

國立交通大學
環境工程研究所
碩士論文

以水蚤毒性試驗評估

有機毒物之混合毒性研究



Individual and Combined Toxic Effects of Chloroacetonitrile,
Aniline, and Malathion on Water flea

研究生：袁慈君

指導教授：陳重元教授

中華民國一百零二年二月

以水蚤毒性試驗評估有機毒物之混合毒性研究

Individual and Combined Toxic Effects of Chloroacetonitrile,
Aniline, and Malathion on Water flea

研究生：袁慈君

Student：Tsz-Jiun Yuan

指導教授：陳重元

Advisor：Dr. Chung-Yuan Chen

國立交通大學

環境工程研究所



Submitted to Department of Environmental Engineering
College of Engineering
National Chiao Tung University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master
in
Environmental Engineering

February 2013
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百零二年二月

以水蚤毒性試驗評估有機毒物之混合毒性研究

學生：袁慈君

指導教授：陳重元

國立交通大學環境工程研究所

摘要

本研究利用水蚤 48 小時急毒性試驗與 21 天慢毒性試驗來評估極性麻醉物-苯胺類和反應性有機物-腈類與殺蟲劑之混合毒性效應。

根據 Chen & Yeh (1996) 的研究，當兩毒性物質的劑量反應曲線之斜率甚小時，容易呈現協同作用；反之，若兩毒性物質之中有一個的劑量反應曲線之斜率甚大時，則易產生拮抗作用。在本研究的結果發現，小斜率的 Aniline 和大斜率的 Chloroacetonitrile 混合後卻呈現協同的效應，且三組的混合急毒性試驗都不符合混合預測模式的結果；isobologram 中也發現 Chloroacetonitrile+Malathion、Aniline+Malathion 的混合呈現出不符合非交互作用理論的圖形。

慢毒性混合試驗中發現，Chloroacetonitrile+Malathion 可能在極低的暴露濃度下，便會對環境生物造成影響。在環境風險評估方面，利用急毒性數據(EC_{10})取代慢毒性數據(NOEC)計算 ACR 值，可能會低估毒性物質在環境中的慢毒性影響。

Individual and Combined Toxic Effects of Chloroacetonitrile, Aniline, and Malathion on Water flea

Student : Tsz-Jiun Yuan

Advisor : Dr. Chung-Yuan Chen

Institute of Environmental Engineering
National Chiao-Tung University

Abstract

This study is using *Daphnia magna* 48hr-acute toxicity tests and 21days-chronic tests to evaluate the combined toxic effects of polar narcotic toxicant aniline and reactive organics nitrile and insecticide.

According to the study of Chen and Yeh(1996), greater- than-additive (synergistic) effects will perform when two toxicants have different mechanisms and the flat concentration-response curves mixed. By contrast, if one of the toxicants has steep curve, less-than-additive (antagonistic) will appear. We could find the toxicity test of this research are not corresponding with the above literature result. And the results of combined acute toxicity tests are not conform with the prediction by RA model.

In the combined chronic toxicity tests, the group of Chloroacetonitrile and Malathion may perform danger effects to environmental organisms. The environmental risk assessments of the present study reveals the chronic toxicity effects may be underestimated by using EC_{10} value instead of NOEC value.

致謝

二年半修業期間承蒙恩師陳重元教授悉心指導，使我在研究領域上增長許多，也給予我許多寶貴的意見，讓我的論文得以順利完成。亦感謝口試委員陳文欽教授及吳南明教授在口試時對學生及本研究的指導和建議。

謝謝實驗室的大小小，詔蔡學姊和學弟妹們的幫忙及鼓勵，還有同學筱涵和小孟的協助，讓我得以在研究期間順利地學習與玩樂。而大學同學們偶爾的噓寒問暖也令我在繁忙的研究生活中找到樂趣。還有我最喜愛的女籃校隊，在我忙碌的研究生活中多添一絲的緊張與充實感，謝謝鄭智仁教練很體諒研究生的困難，也對我很好的，以及球隊裡學妹的熱心與陪伴還有說走就走陪我瘋很久，讓我在研究與籃球間可以很開心的兩者兼顧。還有認識很久的林郁珊小姐，常常讓我罵東罵西，亂碎嘴一通，偶爾收留我讓我在夜晚不寂寞，沒有妳，這段日子我會好無力。

還要感謝我親愛的家人，尤其是爸爸和阿姨，總是在我無理的要求下容忍我，默默地當我的精神支柱，讓我順利完成學業研究。最後還要感謝親愛的媽媽，謝謝妳從小就無怨無悔支持我任何一項決定，雖然妳來不及看到我畢業，但是我已經完成了承諾，相信你看的到。

這段求學時期很精彩，很辛苦但也很快樂，學到很多事情，交到很多好朋友，相信我在此學到的能力一定可以在日後的職場上發揮。

目錄

摘要.....	i
Abstract.....	ii
致謝.....	iii
目錄.....	iv
表目錄.....	viii
圖目錄.....	ix
第一章 前言.....	1
1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究目的.....	2
1.3 研究架構.....	3
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 水蚤毒性試驗.....	4
2.1.1 試驗物種簡介.....	4
2.1.2 水蚤毒性試驗方法.....	5
2.2 有機物毒性作用機制.....	6
2.3 混合毒性.....	8
2.3.1 Isobologram.....	10
2.3.2 混合毒性模式之探討.....	11

2.4	環境影響評估	12
2.4.1	急慢毒性比值(Acute and chronic ratio , ACR).....	14
2.5	毒性化學物質	14
2.5.1	毒性物質—腈類	14
2.5.2	毒性物質—苯胺類	15
2.5.3	毒性物質—有機磷殺蟲劑	16
第三章	基本理論	18
3.1	毒性物質劑量-反應關係	18
3.2	混合毒性理論	19
3.2.1	反應性毒物反應機制	19
3.2.2	非交互作用混合毒性理論	19
3.2.3	交互作用毒性理論	20
3.2.4	混合毒性效應與 ρ 、 λ 的關係	20
3.3	混合毒性試驗指標	22
3.4	Isobologram	23
第四章	材料與方法	24
4.1	實驗設備	25
4.2	試驗毒物	26
4.3	水蚤毒性試驗	28

4.3.1 實驗前準備	28
4.3.2 48 小時急毒性試驗流程	30
4.3.3 21 天慢毒性試驗流程	31
4.3.4 品質管制	32
4.4 藥品混合方式	32
4.5 實驗數據處理	33
第五章 結果與討論	39
5.1 單一毒性試驗結果	39
5.2 混合毒性試驗結果	52
5.3 Isobologram.....	65
5.4 急慢毒性比值(Acute and Chronic Ratio , ACR).....	68
第六章 結論與建議	70
6.1 結論	70
6.2 建議	71
第七章 參考文獻	72
附錄一 單一毒性原始數據	75
附錄二 混合急毒性原始數據	78
附錄三 單一慢毒性原始數據	81
附錄四 混合慢毒性原始數據	84

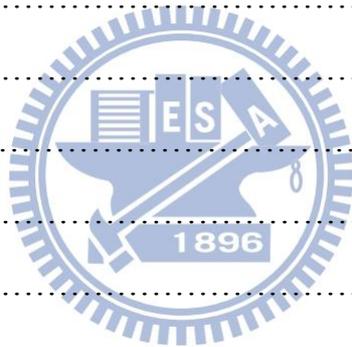
附錄五 Dunnett's test 運算表使用87

附錄六 Daphnia 毒性試驗品質管制圖88



表目錄

表 2.3.1.1	11
表 3.2.4.1	22
表 4.2.1	27
表 4.3.1.1	28
表 4.3.1.2	28
表 4.3.1.3	29
表 5.1.1	40
表 5.1.2	41
表 5.1.3	44
表 5.1.4	45
表 5.1.5	49
表 5.2.1	53
表 5.2.2	56
表 5.2.3	58
表 5.2.4	60
表 5.4.1	68



