 & Hewlitt (1952) 提出擴充 Bliss 的理論, 討論混合毒性作用的相似性(similarity)和獨立性(independence)與毒性作用的關係, 並使用二維的常態分布函數計算, 明確地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)

而基本上 Plackett & Hewlitt (1952) 提出的混合毒性理論即是以非交互作用形式的混合理論 (Non-interactive multiple toxicity theory) 為主, 此理論表示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, 稱此特殊的反應為共同效應(joint effect)。

Christensen & Chen (1985) 年再擴充 Plackett & Hewlitt (1952) 的理論, 使其可應用於多維的混合毒性效應, 並假設基本條件為皆為非交互作用(Non-interactive), 遵循非交互作用理論 (Non-interactive multiple toxicity theory)。

但在近年來，有許多文獻也從化學反應和生化反應方面去研究混合毒性的效應，即表示有些毒性研究發現化學物間有可能產生交互作用 (interactive)，也就是在兩化學物間會互相干擾，進行反應產生新物質而對毒性造成其他影響。Chen & Yeh (1996) 研究結果發現 malononitrile 與反應性醛混合時，會產生明顯的協同情形；Lin *et al.* (2003) 將 Chen & Yeh (1996) 之研究結果作進一步分析，並利用高效率液相層析儀 HPLC 作為偵測儀器，發現當 malononitrile 與長鏈醛同時存在時，醛易被 O₂ 氧化形成 carboxylic acids，此反應的生成物 pH 值極低，造成 Microtox 螢光菌的發光抑制率上升，使得混合結果為毒性協同的現象。而 Lin *et al.* (2004) 對混合毒性的研究中也提到，phenol 和 aniline 的二元混合中，可能也由於酸鹼中和的化學反應而使實驗的毒性結果比預測的毒性來的低。以及在 Chen *et al.* (2010) 利用枯草芽孢桿菌所進行的三種苯二酚毒性化學物的混合毒性試驗中，也提到了鄰苯二酚和對苯二酚混合時，會產生一種強親電性、強反應性、會和蛋白質硫醇基反應的醌類物質，使得混合毒性呈現協同效應，但與間苯二酚一起混合的組別卻不會發生此種反應，而作者也把會產生醌類物質的反應歸納為鄰苯二酚和對苯二酚產生了交互作用，如此一來，並不符合混合毒性研究中非交互作用的假設。並且在 aniline 類的毒化物方面，有部份也有降解的情況發生，在 Gosetti *et al.* (2010) 對 4-chloroaniline 的陽光降解毒性研究當中，有提到 4-chloroaniline 經由陽光照射後，會降解產生複雜的聚合物，使得含有 4-chloroaniline 的廢污水排放更加複雜，原物質和降解物混合之後的毒性也難以掌握。而在 Neuwoehner *et al.* (2010) 對農藥 diuron 所進行的降解毒性研究中，也提到了 diuron 會降解成 aniline 類的物質，並且降解物和原物質對藻類和水蚤所表現的毒性機制不同，顯現出更複雜的混合毒性效應。因此，化學物在混合毒性研究中的複雜表現使得預測混合毒性所要考慮以及研究的層面更多更廣。

2.5.2 混合毒性研究之重要性

在真實水體環境中，通常承受著非單一的毒性物質，呈現的是一種複合性的污染，即代表著水體中的多種毒性物質可能產生交互作用，引起毒性在混合後的變化。但許多環境法規對於水質標準的規範，只根據單一毒性物質對於水中生物做毒性試驗後而訂定，如此的單一毒性規範對現今實際環境評估的需求已無法滿足，加上近年來有些文獻，如 Neuwoehner *et al.* (2010) 對農藥 diuron 所進行的毒性研究中提到，毒性風險的計算方法應該把毒性物質降解物的毒性也一併納入計算，顯現出在環境風險評估方面需要考量更多不同放流物質的複雜混合毒性，或是原物質和降解物的混合毒性。因此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。

2.5.3 混合毒性研究之模式

水體混合毒性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 Concentration addition (CA) 以及 Independent action (IA)。CA 表示混合的毒物機制相同，毒性物質在生物體上作用位置相同，CA 的觀念可用

數學式子表示：
$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{xi}} = 1$$
。而 IA 則表示相互混合的毒物機制不同且毒

性物質在生物體上之作用位置不同，其若以數學式子表示則為：

$E_{mix} = 1 - \prod [1 - E(c_i)]$ 。(Hermens *et al.*, 1984; Altenburger *et al.*, 1996)

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 (Greco *et al.*, 1995)。Broderius *et al.* (2005) 文獻中以 fathead minnow 作為有機物混合毒性試驗物種，以混合毒性結果比較 CA 與 IA model 的預測能力。結果發現相同機制的毒性物質混合時，適用於 CA model，並且當反應物質與其他作用機制毒物混合時，CA 預測出的毒性結果大部分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。Backhaus *et al.* (2004) 對殺蟲劑和抗菌劑進行的 Microtox 混

合毒性試驗，以及 Olmstead & LeBlanc (2005) 利用 *Daphnia magna* 對多環芳香族的混合毒性試驗皆發現 CA model 對混合毒性的預測有高估的現象，Arrhenius *et al.* (2006) 也發現 CA model 有高估毒性的現象，而認為 CA model 較適合用於環境風險的評估上。

但是在 Cedergreen *et al.* (2006) 用四種試驗物種對殺蟲劑和抗真菌劑的混合毒性結果，評估 CA 及 IA model 的預測能力。Cedergreen 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(sigmoid log-logistic dose-response curve)斜率落在 1.25 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。

在 Lin *et al.* (2004) 對 14 種非反應性有機毒化物做二元混合的毒性試驗結果中發現，這些非反應性的毒性物質混合後多呈現相加性(additive)的毒性反應。而在不同機制毒物間的混合試驗，Chen & Chiou (1995) 對非反應性及反應性有機物，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；而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 & Yeh (1996) 針對反應性有機物的混合情形做研究，將反應性有機物依 Lipnick (1991) 的毒性作用機制分類將反應性有機物再細分為四類(反應性親電型毒性、反應性前親電型毒性、反應性具氫基型毒性和反應性多機制型毒性)。研究結果發現，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；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。而當此兩種反應有機物中一者其劑量-反應曲線斜率為高時，易呈現毒性減弱的效應。

本研究選取反應性毒化物與極性麻醉性毒化物做 Microtox 混合毒性試驗，和上述文獻中的混合毒性結果做比較，探討毒性物質的劑量-反應

曲線斜率和混合毒性效應間的關係是否和上述文獻中的結果一致。反應性物質選用醛類及腈類作研究，極性麻醉性物質則選擇重要的化工原料-含鹵素取代基之苯胺類。

2.6 毒性物質—苯胺類的介紹

2.6.1 苯胺類化合物的基本特性

苯胺類化合物為接有芳香基團的胺類，屬於極性化合物，具有低鹼度和親核性性質，分子量大，且分子量越大者越難溶於水，揮發性高。苯胺類的 NH_2 官能基上具有孤對電子，易產生電子轉移的現象。本研究選用的苯胺類為接氯取代基以及接溴取代基的苯胺，其中含氯的苯胺類選用了不同取代基數目和取代基位置的七種氯苯胺，加上一種溴苯胺。表 2.6.1 為苯胺類化合物的基本物化特性，表 2.6.2 為苯胺類化合物的來源資料和主要用途：



表 2.6.1 苯胺類化合物之物化特性

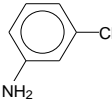
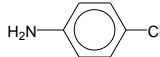
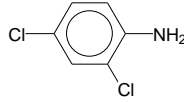
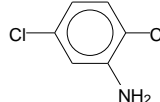
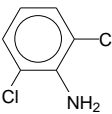
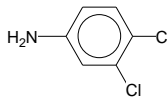
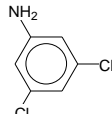
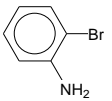
毒性物質	結構圖	分子量 (g/mole)	溶解度 (mg/l)	純度	特性
3-Chloroaniline		127.57	5400	99 %	無色至淺琥珀色液體，遇光或久貯則顏色變深
4-Chloroaniline		127.57	3900	98 %	白色、淺褐色針狀晶體
2,4-Dichloroaniline		162.02	620	99 %	白色結晶體
2,5-Dichloroaniline		162.02	300.3	99 %	白色針狀晶體
2,6-Dichloroaniline		162.02	294.5	98 %	無色晶體，易潮解
3,4-Dichloroaniline		162.02	92	98 %	褐色針狀晶體，
3,5-Dichloroaniline		162.02	784	98 %	白色至淺黃色針狀結晶體
2-Bromoaniline		172.03	949.1	98 %	黃色至紅棕色液體

表 2.6.2 苯胺類化合物之來源和用途

毒性物質	廠牌	供應商	主要用途
3-Chloroaniline	Aldrich	友和	用於有機合成，染料、農藥、醫藥的中間物
4-Chloroaniline	Aldrich	友和	染料、農藥、醫藥的中間物，還可用於生產彩色電影膠片的成色劑
2,4-Dichloroaniline	Aldrich	友和	用於染料、農藥、醫藥的中間物
2,5-Dichloroaniline	Aldrich	友和	用於顯色劑和有機顏料中間物，以及製造氮肥增效劑
2,6-Dichloroaniline	Aldrich	友和	用於染料、農藥、醫藥的中間物
3,4-Dichloroaniline	Aldrich	友和	可作農藥和染料的中間物，也用作生物活性組成的中間物
3,5-Dichloroaniline	Aldrich	友和	用作農藥、醫藥中間物
2-Bromoaniline	Aldrich	友和	有機合成中間物

苯胺類化合物在合成農藥、醫藥、染料的化工廠中是很常見的化學物質，尤其是本研究所選用的苯胺類都是合成常用的除草劑以及殺蟲劑會用到的原料。環境中的苯胺類化合物污染主要來自於化工廠，尤其是農藥製造廠、製藥廠和印染工廠的放流水。如此普遍且大量的工業放流水中都有苯胺類的毒化物存在，這樣的情況將環境造成超過自淨能力負荷的傷害。(Argese *et al.*, 2002)

2.6.2 苯胺類化合物的毒性與危害

苯胺類化合物是屬於極性麻醉性的毒性物質，其毒性主要來自於親脂性，主要藉由覆蓋於生物細胞膜上，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，用於描述疏水性的參數-辛醇與水分配係數 Log P，常用於此類親脂性毒性的極性麻醉性物質的毒性預測和相關性的探討。(Chen & Lee, 2007)

Lu *et al.* (2007)使用 *Scenedesmus obliquus* (斜生柵藻)對氯酚以及苯胺

類進行單一和混合的生物毒性試驗，結果發現上述兩類極性麻醉性毒化物的 Log P 值越大，毒性也越強。另外 Chen & Lee (2007) 利用了 *Pseudokirchneriella subcapitata* (月芽藻) 對含氯和溴取代基的苯胺類進行了單一毒性的生物試驗，並比較了不同試驗物種對於苯胺類化合物的毒性以及敏感性，結果顯示 Log P 和毒性間有良好的相關性。而 Chen & Lee (2007) 也提到取代基的數目越多，氯苯胺的毒性大部份有毒性增強的趨勢，而在一氯苯胺的部份，對位比間位的氯苯胺毒性要來的強，因此也表示取代基的位置關係也會對苯胺類的毒性造成影響。

苯胺類化合物對人體的毒性高，僅少量就能引起中毒。主要是通過皮膚、呼吸道和消化道進入人體，從而破壞血液造成溶血性貧血，損害肝臟引起中毒性肝炎，甚至導致各種癌症 (Pauluhn, 2004)。苯胺急性中毒的患者口唇、指端、耳廓會產生青紫，有頭痛、頭暈、噁心、嘔吐、手指發麻、精神恍惚等狀快；重度中毒時，皮膚、粘膜嚴重青紫，呼吸困難，抽搐，甚至昏迷，休克。出現溶血性黃疸、中毒性肝炎及腎損害，化學性膀胱炎，眼接觸引起結膜角膜炎。而慢性中毒患者有神經衰弱的表現，伴有輕度青紫、貧血和肝、脾腫大。

2.7 毒性物質—醛類的介紹

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、丁醛及戊二醛作混合毒性試驗。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，易聚合氧化，也容易與含氮化合物產生反應。醛類的使用十分地廣泛，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。(O'Brien *et al.*,

2005)

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，並且部分醛類會傷害生物體的DNA。(Marnett, 1998)

2.8 毒性物質—腈類的介紹

腈類化合物為氰酸和含碳基結合的氰化物，有機腈類則當做溶劑或除膠用，腈類本身毒性低，但吸收進入人體經代謝後會產生氰根(CN⁻)造成中毒，而且症狀是延遲產生的(洪東榮, 氰化物中毒的診斷與救治)。本研究選用劑量-反應關係曲線(sigmoid log-logistic dose-response curve)斜率大的乙腈(acetonitrile)以及斜率小的丙二腈(malononitrile)作為混合毒性試驗的反應性毒化物，希望能就不同斜率的反應性毒性物質和苯胺類混合後的毒性效應做探討。

乙腈(acetonitrile)為無色透明液體，極易揮發，適合作為許多有機、無機和氣體物質的溶劑。乙腈能發生典型的腈類反應，並被用於製備許多典型含氮化合物，是一個重要的有機中間體。乙腈可用於合成維生素A，碳胺類藥物及其中間體的溶劑，還用於製造維生素B1和氨基酸的活性介質溶劑。可代替氯化溶劑。用於乙烯基塗料，也用作脂肪酸的萃取液，酒精變性劑，在織物染色，照明工業，香料製造和感光材料製造中也有許多用途。乙腈的中毒作用，主要由體內釋放CN⁻所致，但不能排除乙腈本身及其代謝產物硫氰酸鹽的作用，後者在慢性作用中更為重要。急性氰化物中毒主要造成細胞或組織的缺氧，臨床表現就以缺氧及細胞因缺氧而產生的酸中毒為主。而因為職業性或環境上的慢性暴露，可能會有呼吸困難、頭痛、頭昏、噁心、嘔吐、聲音沙啞、口腔有杏仁味、眼結膜發炎、

心悸、胸痛、體重減輕、無力感、睡眠障礙及心智變化等。(洪東榮, 氰化物中毒的診斷與救治)

丙二腈(malononitrile)為無色結晶體, 易潮解, 主要用途為醫藥、農藥、染料方面的有機合成原料。malononitrile 侵入人體的途徑為吸入、食入、經皮膚吸收, 其毒性類似氰化物。而氰化物的毒性作用為抑制細胞呼吸, 造成組織缺氧。

Chen & Huang (1996) 研究中, 利用 Microtox 對含氰基的有機物做混合毒性試驗, 在結果中發現和 malononitrile 一起混合的毒性效應主要呈現強烈的毒性協同作用, 而和 acetonitrile 一起混合的毒性結果卻都呈現毒性減弱的情況。而 acetonitrile 是屬於劑量-反應關係曲線斜率相當大的毒化物, 由於此斜率過大, 在與其他有機物混合時, 發生了 complex joint action, 此種新一類的毒性混合協力作用在 Chen & Chiou (1995) 的文獻中被提到, 此種狀況主要發生在兩個毒性物質的劑量-反應關係曲線斜率相差極大時, 兩者混合後會有毒性減弱的情況。因此, 本研究選用此兩種腈類來作毒性混合試驗, 欲探討在其及苯胺類的混合效應結果是否也有相同的情況發生。

第三章 基本理論

3.1 QSARs(Quantitative Structure Activity Relationship)毒性作用

分類：

QSAR 主要的意義在於，以化學物質的物理或化學性質，推測或描述其生化活性大小，即對生物體生化活動造成干擾的程度，而在物化特性與生化活性間，找出一定的關係。QSAR 最早是應用在藥物學和醫學領域，是用來預測藥物對生物體的反應，以研究更有效，副作用小、不同進入人體途徑的方式。之後 QSAR 便發展推廣至環境毒物學的應用上，用以推估毒化物進入環境中時，對環境可能造成的影響程度。而 QSAR 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。



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，並不直接參與生物體的生化反應，此類有機物的分子會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。而其覆蓋在細胞膜的行為主要來自非反應性有機物的親脂性(lipophilicity)，即是此類有機物毒性表現的來源。有機物的親脂性促使有機分子此種毒性反應類似吸附的行為，故為可逆的毒性，並不直接和生物體反應。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。屬於麻醉性的毒性物質其毒性在毒性作用達穩定的狀態下，與描述化學物質疏水性的參數-辛醇與水分配係數(Log P)成正

比。麻醉作用機制又可分為極性(Polar)以及非極性(Non-Polar)，本研究實驗中選用的苯胺類皆屬於 Polar Narcosis。Verhaar *et al.* (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劇烈，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。醛類和腈類屬反應性有機物。



3.2 毒性物質劑量-反應模式及常用的單一毒性模式

在毒性試驗中，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。

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。不同的模式根據不同的理論發展而成，其中最常見的毒性物質劑量-反應模式有 Probit、Weibull 及 Logit

三種，Christensen 曾經對這三種不同的模式做比較。這三種模式根據的是不同的假設: Probit 模式假設受體生物對毒性物質的容忍度為常態分布，具有統計上的意義，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：


$$Y = \text{NED} + 5$$

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

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

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。

從 Chen and Chiou (1995) 所做的 Microtox 毒性試驗分析發現，Probit 及 Logit 模式較適合螢光菌的毒性分析，而 Weibull 模式的假設不能符合無特定反應位址的麻醉性有機物。

3.3 混合毒性理論

3.3.1 混合毒性試驗指標

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

$$M = \frac{Z_1}{EC50_1} + \frac{Z_2}{EC50_2}$$

其中 M：sum of toxic units 相加係數

Z₁：毒性物質 1 的濃度

Z₂：毒性物質 2 的濃度

Z₁+Z₂：造成 50% 的抑制

EC50₁：毒性物質 1 的 EC50 毒性容忍度

EC50₂：毒性物質 2 的 EC50 毒性容忍度

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。相加係數 M 的意義如下：

M<1：毒性協同作用(greater than additive,毒性增強)。

M=1：(95%信賴區間包含 1)毒性相加作用(addictive)。

M>1：毒性拮抗作用(less than additive,毒性減弱)。

3.3.2 非交互作用混合毒性模式

Hewlett & Plackett 於 1959 年提出非交互作用混合毒性，此為二維模式，假設生物反應為 quantal(生或死)，且毒性物質間不能有交互作用，後經多位學者研究，Christensen & Chen 於 1985 年擴充此理論，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多維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,即為存活率)。 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)。用來描述兩化學物質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。

$$\delta_i = \frac{Z_i}{\bar{Z}_i}$$

Z_i : 毒性物質 i 的濃度。

\bar{Z}_i : 單一生物體對毒性物質 i 的毒性容忍濃度。

3.3.3 交互作用混合毒性模式

而 Hewlett 的交互作用理論擴充非交互作用理論，提出交互作用混合毒性模式，因在某些情形下，不同毒性物質間的會產生交互作用造成毒性增強。Hewlett 認為相關係數 λ 可為 0 到無限大， λ 介於零到一之間為毒

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：

$$\delta_1^\lambda + \delta_2^\lambda \leq 1, \lambda > 1$$

3.3.4 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: 此係數最早由 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，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， $\rho = 0$ 則表示兩毒性物質之容忍分布為不相關。

(2) Similarity Coefficient: 此參數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生化系統，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，為毒性拮抗 (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，如下表所示：

表 3.3.4.1 四種基本混合效應

action mode	ρ	λ	意義	Response	Effect
CA	1	1	兩種毒物反應完全相關，機制完全相同，反應位置一樣稱為濃度相加 (Concentration Addition)		Additive
NA	1	0	兩種毒物的反應完全相關，但毒性機制完全不同，稱為非相加 (No Addition)	$\max (P_1, P_2)$	Antagonistic
RM	0	0	兩種毒性物質的反應完全無關，毒性機制也完全不同時，稱為多重反應 (Response Multiplication)	$1-(1-P_1)(1-P_2)$	
RA	-1	0	兩種毒物反應為負相關，且毒性機制完全不同，稱為反應相加 (Response Addition)	$\min (1, P_1+P_2)$	

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。在本研究當中，由於試驗毒化物是屬於不同機制的化學物質(作用位置不同， $\lambda = 0$)，而 pure culture 的 ρ 值常為 1 或 -1，為了達到較保險的預估

效果，我們採用了 $\rho = -1$ 的情況，因此在預測混合毒性的模式分析上，選擇 Response Addition 模式。

3.3.5 Isobologram

Isobologram 是以圖形描述兩種毒性物質混合後，毒性變化的表示法，其混合效應的圖形中有向內凹 (strike) 和向外凹 (bolw) 的情形發生。Isobologram 主要的繪製原理為，在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 EC_{50} 或 LC_{50})，按不同的混合比例畫出一個等抑制率或死亡率曲線，兩軸代表的是兩混合毒物個別貢獻的毒性單位。Isobologram (如圖 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。