圖目錄

圖 1.3.1	3
圖 2.1.1.1	5
圖 2.4.1	13
圖 2.5.1.1	15
圖 2.5.2.1	16
圖 2.5.3.1	16
圖 5.1.1	41
圖 5.1.2	42
圖 5.1.3	42
圖 5.1.4	46
圖 5.1.5	46
圖 5.1.6	47
圖 5.1.7	47
圖 5.1.8	50
圖 5.1.9	50
圖 5.1.10.....	51
圖 5.1.11.....	51
圖 5.2.1	54
圖 5.2.2	54
圖 5.2.3	55
圖 5.2.4	55
圖 5.2.5	57
圖 5.2.6	57

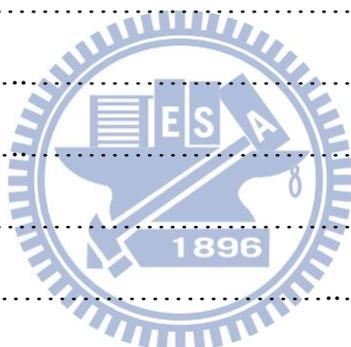


圖 5.2.7	58
圖 5.2.8	61
圖 5.2.9	62
圖 5.2.10.....	62
圖 5.2.11.....	63
圖 5.2.12.....	64
圖 5.2.13.....	64
圖 5.2.14.....	65
圖 5.3.1	66
圖 5.3.2	66
圖 5.3.3	67



第一章 前言

1.1 研究緣起

隨著工業的蓬勃發展，加上科技的日新月異，愈來愈多的工業使用人造合成化學物質，使得工業排放廢水或是家庭污水中的污染物組成有很大的變異，加上環境生態保護評估的標準尚未完善，使得環境污染負荷日益加重，且這些污染物並非以單一形式存在排放廢水中，而是以共同存在的方式呈現出對環境的影響，例如有研究指出，在美國 139 條監測溪流中就有約莫 1/3 是含有 10 種以上不同種類的化學物質，像是藥物、工業化學物質或是農藥等等[1]。在分析這種具高度複雜性的環境水體時，除了考慮傳統水質參數，更需要考量到這些污染物對生態環境及人體健康的影響性。有鑑於此，便發展出一套以生物為指標的毒性試驗(bioassay)，以輔助化學檢測能力之不足。

近數十年來，這種混合式暴露的毒性效應研究一直持續進行中，也愈來愈被重視，且環境中的有機污染物會因種類不同而隨著不一樣的生物化學作用，例如降解或是加成等等，產生出其他我們無法預測的有機毒化物，而使得其原本的毒性增高或降低[2, 3]。

一般，用於環境毒性風險評估的毒性預測模式都是以單一化學物質為主，但環境中的水生生物不單單只會暴露在單一毒性物質中，而是同時暴露於多種毒化物的混合物中，所以單純用模式預測的毒性會跟混合物實際呈現出的毒性不相符合[4]。目前國內現行的放流水管制規範也只針對單一毒性物質的放流濃度，但成分複雜的污水中含有潛在的混合毒性效應，可能導致最終放流時的毒性濃度增強，所以利用故有法規來規範這種非單一化學物的排放，應考慮其適用性是否足夠，且對於混合後的效應也須更進一步的研究與探討。

實際上，環境毒性風險評估應以慢毒性的試驗結果當作評估毒化物進入水體環境所造成之影響的標準，但由於慢毒性的測試時間需長達幾個月，甚至半年至一年，故實際應用上是不符合效率和成本的，因此，便利用測試時間較短的急毒性試驗當作替代，讓我們能在最短時間內了解毒化物對生物體所造成的急性毒性危害，得以快速地對這些毒化物加以管制防範。近十年來，除了急毒性之外，亦有學者利用試驗物種本身的生理參數當作毒性試驗終點，去研究毒性物質對試驗物種的生理機能或行為的變異度。此類的亞急毒性試驗能在不超過毒性物質致死量下得到結果，即比起急毒性，亞急毒性試驗更能評估到環境中以低濃度存在的毒化物質影響性，例如：C. Barata [5]的研究中證明，假設複雜的混合物以低濃度存在於環境中，則利用水蚤餵食抑制的亞急毒性試驗結果比水蚤 48 小時急毒性的試驗結果還來的顯著。

本研究採用浮游動物—水蚤(*Daphnia magna*)作為毒性試驗物種，其具有繁衍快速、生長周期短、適應不良環境能力高等優點，比起其他生物毒性試驗物種(例如：魚類急毒性、米蝦急毒性)的取得和繁殖更加便利，且在水生食物網中佔有一重要地位，為魚類和脊椎動物類主要食物來源。

在過去混合毒性的研究中，大部分都以麻醉性毒化物為主要探討對象，且不同機制間的毒性混合效應亦較少被研究，尤其以反應性和急性麻醉性毒化物之混合最少[6]。在Chen & Yeh[7]的研究中發現含氰基(-CN)有機物與其他反應性有機物混合時，具有強烈的協同現象(synergism)，這表示此類化學物質對水體環境具有危害性。而根據Manon Vaal [8]的研究，毒性機制為極性麻醉性的苯胺類，對水蚤具有特殊作用機制。故本研究採取含氰基之腈類、苯胺類及有機磷殺蟲劑這三種對水蚤具有特殊毒害機制的有機物互相混合，進行毒性研究。

1.2 研究目的

1. 利用二種水蚤毒性試驗對不同毒性機制的有機物進行單一及混合毒性測試，以取得毒性數據作比較。
2. 提供混合毒性結果予毒性資料庫做為參考數據，亦可作為環境毒性風險評估的參考資料。

1.3 研究架構

一開始先從參考文獻中收集相關資料及毒性數據，決定預擬實驗的毒性化學物質，再整理出相關的物化參數資料和文獻，並進一步建構出實驗方法、目的，最後就實驗結果去做分析討論以完成整個毒性試驗流程。試驗流程如圖 1.3.1 所示。

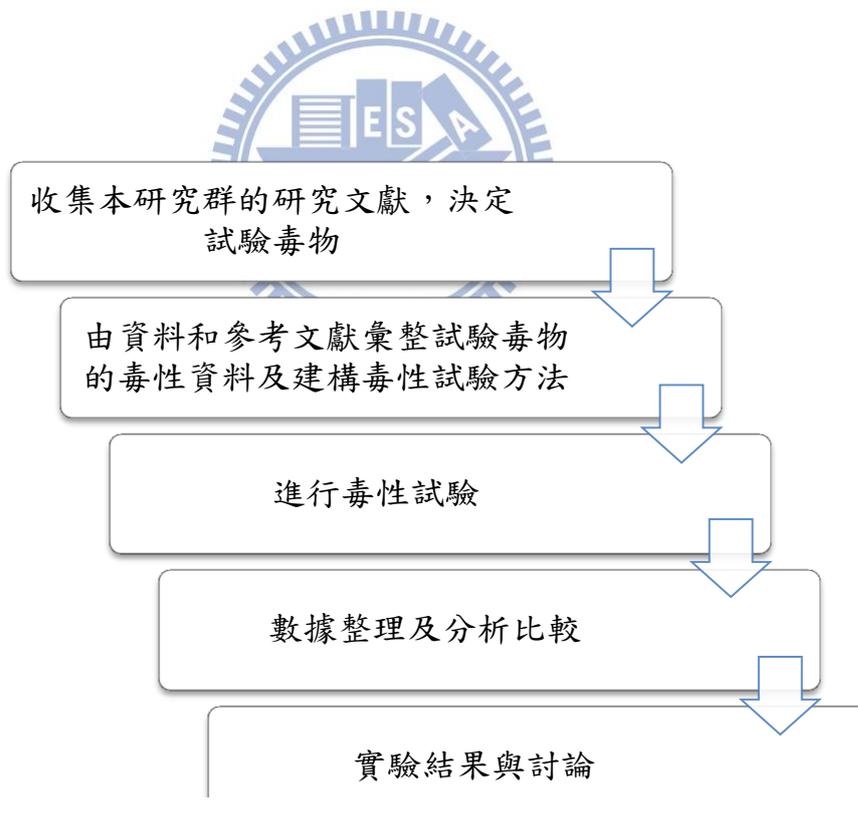


圖 1.3.1 實驗流程圖

第二章 文獻回顧

2.1 水蚤毒性試驗

2.1.1 試驗物種簡介

本實驗採用的試驗物種為水蚤(*Daphnia magna*)，其為 OECD 及 US.EPA 等國際組織所採用的水生生物毒性試驗標準物種之一，亦為我國生物毒性試驗的標準物種。本研究室於 2011 年 1 月份向環境檢驗所取得。*Daphnia magna* 是屬於甲殼綱(Crustacea)枝角目(Cladocera)的淡水類浮游動物，為濾食性，主要食物來源為水中的懸浮顆粒，如：藻、菌或死亡的有機物質，為水生生物食物鏈中的重要環節[9]。水蚤體型短小、左右兩側略為圓扁，被兩片透明軟殼包覆住，體長約 0.2~5mm，其特殊的跳躍式游泳方式使牠們被稱作水蚤(water flea)，體色大多透明無色，故易於觀察其卵的生長情況。水蚤族群大部分都是行孤雌生殖，所產的卵稱“夏卵”，不需受精，可直接在育兒室中發育為小水蚤。若是生長環境變差，如溫度急遽變化、食物短缺或是族群密度過高，都會讓水蚤從孤雌生殖轉變為有性生殖，而產生“冬卵”，又稱休眠卵，冬卵的特徵為周圍有堅硬的卵鞍(ephippium)保護，會於水蚤脫殼時排出並沉積在水底。水蚤在水生毒性試驗已有多年歷史，其原因包括，在水中有完整的生命週期、產量多、易繁殖、世代短及對化學物質具高度敏感性等[10, 11]。

圖 2.1.1.1 為 *Daphnia magna*。



圖 2.1.1.1 *Daphnia magna*[12]

2.1.2 水蚤毒性試驗方法

毒性試驗是將試驗物種，包含原生動物、魚類、甲殼類、藻類及植物等暴露於不同毒性物質濃度或劑量下，且記錄在一段暴露時間後所得生物的反應終點或存活結果。

一般毒性試驗主要分為急毒性及慢毒性兩種，而現有的水蚤急毒性試驗標準方法分別有中華民國環檢所所用之"生物急毒性檢測方法—水蚤靜水式法"[12]、U.S. EPA所用之"Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms"[13]、OECD所用之"Guidelines for the testing of chemicals, Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute immobilization test"[14]、ISO所用之"Water quality-Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test"及ASTM所用之"Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians"等。而慢毒性試驗標準方法則有U.S. EPA所用之"Sort-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms"[15]、

OECD所用之"Guidelines for the testing of chemicals, Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction test"[16]等。其常使用存活率、體長或總存活子代數當作反應終點[17]。

另外，在過去的一些研究中也有提到，生物體內外生化和生理功能上的損傷及改變，為一個可在第一時間內觀察到的對應環境擾動的作用指標，這些改變亦可用來解釋一些生物體可觀察到的存活生長及繁殖的變化。從那些文獻結果來看，這些非標準試驗的毒性試驗方法比標準的急毒性試驗更具敏感性，且亦快速，在更早之前就已經成功地使用於魚類上[18]。而在水蚤上的應用，例如，利用水蚤趨光泳動行為[19]或是利用水蚤餵食抑制速率的方法[5]來當作監測毒性物質的指標。

2.2 有機物毒性作用機制

在水體毒理學中，針對有機物的性質分類出多種毒性作用機制，而常見的分類法是概括性地將化學物質分成非反應性(Non-reactive)和反應性(Reactive)兩大類型：

1. 非反應性有機物毒性機制(Non-reactive)

一般為一種可逆非特定型(Reversible non-specific)的毒性作用，又稱為麻醉效應毒性(Narcosis Effect)，又可細分為非極性麻醉型(Nonpolar narcotic)和極性麻醉型(Polar narcotic)。非反應性毒性機制符合辛醇與水係數模式，即主要毒性與親脂性(Lipophilic)有關，其使有機物分子附著於細胞膜或酵素表面之疏水結構上，並將其生化作用之管道或是反應基阻擋住，使一些新陳代謝之功能不能正常進行，造成生命功能受損，其呈現出的毒性效應與麻醉效應相似。親脂性屬物理作用，毒性物質並未在生物體內產生化學變化，因此生物在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，屬於可逆行之毒性作用。

現今工業中所使用的有機化學物質大多是屬於麻醉型毒性物質，且以非極性麻醉型有機物占的量最多，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 [20] 在 1988 年發表的實驗結果發現，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線性回歸，其顯示此類有機物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。此外這類型毒物的毒性比其它類型毒物還要低，便將其定義成基線毒性 (baseline toxicity)。

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

Ren & Frymier [21] 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，毒性約為基線毒性的2至10倍。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。也有其他文獻指出其毒性較高之原因與有機物所帶之電荷、結構的極性和氫鍵鍵結能力等不同因素有關[22, 23]。

2. 反應性(Reactive)有機物毒性機制

反應性為不可逆特定型的一種毒性作用，此類有機物除了有麻醉性機制外(分子之疏水結構具麻醉效應)，其官能基與生物體內所產生之化學變化則為主要之毒性來源，通常此類有機物質的毒性超過基線毒性，比麻醉型有機物的毒性還要來的劇烈。Verhaar在1992年的 研究中發現反應性有機物的毒性通常會比基線毒性大數個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、反應位置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」。而 Russom [24]於 2007 年將反應性有機物分為四類，分別如下：

- 氧化磷酸非耦合 (Oxidative phosphorylation uncouplers)
- 呼吸抑制 (Respiratory inhibition)
- 前親電性/親電性 (Reactive electrophiles /proelectrophiles)
- 乙醯膽鹼酯酶抑制 (Acetylcholinesterase inhibitors)

2.3 混合毒性

在環境生態系統中的污染，不論是陸生或者是水生生態系中，目前所受到的污染衝擊已經不再侷限於單一毒性物質的污染上，取而代之的則是複合性的污染。混合後之毒性物質的毒性並無法簡單的以單一毒性物質的毒害來涵蓋之，因此在探討環境生態系所受的影響時，不應再將焦點集中在單一物質之毒性效應上，所以發展出可以完整評估環境生態真實污染狀況的方法是刻不容緩的。

混合毒性的研究早期由Bliss [25] 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為similar或independent，且將生物體對毒性的容忍度分布之相關係數定義在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-反應曲線及完全正相關的毒性容忍度，而 $\rho=0$ 則指反應獨立和零相關。