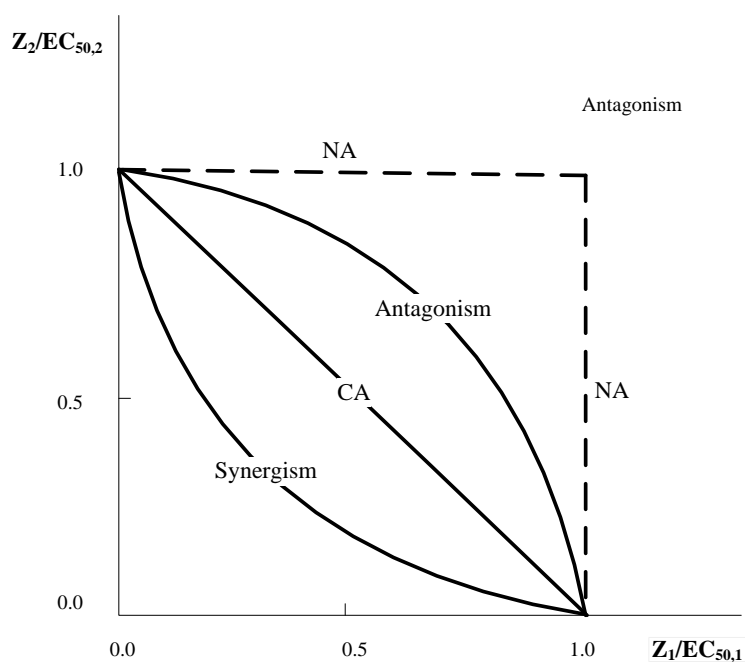


圖 3.3.5.1 isobologram 示意圖

第四章 實驗設備與方法

4.1 基本實驗設備

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、逆滲透、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

毒性試驗設備為 Microtox Model 500，Micobics 製(圖 4.1.1)。

3. 冰箱

乾燥菌種貯存於-20°C之冰箱，MOAS、稀釋水及活化液則存放於 Whirlpool ET250DM 之冰箱(4°C)

4. TOC

毒性物質濃度的定量分析使用廠牌為 Jena 的總有機碳分析儀(TOC)。



4.2 Microtox 毒性試驗

4.2.1 基本原理

Microtox 生物毒性試驗之原理為利用海洋發光菌(費氏弧菌)(*Vibrio fischeri*; 學名為 *Photobacterium phosphorium*)，以其自發性的螢光反應來反映生物毒性。當 *Photobacterium phosphorium* 暴露在毒性物質之中，其受到毒性物質的作用，其螢光的發光強度將會受到抑制。因此此 Microtox 生物毒性試驗即是由 *Photobacterium phosphorium* 螢光的發光抑制來作為毒性物質毒性強弱的指標。

4.2.2 儀器構造

Microtox 的實驗儀器設備主要由培養槽(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 32 個(如圖 4.2.2.1), 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, 右側標示 Reagent 的培養槽則供儲放螢光菌液, 下方標示 Read 的培養槽則為讀取螢光訊號時使用。控溫設備位於整個培養槽下方, 左側 30 個培養槽的溫度皆維持 15°C 以保持實驗時維持一定溫度狀態, 右側標示 Reagent 的培養槽的溫度則維持 4°C 以保持螢光菌在實驗期間有最佳活性。

(2)螢光偵測裝置: 螢光偵測裝置位於標示 Read 槽之下方, 偵測時按 Read 鍵, 即可自動將上方小試管拉下以偵測螢光訊號。

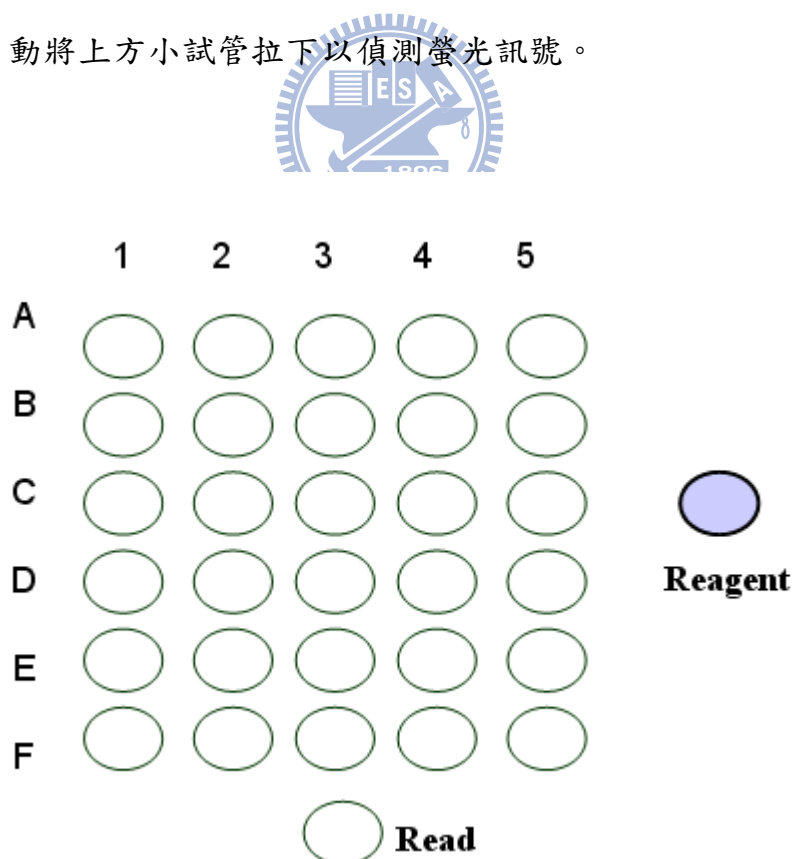


圖 4.2.2.1 Microtox 螢光快速分析儀的 32 個槽其相關位置圖

4.2.3 基本配備

Microtox 基本配備共計下面數種:

- (1)稀釋液(Diluent solution): 主要成分為含 2%濃度之 NaCl 無毒溶液，用於稀釋樣品，由實驗室自行配置。主要配製程序是取實驗室純水製造設備製造之純水，配成 NaCl 濃度為 2%之溶液後，再經 0.2 μ m 濾紙過濾處理。
- (2)活化液(Reconstitution solution): 活化液為經過實驗室純水製造設備以及 0.2 μ m 濾紙過濾處理的無毒無菌蒸餾水，用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，配置程序是取實驗室純水製造設備製造之純水，配成 NaCl 濃度為 22%之溶液後，再經 0.2 μ m 濾紙過濾處理。滲透壓調節液之功能在於調整試驗小試管內樣品的 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:

$$X \text{ 毫升的樣品} * 0.1 = \text{所需的滲透壓調節液體積}$$

- (4)小試管(Cuvette): 購買自典試科技公司的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 *Photobacterium phosphorium* 生長於海底，經過處理成冷凍乾燥狀態，在零下 20 $^{\circ}$ C 的環境可維持一年。
- (6)Micropipette: 作為實驗進行中移動螢光菌液、solution、及樣品用。

4.2.4 標準分析程序:

- (1) 加 1000 μ l 的活化液至小試管，放置在 reagent 培養槽，等待 10 分鐘，

使之與培養槽溫度達平衡。接著自冷凍庫中取出粉狀的螢光菌並加入 reagent 槽中的活化液，等待 5 分鐘使螢光菌活化。

- (2) 將小試管放入 A1-A5、B1-B5，以及 E4、E5，F4、F5 的培養槽，隨即加 500 μ l 稀釋液到 B1-B5 和 F4、F5 培養槽，並加 1000 μ l 稀釋液到 A1-A4 和 E4、E5 培養槽。
- (3) 以 Micropipette 抽取 10 μ l 的螢光菌分別加入 B1-B5 和 F4、F5 培養槽，並以 Micropipette 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 倍稀釋方式，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 至 E5、E5 抽取 1000 μ l 至 E4、E4 抽取 1000 μ l 拋棄。
- (5) 由螢光菌分別加入 B1-B5 和 F4、F5 時，計時 15 分鐘之後，將 B1-B5 和 F4、F5 依序放入 read 槽中讀取其儀器顯示的螢光值，此時即為 0 分鐘之螢光值(I_0)，隨即以 Micropipette 將 A1-A5 和 E4、E5 中各抽取 500 μ l 加入 B1-B5 和 F4、F5，等待 5 分鐘以及 15 分鐘後，分別記錄其螢光值(I_5 、 I_{15})。

4.2.5 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)。每次的實驗約進行 12 組的毒性物質，需時兩小時至三小時，此時螢光菌將近用完，此為確保生物質試劑品質所做的時間控制。

(2) 吸光光譜干擾

由於 Microtox 活體螢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。

4.3 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,其基本的資料分別如表 4.3.1 以及 4.3.2 所示。

表 4.3.1 反應性有機化學物質基本資料

作用機制	化學物質	分子式	分子量 (g/mole)	廠牌	純度 %
Electrophile nonelectrolytes	Formaldehyde	CH ₂ O	30.03	Merck	37 %
	Propionaldehyde	C ₃ H ₆ O	58.08	Fluka	100 %
	Butyraldehyde	CH ₃ (CH ₂) ₂ CHO	72.1	ACROS	99 %
	Glutaraldehyde	OCH(CH ₂) ₃ CHO	100.12	Fluka	25 %
Cyanogenic nonelectrolytes	Acetonitrile	CH ₃ CN	41.05	J.T.Baker	99 %
	Malononitrile	NCCH ₂ CN	66.06	Aldrich	99 %

表 4.3.2 麻醉性有機化學物質基本資料

化學物質	分子式	分子量 (g/mole)	廠牌	純度 %
3-Chloroaniline	C ₆ H ₆ ClN	127.57	Aldrich	99 %
4-Chloroaniline	C ₆ H ₆ ClN	127.57	Aldrich	98 %
2,4-Dichloroaniline	C ₆ H ₅ Cl ₂ N	162.02	Aldrich	99 %
2,5-Dichloroaniline	C ₆ H ₅ Cl ₂ N	162.02	Aldrich	99 %
2,6-Dichloroaniline	C ₆ H ₅ Cl ₂ N	162.02	Aldrich	98 %
3,4-Dichloroaniline	C ₆ H ₅ Cl ₂ N	162.02	Aldrich	98 %
3,5-Dichloroaniline	C ₆ H ₅ Cl ₂ N	162.02	Aldrich	98 %
2-Bromoaniline	C ₆ H ₆ BrN	172.03	Aldrich	98%

4.3.1 有機藥品配製

苯胺類藥品是分子量相當大的芳香族胺類，因此在水中的溶解度較低，尤其是含氯量較多的苯胺類也會更難溶於水，因此所需要的藥品溶解時間也會較長，必須注意藥品配製時的揮發問題。實驗中的濃度皆為名義濃度。

其中 2,5-Dichloroaniline、2,6-Dichloroaniline、3,4-Dichloroaniline、3,5-Dichloroaniline，採用配置儲備溶液(stoke solution)的方法,保存時間長。考慮到其易揮發的性質，以 300 ml 的 BOD 瓶裝入純水，並加入計算後之適量有機化學物以及磁石，蓋上 BOD 瓶蓋且水封，以磁石攪拌器攪拌至隔夜，以確保有機物完全溶解於水中並可減少藥品揮發。其餘藥品採用配置測試溶液(test solution)的方法，其量少，濃度低，配置後馬上進行實驗。此法使用 60 ml 之錐形瓶，裝入純水，再加入計算後之適量有機化學物以及磁石，迅速蓋上瓶蓋封緊，以磁石攪拌器攪拌使之混合均勻且溶解，作為而後進行毒性試驗之毒性樣本。試驗毒物溶液配置後再以 TOC (總有機碳分析儀)定量。

4.4 實驗數據處理

將 Microtox 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以 Probit model 計算, 求得螢光抑制 50% 的 EC_{50} 值。

4.5 藥品混合方式

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), 之後代入 M 值中進行 joint effect 的判定, 進行兩種有機物的交叉混合。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

本實驗中主要進行 $1:1$ 的混合比例試驗, 而在 isobologram 分析試驗則使用 $3:1$ 、 $1:1$ 、 $1:3$ 的毒性單位比例混合。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 依照體積比混合，若為 1:1 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 1:1 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

4.6 高效率液相層析儀(HPLC)分析

4.6.1 HPLC 原理

高效率液相層析儀器是利用樣品通過分離管柱(固定相)時，分析物質在管柱中與移動相以及管柱(固定相)之間的親和作用力不同，在移動相的沖提下，每種物質經過管柱的速度會有所不同，在此過程中樣品中的各種物質會逐漸被分離。有的物質較易和移動相介面結合，其通過管柱(固定相)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，隨後其他的物質再被偵測；反之較容易和固定相介面結合的物質，則較慢出現偵測訊號。當偵測器偵測到物質時，連結到電腦的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)。

4.6.2 儀器型號以及設定

偵測器：Waters 2996 Photodiode Array Detector

管柱：C18 - 4.6 × 150 mm

移動相：60% 甲醇 / 40% 去離子水

流速：1.0 ml/min

偵測波長：205 nm

樣品注射量：20 μl

滯留時間：10 ~ 15 min

樣品濃度：符合混合毒性試驗之 stock solution 濃度

4.6.2 操作步驟

- (1) 裝上分析用 C18 管柱後，開機且進行系統診斷，並去除 pump 以及管線中的氣泡，以免影響分析結果。
- (2) 設定基本流洗條件，以 60% 甲醇 + 40% 去離子水的移動相比例，0.2 ml/min 的流速，流洗儀器至少一小時，使儀器穩定以及沖洗管柱至無殘留物的情況。
- (3) 流洗結束後，設定分析樣品之條件，流速條件為 1.0 ml/min，停留時間設定為 10 ~ 15 分鐘，移動相比例和流洗時相同。
- (4) 按下 inject 鍵，以注射器吸取樣品，注射量為 20 μl，注射入 pump 中，進行分析。
- (5) 由連接 HPLC 之電腦螢幕觀察分析時的脈衝變化，可觀察到不同時間點的脈衝曲線情況。
- (6) 結束分析後，再以 0.2 ml/min 的流速，同比例的移動相，流洗至少 1 小時後方可以關機，最後再卸下管柱。

4.7 質譜儀(MS)分析

4.7.1 MS 原理

質譜儀(mass spectrometry, MS)的原理是以熱電子撞擊氣體分子，使其產生碎片及離子，再經磁場分離，依據質荷比之測量，來決定分子質量，因此可以用於分子的鑑定或確認。

4.7.2 基本分析程序

- (1) 將不同型態的樣品(氣、液、固相)導入質譜儀之中。
- (2) 樣品分子在離子源內游離 (ionization) 成氣相之離子形式。
- (3) 依質荷比 (m/z : mass to charge ratio) 的不同，分離各個樣品離子。
- (4) 各樣品離子到達偵測器被偵測出來。
- (5) 在資料處理系統中，離子偵測訊號被轉換成可讀或圖譜方式呈現。

4.7.3 儀器型號以及設定

質譜儀：AB (API3000)

稀釋溶液：50 % MeOH + 0.1 % FA

正離子模式下使用 infusion



第五章 結果與討論

5.1 Microtox 單一毒性實驗

本研究利用 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)、乙腈 (acetonitrile)、丙二腈 (malononitrile)；極性麻醉性有機物包括 3-Chloroaniline (3CA)、4-Chloroaniline (4CA)、2,4-Dichloroaniline (24DCA)、2,5-Dichloroaniline (25DCA)、2,6-Dichloroaniline (26DCA)、3,4-Dichloroaniline (34DCA)、3,5-Dichloroaniline (35DCA)、2-Bromoaniline (2BA)。上述有機物皆屬揮發性，且 Microtox 為一開放式的實驗環境，當有機物為高揮發性時，在此種環境下進行實驗是可能造成每一次的實驗結果有所差異的。因此每次在進行混合毒性試驗前，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} 值混合作試驗。

單一毒性試驗的結果如表 5.1.1 所示，共計六種反應性化學物質以及八種極性麻醉性苯胺類物質，經由 Probit model 作數據處理分析。結果的部份包括了試驗時的 stock solution 濃度、試驗次數 n 、 EC_{50} 值、 EC_{50} 值的標準差以及變異係數，及劑量-反應曲線之斜率。圖 5.1.1~圖 5.1.14 則是所有實驗毒化物 Microtox 試驗之劑量-反應曲線圖，取用暴露時間 15 分鐘的數據。

表 5.1.1 試驗毒物之 Microtox 毒性試驗數據

毒性作用 分類	chemical	stock solution conc. (mg/L)	n	EC ₅₀ (mg/L)	SD (mg/L)	CV (%)	slope
reactive	Formaldehyde	80	5	5.96	0.92	15.4 %	1.65
	Propionaldehyde	2800	2	192.43	3.97	2.1 %	1.39
	Butyraldehyde	1680	1	140.82	-	-	1.77
	Glutaraldehyde	46.67	8	3.89	0.47	12.0 %	1.53
	Acetonitrile	240000	4	17521.5	799.32	4.56 %	4.20
	Malononitrile	3333	1	236.76	-	-	1.97
polar narcosis	3-Chloroaniline	266.67	8	22.83	1.56	6.8 %	1.30
	4-Chloroaniline	66.67	7	5.08	0.52	10.3 %	1.48
	2,4-Dichloroaniline	62.67	4	4.94	0.83	16.9 %	1.77
	2,5-Dichloroaniline	53.33	2	5.51	0.05	0.8 %	1.86
	2,6-Dichloroaniline	22.67	3	1.89	0.58	30.7 %	1.59
	3,4-Dichloroaniline	8.67	4	0.83	0.12	14.2 %	1.36
	3,5-Dichloroaniline	160	3	14.87	3.43	23.1 %	1.61
	2-Bromoaniline	173.33	4	13.65	1.32	9.67 %	1.77

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.

麻醉性毒化物的部分，由表 5.1.1 可觀察到苯胺類對 Microtox 的毒性非常高，其中毒性最高者為 3,4-Dichloroaniline，毒性最低者為 3-Chloroaniline，而接有兩個氯取代基的氯苯胺毒性大部分都比一氯苯胺來的大，除了 3,5-Dichloroaniline。Chen *et al.* (2007) 在其對氯苯胺作用芽藻的生物毒性試驗中提到，若比較同一種取代基的苯胺類毒性，會發現取代基的數目越多，毒性也有增強的趨勢，並且取代基的位置在一氯苯胺的部

份，會呈現對位取代基的氯苯胺比間位取代基的氯苯胺毒性來的強，這在本研究的結果中也是相同的現象。而在劑量-反應曲線的斜率方面，本研究選用的苯胺類幾乎都是屬於斜率在 2 以下的小斜率的物質，只有 2,5-Dichloroaniline 的斜率較接近 2。

而在反應性的單一毒性數據方面，由表 5.1.1 可看出醛類對 Mcirotox 的毒性比腈類高出非常多，這是由於醛類是一反應性高的有機化學物，Chen & Yeh (1996) 提到醛類的毒性作用機制是屬於親電性的作用機制，是醛類所進行的 Schiff base formation，而 Dawson *et al.* (2006) 也提到過 Schiff base 的作用是在具有雙碳結構的有機物所會進行的反應。其 Schiff base 的形成常是氨基的氮對碳基團的碳進行親核攻擊，脫水成為亞胺結構。而和醛類相比，腈類對 Mcirotox 就相對弱得多，其毒性作用機制是屬於 Cyanogenic nonelectrolytes，主要是由於腈類的 C 和 N 的三鍵取代基釋放出 CN⁻離子而造成毒性。其中值得注意的是乙腈的劑量-反應曲線的斜率相當大，是屬於大斜率的物質，由圖 5.1.5 可清楚地觀察到，表示螢光菌對乙腈的最高容忍濃度到完全抑制僅在一狹小的範圍內。