Plackett & Hewlitt [26]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 在 1952 年所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[27]將 Plackett & Hewlitt 的理論模式再加以擴展，使其可應用於多維的混合毒性效應，並可以使用任意的毒性容忍分布，如 Probit、Logit 等，計算多種毒性物質混合毒性。而 Christensen & Chen 在 1989 年以 Weibull 為基礎，進一步歸納出劑量反應模式中的斜率可用於預測 isobole 之圖形。

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 於 1996 年之研究結果發現 malononitrile 與反應性醛混合時，會產生明顯的協同情形；Lin [28] 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 O_2 氧化形成 carboxylic acids(R-COOH)，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，造成混合結果為毒性協同的現象。而 Lin [29] 又在 2004 年對混合毒性的研究中提到，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。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。

2.3.1 Isobologram

此為另一種混合毒性的表示方法，以描繪等毒性作用(如 LC_{50})為分析手段。Lloyd.(1961)根據 isobole 發展出毒性單位(Toxic unit)觀念，而 Sprague & Ramsay(1965)發展出以毒性單位 Toxic unit(TU)作為判斷混合毒性作用的指標，之後還有其他兩種判斷混合毒性效應的指標，分別為 Marking(1975)所提出的加成指標值(Additive index, AI)及 Konemann(1981)根據統計學基礎所提出的混合毒性指標(Multiple toxicity index, MTI)。而 MTI 一個重要的優點為其 MTI 和相似係數 λ 一致，當混合毒性實驗數據不足時，可利用其來估計 λ 值。

Lloyd (1961)為最早提出 TU、AI 和 MTI 三種參數即相關的觀念，該作者當初選用 rainbow trout (彩紅鱒)針對兩種重金屬鋅和銅進行實驗，並導入三參數來量化抽象的 Joint effect 作用，最後並以圖來表示該現象；Joint effect 又可細分為四類，分別為簡單相加(simple additive)、協同作用(synergism)、拮抗作用(antagonism)和不作用(no interaction)，如表 2.3.1.1 所示：

表 2.3.1.1 四種常見的混合毒性效應及判定指標

Type of action	Identification	Index
simply additive	ideal additive effects are observed when the joint toxic response is equal to the sum of the single chemical toxicity	TU(or M) = 1 AI = 0 MTI = 1
synergism	combined effect is greater than the sum of the toxicity of individual chemical	TU < 1 AI < 0 MTI > 1
antagonism	overall toxic effect is less than the sum of the toxicity of individual chemical	TU > 1 AI > 0 MTI < 0
no interaction	joint toxic effect is equal to that caused by the component with the greatest toxicity	

TU = Toxic Unit, AI = Additive Index, MTI = Mixture Toxicity Index

2.3.2 混合毒性模式之探討

混合毒性研究在過去就有許多學者探討研究，其所採用的混合毒性理論主要分為兩大類，為：

(1) Concentration addition (CA): 即混合毒性作用位置一致，毒性機制相同，

可以 $\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{EC_{xi}}$ 來表示。

(2) Independent action (IA): 即混合毒性作用位置不同且毒性機制亦不同，

以 $E_{mix} = 1 - \pi[1 - E(C_i)]$ 來表示。

在過去的混合毒性研究上，常以上述兩種混合模式來評估預測混合毒

性效應，大部分的學者皆認為 Concentration addition (CA) 具有較高的預測能力，而 Independent action (IA) 模式會低估混合毒性效應。

Chen and Yeh(1996)亦針對不同機制的反應性有機物作混合毒性研究，Chen 認為單單以 CA、IA 來評估混合毒性效應是不夠的，因此，加入兩個參數分別為作用位置相似度(λ)及毒性容忍度之相關性(ρ)，並利用劑量-反應曲線之斜率(β)來加以探討。過去研究認為 CA 模式會高估毒性效應，IA 則否的情況是以 ρ 為 1、 λ 為 1 (CA)的情況下去評估，但當 ρ 為-1、 λ 為 1 時，即兩毒性物質之作用位置不同，其毒性效應仍然有可能比 CA 模式來的更嚴重。其研究發現，當作用機制相同時，混合毒性效應皆以毒性相加(simple addition)或毒性減弱(antagonism)為主；若毒性作用機制不同時，其劑量-反應曲線之斜率可以得到一趨勢；當毒性物質兩者之一的斜率甚大時，其毒性效應易呈現拮抗作用(antagonism)，相反之，當毒性物質兩者之斜率甚小時，其混合毒性效應容易呈現協同作用(synergism)。

2.4 環境影響評估

環境中的化學物質成千上萬種，而其本身具有的危險性也對周遭環境生態和人類健康造成嚴重的威脅，使得各國紛紛發布針對毒性化學物質與環境生態相關的風險評估標準。除了必須了解毒性化學物質的基本物化特性外，也要觀察其對環境生態是否有累積性的作用或是與環境間的生物化學反應。過去的環境影響評估大多利用急毒性試驗的毒性數據(LE_{50} or EC_{50})作為判斷的依據，但根據許多研究發現，有很多毒性化學物質在環境中的流布劑量並不會到達發生半數致死率或是半數影響作用的情況，而是本身所存在的低濃度下，經過長時間的暴露後，便會造成生態環境的影響。於是爾後的許多研究便漸漸以慢毒性試驗的毒性數據($NOEC$ or $LOEC$)當成環境風險評估的判斷準則。

根據 OECD 風險評估流程，必須先對其化學物作化學安全評估 (Chemical safety assessment, CSA)，然後再進行下一步的毒性化學物質之風險管理(Risk management)。