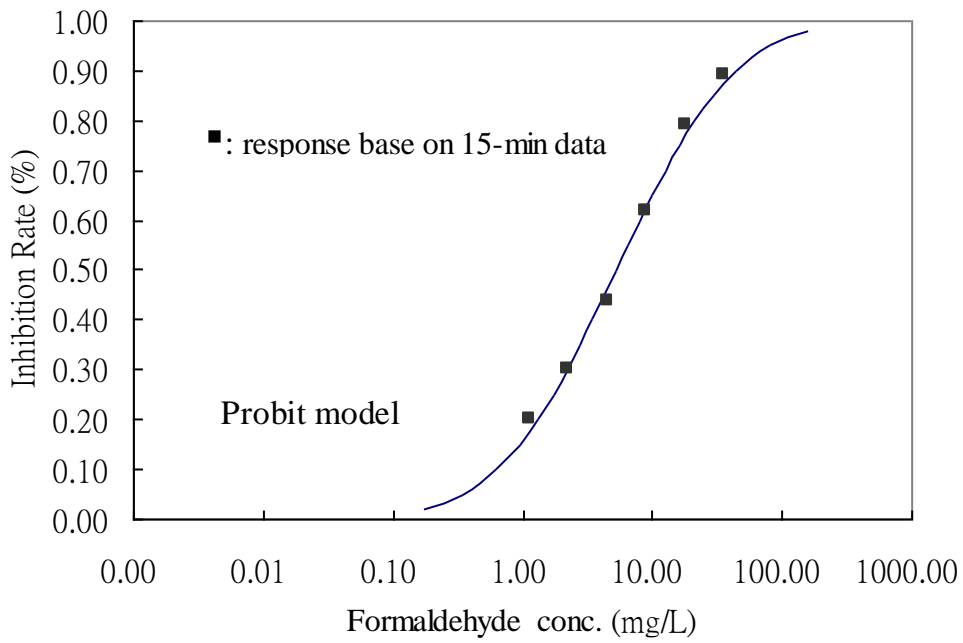


圖 5.1.1 Formaldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線

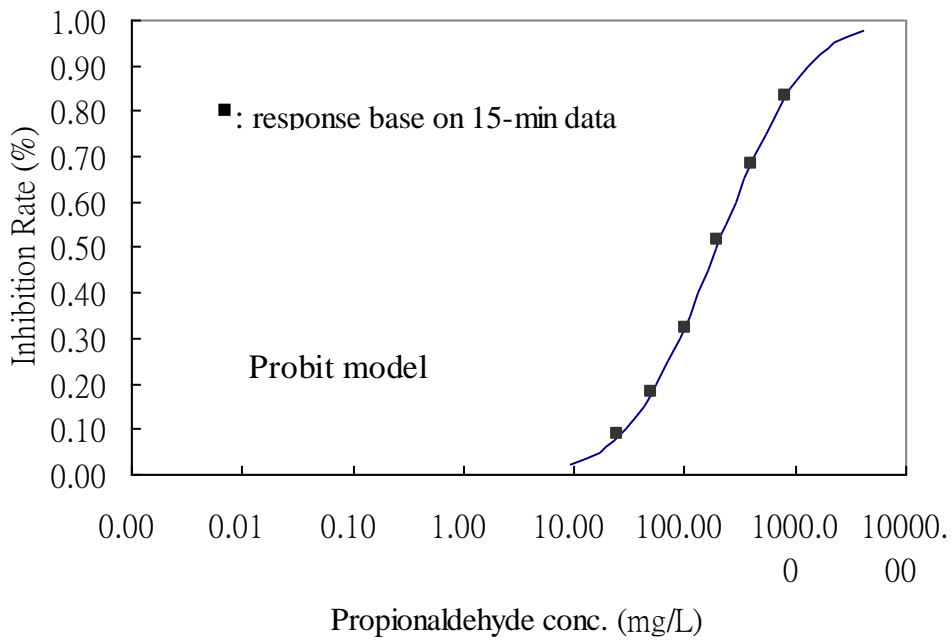


圖 5.1.2 Propionaldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線

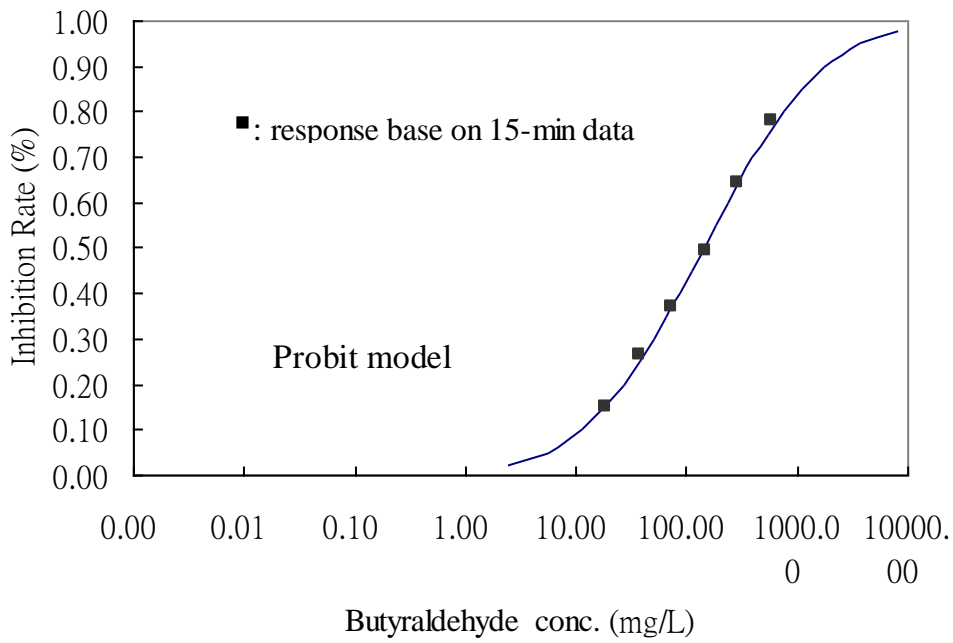


圖 5.1.3 Butyraldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線

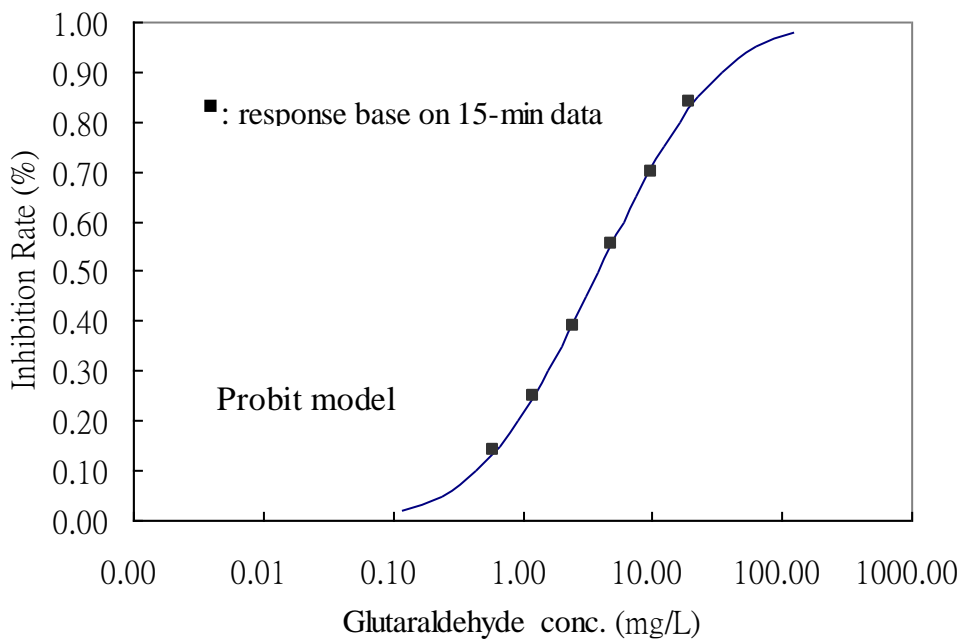


圖 5.1.4 Glutaraldehyde 之 Microtox 劑量反應曲線

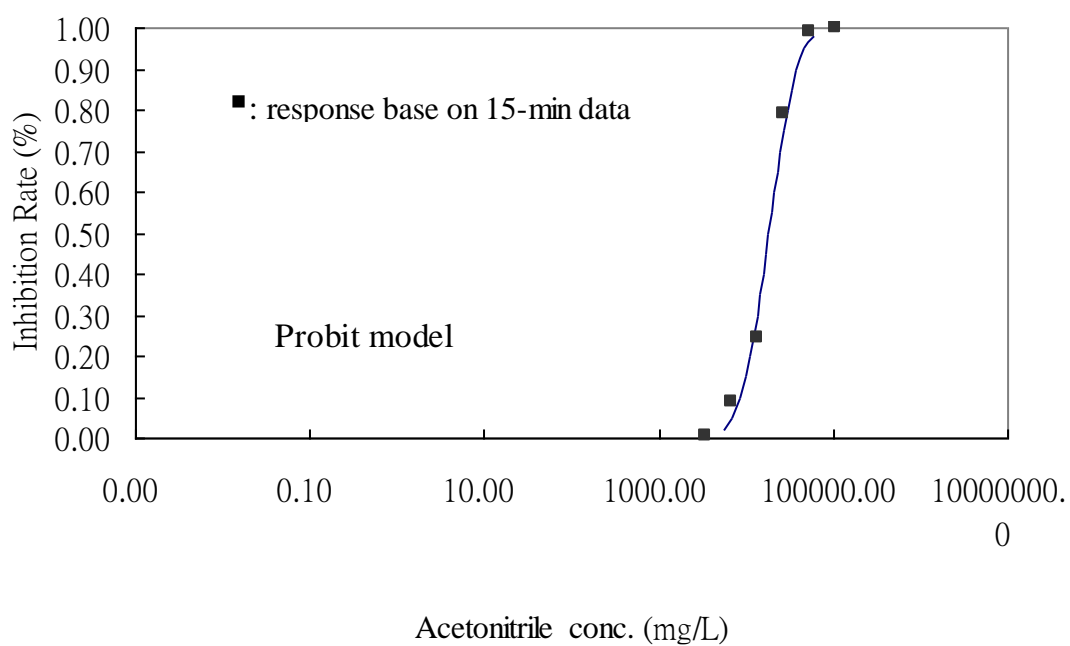


圖 5.1.5 Acetonitrile 之 Microtox 劑量反應曲線

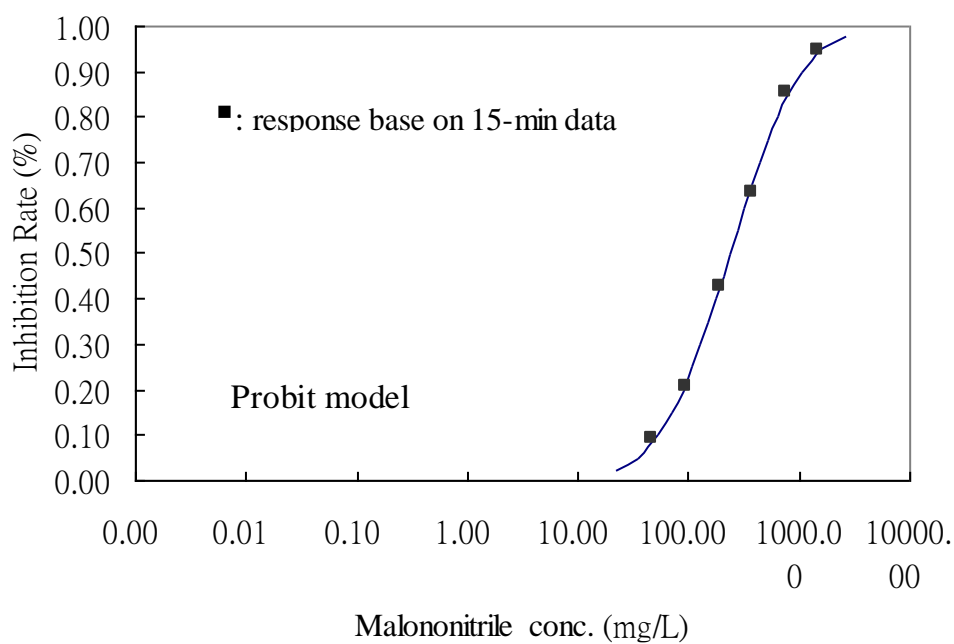


圖 5.1.6 Malononitrile 之 Microtox 劑量反應曲線

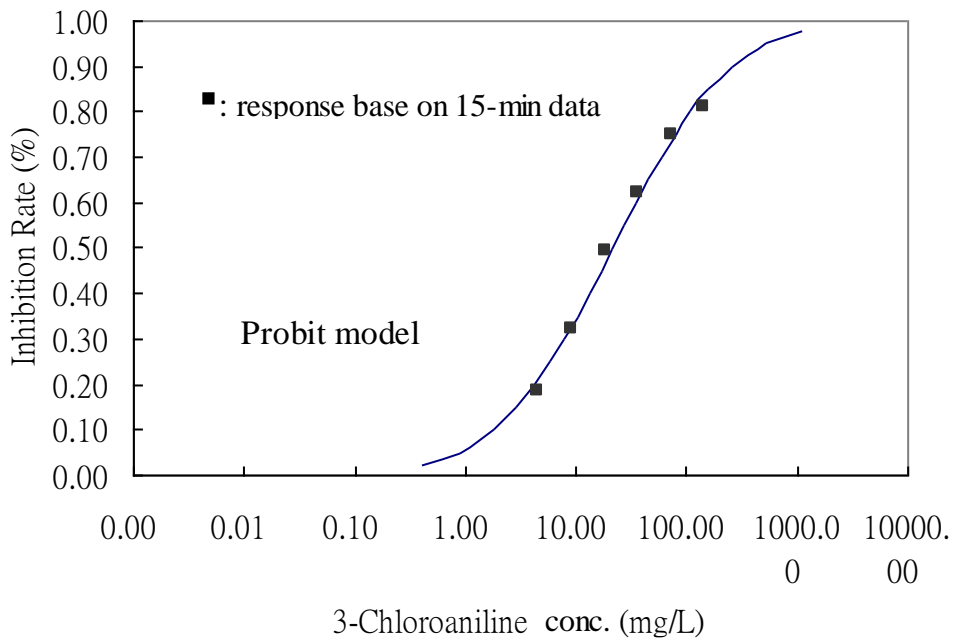


圖 5.1.7 3-Chloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線

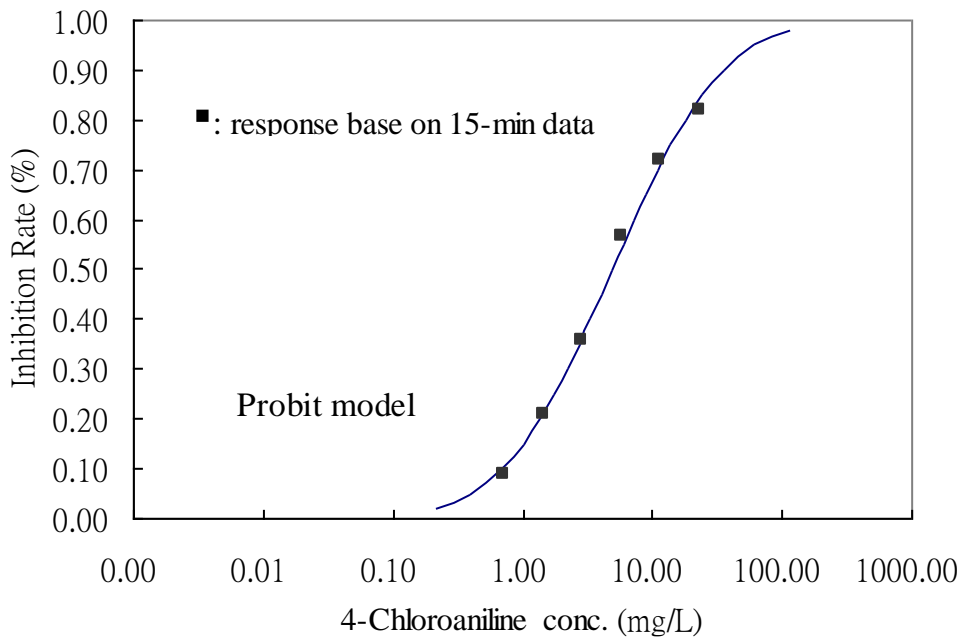


圖 5.1.8 4-Chloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線

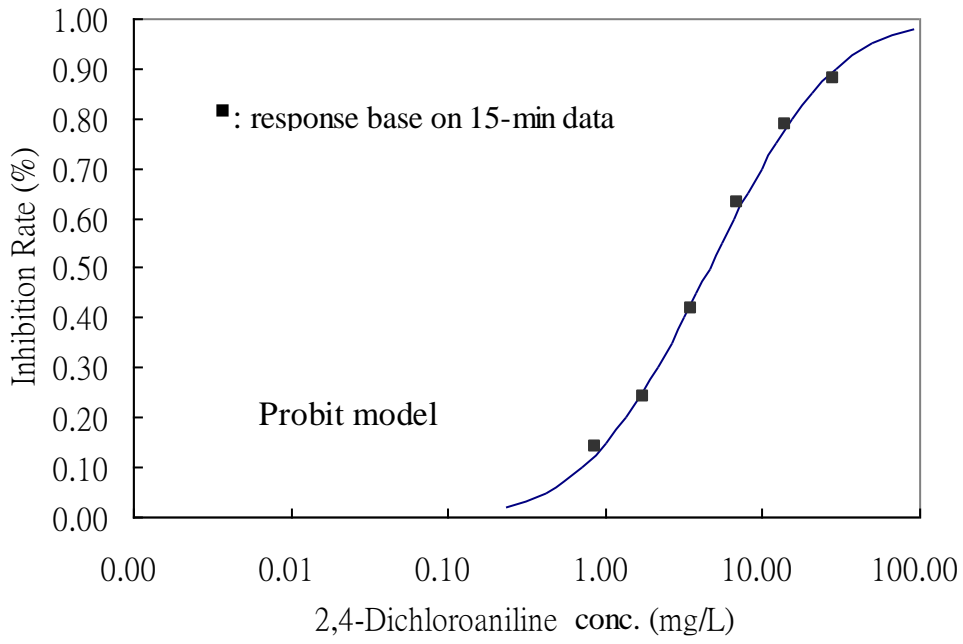


圖 5.1.9 2,4-Dichloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線

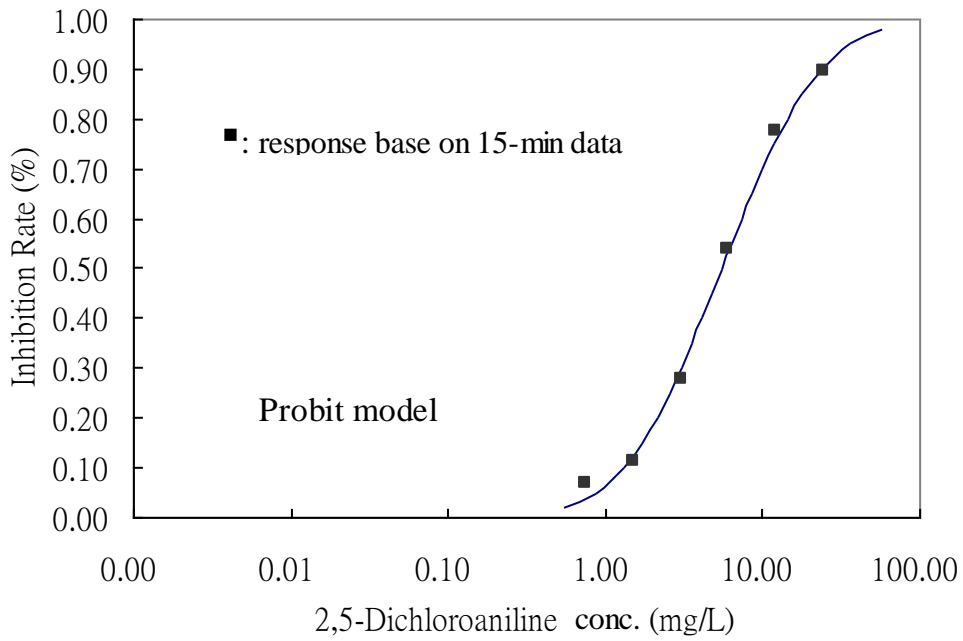


圖 5.1.10 2,5-Dichloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線

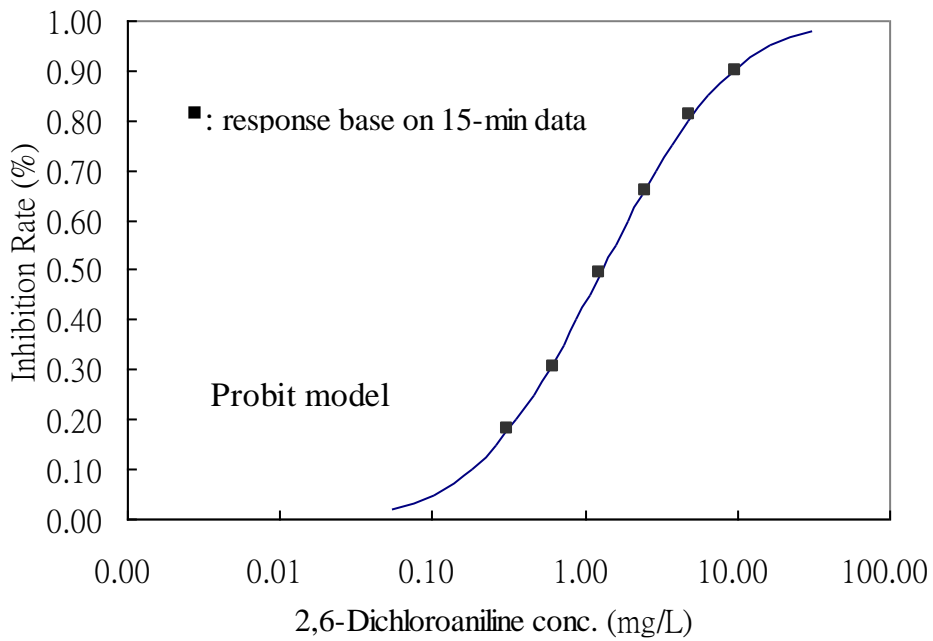


圖 5.1. 11 2,6-Dichloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線

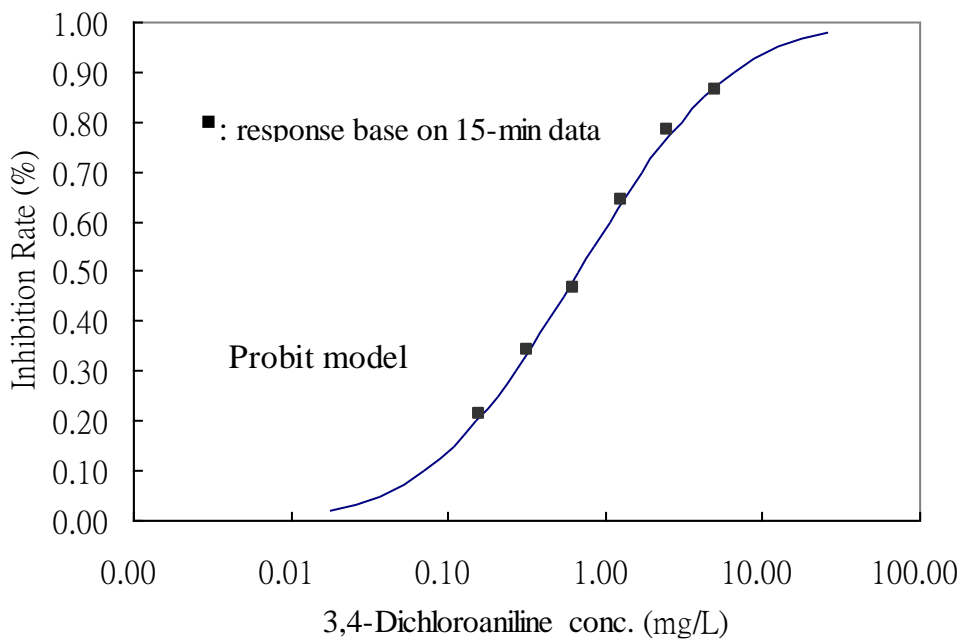


圖 5.1. 12 3,4-Dichloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線

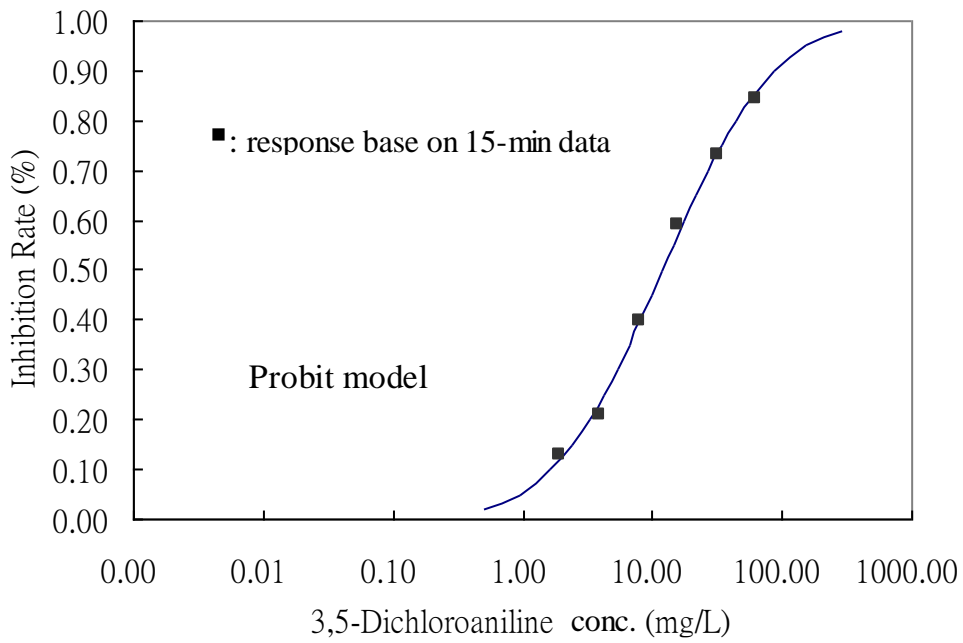


圖 5.1.13 3,5-Dichloroaniline 之 Microtox 劑量反應曲線

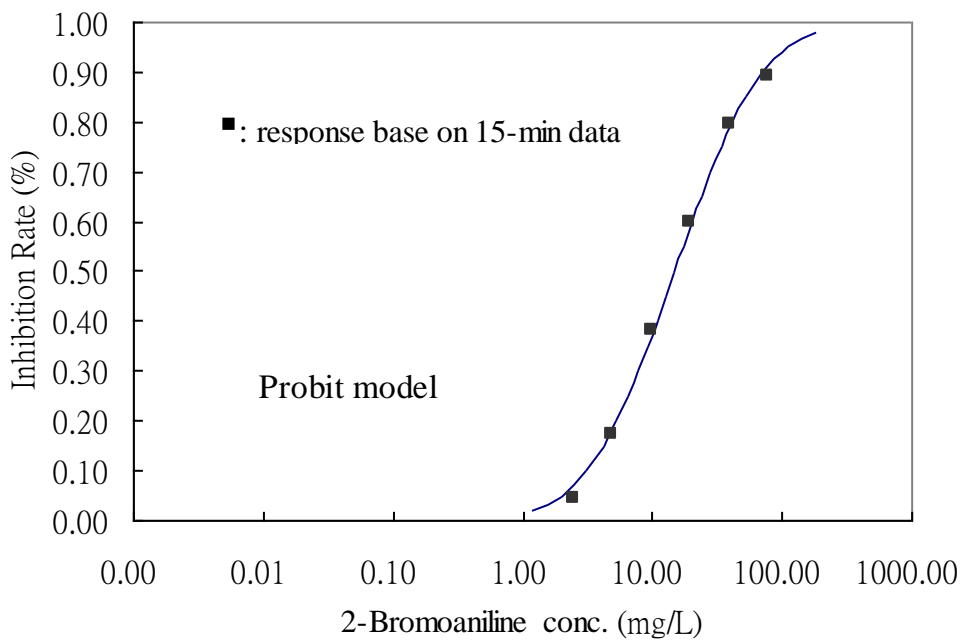


圖 5.1.14 2-Bromoaniline 之 Microtox 劑量反應曲線

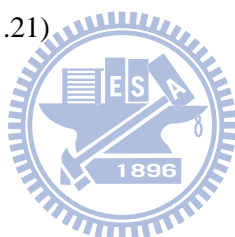
5.2 混合毒性試驗結果

由文獻回顧的部份可以歸納出，當相同機制的毒性物質混合時，其混合毒性大多呈現毒性相加的現象，而在不同機制的毒性物質混合時，根據 Broderius *et al.* (2005) 以 fathead minnow 作為有機物混合毒性試驗物種的文獻中表示，會有毒性稍為拮抗的情形發生。但以劑量-反應曲線的斜率來探討，有許多文獻的實驗結果指出當小斜率的物質和大斜率的物質混合，會產生拮抗作用，而小斜率的物質互相混合時，則會觀察到協同作用的現象發生。而本研究選用反應性和極性麻醉性兩種不同機制的毒化物來作混合毒性試驗，其中也包括有大斜率和小斜率的物質，來探討其實驗結果和上述文獻是否有相符合之處。混合毒性試驗的結果列在表 5.2.1、5.2.2、5.2.3、5.2.4。



表 5.2.1 Formaldehyde 及 Glutaraldehyde 和 苯胺類之混合毒性結果 (TU=1:1) 之 1

	Formaldehyde		Glutaraldehyde	
	Observation	Prediction	Observation	Prediction
3-Chloroaniline	1.381 [A] (1.25-1.53)	0.72 [S]	1.039 [+] (0.92-1.17)	0.68 [S]
	1.354 [A] (1.27-1.45)	0.62 [S]	1.033 [+] (0.95-1.12)	0.64 [S]
	1.293 [A] (1.17-1.43)	0.74 [S]	1.032 [+] (0.99-1.07)	0.64 [S]
	1.006 [+] (0.89-1.13)	0.66 [S]		
4-Chloroaniline	1.404 [A] (1.29-1.53)	0.80 [S]	0.988 [+] (0.92-1.06)	0.76 [S]
	1.070 [+] (0.95-1.21)	0.73 [S]	1.359 [A] (1.24-1.49)	0.64 [S]
			1.094 [A] (1.05-1.14)	0.62 [S]
			1.097 [+] (0.98-1.24)	0.74 [S]
2,4-Dichloroaniline	1.246 [+] (0.85-2.02)	0.80 [S]	0.942 [+] (0.77-1.17)	0.82 [S]
			0.773 [+] (0.58-1.08)	0.76 [S]
2,5-Dichloroaniline			0.621[S] (0.50- 0.79)	0.82 [S]
2,6-Dichloroaniline			1.117 [A] (1.08-1.17)	0.78 [S]
			1.130 [+] (0.93-1.40)	0.76 [S]



S: synergism ; +: addictive ; A: antagonism

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

表 5.2.2 Formaldehyde 及 Glutaraldehyde 和 苯胺類之混合毒性結果
(TU=1:1) 之 2

	Formaldehyde		Glutaraldehyde	
	Observation	Prediction	Observation	Prediction
3,4-Dichloroaniline	1.105 [+] (0.72-1.87)	0.74 [S]	1.171 [A]	0.64 [S]
			(1.02-1.36)	
			1.208 [A]	0.66 [S]
			(1.08-1.35)	
			1.271 [A]	0.70 [S]
			(1.18-1.37)	
3,5-Dichloroaniline	1.155 [A] (1.05-1.28)	0.76 [S]	1.175 [+] (0.89-1.59)	0.68 [S]
2-Bromoaniline	1.151 [A] (1.02-1.30)	0.76 [S]	0.918 [+] (0.84-1.01)	0.80 [S]
			0.856 [S] (0.76-0.96)	0.80 [S]
			0.927 [+] (0.84-1.03)	0.74 [S]

S: synergism ; +: additive ; A: antagonism

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

表 5.2.3 Propionaldehyde 及 Butyraldehyde 和 苯胺類之混合毒性結果
(TU=1:1)

	Propionaldehyde		Butyraldehyde	
	Observation	Prediction	Observation	Prediction
3-Chloroaniline	1.721 [A] (1.49-2.02)	0.56 [S]		
	1.384 [A] (1.27-1.52)	0.68 [S]		
4-Chloroaniline	0.998 [+] (0.77-1.31)	0.64 [S]		
2,4-Dichloroaniline			1.470 [A] (1.16-1.95)	0.66 [S]
2,5-Dichloroaniline			1.344 [A] (1.18-1.53)	0.74 [S]
3,4-Dichloroaniline	1.255 [+] (0.94-1.66)	0.56 [S]		
2-Bromoaniline			1.602 [A] (1.30-2.00)	0.70 [S]

S: synergism ; +: additive ; A: antagonism

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

表 5.2.4 Acetonitrile 及 Malononitrile 和 苯胺類之混合毒性結果(TU=1:1)