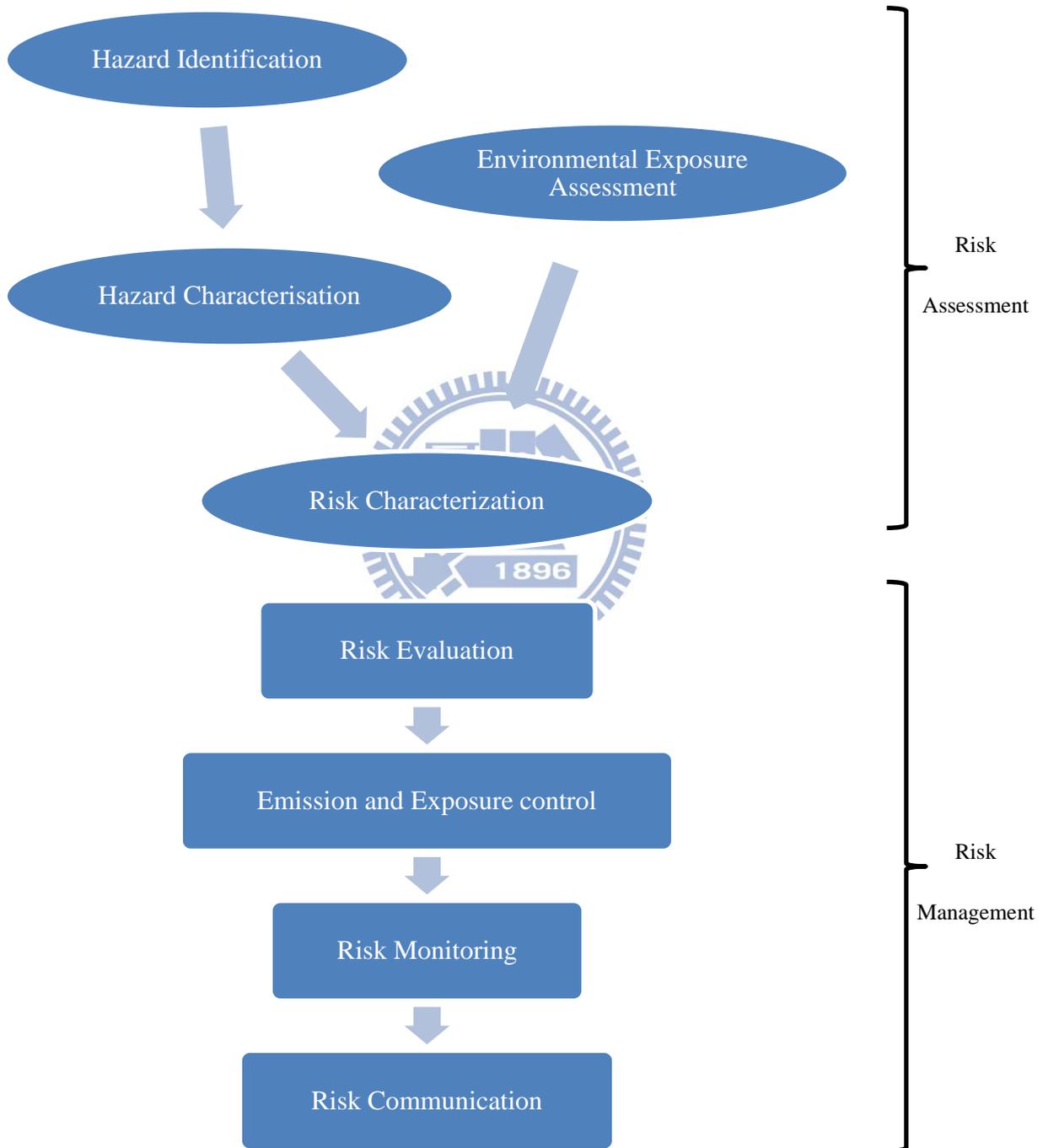


圖 2.4.1 The OECD environmental risk assessment

2.4.1 急慢毒性比值(Acute and chronic ratio, ACR)

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

$$ACR = \frac{\text{Acute toxicity}(LC_{50} \text{ or } EC_{50})}{\text{Chronic toxicity}(NOEC \text{ or } LOEC)}$$

一般而言，ACR 的計算是基於一個實驗結果而得到的。而若缺乏慢毒性實驗結果時，一般會採用ACR 為10，以便利利用急毒性的結果推估慢毒性的值來填補毒性數據資料庫的空缺。



2.5 毒性化學物質

2.5.1 毒性物質—腈類

腈類化合物為氰酸和含碳基結合的氰化物，其結構通式為 R-CN，大多數可溶於水中，沸點比同碳數烷類高的現象和腈類具高極性的特性有關。工業上，有機腈類可當作溶劑或除膠用，且為醫藥及維他命工業的中間產物。根據以往的研究結果顯示，腈類化合物和其他化學物質混合產生協同效應的機會很高。

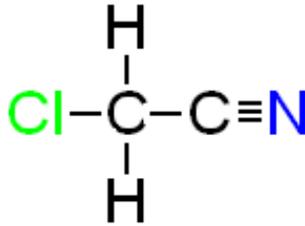


圖 2.5.1.1 氯乙腈

氯乙腈(Chloroacetonitrile)為無色透明液體，有刺激氣味，可作為殺蟲劑、有機合成原料或分析試劑。遇火、高熱易燃，受熱會分解出高毒性蒸氣。會由吸入、食入或皮膚吸收等途徑侵入人體。其在毒性分類機制中屬於反應性的呼吸抑制作用，且為大斜率的毒化物。

1996年，Chen & Huang 利用 Microtox 對含氰基的毒化物做混合毒物試驗，結果發現斜率大的乙腈和斜率小的醛類化合物的混合毒性均呈毒性減弱的拮抗作用，而和斜率小的丙二腈的混合毒性結果卻都呈現毒性增強的協同作用。和醛類化合物或丙二腈相比，乙腈的劑量-反應關係曲線斜率相當大。而此種結果可利用 Chen & Chiou(1995) 的文獻中所提到的 complex joint action 作解釋，當兩個毒性物質的劑量-反應關係曲線斜率相差極大時，混合後便會有毒性減弱的情況。

2.5.2 毒性物質—苯胺類

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，且分子量愈大者愈難溶於水，揮發性愈高。苯胺類的-NH₂官能基上具有孤對電子，易產生電子轉移的現象。其在合成農藥、醫藥或染料的化工廠內是很常見的化學物質，而環境中絕大部分的苯胺類毒化物污染主要都來自於化工廠的放流水，這樣也可能造成超過環境自淨能力負荷的傷害。

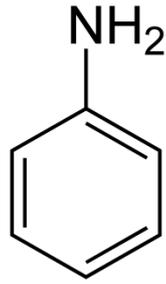


圖 2.5.2.1 苯胺

苯胺(Aniline)屬於極性麻醉性的毒性物質，其毒性主要來自親脂性，因此，可利用疏水性參數-辛醇與水分配係數 Log P 來探討和預測此類親脂性毒性的極性麻醉型物質。

2.5.3 毒性物質—有機磷殺蟲劑

殺蟲劑為農藥的一種，經常用於農業、醫藥、工業及居家環境。因應農業的迅速發展，殺蟲劑的發明也令農業產量大升，但是幾乎所有殺蟲劑都會嚴重地改變生態系統，大部分亦對人體有害[30]。

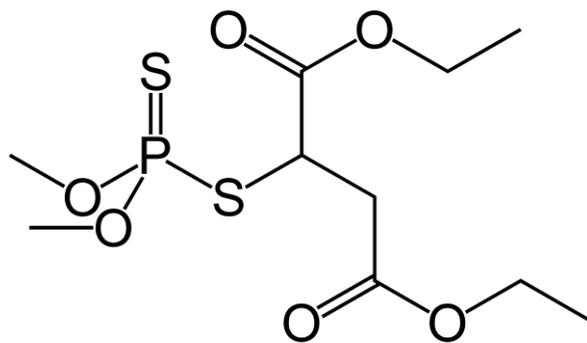
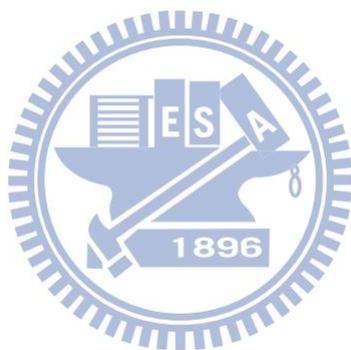


圖 2.5.3.1 馬拉松

有機磷殺蟲劑為含磷類殺蟲劑，具有蒜鼻的的刺刺激臭味，因有機氯殺蟲劑被禁用，而使近年來有機磷類殺蟲劑被大量廣泛使用，可用於殺蟲、殺菌或殺蟎。大部分此類殺蟲劑都具有乙烷膽鹼酯酶的神經抑制作用[31]。根據研究，此種殺蟲劑的主要降解產物為氯酚及硝基酚，而這些降解物質對人體或是水體生物均具有相當高的毒性，馬拉松(Malathion)為澄清液體，具高揮發性，對截肢動物和甲殼類動物之神經系統殺害性極大。

過去殺蟲劑對水蚤的毒性研究並不普遍，在 Wang[19]的研究中以三種不同類的殺蟲劑對圓水蚤的急毒性試驗結果指出，具神經毒性的有機磷類殺蟲劑 Malathion 的毒性最高($EC_{50}=0.05\text{ppb}$)。



第三章 基本理論

3.1 毒性物質劑量-反應關係

毒性試驗中，毒性物質對受測試物種發生作用時，其受體生物所受影響或死亡的百分率，會隨毒性物質劑量不同而有所改變。通常毒性物質的劑量對於受體生物的反應劑量會呈現 S 曲線關係，稱之為劑量-反應曲線圖。

若在毒性試驗中，受測生物受毒性物質影響造成 50% 的抑制或死亡，則稱為 EC_{50} (Effect Concentration 50%) 或 LC_{50} (Letha concentration 50%)。不同的受測生物體對於不同的毒性物質會有不一樣的斜率大小的劑量-反應關係。由於直接用 S 型曲線求取 EC_{50} (半致死濃度) 並不容易，故通常都要藉由數學關係是將 S 型轉為直線型以便求取其值，此種數學轉換模式即為劑量-反應關係模式。

常見的劑量-反應關係模式有 Probit、Weibull 及 Logit 三種，本研究使用最常見的 Probit 模式來進行毒性數據的分析。Probit 模式假設其生物對毒性物質的容忍度分布為一常態分佈 (Normal distribution)，主要是將劑量-反應模式的 S 型曲線，轉換成 NED (Normal equivalent deviation) scale 上的一直線，原本的反应-劑量曲線 50% 反應率之處所對應到 NED scale 上為 0，84.1% 反應率之處對應之值為 1。而 NED scale 之座標值加上 5 即為 Probit 的座標，Probit 單位和反應率及毒性物質濃度間的轉換關係如下：

$$Y = NED + 5$$

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

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

其中，Y 為 Probit 的單位；a 和 b 分別為反應-劑量曲線的截距和斜率；Z 為毒性物質之劑量濃度(mg/L)；P 為受測生物對毒性物質之反應率；erf 為 error function。

3.2 混合毒性理論

3.2.1 反應性毒物反應機制對於許多有機物，當以辛醇與水分配係數去描述時，常呈現出比預估毒性更激烈的毒性反應，超過原本的基線毒性 (baseline toxicity)，可稱此種有機物為模式的”outlier”，其具有超額毒性 (exceed toxicity)，此類具有超額毒性的有機物被歸納為反應性有機物。反應性有機物的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置均已產生化學變化，故其毒性反應為不可逆。腈類和殺蟲劑均屬反應性有機物。

3.2.2 非交互作用混合毒性理論

Hewlett & Plackett (1959)最早提出非交互作用(Non-interaction)混合毒性模式，是一種二維的混合模式，亦即假設兩種毒性物質之間沒有任何交互作用發生，並假設生物反應為非生及死(quantal)，亦即另一種毒性物質加入不影響原毒性物質與受體的結合能力，而當生物反應與毒性物質劑量呈一常態分布時，其二維毒性試驗之不反應率(Non-response fraction, Q) 如下：

$$Q = \Pr \left[\delta_1^{\frac{1}{\lambda_{12}}} + \delta_2^{\frac{1}{\lambda_{12}}} \leq 1 \right]$$
$$\delta_i = \frac{Z_i}{\bar{Z}_i}$$

其中：

Q：毒性試驗中，生物不反應部份分率(non-response fraction)，由機率分布函數內的積分區間決定其大小。

Pr：機率分布函數(可能為常態分布或其他機率分佈)，生物體對兩種毒性物質的容忍度分布，而這兩種不同的容忍度分布有一相關係數 ρ 存在。

Z_i ：毒性物質 i 之試驗濃度。

\bar{Z}_i ：單一生物體對毒性物質 i 之毒性容忍濃度。

λ_{12} ：相似係數(Similarity)，在混合毒性理論中，為兩者毒性作用系統相似度的度量指標，而 $0 < \lambda_{12} < 1$ 。相似係數越趨近於 1 時代表兩毒性物質作用系統越相近，即作用位置越相近。

3.2.3 交互作用毒性理論

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：

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

3.2.4 混合毒性效應與 ρ 、 λ 的關係

毒性容忍度之相關係數(correlation coefficient, ρ)和作用位置之相似係數(similarity coefficient, λ)兩參數為混合毒性效應的指標，以下為 ρ 和 λ 兩參數的介紹：

(1) Correlation coefficient: 相關係數最早由 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: 相似係數為用來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)。

將其相互配對會產生四種主要的混合毒性效應模式的 active mode: Response Multiplication (RM)、No Addition (NA)、Concentration Addition (CA)、Response Addition (RA)，這四種 action mode 與 ρ 、 λ 的關係如表 3.2.4.1 所示。

表 3.2.4.1 四種基本混和效應

Parameter values		Types of action	Abbreviation	Response
ρ	λ			
0	0	Response multiplication	RM	$1-(1-P1)(1-P2)$
1	0	No addition	NA	$\text{Max}(P1, P2)$
1	1	Concentration addition	CA	-
-1	0	Response addition	RA	$\text{Min}(1, P1+P2)$

3.3 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包括混合毒性單位(toxic unit, TU)、加成指標(additive index, AI)、混合毒性指標(mixture toxicity index, MTI)。而在本研究中則選用混合毒性單位，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

Z_1 ：毒性物質 1 的濃度

Z_2 ：毒性物質 2 的濃度

$EC50_1$ ：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

本實驗用 TU 作為混合的毒性單位，至於判別混合結果則以 95% 信賴區間為依據。相加係數 M 的意義如下：

M < 1：代表混合毒性效應為毒性增強
(synergistic 協同；greater than additive)

M = 1：代表混合毒性效應為毒性相加(additive)

M > 1：代表混合毒性效應為毒性減弱
(antagonistic 拮抗；less than additive)

3.4 Isobologram

將混合毒性試驗中之兩種毒性物質以不同的毒性單位比例加以混合，在一個固定的抑制率或死亡率下(如EC₅₀或LC₅₀)，兩軸分別代表兩毒性物質對此抑制率之個別貢獻的毒性單位，按不同的混合比例畫出一條等抑制率或死亡率曲線，此一圖形則稱為Isobologram。

Isobologram的兩軸分別代表二種混合之毒性物質各別的毒性單位，當此曲線在(1,0) 及(0,1) 兩點相連之直線的右上方，即曲線向外凸出偏離原點時，表示混合毒性效應為毒性減弱(antognism)；當此曲線在(1,0) 及(0,1) 兩點相連之直線的左下方，即曲線向內凹接近原點時，表示混合毒性效應為毒性加強(synergism)；當曲線進似重疊在(1,0) 及(0,1) 兩點相連之直線時，則表示混合毒性效應為毒性相加(simple addition)。通常兩毒性物質會以毒性單位1:3、1:1 和3:1 的比例互相混合，將實驗結果繪製成Isobologram以判斷混合毒性的效應。

Isobologram 另一個主要的功能，即可用來判斷混合毒性效應是否為 complex joint action。而 complex joint action 的主要特性如下：(1) 在任何毒

性單位比例之下，均呈現混合毒性減弱的現象。(2) 不同毒性單位比例，其混合毒性效應減弱之強度會有所不同，即在某一毒性單位比例下會有較強的毒性減弱現象發生。(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，對另一種毒性物質會有解毒作用。因此我們可以依此特性對Isobologram 加以應用。



第四章 材料與方法

4.1 實驗設備

1. 純水製造設備

包括四道濾心過濾(0.5 μm)、離子交換、蒸餾(Aquatron A4S, Bibby)，蒸餾水儲水桶(60 L container, Nalgene)，再加上超過濾(Milli-Q Plus, Millipore, outflow conductivity 18.2 $\text{M}\Omega\text{-cm}$)。水質之電阻值控制在 18.2 Mega-ohm ($\text{M}\Omega\text{-cm}$)。

2. pH meter

購自 Suntex，型號為 Model SP-2200。其精確度為 ± 0.01 。

3. 溶氧測定儀

使用美國 YSI 公司出產之微電腦溶氧測定儀，型號 Model YSI 5100，附有溶氧測定探頭(BOD Probe)，為 Model 5010。在探頭部分設有電動攪拌器，可以對樣品進行攪拌，溶氧測定範圍為 0.0 ~ 60.0 mg/L，精準度為 $\pm 0.01\text{mg/l}$ 。