	Acetonitrile		Malononitrile	
	Observation	Prediction	Observation	Prediction
3-Chloroaniline	1.841 [A] (1.32- 2.34)	1.04 [+]	1.335 [A] (1.13-1.59)	0.78 [S]
4-Chloroaniline	2.081 [A] (1.66-2.61)	1.12 [A]	1.280 [A] (1.13-1.46)	0.82 [S]
2,4-Dichloroaniline	2.010 [A] (1.92-2.10)	1.22 [A]	1.259 [+] (0.97-1.70)	0.87 [S]
2,6-Dichloroaniline			1.291 [A] (1.17-1.43)	0.86 [S]
2-Bromoaniline	1.755 [A] (1.68-1.83)	1.2 [A]		

S: synergism ; +: addictive ; A: antagonism

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

由表 5.2.1、5.2.2、5.2.3、5.2.4 的結果可以觀察到，全部的實驗組數中，協同的作用非常少，僅僅在 Glutaraldehyde 和 2,5-Dichloroaniline 以及 2-Bromoaniline 的混合部份發生。其餘大部分的實驗結果呈現相加或拮抗作用，在小斜率物質互相混合的部份，與 Chen & Yeh (1996) 的文獻中，小斜率物質相混合會呈現協同作用的部份並不符合。而在含有大斜率物質的乙腈與其他苯胺類混合的部份，毒性明顯呈現拮抗的作用，這與 Chen & Huang (1996) 文獻中，大斜率的乙腈在與其他小斜率的物質混合時，呈現明顯的拮抗作用是符合的。

若以毒性機制的異同觀點來看，參考 Lipnick (1991) 對毒性化學物分類的文獻，苯胺類屬於極性麻醉性的化學物，而醛類則屬於反應性的化學物。不同機制的毒化物混合，在 Broderius *et al.* (2005) 以 fathead minnow 作為不同機制有機物混合毒性試驗物種的文獻中呈現的是拮抗的混合效應結果，而在 Dawson *et al.* (2006) 對十種同屬軟親電性，但有不同毒性分子

作用位置的化學物，進行毒性試驗的文獻中，不同毒性分子作用位置的物質混合，混合效應也不符合相加作用，毒性呈現稍微減弱的結果。因此以機制方面來討論，不同機制的毒化物混合，毒性作用位置的差異會造成毒性貢獻比例不同，是會產生毒性減弱的情況。但若從其他以劑量-反應曲線斜率的文獻角度來探討，本研究在小斜率物質相混合的部份，大部分的混合效應結果偏向相加以及拮抗作用，這部分和探討小斜率物質相混容易呈現協同作用的參考文獻牴觸了。而 Broderius *et al.* (2005) 的文獻中所使用的物種為 fathead minnow，此種魚類進行毒性試驗所得的劑量-反應曲線斜率和其他物種的劑量-反應曲線斜率相比，相對較大，若再從此文獻中的斜率去討論，大斜率的情況相混合可能也是造成毒性拮抗的結果。因此，對於本研究的苯胺類以及醛類的混合試驗大部分呈現毒性相加甚至拮抗的結果，推測兩種類毒性化學物間，彼此應該是產生了交互作用，產生了其他物質造成更加複雜的混合毒性效應，因此不符合非交互作用理論下，以斜率作為基礎的 RA 毒性預測之模式。

5.3 初步化學分析及探討

一般混合毒性理論的基本假設為非交互作用理論，也就是假設混合的兩種化學物質不會產生化學反應。此假設使混合毒性作用理論可以簡單地描述不同毒化物在混合時，在生物體上作用產生的毒性影響貢獻。但就實際情況中，混合毒性牽涉的反應是相當複雜的，不但兩化學物間可能會有化學反應產生，單一化學物本身也可能會有降解或產生衍生物的情況。例如在 Gosetti *et al.* (2010) 對 4-chloroaniline 的陽光降解毒性研究當中，在陽光模擬器的照射之下，10 分鐘內就可以觀察到 4-chloroaniline 溶液的顏色變化，40 分鐘時，即可在 HPLC 的偵測下，看到降解物的產生；而在 Schuler *et al.* (2009) 利用端足蟲對五氯苯(pentachlorobenzene)以及熒蒽

(fluoranthene)作混合毒性試驗的文獻中也發現，熒蔥會產生衍生物，因此原本只有五氯苯和熒蔥的二元混合毒性試驗，應該也要把熒蔥的衍生物納入混合毒性的考量。除了上述化學物可能產生複雜毒性效應的原因，甚至毒化物和生物體內酵素的反應，或是毒化物和所處環境中的物質也有可能產生化學反應，如此一來，便增加了許多混合毒性的複雜性。

在 Lin *et al.* (2003) 的文獻中，Lin 以 HPLC 針對 malononitrile 與醛類的混合進行了分析，並偵測到了新物質的產生，解釋了 malononitrile 與醛類混合後，產生毒性增強的原因。而在本研究的混合毒性結果方面，推測苯胺類和醛類間會有化學反應產生，因此本研究就相關反應的文獻探討，以及選用 HPLC 儀器的化學分析，討論兩類化學物間是否會形成新物質而使混合毒性試驗結果趨向更複雜的效應，而不符合 RA 模式的預測結果。

5.3.1 苯胺類與醛類相關反應

在文獻回顧中提到的 Dawson *et al.* (2006) 利用費氏弧菌對十種軟親電性的化學物進行混合毒性的研究中，其文獻中提到的軟親電性化學物還細分為三種不同的分子作用位置，其中一類含有雙碳基的物質，會與一級胺類的親核物質產生反應，生成 Schiff base。所謂的 Schiff base 指的就是亞胺類(imine)物質，而 Schiff base 生成的反應主要為氨基的 N 對碳基的 C 進行親核攻擊，脫水之後，產生亞胺結構的物質。而本研究中所使用的苯胺類即是一級胺類的物質，醛類是含有碳基且反應性強的物質。

苯胺類的結構為苯環上接有氨基官能基，其氨基上的 N 含有孤對電子(lone pair)，易發生電子轉移的情況，而醛類又是屬於性質活潑，反應性強，容易產生聚合和氧化反應的親電性含碳基物質，兩者混合時，是非常有可能產生交互作用的。Schiff base 的生成反應條件與苯胺類以及醛類皆符合，也有許多文獻探討這兩類物質所進行的縮合反應，在 Saggiomo *et al.*

(2009) 對亞胺的生成研究中就提到了要生成亞胺的反應即是一級胺與碳基化合物產生脫水縮合反應，而在 Gaspar *et al.* (2006) 的文獻中，作者對 aniline 以及 Fischer's base aldehyde 進行縮合反應而產生半菁染料的過程進行了動力學的研究，也說明了此種縮合反應即是游離的 amine 對醛類的碳基團作親核攻擊。此種苯胺類和醛類的簡單反應結構如圖 5.3.1.1。

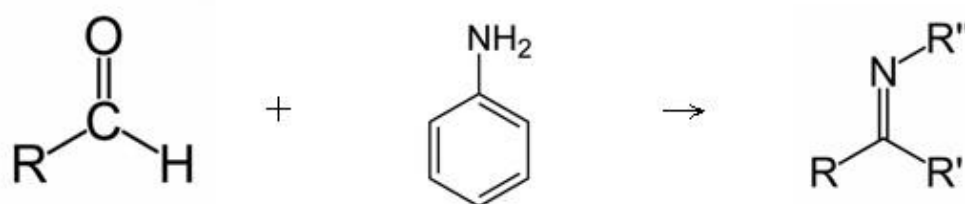


圖 5.3.1.1 亞胺生成反應結構圖

另外在苯胺類物質方面，有些文獻指出苯胺類單一存在即有降解的特性。如在文獻回顧部分提到的 Gosetti *et al.* (2010) 這篇文獻進行了 4-chloroaniline 在陽光模擬器照射之下的降解毒性研究，內容提到了 4-chloroaniline 溶在水或是乙腈中，經過光解皆會產生降解物，即使沒有水解的情況產生，光解產生的二聚化產物和 HCl 也影響了 4-chloroaniline 的毒性表現，發生了毒性增強的結果；而在 Neuwoehner *et al.* (2010) 對農藥 diuron 所進行的毒性研究中，雖然在此研究中，3,4-dichloroaniline 為最終降解物，並沒有繼續研究 3,4-dichloroaniline 的降解，但 diuron 的降解過程也說明了原物質和降解物的性質以及毒性表現是不同的，尤其在疏水性方面，影響了麻醉性毒化物的毒性表現，而在降解過程中，也有原本為基線毒性的物質，轉變為 specific effect 的情況發生，或是轉變為在未知的分子作用位置上作用，甚至 diuron 和其降解物在藻類和水蚤上的毒性作用機制表現也不同，這更牽涉到了和不同物種的不同毒性載體有關，顯現出更

複雜的毒性效應。

5.3.2 HPLC 分析

在初步化學分析方面，要以儀器偵測到反應物生成，一般來說可以使用分光光度計、液相層析儀、氣相層析儀等儀器來分析。在吸收光譜的方法中，化學物質在不同的波長之下，有不一樣的吸光值，而不同的化學物質在同一波長之下，所能觀察到的吸光值也不同，因此若是利用分光光度計的吸收光譜來作為輔助分析化學反應的工具，可以將混合化學物掃全波長，就化學物反應之後，由於結構上的改變而使有最大吸收值的波長改變，來判定是否有反應發生或是新物質的生成。但是因為使用分光光度計沒有觀察到明顯的波長位移，因此本研究參考了文獻回顧中提到的 Lin *et al.* (2003) 使用高效率液相層析儀(HPLC)分析混合毒化物的文獻，選定了 HPLC 作為本研究化學分析的主要工具。Lin *et al.* (2003) 在其研究中，使用 HPLC 分析 malononitrile 與長鏈醛類，並偵測出混合後有第三物質的出現，解釋了 malononitrile 混合長鏈醛類之後，會有交互作用產生，生成一酸性物質，而使得在 microtox 毒性試驗的螢光菌上，呈現一毒性增強的效應。

本研究利用 HPLC 分析中，不同化合物經過分離管柱，也就是固定相，所需要的停留時間不同，而在連結的電腦螢幕上出現的偵測訊號 peak 的時間不同，此種定性的原理，來分析苯胺類以及醛類在單一存在和混合之後的 peak 出現情況，觀察是否在混合之後會出現第三種化學物質的 peak，或是原本單一分析的結果和混合分析的結果訊號比較之下有無差別，進而探討苯胺類和醛類產生的交互作用。

本研究使用 Photodiode Array Detector 作為偵測器，分離管柱為 C18 管柱，混合分析的濃度以進行 Microtox 混合毒性試驗的濃度來分析，單一

分析的部份也是使用和在混合試驗中同濃度的單一化學物質來分析，以便比較其訊號值有無增減。而在這裡要說明，對於醛類的標準分析方法為DNPH 衍生法，需要使用採集揮發的醛類氣體，並加入衍生試劑，才能在HPLC 上觀察到醛類的偵測訊號，否則無論使用任何分離管柱或是任何移動相皆無法在實驗濃度的情況下偵測到本研究中所使用的醛類化合物。但如此一來，加入衍生試劑會使得混合毒性的分析更為複雜，因為無法確定新物質的產生是否為衍生試劑所造成，因此，本研究利用適合苯胺類在混合試驗濃度下的 HPLC 分析條件來進行分析，主要觀察苯胺類的 peak 變化情形以及新物質的 peak 是否產生。在參考文獻還有進行分析試驗的測試下，得知苯胺類在 205nm 的波長以及在 60% 甲醇/40% 去離子水的移動相沖提之下，可以觀察到明顯易辨認的最大的訊號值，因此以此固定作為所有分析的條件，以便比較訊號值的差異。

本研究以上述條件進行了 3-chloroaniline + 甲醛、3-chloroaniline + 戊二醛、4-chloroaniline + 甲醛、4-chloroaniline + 戊二醛、3,4-dichloroaniline + 戊二醛五組的單一以及混合分析，這些組別都是在混合試驗結果中，不符合 RA 模式預測而呈現相加或拮抗的混合組別。在這些混合物質的分析中，除了苯胺的 peak 之外，並無發現其他新物質的 peak 產生，但並不能就此直接推斷苯胺和醛類混合時，沒有化學反應發生，有可能是因為分析時的條件，例如偵測器的極限、新物質的結構是否能被偵測器偵測到、移動相的種類和比例、管柱的種類、分析時的移動相流速等因素，導致生成物新物質無法顯現出 peak，亦或是新物質 peak 出現的時間和苯胺類的出現時間太接近，偵測到的 peak 無法分離而無法辨別是原來的苯胺或者是新的生成物。而在參考的 Lin *et al.* (2003) 這篇文獻當中，作者在分析 malononitrile 與醛類之前，先將此兩種毒化物經過一連串的前處理，包括將 malononitrile 與醛類加上膠體粒子一起混合攪拌(因為膠體粒子能促進 malononitrile 與醛類的碰撞機會，使反應可以加速生成)，接著在 30°C 下水

浴，並混合搖晃 24 小時，最後再使用 HCl 將 pH 值調整至 2.5 的酸性情況，經由這些前處理之，才能在 HPLC 上觀察到 malononitrile 與醛類混合後產生的新物質 peak。因此能否觀察到有第三種物質的生成，除了 HPLC 的分析條件是否符合生成的新物質所能被偵測到的條件，還要考慮到生成物的 peak 是否能和反應物的 peak 分離到我們能夠觀察到的程度，並且新物質的生成是否受到環境的影響，是否要經過某些環境的調整才能完整地生成，而在毒性試驗中環境是否能成功再造，而用在分析的情況下，這些都是影響到 HPLC 能否偵測到新物質產生的問題。

雖然在本研究的 HPLC 分析當中，並無發現新物質的 peak 出現，但就單一和混合分析中的 peak 面積變化，也是可以觀察苯胺類和醛類混合之後，反應物訊號的改變，推測反應物量的變化，進而探討有交互作用產生。本分析研究中所使用的分析濃度符合 Microtox 混合毒性試驗中的濃度。

由於考慮到背景值的干擾，以及背景物質的脈衝，因此先進行了溶劑的 HPLC 分析。因為毒化物溶液皆以去離子水為溶劑配製而成，所以先要分析去離子水在本研究設定的條件之下，HPLC 偵測出來的脈衝曲線變化，如圖 5.3.2.1 所示，由於訊號值非常低，圖形呈現非常雜亂的情形，單位的範圍也在非常小的數值內，而在圖 5.3.2.2 可以發現戊二醛的脈衝圖和去離子水非常相似，皆在一非常小的數值範圍內跳動，觀察不到特別高的脈衝。這是因為先前提到的醛類的標準分析方法為 DNPH 衍生法，無法在不加入衍生試劑反應的情況下在 HPLC 上觀察到 peak，因此在本研究設定的條件下，戊二醛在 HPLC 的分析結果看起來和背景值是一樣的。而由於在 Microtox 的試驗中，必須添加滲透壓調節液(Microtox Osmosis Adjustment Solution ; MOAS)來調整實驗環境成為適合海洋發光菌的環境，其成分為 22% 的食鹽水，因此在 HPLC 分析當中，也把 MOAS 加入分析，使其儘量符合 Microtox 毒性試驗的環境。圖 5.3.2.3 為 MOAS 的 HPLC 分析圖，可以清楚地在 1.652 分鐘的地方觀察到一面積為 767262 $\mu V \cdot sec$

的脈衝，在多於五次的分析後，確定為 MOAS 在 HPLC 分析時會出現的脈衝圖形。而在五組 HPLC 試驗當中，在 4-chloroaniline + 戊二醛的分析發現，混合後的 4-chloroaniline + 戊二醛所能偵測到的脈衝，不論是在 peak 的高度或是面積方面，皆比 4-chloroaniline 單一分析時的 peak 還要來得低，也就是說，4-chloroaniline 在與戊二醛混合後，脈衝值大幅下降，甚至只有單一存在時的十分之一。由 HPLC 的分析脈衝圖來討論，在圖 5.3.2.4，4-chloroaniline 的單一分析圖可以看到，4-chloroaniline 單一存在時，peak 出現在 4.102 分鐘，peak 面積為 3173382 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ ，而加入 MOAS 後，可能因為 MOAS 加的量非常少(如實驗步驟所述)，濃度並不算太高，所以在圖 5.3.2.5，也就是 4-chloroaniline 加上 MOAS 的分析，並沒有觀察到 MOAS 的 peak 出現，依然只有 4-chloroaniline 的 peak，出現在 4.111 分鐘，面積為 1321978 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ ，相比之下面積有削減，但可能是因為加了 MOAS 而溶液的性質改變的關係。再看到 4-chloroaniline + 戊二醛的分析結果，即圖 5.3.2.6，可以發現雖然出現 peak 的時間是 4.153 分鐘，和單一只有 4-chloroaniline 時是差不多的停留時間，但 peak 的面積卻減少至 331631 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ ，幾乎是單一 4-chloroaniline 分析時的十分之一，降低的程度可以非常明顯地觀察到；而在添加了 MOAS 的 4-chloroaniline + 戊二醛混合分析結果，即圖 5.3.2.7 也可以發現雖然 peak 出現時間是 4.214 分鐘，和前述的 4-chloroaniline peak 出現時間幾乎一樣，但 peak 的面積卻也下降至只有 22937 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ ，比沒有含 MOAS 的混合分析還要來得更低。

在 4-chloroaniline 如此明顯的變化之下，雖然無法觀察到新物質的 peak 產生，但可以藉由此分析結果推論 4-chloroaniline 在與戊二醛混合之後削減的量，可能產生了會降低海洋發光菌抑制的物質，而使得混合毒性呈現減弱的現象，所以與模式預測的毒性效應不符合。即使此物質並不能在實驗設定的分析條件下被測得，但在前述相關的文獻的探討之下，是可以推論苯胺與醛類存在著可能發生交互作用的機會非常大，並且影響了

Microtox 毒性試驗的毒性效應，使得混合毒性效應較模式推測要來得弱。並且雖然在加了 MOAS 的情況之下，HPLC 的分析結果並沒有很劇烈的改變，但是不能排除化學物和 Microtox 試驗中所使用的海洋發光菌之間，是否有更複雜的生物反應作用，或是與海洋發光菌生物體內的酵素影響有關，其酵素可能促進了某些反應的發生，使得發光抑制降低，表現出來的毒性效應也受影響而減弱。

對於其他沒有偵測到濃度改變或者是新物質 peak 產生的混合毒性試驗組別，並不能完全排除化學物質間交互作用反應的可能性。在 HPLC 的分析方面，化學物質在偵測器上觀察到的 peak 常和管柱固定相有很大的關係，固定相的吸附能力是造成化學物在管柱中停留時間不同的主要原因，若是新物質的產生和該管柱之間的作用力非常強，則有可能會有無法沖提出管柱的可能性，如此一來，我們也無法在偵測器上觀察到新物質的 peak，而只能觀察到原物質 peak 的訊號值下降。另外還有個可能性是新物質生成的濃度太低，無法被 HPLC 分析出來，或者是在兩化學物間之化學反應相關的官能基變化，並不能被此分析偵測條件給測得，比方說，此條件是適用於偵測烴基改變的反應，但可能在混合毒性內發生的反應是由硝基的變化造成的，因此在這種情況下，便不能成功地測得化學反應發生的情況。所以在沒有觀察到 peak 改變的 HPLC 分析圖，還是不能排除原物質已經發生交互作用化學反應的可能性。

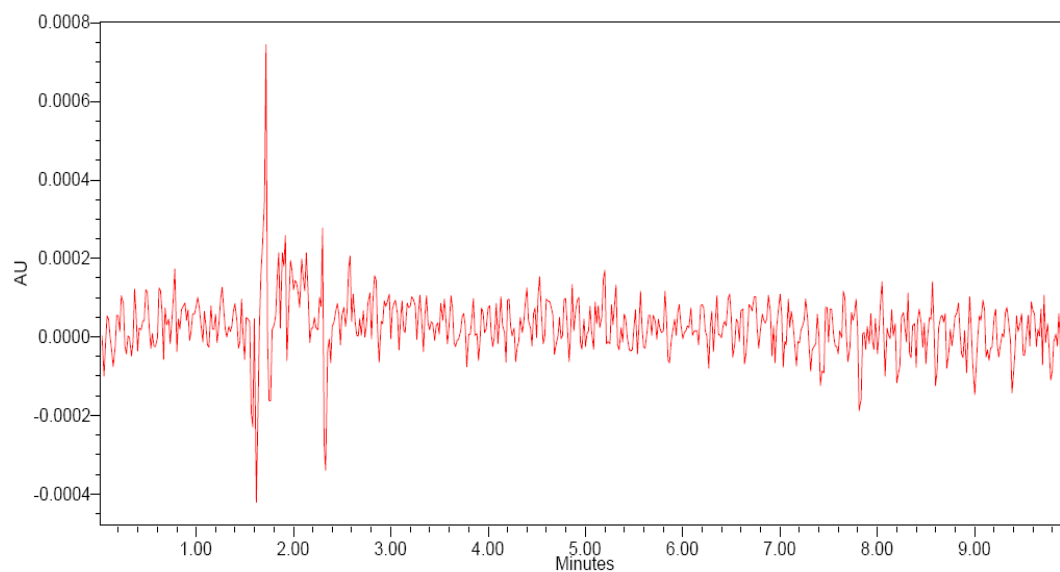


圖 5.3.2.1 去離子水之 HPLC 分析圖

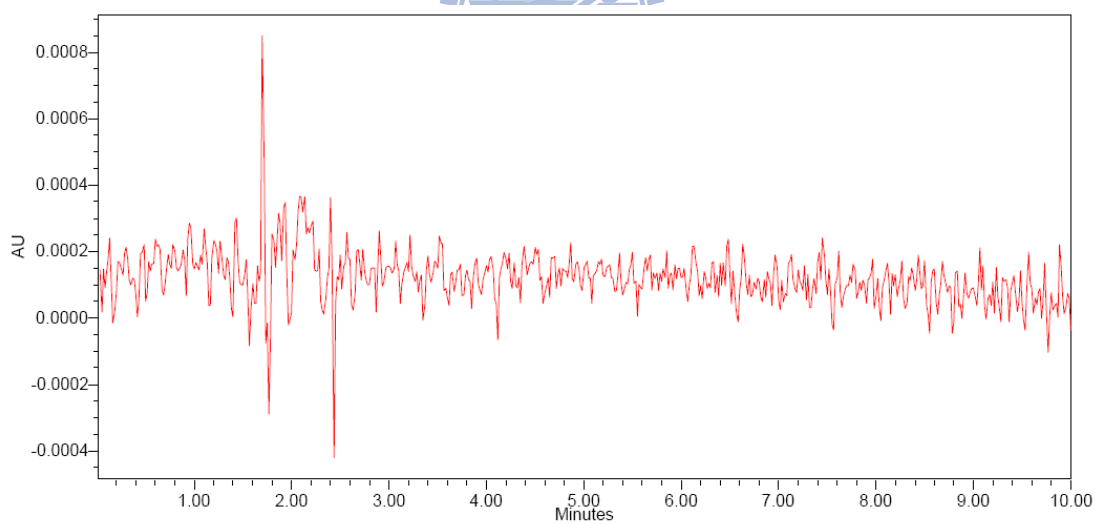


圖 5.3.2.2 戊二醛之 HPLC 分析圖

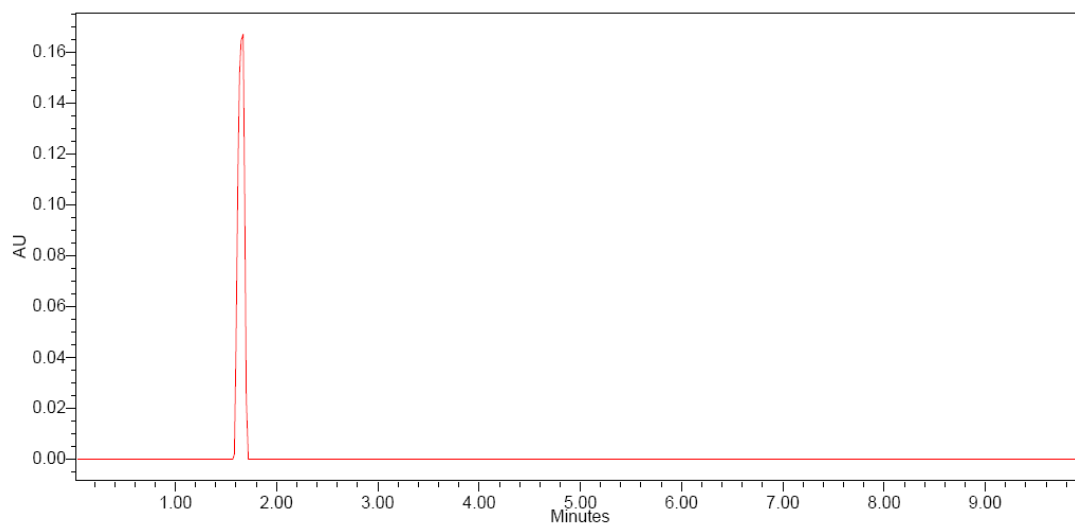


圖 5.3.2.3 MOAS 之 HPLC 分析圖(DT=1.652)

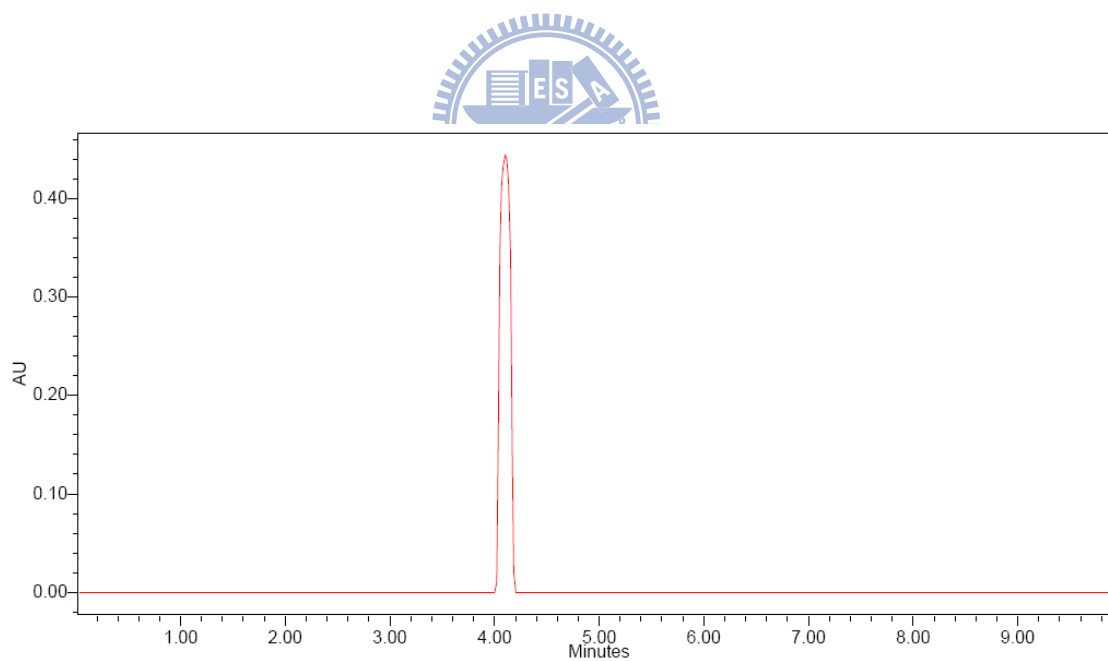


圖 5.3.2.4 4-chloroaniline 之 HPLC 分析圖(DT=4.102)

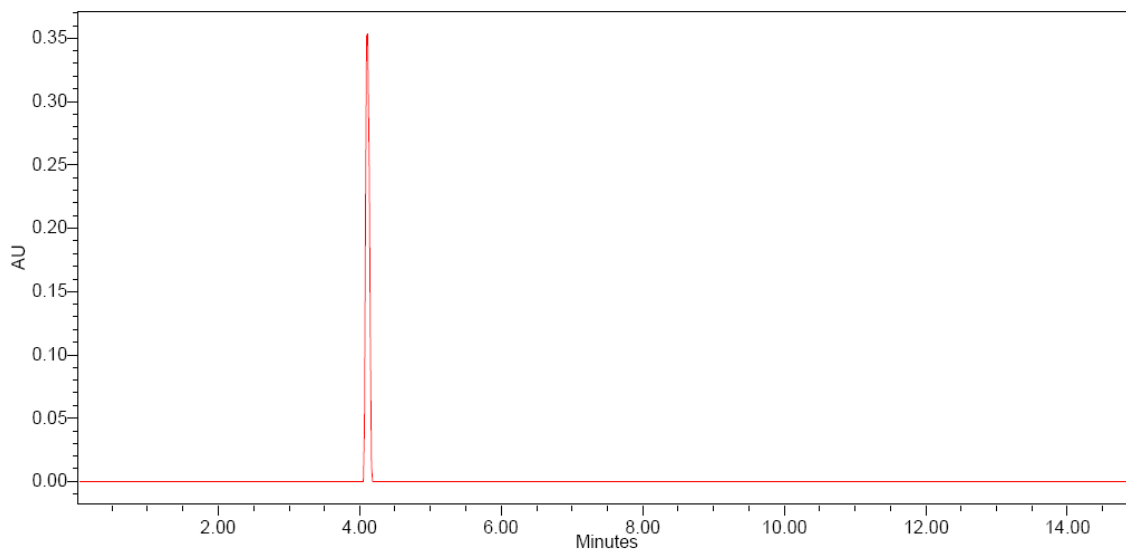


圖 5.3.2. 5 4-chloroaniline(含 MOAS)之 HPLC 分析圖(DT=4.111)