4. 電導度計

型號 Model CD-4306，具 4 段電導度測試範圍(0.1 μS ~200 μS 、0.001mS~2mS、0.01mS~20mS、0.1mS~200mS)和溫度補償功能。

5. 餘氯計

使用 Motortech 之 Micro7⁺餘氯計

6. 溫度恆溫控制設備

使用臻美公司訂製之循環式水浴槽並配合室內空調恆溫方式，將馴養水溫及試驗水溫控制在 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。且內含溫度監測裝置，可顯示毒性試驗期間水樣之最高及最低溫度。

4.2 試驗毒物

本試驗所選用的毒物均為環境水體中的常見污染物，其基本物化特性資料如表 4.2.1 所示。



表 4.2.1 試驗毒性物質基本物化資料

Action modes	Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Solubility (mg/L)
Respiratory inhibition	Chloroacetonitrile	107-14-2	<u>C₂H₂CIN</u>	75.5	soluble
Polar narcotic	Aniline	62-53-3	<u>C₆H₇N</u>	93.13	3.6x10 ⁴
Acetylcholinester inhibitor	Malathion	121-75-5	<u>C₁₀H₁₉O₆PS₂</u>	330.36	145(at 20°C)

4.3 水蚤毒性試驗

4.3.1 實驗前準備

1. 馴養水配置

本實驗使用之馴養水為參考中華民國環檢所和 OECD 使用之稀釋水，配置方法如下：

將四種試藥級試劑依比例配置(表 4.3.1.1)，等試藥完全溶解後，劇烈曝氣至少 8 小時，其硬度需落在 160~180 mg/L(as CaCO₃)間，室溫下避光保存不宜超過 14 天。除了這四種試劑以外，還參照 OECD 的標準方法，添加維生素，先將兩種維生素(B₁、B₁₂)依比例配成 1L 的儲備溶液(表 4.3.1.2)，此儲備液必須保存在冷凍情況下。

表 4.3.1.1 稀釋水成分

	添加試劑(mg/L)				最終水質
	NaHCO ₃	MgSO ₄ · 7H ₂ O	KCl	CaSO ₄ · 2H ₂ O	硬度
高硬度稀釋水	192.0	246.0	8.0	120.0	160-180

表 4.3.1.2 維生素儲備液

Combined vitamin stock(1L)	
添加維生素(mg/L)	
Thiamine hydrochloride(B1)	750
Cyanocobalamine(B12)	10

2. 水蚤馴養

- (1) 馴養時間至少 3 週。水蚤自飼養單位(環檢所)取回後，放入內盛 1L 馴養水之 2L 圓形燒杯中馴養。
- (2) 馴養之水溫必須與毒性試驗溫度一致，即 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照時間應維持在每天 16 ± 1 小時。
- (3) 馴養時須小心控制水蚤密度，於每 2 天換水一次，以避免廢棄物累積，造成冬卵產生或水蚤驟死的狀況。
- (4) 如以 3L 水量馴養，開始時可放入約 25 隻成蚤，馴養期間水蚤數建議控制在 200 隻以下。建議於換水時將水蚤族群適度減量。
- (5) 馴養缸內溶氧建議維持在 5 mg/L 以上，可使用曝氣設備微量通氣以增加溶氧。

3. 水蚤飼料

根據環檢所的“生物急毒性檢測方法-水蚤靜水式法”中，其水蚤飼料有分 A、B、C 三種，在本實驗選用飼料 A 進行餵食，餵食量約為 1ml/L 馴養水，其成分說明如下表 4.3.1.3：

表 4.3.1.3 水蚤飼料成分

成分	添加量 (g/500ml 稀釋水)	備註
魚飼料	6.3	使用底棲魚錠片飼料，成分須含螺旋藻
乾酵母粉	2.6	只能放置一個月
草葉粉	0.5	-

先用 500ml 稀釋水將魚錠片飼料泡軟，再把乾酵母粉和草葉粉一起加入均質機，高速攪打 5 分鐘後，冷藏靜置一小時，再取上層液 300ml，方裝後冷凍保存。其解凍後可冷藏保存 7 天。

除了飼料以外，還搭配月芽藻餵食，大約培養一個禮拜後計算月芽藻濃度，接著離心將上層培養液去除，再以馴養水重新調整濃度為 3×10^7 個/ml。餵食量約 1.5ml/L 馴養水。

4. 小於 24 小時實齡之試驗水蚤製備

開始試驗前 24 小時，自馴養燒杯內以玻璃管，吸取成熟母水蚤放入內盛稀釋水之 1L 燒杯。飼養溫度為 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照時間維持在每天 16 ± 1 小時。24 小時後再將成熟母水蚤從燒杯內吸出，這樣即可獲得毒性試驗所需之時齡不超過 24 小時之水蚤。

5. 實驗前，將 50ml 小燒杯放入震盪器，用 RO 水清洗，之後再用稀釋水潤過一次。

6. 配製當次實驗所需毒化物的儲備液。

4.3.2 48 小時急毒性試驗流程

1. 使用 < 24 小時實齡的幼蚤，實驗前 2 小時餵食幼蚤。
2. 將稀釋水倒入少許至 50ml 小燒杯中，再用玻璃管和吸球從 1L 燒杯中吸取小水蚤至小燒杯中。一個燒杯要放 5 隻幼蚤，一個濃度有 4 重複，所以一組實驗(5 個濃度+空白)共需要 120 隻幼蚤。
3. 將毒化物依各個濃度分別添加至有水蚤的小燒杯中，再以稀釋水定量

到 50ml，定量完後用石臘膜(paraffin)將杯口封住以減少毒化物揮發影響實驗。

4. 把封完膜的小燒杯亂數擺放進恆溫水槽中。溫度為 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，以定時開關器控制光暗比為 16 : 8 (light : dark)。實驗期間(48 小時內)不餵食。
5. 分析其當次實驗使用的稀釋水、最高濃度、最低濃度的基本水質(pH、溶氧、導電度)。
6. 48 小時後，計算小燒杯內水蚤的存活數量，並分析其空白組、最高濃度和最低濃度的基本水質(pH、溶氧、導電度)。

4.3.3 21 天慢毒性試驗流程

1. 使用 < 24 小時實齡的幼蚤，實驗前不餵食。
2. 將稀釋水倒入少許至 25ml 小燒杯中，再用玻璃管和吸球從 1L 燒杯中吸取幼蚤至小燒杯中。一個燒杯放 1 隻幼蚤，一個濃度有 10 重複，所以一組實驗(5 個濃度+空白)共需要 60 隻幼蚤。
3. 將毒化物依各個濃度分別添加至有水蚤的燒杯中，再以稀釋水定量到 100ml，定量完後用石臘膜(paraffin)將杯口封住以減少毒化物揮發影響實驗。
4. 把封完膜的小燒杯亂數擺放進恆溫水槽中。溫度為 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，以定時開關器控制光暗比為 16 : 8 (light : dark)。實驗期間，每天都要更換試驗溶液，且要餵食。
5. 分析每天更換後使用的稀釋水、最高濃度、最低濃度的基本水質(pH、溶氧、導電度)。
6. 每天要計算存活率和生殖率，且要將新生小水蚤從燒杯內移出。