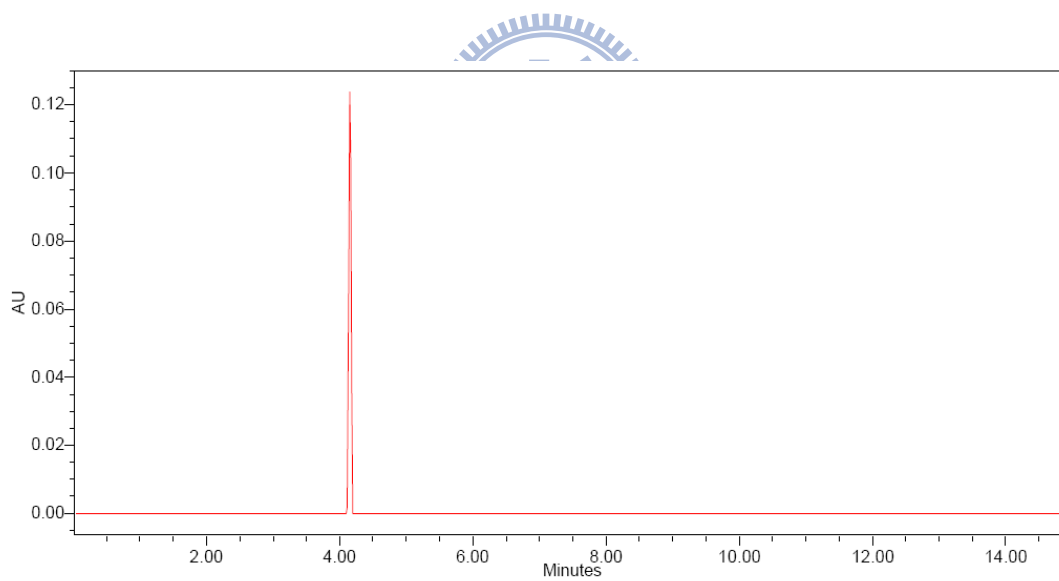


圖 5.3.2. 6 4-chloroaniline 混合戊二醛之 HPLC 分析圖(DT=4.153)

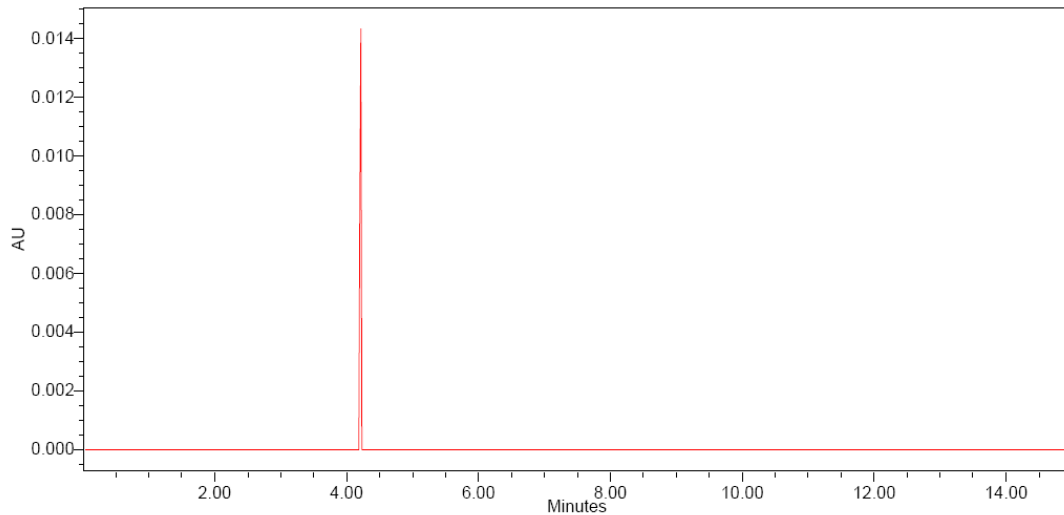


圖 5.3.2.7 4-chloroaniline 混合戊二醛(含 MOAS)之 HPLC 分析圖
(DT=4.214)

5.4 Isobologram 分析

針對上節 HPLC 化學分析無法觀察到的混合毒性試驗組別，進行了 isobologram 的混合毒性試驗。Isobologram 的主要目的是藉由不同比例的毒性物質混合，來觀察分析是否有“非交互作用”以外的情形產生。以下圖 5.4.1~5.4.5 為五組 isobologram 之結果，分別是 3-chloroaniline + 甲醛、4-chloroaniline + 甲醛、3-chloroaniline + 戊二醛、4-chloroaniline + 戊二醛、3,4-dichloroaniline + 戊二醛，如下所示：

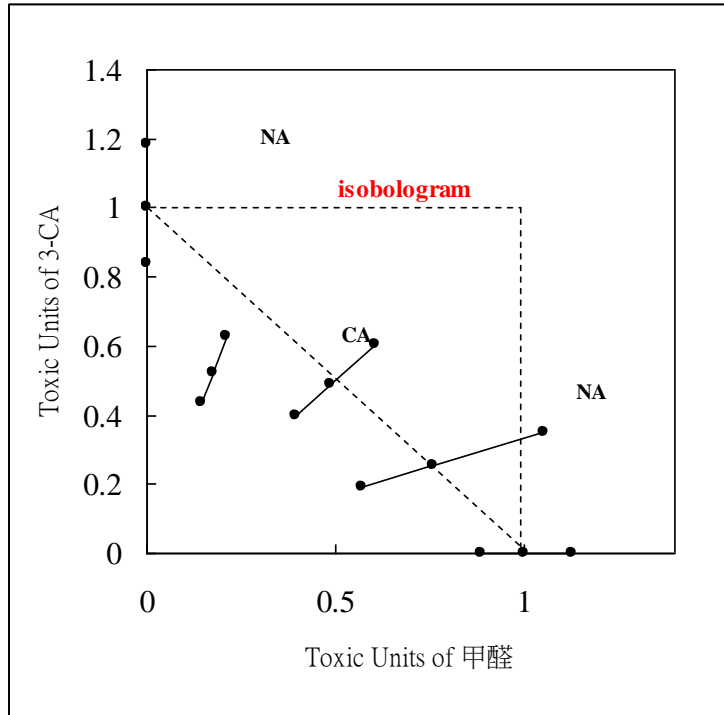


圖 5.4.1 3-chloroaniline + 甲醛之 isobologram 分析圖

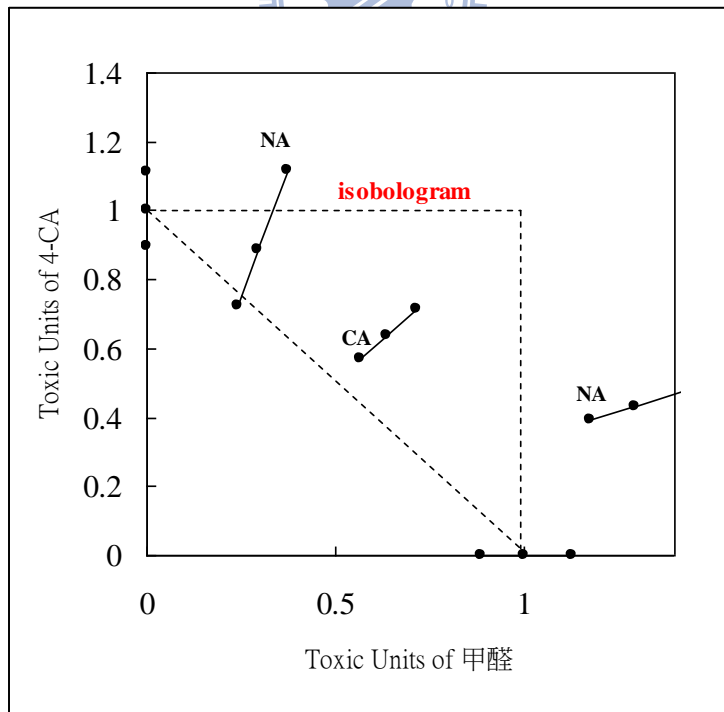


圖 5.4.2 4-chloroaniline + 甲醛之 isobologram 分析圖

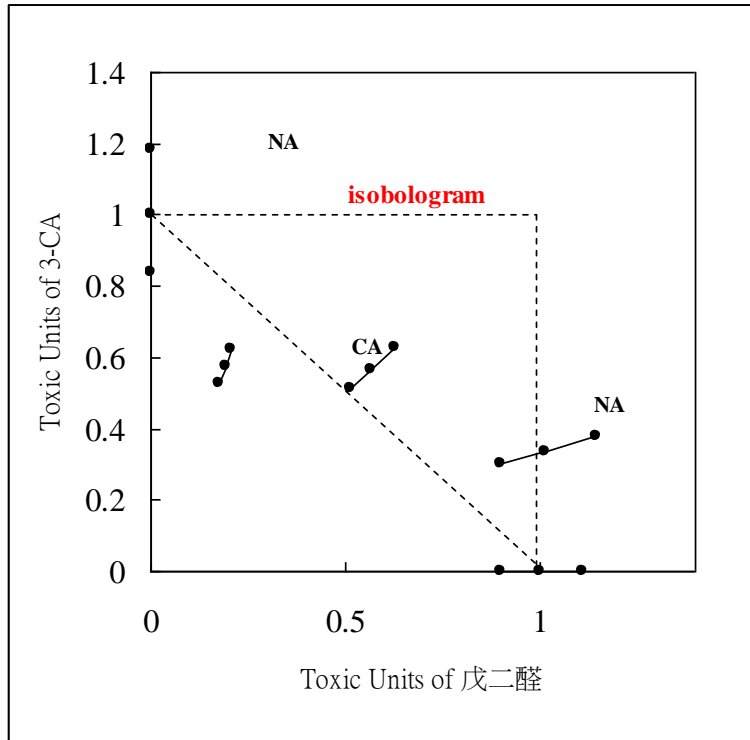


圖 5.4.3 3-chloroaniline + 戊二醛之 isobologram 分析圖

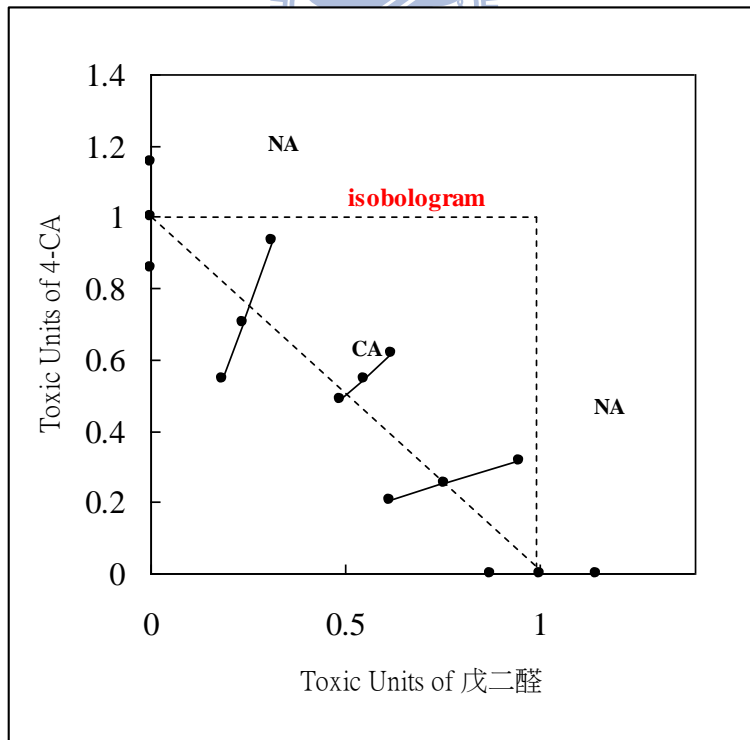


圖 5.4.4 4-chloroaniline + 戊二醛之 isobologram 分析圖

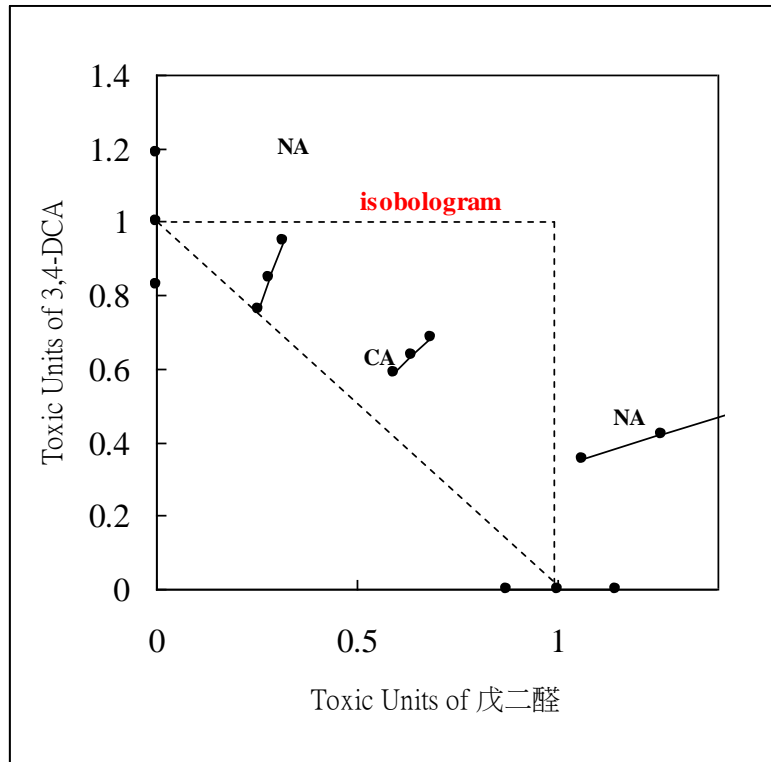


圖 5.4.5 3,4-dichloroaniline + 戊二醛之 isobologram 分析圖

可以看到在圖 5.4.2、圖 5.4.3、圖 5.4.5，也就是 4-chloroaniline + 甲醛、3-chloroaniline + 戊二醛、3,4-dichloroaniline + 戊二醛的組別，皆有部分落在代表非交互作用的虛線區塊以外，由此可以判定在這些混合試驗中，存在著交互作用的毒性效應，才會使得 isobologram 的圖上有落於虛線外的點。而其他兩組 3-chloroaniline + 甲醛、4-chloroaniline + 戊二醛，皆落在虛線內的 isobologram 圖，其中 4-chloroaniline + 戊二醛的混合組別可由 HPLC 化學分析中得到 4-chloroaniline 濃度減少，間接證明有交互作用產生，而 3-chloroaniline + 甲醛的部份，推測應是由於非交互作用以及交互作用皆存在在這兩種化學物質之間，而兩種作用相混合之後之結果，造成混合效應並不如非交互作用理論條件下之模式預測的協同效應，而是非交互作用和交互作用皆影響了混合毒性效應，而呈現出相加甚至拮抗的毒性效應。

由 isobologram 分析可以更確定醛類以及苯胺類混合效應呈現的相加以及拮抗效應，其中有化學物間之交互作用的存在，影響了整體的混合效

應結果，其 isobologram 圖並不單純地皆落在虛線範圍內，也不全落在 CA(Concentration Addition)作用的虛線上方或下方，因此推斷應該是交互作用和非交互作用兩者之綜合作用下之結果。

5.5 質譜儀分析

進一步使用質譜儀來分析前兩節五組毒性物質混合後，是否有新的分子量出現。這裡將單一毒化物和混合後之毒化物的質譜儀分析圖作疊圖比較，由圖中觀察混合後的毒化物分析中，是否有單一分析沒有出現的分子量 peak。以下圖 5.5.1 到圖 5.5.5 為五組混合毒化物 MS 分析結果比較圖，分別為 3-chloroaniline + 甲醛、4-chloroaniline + 甲醛、3-chloroaniline + 戊二醛、4-chloroaniline + 戊二醛、3,4-dichloroaniline + 戊二醛，由於儀器的要求，分析濃度皆在 0.5 mg/L 之下：

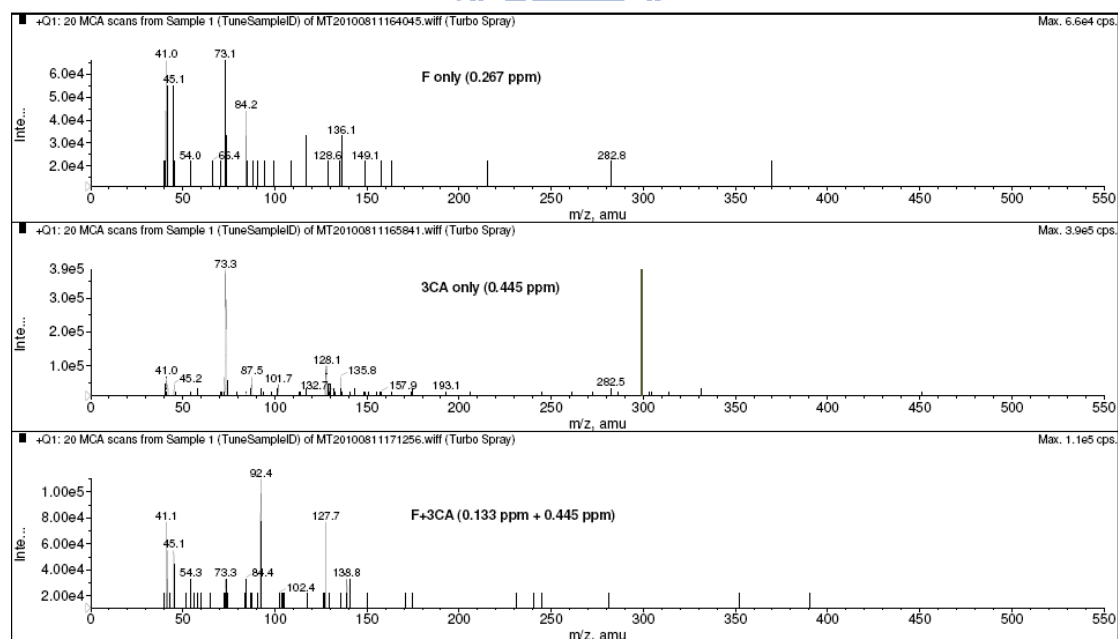


圖 5.5.1 3-chloroaniline + 甲醛(F) 之 MS 分析圖

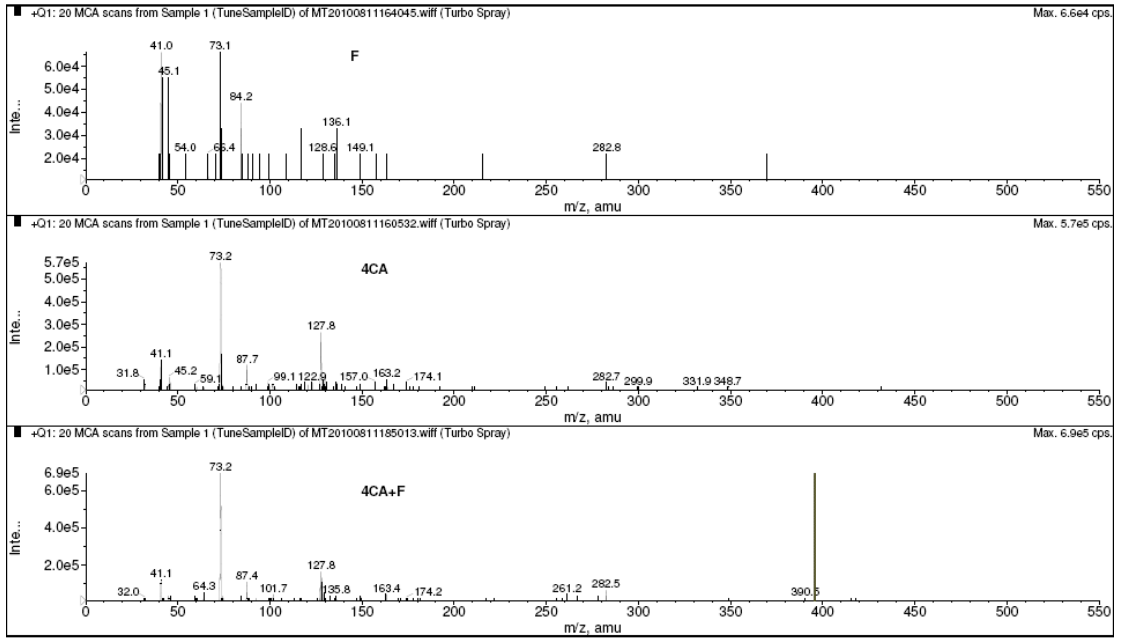


圖 5.5.2 4-chloroaniline + 甲醛(F) 之 MS 分析圖

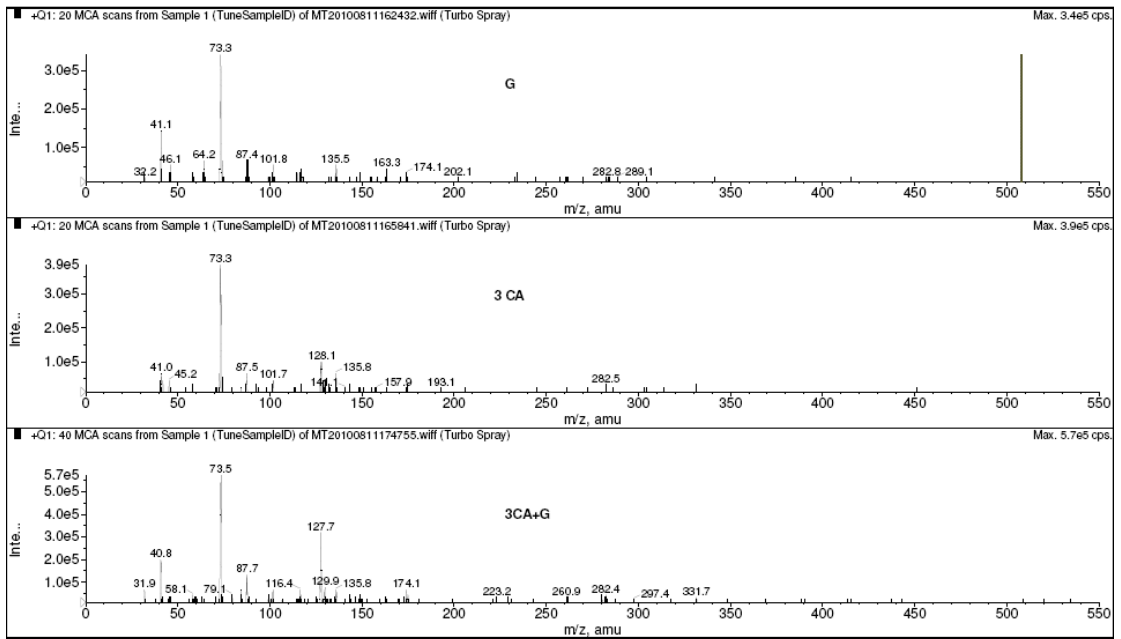


圖 5.5.3 3-chloroaniline + 戊二醛(G) 之 MS 分析圖

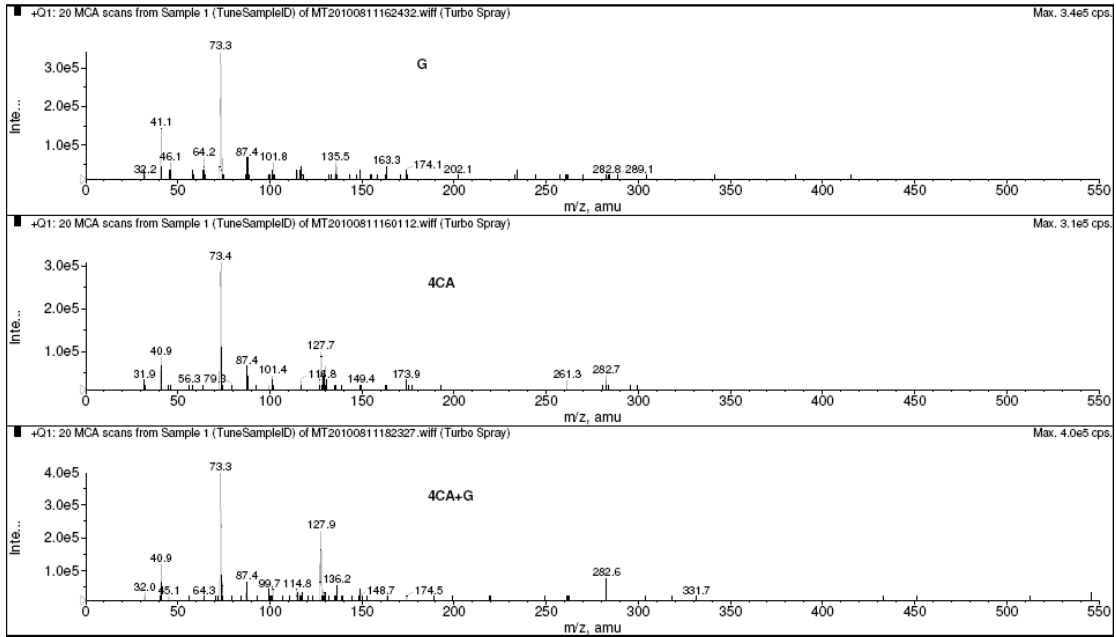


圖 5.5.4 4-chloroaniline + 戊二醛(G) 之 MS 分析圖

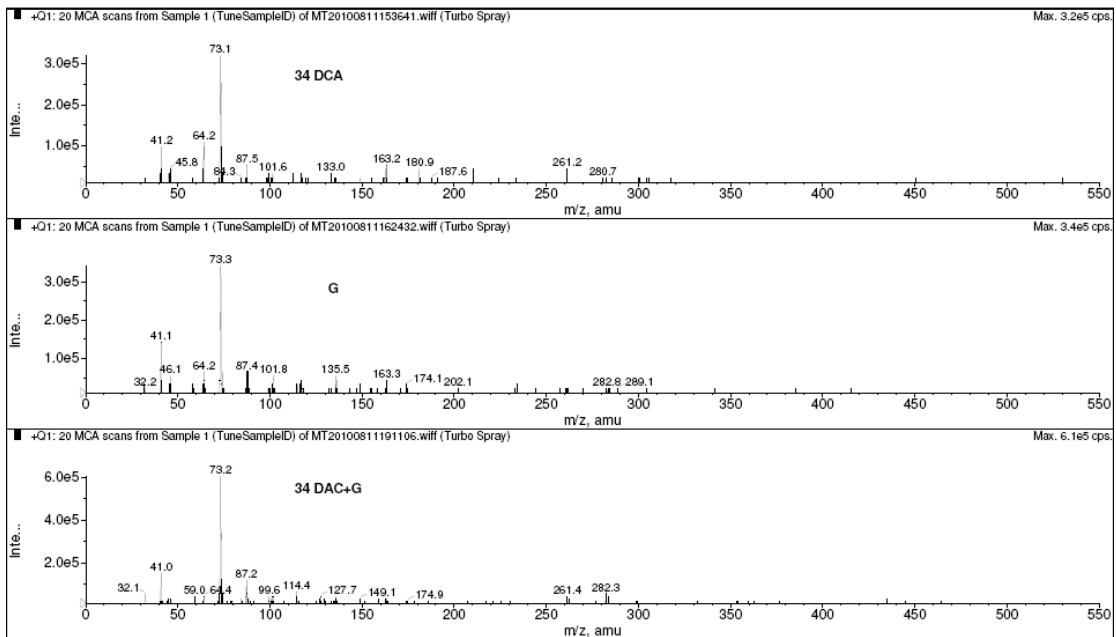


圖 5.5.5 3,4-dichloroaniline + 戊二醛(G) 之 MS 分析圖

以預估的亞胺生成反應來計算分子量時，在該分子量處並未發現有明顯的 peak 出現，這是由於可能該生成物的分子帶電量不足以被質譜儀偵測到，或者是濃度太低不易觀測，但在其他單一分析中並未出現 peak 的分子量卻仍然有發現 peak 的存在，將圖拉近之後觀察結果，整理成下表 5.5.1，可

以看到各組的混合物中，有哪些分子量的新物質產生：

表 5.5.1 MS 分析結果整理

chemical	有新 peak 之分子量
3-chloroaniline + 甲醛	245.5、352.5、390
4-chloroaniline + 甲醛	261.2、278、390.2
3-chloroaniline + 戊二醛	297.4、317.2
4-chloroaniline + 戊二醛	199.4、219、318
3,4-dichloroaniline + 戊二醛	在 0.5 mg/L 的分析濃度之下，由於濃度過低，可能不適合此組混合物之分析，因此並不能觀察到新 peak 的產生。

由表 5.5.1 可以看到有四組分析皆有可能為新物質的分子量 peak 產生，經由計算和參考文獻並未能找出此些分子量的物質為何種化合物，這可能是由於醛類和含鹵素苯胺類所產生的反應是有比亞胺生成反應更為複雜的反應，亦有可能產生聚合的反應，硝基和鹵素取代基皆有可能存在有更複雜的反應行為，產生較大的分子量產物，目前還未能得知是何種化合物。可以確定的是，當醛類和苯胺類混合時，的確是會產生其他化學物質，而這些化學物質有可能就是影響毒性反應，並造成毒性效應不符合非交互作用理論的原因之一。

第六章 結論與建議

6.1 結論

本研究針對急性麻醉性的苯胺類以及反應性的醛類和腈類，使用 Microtox 方法進行單一以及混合的毒性試驗，並探討毒性試驗的結果以及混合毒性效應與預測模式和化學分析結果的比較，以下為本研究的結論：

- (1) 在對四種醛類、兩種腈類以及八種含鹵素取代基苯胺類所做的單一毒性試驗中，發現苯胺類對於 Microtox 的毒性相當高，並且大部分接有兩個氯取代基的苯胺都比只接一個氯的苯胺毒性還要高，其中毒性最高的為 3,4-Dichloroaniline；而腈類的毒性是三類之中最低的，其劑量反應曲線斜率也是三類中最高的，其毒性呈現忽限式之反應。
- (2) 在大斜率 acetonitrile 與小斜率苯胺類進行的混合毒性試驗結果方面，皆符合 RA 模式預測的拮抗作用；但在其他小斜率物質，尤其是醛類與苯胺類混合時，其混合毒性效應大部份為相加或拮抗的結果，與 RA 預測模式的結果(協同作用)不相同。
- (3) 在 HPLC 的分析下，發現 4-chloroaniline 與戊二醛混合後，與單一 4-chloroaniline 的分析結果相比，4-chloroaniline peak 的面積明顯削減了約十分之一，由此推論可能在此混合過程中產生了會使 Microtox 毒性試驗中海洋發光菌的發光抑制減弱的物質，導致混合毒性效應呈現拮抗，而不符合 RA 預測的協同效應。此外，由文獻中亦證明苯胺類以及醛類可能會產生縮合反應並形成亞胺類物質，又稱為 schiff base，推論此反應可能為混合毒性產生拮抗之原因。
- (4) 在 isobologram 的分析部份，可觀察到 4-chloroaniline + 甲醛、3-chloroaniline + 戊二醛、3,4-dichloroaniline + 戊二醛三組混合試驗的部

份，圖上的數值有落在代表非交互作用的虛線範圍之外，因此可推定這些混合組別中有交互作用存在。而沒有觀察到有數值落在虛線範圍外的組別，我們也推論此情形是在非交互作用以及交互作用兩者綜合影響之下的結果。

- (5) 質譜儀分析的部份在 3-chloroaniline + 甲醛、4-chloroaniline + 甲醛、3-chloroaniline + 戊二醛、4-chloroaniline + 戊二醛的混合物分析中，皆有在單一分析未發現 peak 的分子量處，發現新物質之 peak，推斷這些混合物中應有新物質的產生，可能為造成毒性反應不符合非交互作用理論之原因。
- (6) 本研究中之醛腈類與苯胺類之混合試驗，其混合後之毒性效應為毒性相加或減弱之結果，表示此混合毒化物對水體環境的衝擊以及風險，較此兩類毒化物單一存在時還要來得小。



6.2 建議

混合毒性牽涉的因素非常複雜，除了毒化物本身在生物體分子作用的位置不同，毒化物間的化學反應、毒化物的降解、毒化物和環境間的反應、毒化物受生物體內生化系統酵素影響的化學反應，都是會造成複雜毒性效應的原因，未來在進行混合毒性的探討，應當納入更多可能造成複雜毒性效應之反應的考量，以免錯估混合毒性在環境中的風險。

參考文獻

- Akers KS, Sinks GD, and Schultz TW.** 1999. Structure- toxicity relationships for selected halogenated aliphatic chemicals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7:33-39.
- Altenburger R, Boedeker W, Faust M, and Grimme LH.** 1996. Regulations for combined effects of pollutants: consequences from risk assessment in aquatic toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 34(11-12): 1155-1157.
- Argese E, Bettiol C, Alfonso F, Zambon A, Mazzola M, and Ghirardini AV.** 2001. Assessment of chloroaniline toxicity by the submitochondrial particle assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(4):826-836.
- Arrhenius Å, Backhaus T, Grönvall F, Junghans M, Scholze M, and Blanck H.** 2006. Effect of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: mixture toxicity studies with TBT, Irgarol, and Sea-Nine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50:335-345.
- 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. Chem.* 23(2):258-264.
- Bliss CI.** 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26:585-615.
- Broderius SJ, Kahl MD, Elonen GE, Hammermeister DE, and Hoglund MD.** 2005. A comparison of the lethal and sublethal toxicity of organic Chemical mixtures to the fathead minnow (*pimephales promelas*).

Environ. Toxicol. Chem. 24:3117-3127.

Cedergreen N, Kamper A, and Streibig JC. 2006. Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aqua. Toxicol.* 78:243-252.

Chen CY and Chiou YS. 1995. Toxicity of binary mixtures of organic chemicals. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10:97-106.

Chen CY and Huang CF. 1996. Toxicity of organic mixture containing cyanogenic toxicants. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(9):1464-1469.

Chen CY, Ko CW, and Lee PI. 2007. Toxicity of substituted anilines to *Pseudokirchneriella subcapitata* and quantitative structure-activity relationship analysis for polar narcotics. *Environ. Toxicol. Chem.* 26:1158-1164.

Chen CY and Yeh JT. 1996. Toxicity of binary mixtures of reactive toxicants. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 11:83-90.

Chen H, Yao J, Wang F, Zhou Y, Chen K, Zhuang R, Choi MMF, and Zaray G. 2010. Toxicity of three phenolic compounds and their mixtures on the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 408:1043-1049.

Christensen ER and Chen CY. 1985. A general non-interactive multiple toxicity model including Probit, Logit, and Weibull transformations. *Biometrics.* 41:711-725.

Cormier MJ, Totten, and Rostorfer HH. 1956. Comparative studies on different bacterial luciferase preparations. *Arch. biochem. Biophys.* 63:414-426.

Cronin MTD and 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.

Dalzell DJB. 2002. A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere.* 47:535-45.

Dawson DA, Pösch G, and Schultz TW. 2006. Chemical mixture toxicity testing with *Vibrio fischeri*: Combined effects of binary mixtures for ten soft electrophiles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65:171-180.

Farre M and Barcelo D. 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends Anal. Chem.* 22(5):299-310.

Gaspara CL, Baldea I, and Paneac I. 2006. Kinetics of the formation of hemicyanine dyes by the condensation of Fischer's base aldehyde with anilines. *Dyes Pigm.* 69:45-53.

Gosetti F, Bottaro M, Gianotti V, Mazzucco E, Frascarolo P, Zampieri D, Oliveri C, Viarengo A, and Gennaro MC. 2010. Sun light degradation of 4-chloroaniline in waters and its effect on toxicity. A high performance liquid chromatography - Diode array - Tandem mass spectrometry study. *Environ. Pollut.* 158:592-598.

Greco WR, Bravo G, and Parsons JC, 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* 47:331-385.

Gunatilleka AD and Poole CF. 1999. Models for estimating the nonspecific aquatic toxicity of organic compounds. *Anal. Commun.* 36:235-242.

Hermens J, Canton H, Steyger N, and 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.

- Hewlett PS and Plankett RL.**1959. A united theory for quantal responses to mixtures of drugs: non-interactive action. *Biometrics*. 15:591-610.
- Jawecki GN and Sawicki J.** 2002. A comparison of sensitivity of spirotox biotest with standard toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:389-395.
- Liao YY, Wang LS, He YB, and Yang H.** 1996. Toxicity QSAR of substituted benzenes to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56:460-466.
- Lin Z, Wang L, Shi P, Zhao D, and Yin K.** 2004. Development of a fragment constant method for estimating the mixture toxicity. *Arch. Environ. Contam.* 46:1-7.
- Lin Z, Yin K, Shi P, Wang L, and Yu H.** 2003. Development of QSARs for predicting the joint effects between cyanogenic toxicants and aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* 16(10):1365-1371.
- Lipnick RL.** 1991. Outliers : their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity. *Sci. Total Environ.* 109:131-153.
- Liu SS, Song XQ , Liu HL, Zhang YH, and Zhang J.** 2009. Combined photobacterium toxicity of herbicide mixtures containing one insecticide. *Chemosphere.* 75:381-388.
- Lu GH, Wang AC, Tang ZY, and Guo XL.** 2007. Quantitative Structure-Activity Relationships for predicting the joint toxicity of substituted anilines and phenols to algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78:107-111.
- Nealson KH.** 1977. Autoinduction of bacterial luciferase. *Arch. Microbiol.* 112:73-79.
- Marnett LJ.** 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde.

Mutat. Res. 424:83-95.

- McElroy WD and Green A.** 1955. Enzymatic properties of bacterial luciferase. *Arch. biochem. Biophys.* 56:240-255.
- McElroy WD and Green A.** 1956. Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin. *Arch. biochem. Biophys.* 64:257-271.
- Neuwoehner J, Zilberman T, Fenner K, and Escher BI.** 2010. QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. *Aquat. Toxicol.* 97:58-67.
- O'Brien JP, Siraki AG, and Shangari N.** 2005. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit. Rev. Toxicol.* 35(7):609-662.
- Olmstead AW and Leblanc GA.** 2005. Joint action of polycyclic aromatic hydrocarbons: predictive modeling of sublethal toxicity. *Aquat. Toxicol.* 75:253-262.
- Patoczka J and Johnson RK.** 1995. Pretreatment of chemical wastewater for toxicity reduction. *Presented at 68th Annual Water Environment Federation Conference & Exposition. Killam Associates, 27 Bleeker St., Millburn, NJ 07041.*
- Parvez S, Venkataraman C, and Mukherji S.** 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ. Int.* 32:265-268.
- Pauluhn J.** 2004. Subacute inhalation toxicity of aniline in rats: analysis of time-dependence and concentration-dependence of hematotoxic and splenic effects. *Toxicol. Sci.* 81:198-215.
- Plackett RL and Hewlett PS.** 1952. Quantal responses to mixtures of Poison.

- J. Roy. Stat. Soc.* 14:141-163.
- Ragaini F and Cenini S.** 1999. Intermediate formation of anilines in the synthesis of Schiff bases from nitroarenes and aldehydes. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 144:405-410.
- Ren S and Frymier PD.** 2002. Modeling the toxicity of polar and nonpolar narcotic compounds to luminescent bacterial SHK1. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:2649-2653.
- Rucki M and Tichy M.** 2006. Partition coefficient K_{ow} of benzene, ethanol and aniline in benzene-ethanol and aniline-benzene mixtures and coefficient of distribution K_{mix} of these mixtures. *QSAR Comb. Sci.* 25(4):310-316.
- Saggiomo V and Luning U.** 2009. On the formation of imines in water—a comparison. *Tetrahedron Lett.* 50:4663-4665.
- Schuler LJ, Landrum PF, Harwood AD, Tripp EM, and Lydy MJ.** 2009. Joint toxicity of fluoranthene and pentachlorobenzene to *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutus*. *Chemosphere.* 77:399-403.
- Schultz TW, Sinks GD, and 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:51–109.
- Tsai KP and Chen CY.** 2007. An algal toxicity database of organic toxicants derived by a closed-system technique. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(9):1931-1939.
- Verhaar HJM, Van Leeuwen CJ, and Hermens JLM.** 1992. Classifying environmental pollutants. Structure-activity relationships for prediction of aquatic toxicity. *Chemosphere.* 25:471-491.
- Veith GD, Call DJ, and Brooke LT.** 1983. Structure-toxicity relationships for

the fathead minnow, *Pimephales promelas*: Narcotic industrial chemicals.
Can. J. Fish Aquat. Sci. 40:743-748.

Zhao YH, Yuan X, Su LM, Qin WC, Abraham MH. 2009. Classification of toxicity of phenols to *Tetrahymena pyriformis* and subsequent derivation of QSARs from hydrophobic, ionization and electronic parameters.
Chemosphere. 75:866-871.

洪東榮. 中國醫藥大學附設醫院毒物科暨毒藥物諮詢檢驗中心網站-氰化物中毒的診斷與救治. 網址：

http://www.cmuh.cmu.edu.tw/cmuh/introduction/layout_2/?did=10124&id=867



附錄一 單一毒性原始數據

Formaldehyde			Formaldehyde		
Conc (mg/L)	Initial light	Final light	Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	99.58	76.84	Control	92.49	71.96
27.6	88.14	10.27	36	96.46	8.08
13.8	88.07	18.33	18	92.26	15.11
6.9	89.92	32.43	9	92.54	27.54
3.45	93.48	50.28	4.5	91.66	40.1
1.73	84	62	2.25	103	56
0.86	89	68	1.13	95	59

Formaldehyde			Formaldehyde		
Conc (mg/L)	Initial light	Final light	Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	88.82	68.83	Control	97.73	70.07
31.8	81.01	7.68	36	93.9	7.57
15.9	83.84	15.66	18	96.24	15.93
7.95	82.81	28.03	9	94.72	26.72
3.98	80.72	39.41	4.5	98.24	44.18
1.99	84	56	2.25	99	56
0.99	88	62	1.13	97	65

Formaldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	92.73	74.06
36	94.98	6.56
18	92.61	14.33
9	92.26	25.07
4.5	98.73	39.49
2.25	101	56
1.13	100	66

Propionaldehyde

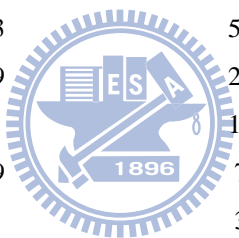
Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	82.51	69.12
1025.55	84.03	11.21
512.78	86.85	20.79
256.39	79.75	30.31
128.19	81.68	43.01
64.1	92	54
32.05	88	59

Propionaldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	93.79	68.99
805.86	98.83	12.23
402.93	89.04	20.69
201.47	92.51	33.1
100.73	95.82	47.69
50.37	96	58
25.18	94	63

Butyraldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	82.83	64.98
591.75	75.95	13
295.88	81.12	22.64
147.94	74.15	29.57
73.97	77.75	38.49
36.98	85	49
18.49	84	56



Glutaraldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	96.32	80.21
26.76	90.8	7.66
13.38	93.59	16.48
6.69	86.97	27.32
3.35	91.48	41.59
1.67	94	59
0.84	94	70

Glutaraldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	95.62	76.71
24	84.85	5.44
12	84.56	13.82
6	86.87	25.82
3	92.26	41.55
1.5	84	48
0.75	91	62

Glutaraldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	95.53	71.41
20.84	93.91	13
10.42	88.92	18.67
5.21	102.32	34.24
2.6	94.53	43.99
1.3	103	56
0.65	96	65

Glutaraldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	90.53	72.94
21	91.92	6.4
10.5	87.42	15.09
5.25	92.09	29.75
2.63	96.18	46.99
1.31	103	61
0.66	93	66

Glutaraldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	87.34	69.26
31.54	96.63	3.18
15.77	89.88	10.44
7.84	84.95	19.73
3.94	91.19	31.66
1.97	93	45
0.99	84	52

Glutaraldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	94.88	69.9
21	109.09	7.07
10.5	95.69	16.34
5.25	96.77	28.94
2.63	83.92	38.59
1.31	90	56
0.66	107	70



Glutaraldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	95.69	78.17
27.08	99.05	9.17
13.54	98.51	19.75
6.77	98.02	33.77
3.38	94.91	47.33
1.69	97	57
0.85	98	66

Glutaraldehyde

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	90.42	73.5
19.44	88.97	11.53
9.72	86.11	20.98
4.86	83.85	30.36
2.43	94.85	47.02
1.22	100	61
0.61	96	67

Acetonitrile

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	91.13	79.94
120000	85.4	0.08
60000	81.68	0.48
30000	93.44	14.19
15000	90.68	50.58
7500	93	79
3750	96	88

Acetonitrile

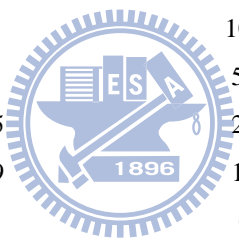
Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	90.68	73.67
108000	92.54	0.01
54000	93.52	1.02
27000	92.81	14.74
13500	86.37	48.85
6750	94	74
3375	92	78

Acetonitrile

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	88.77	79.91
108000	95.81	0.11
54000	87.63	1.02
27000	92.66	16.25
13500	94.36	53.69
6750	90	79
3375	77	68

Acetonitrile

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	90.86	88.48
108000	90.29	0.04
54000	85.94	0.92
27000	86.88	17.82
13500	86.89	64.01
6750	97	86
3375	97	94



Malononitrile

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	93.39	69.42
1499	89.11	3.41
749.5	91.85	9.96
374.75	87.41	23.74
187.38	93.92	39.85
93.69	88	52
46.84	92	62

3-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	91.13	80.37
92.09	91.83	20.47
46.04	90.3	27.66
23.02	91.53	37.85
11.51	94.18	52.06
5.76	92	69
2.88	97	77

3-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	99.65	80.89
155.13	97.27	16.6
57.57	89.28	21.64
28.78	89.27	28.54
14.39	95.46	44.98
7.2	97	62
3.6	99	76

3-Chloroaniline

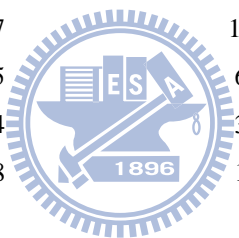
Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	90.27	77.06
151.97	94.84	13.73
75.98	89.24	18.71
37.99	92.92	26.75
18.99	94.2	39.69
9.5	95	59
4.75	103	68

3-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	87.32	72.47
111.46	83.67	16.17
55.73	84.2	20.45
27.87	80.54	29.44
13.93	85.45	44.08
6.97	85	59
3.48	87	66

3-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	94.85	75.2
135.51	90.88	14.47
67.75	91.2	18.16
33.88	85.35	25.49
16.94	89.21	39.62
8.47	95	58
4.23	95	66



3-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	89.37	77.52
154.36	81.73	12.36
77.18	78.46	16.38
38.59	79.59	23.01
19.29	86.1	37.83
9.56	92	55
4.82	88	64

3-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	81.6	66.66
145.58	88.57	13.86
72.79	88.8	18.29
36.39	81.14	25.19
18.2	82.24	34.1
9.1	83	46
4.55	84	56

3-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	93.98	77.03
156.51	91.89	12.87
78.26	90.38	16.46
39.13	91.8	25.36
19.56	90.92	36.6
9.78	90	52
4.89	93	64

4-Chloroaniline

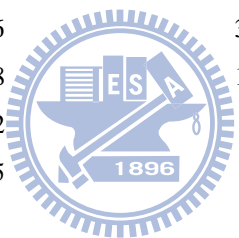
Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	100.56	81.2
29.61	82.82	11.45
14.81	93.86	18.75
7.4	91.43	30.13
3.7	95.33	45.67
1.85	93	64
0.93	95	73

4-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	97.93	85.97
30.48	96.06	11.06
15.24	89.55	16.78
7.62	89.27	26.22
3.81	86.69	40.25
1.9	89	57
0.95	101	78

4-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	91.21	83.82
36.68	86.36	9.78
18.34	82.93	14.95
9.17	86.27	24.77
4.59	91.67	40.33
2.29	90	58
1.15	84	67



4-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	98.92	90.99
30.48	94.35	13.98
15.24	77.74	17.96
7.62	87.78	30.71
3.81	94.28	49.7
1.9	97	68
0.95	92	76

4-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	86.58	75.45
35.67	64.31	9.07
17.84	83.79	16.86
8.92	84.21	26.53
4.46	91.15	43.46
2.23	88	55
1.11	84	62

4-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	91.91	77.05
23.02	89.77	13.54
11.51	92.83	21.91
5.75	93.82	34.23
2.88	89.42	48.07
1.44	95	63
0.72	89	68

4-Chloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	97.28	73.78
28.96	96.74	11.72
14.48	95.85	17.88
7.24	100.16	28.87
3.62	87.94	37.54
1.81	96	52
0.9	93	57

2,4-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	95.53	79.09
26.24	85.15	9.09
13.12	89.72	18.4
6.56	87.38	33.67
3.28	94.03	54.47
1.64	103	79
0.82	97	82

2,4-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	94.47	84.82
29.69	85.68	7.64
14.85	88.1	14.91
7.42	89.72	27.36
3.71	85.81	47.24
1.86	95	64
0.93	96	73



2,4-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	89	81.75
28.02	93.71	10.34
14.01	88.48	17.25
7	89.53	30.4
3.5	91.95	49.2
1.75	99	69
0.88	95	75

2,4-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	88.71	79.34
27.22	92.33	8.44
13.61	88.47	15.01
6.81	110.9	32.02
3.4	92.49	47.81
1.7	92	65
0.85	90	74

2,5-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	99.08	85.32
26.37	93.9	11.4
13.19	93.58	21.62
6.59	107.48	38.25
3.3	97.78	54.12
1.65	94	69
0.83	95	74

2,5-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	84.46	70.77
24.35	82.26	7.25
12.18	79.37	14.95
6.09	78.48	30.36
3.04	77.38	47
1.52	82	61
0.76	86	67

2,6-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	93.85	76.63
11.8	90.07	8.8
5.9	89.74	16.99
2.95	87.63	31.22
1.47	91.58	50.33
0.74	98	66
0.37	96	73

2,6-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	97.96	84.69
9.88	96.49	8.23
4.94	101.45	16.57
2.47	105.04	30.97
1.24	108.74	47.62
0.62	103	62
0.31	106	75



2,6-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	84.36	78.22
10.96	88.94	10.08
5.48	82.83	17.85
2.74	80.5	31.59
1.37	85.32	48.43
0.69	92	64
0.34	97	74

3,4-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	88.4	83.24
3.9	92.86	19.91
1.95	88.74	28.67
0.98	93.27	41.74
0.49	94.68	56.68
0.24	90	72
0.12	92	74

3,4-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	100.57	85.65
3.73	89.58	14.56
1.87	81.97	20.57
0.93	95.29	35.05
0.47	87.93	49.59
0.23	93	60
0.12	94	72

3,4-Dichloroaniline

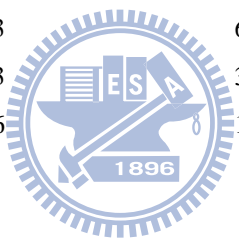
Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	89.69	83.32
5.06	94.13	11.95
2.53	89.55	17.97
1.27	87.69	29.12
0.63	93.35	46.26
0.32	95	58
0.16	101	74

3,4-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	93.64	73.21
4.18	91.52	12.73
2.09	90.38	19.53
1.05	87.81	29.06
0.53	85.01	44.7
0.27	95	56
0.14	97	64

3,5-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	97.47	94.44
62.76	96.83	14.61
31.38	100.23	26.14
15.69	96.74	38.54
7.85	98.47	57.41
3.92	99	76
1.96	89	75



3,5-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	90.72	75.55
73.01	94.05	11.26
36.51	96	19.41
18.25	87.16	31.29
9.13	89.52	47.95
4.56	103	63
2.28	94	72

3,5-Dichloroaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	95.54	86.88
54.64	95.81	16.81
27.32	87.56	30.06
13.66	85.07	47.92
6.83	87.73	61.27
3.42	96	81
1.71	88	76

2-Bromoaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	89.76	76.75
68.76	95.45	10.63
34.38	90.24	18.14
17.19	89.43	31.13
8.6	84.82	48.58
4.3	90	62
2.15	97	71

2-Bromoaniline

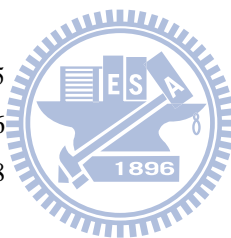
Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	98.46	78.67
94.8	92.14	6.33
47.4	91.51	12.78
23.7	92.43	26.09
11.85	101.65	42.59
5.93	95	61
2.96	92	72

2-Bromoaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	100.45	84.82
78.46	99.16	9
39.23	90	15.55
19.61	89.7	30.56
9.8	94.8	49.38
4.9	96	67
2.45	99	80

2-Bromoaniline

Conc (mg/L)	Initial light	Final light
Control	101.46	88.99
72	100.17	8.37
36	95	16.41
18	85.2	28.22
9	102.7	52.4
4.5	112	77
2.25	115	89



附錄二 混合毒性原始數據

Formaldehyde+3-Chloroaniline
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	103.05	85.88
0.125	91	77
0.25	103	81
0.5	87.39	58.12
1	81.7	43.6
2	88.88	25.8
4	99.74	15.16

Formaldehyde+3-Chloroaniline
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	92.33	83.28
0.125	95	83
0.25	94	79
0.5	87.36	65.26
1	92.82	50.09
2	89.82	29.04
4	89.21	14.27

Formaldehyde+3-Chloroaniline
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	94.79	76.39
0.125	99	76
0.25	97	72
0.5	88.92	57.6
1	87.02	41.36
2	87.05	23.64
4	88.42	13.08

Formaldehyde+3-Chloroaniline
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	94.76	84.46
0.125	94	81
0.25	97	79
0.5	95.79	62.77
1	97.49	41.05
2	92.81	22.42
4	94	12.03

Formaldehyde+4-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	99.65	86.86
0.125	99	88
0.25	103	88
0.5	96.04	70.06
1	98.13	51.19
2	94.39	31.24
4	93.49	14.83

Formaldehyde+3,4-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	98.5	94.75
0.125	108	86
0.25	95	79
0.5	92.17	68.35
1	91.81	47.96
2	95.45	30.64
4	97.28	17.44

Formaldehyde+4-Chloroaniline

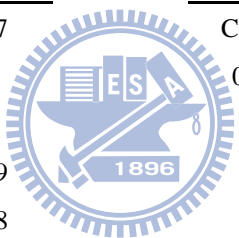
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	91.95	84.97
0.125	98	87
0.25	101	87
0.5	86.54	63.99
1	88.97	41.88
2	93.35	22.01
4	96.4	10.94

Formaldehyde+3,5-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	98.69	98.02
0.125	100	93
0.25	107	92
0.5	100.4	70.61
1	93.91	48.13
2	88.88	33.17
4	96.11	19.01



Formaldehyde+2,4-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	96.23	91.11
0.125	93	76
0.25	97	77
0.5	95.4	72.33
1	87.24	49.35
2	91.75	31.86
4	95.49	15.94

Formaldehyde+2-Bromoaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	97.64	91.19
0.125	91	84
0.25	94	82
0.5	93.72	63.2
1	90.3	46.98
2	90.5	28.1
4	93.55	12.99

Glutaraldehyde +3-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	89.48	79.64
0.125	91	78
0.25	85	72
0.5	88.59	57.38
1	80.27	35.75
2	86.26	22.15
4	81.88	9.87

Glutaraldehyde +4-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	97.69	89.36
0.125	92	80
0.25	98	80
0.5	97.85	62.28
1	93.6	42.28
2	88.39	23.09
4	83.83	10.21

Glutaraldehyde +3-Chloroaniline

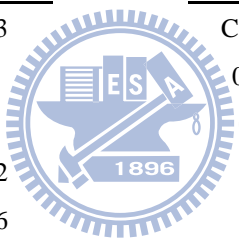
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	90.8	73.83
0.125	92	69
0.25	98	67
0.5	93	54.62
1	92.04	38.36
2	85.89	21.21
4	88.05	11.69

Glutaraldehyde +4-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	91.55	72.47
0.125	92	70
0.25	88	65
0.5	86.72	51.94
1	78.18	37.22
2	82.82	25.11
4	79.74	13.03



Glutaraldehyde +3-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	94.68	90.51
0.125	97	87
0.25	99	81
0.5	89.73	60.53
1	88.94	43.53
2	90.22	26.07
4	92.69	14.54

Glutaraldehyde +4-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	102.01	80.4
0.125	91	68
0.25	101	69
0.5	96.52	54.12
1	93.88	39.74
2	95.95	24.47
4	95.9	12.45

Glutaraldehyde +4-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	100.5	97.5
0.125	98	87
0.25	103	86
0.5	96.02	68.97
1	99.07	50.97
2	86.87	27.91
4	103.43	15.5

Glutaraldehyde +2,5-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	97.18	94.97
0.125	105	85
0.25	108	76
0.5	92.86	55.61
1	86.93	33.01
2	89.55	15.17
4	85.43	6.16

Glutaraldehyde +2,4-Dichloroaniline

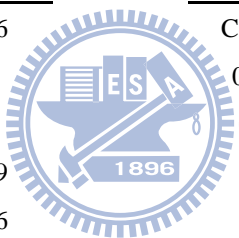
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	91.44	84.96
0.125	99	78
0.25	102	73
0.5	90.2	58.79
1	85.8	35.16
2	87.95	18.01
4	86.31	7.55

Glutaraldehyde +2,6-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	91.44	87.94
0.125	88	79
0.25	96	79
0.5	90.52	61.23
1	88.24	45.98
2	89.39	29.44
4	88.45	15.31



Glutaraldehyde +2,4-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	99.21	93.47
0.125	101	84
0.25	103	81
0.5	99.47	63.31
1	97.35	48.56
2	95.73	24.82
4	100.83	11.72

Glutaraldehyde +2,6-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	100.34	100.33
0.125	95	87
0.25	104	84
0.5	97.27	64.58
1	82.94	48.23
2	95.99	34.98
4	96.64	18.5

Glutaraldehyde +3,4-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	86.87	73.55
0.125	90	70
0.25	88	65
0.5	84.58	53.07
1	77.23	37.69
2	76.59	21.21
4	80.86	12.03

Glutaraldehyde +3,5-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	96.21	89.59
0.125	110	90
0.25	100	83
0.5	98.93	70.76
1	91.54	47.11
2	97.07	31.66
4	98.13	16.13

Glutaraldehyde +3,4-Dichloroaniline

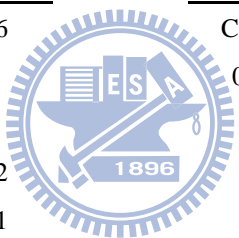
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	102.86	91.36
0.125	97	79
0.25	97	76
0.5	102.51	64.72
1	100.76	49.91
2	93.9	31.41
4	98	17.08

Glutaraldehyde +2-Bromoaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	103.46	91.57
0.125	98	81
0.25	97	78
0.5	97.69	57.84
1	87.12	34.5
2	84.38	16.83
4	88.21	7.43



Glutaraldehyde +3,4-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	98.74	87.19
0.125	103	85
0.25	105	78
0.5	101.25	62.84
1	92.2	46.21
2	91.21	32.21
4	94.97	19.26

Glutaraldehyde +2-Bromoaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	96.1	93.47
0.125	89	85
0.25	92	79
0.5	99.78	65.98
1	91.23	43.57
2	85.11	19.61
4	88.48	8.87

Glutaraldehyde +2-Bromoaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	91.81	79.46
0.125	90	71
0.25	92	67
0.5	90.9	55.46
1	86.64	36.26
2	87.5	20.29
4	91.55	9.57

Propionaldehyde +4-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	89.02	80.71
0.125	84	68
0.25	90	59
0.5	93.53	59.05
1	85.26	39.99
2	93.12	28.13
4	97.19	19.16

Propionaldehyde +3-Chloroaniline

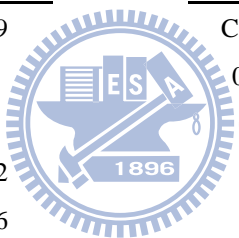
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	91.94	87.89
0.125	91	85
0.25	92	82
0.5	97.6	74.62
1	84.63	52.56
2	90.79	36.65
4	84.47	24.95

Propionaldehyde +3,4-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	92.73	77.84
0.125	88	72
0.25	86	68
0.5	89.31	51.93
1	86.68	38.32
2	87.4	28.67
4	83.56	18.43



Propionaldehyde +3-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	95.63	82.78
0.125	95	76
0.25	95	70
0.5	93.69	59.9
1	89.91	45.56
2	93.45	31.38
4	90.69	21.44

Butyraldehyde +2,4-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	95.82	92.14
0.125	98	81
0.25	100	78
0.5	92.53	65.42
1	82.98	49.33
2	91.85	35.86
4	89.39	25.66

Butyraldehyde +2,5-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	91.72	77.32
0.125	100	83
0.25	100	77
0.5	93.44	61.36
1	88.34	42.42
2	85.55	25.96
4	86.6	17.37

Acetonitrile +4-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	102.53	87.83
0.125	116	98
0.25	108	94
0.5	96.39	93.42
1	97.93	78.95
2	93.38	43.02
4	100.81	8.3

Butyraldehyde +2-Bromoaniline

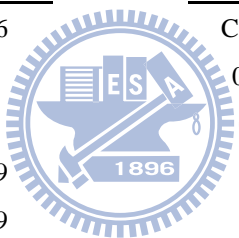
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	96.16	90.36
0.125	93	87
0.25	96	85
0.5	80.06	56.59
1	85.81	51.79
2	84.47	32.29
4	83.76	23.53

Acetonitrile +2,4-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	102	89.04
0.125	93	86
0.25	97	92
0.5	97.08	94.22
1	97.88	81.65
2	94.4	40.63
4	89.41	6.92



Acetonitrile +3-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	94.8	86.51
0.125	80	77
0.25	101	89
0.5	88.74	83.64
1	83.9	76.03
2	85.6	38.49
4	81.35	7.09

Acetonitrile +2-Bromoaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	89.76	91.6
0.125	96	102
0.25	96	98
0.5	95.95	98.21
1	93.18	77.45
2	86.32	37.62
4	89.82	6.07

Malononitrile +3-Chloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	96.86	91.85
0.125	101	91
0.25	91	79
0.5	96.5	64.64
1	95.47	54.06
2	93.55	35.18
4	97.12	20.69

Malononitrile +2,4-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	97.57	96.12
0.125	98	84
0.25	87	72
0.5	95.27	71.02
1	89.53	51.97
2	90.61	33.6
4	92.31	18.79

Malononitrile +4-Chloroaniline

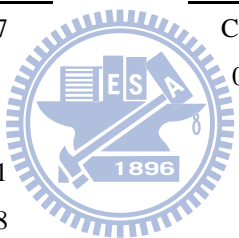
(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	95.15	92.27
0.125	94	85
0.25	94	81
0.5	89.83	61.81
1	90.67	51.78
2	88.44	31.92
4	90.68	19.76

Malononitrile +2,6-Dichloroaniline

(TU= 1:1)

TU	Initial light	Final light
Control	100.68	93.38
0.125	100	85
0.25	101	82
0.5	98.87	66.7
1	92.53	49.69
2	94.31	34.37
4	93.71	18.49



附錄三 HPLC分析之檢量線