4.3.4 品質管制

1. 利用單一水蚤物種(*Daphnia magna*)進行試驗，不可混合其他種類。水蚤馴養時若出現異常狀況(高死亡率、出現冬卵、水蚤變色等)，則不可用來製備試驗水蚤。
2. 初始毒性試驗：以參考毒物至少進行 5 次毒性試驗，每次試驗濃度都需相同，且 5 個濃度中至少需有 2 個造成試驗生物部分死亡。求取其 LC50 平均值和變異係數(CV)，生物試驗之 CV 值不得超過 50%。
3. 毒性試驗期間，每個月至少執行一次參考毒物試驗，管制上下限為 $\pm 2SD$ 。

4.4 藥品混合方式

本研究中為 3 種毒化物兩兩相互混合，總共 3 組的混合毒性試驗，以毒性單位比 1 : 1 的比例進行試驗。毒性單位算法如下：

$$TU_1 : TU_2 = \frac{Z_1}{EC_{50,1}} : \frac{Z_2}{EC_{50,2}}$$

其中， Z_1 、 Z_2 ：毒物濃度

$EC_{50,1}$ 、 $EC_{50,2}$ ：個別毒性物質之半抑制濃度

TU_1 、 TU_2 ：個別毒性物質之毒性單位

另外，本研究會進行製作 Isobologram 以更進一步的探討混合毒性效應。實驗方法上，分別進行 3 : 1、1 : 1、1 : 3 的混合毒性試驗。

4.5 實驗數據處理

1. 48 小時 LC₅₀ 計算

各試驗濃度：

水蚤死亡總數 = 20 - (4 個試驗燒杯之水蚤存活數量加總)

水蚤死亡百分率 = 水蚤死亡總數 ÷ 20 × 100%

2. 慢毒性計算

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

其中：

Y = 每隻成蚤所生的總幼蚤數

x = 試驗濃度

x₀ = 成蚤存活率的 EC50

c = 空白組預期可生產的幼蚤數

b = 斜率參數



3. 利用 Probit model 進行計算

➤ 使用條件：

(1) 5 個試驗濃度隻死亡百分率數據經過平滑化及調整之後，需有至少一組 ≥ 50%，及至少一組 ≤ 50%。

(2) 5 個試驗濃度隻死亡百分率數據都經過平滑化及調整後，必須有 1 個或 1 個以上的濃度有部分死亡的情形。

4. ANOVA Dunnett's test

➤ 基本原理：

即利用分析變異的方法來判定，變異為基於各類觀察體常因受某些因素之影響，以致其特性常發生不同之差異。通常總變異可分為兩方面來說明便易產生的原因：

- ✓ 以知原因之變異(由自變數引起)
- ✓ 未知原因之變異(實驗誤差，包含抽樣誤差)

亦即以下列關係式表示之：

總變異 = 組間變異 + 組內變異(誤差變異)

$$SST = SSB + SSW$$

ANOVA TABLE			
變異數之來源 (Source)	自由度 (Degree of freedom)	平方和 (Sum of square)	平均方 (Mean square)
組間(Between)	P-1	SSB	$S_B^2 = SSB/(P-1)$
組內(Within)	N-P	SSW	$S_w^2 = SSW/(N-P)$
總和(Total)	N-1	SST	

P：組數個數；N：總樣本數

所以

$$SST = \sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij}^2 - G^2/N$$

$$SSB = \sum_{i=1}^P T_i^2/n_i - G^2/N$$

$$SSW = SST - SSB$$

G ：所有試驗數據之和

T_i ：組數為第 i 組時，所有 replicates 數據之和

X_{ij} ：組數為第 i 組時的第 j 個 replicate 之數據

n_i ：處理組 replicates 之數目

➤ 以下為統計方法中之 Dunnett's Test 的操作程序

✓ 步驟一：建立毒性試驗原始數據資料表

Replicate	Treatment				
	1	2	3	4	----j
1	Y_{11}	Y_{21}	Y_{31}	Y_{41}	Y_{j1}
2	Y_{12}	Y_{22}	Y_{32}	Y_{42}	Y_{j2}
3	Y_{13}	Y_{23}	Y_{33}	Y_{43}	Y_{j3}
----i	Y_{1i}	Y_{2i}	Y_{3i}	Y_{4i}	Y_{ji}

✓ 步驟二：建立變異數分析表

分析變數

變異數之來源 (Source)	自由度 (DF)	平方和 (Sum of square)	平均方 (Mean square)
Blocks(rows)	n-1	SSqR	$\frac{SSqR}{n-1}$
Treatments(columns)	c-1	SSqK	$\frac{SSqK}{c-1}$
Error	(n-1)x(c-1)	SSqE	$S^2 = \frac{SSqE}{(n-1) \times (c-1)}$

c：包含控制組的毒化物濃度個數

n：所有試驗重複組的組數

S²：Estimated error variance

其中

$$SSqR = \frac{1}{c} \sum_{i=1}^c Y_i^2 - \frac{G^2}{c \times n}$$

$$SSqK = \frac{1}{n} \sum_{j=0}^c Y_j^2 - \frac{G^2}{c \times n}$$

$$SSqE = \sum_{j=0}^c \sum_{i=0}^n y_{ij}^2 - \frac{1}{c} \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \frac{1}{n} \sum_{j=0}^c Y_j^2 + \frac{G^2}{c \times n}$$

G：所有試驗數據之和

Y_i ：重複組為第 i 組時，所有對應濃度數據之和

Y_j ：濃度為第 j 組時，所有重複組數據之和

y_{ij} ：濃度為第 j 組的第 i 個 replicate 之數據

✓ 步驟三：計算出每種毒化物濃度與控制組間的 S 值

$$S_i = \frac{(\bar{y}_j - \bar{y}_0)}{S_d}$$

而 S_d 為 The standard error of difference： $S_d = \sqrt{\frac{2 \times S^2}{n}}$

其中

\bar{y}_0 ：控制組數據之平均值

\bar{y}_j ：處理組第 j 數據之平均值

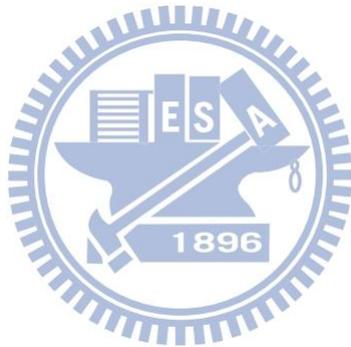
S^2 ：分析變數表中 Estimated error variance

✓ 步驟四：可表示為下表並查表得出結論

Treatment	S_i	r	查表 $T_{\alpha, (N-1) \times (c-1)}$ (Tabulated value)
1	S_1	2	
2	S_2	3	
3	S_3	4	$S_i < T$ 不顯著
4	S_4	5	$S_i > T$ 顯著
...j	S_j	j+1	

‘其中

- I. 以上各處理組 S_i 值以步驟 3 方法算出。
- II. r 為依 S_i 值大小而排序(S_i 值最小時, r 定為 2, 以此類推)。
- III. $T_{\alpha, (N-1) \times (c-1)}$ 查表求得 T 值時, α 顯著水準(一般為 one-side test)、 $(n-1) \times (c-1)$ 為組內自由度、 r 為排序。
- IV. 當 S_i 值大於其所相對的 T 值時則為達顯著(Significant); 當 S_i 值小於其所相對的 T 值時則未達顯著(Not significant), 此值即為 NOEC。



第五章 結果與討論

5.1 單一毒性試驗結果

本研究主要利用二種水蚤毒性試驗方法針對不同毒性機制的有機物進行實驗，其中包括腈類、苯胺類及有機磷殺蟲劑，先進行單一毒性試驗求取單一毒物的急毒性 EC_{50} 值及慢毒性 NOEC 值，而後再依據單一毒化物 EC_{50} 值或 NOEC 值混合作毒性試驗。除此之外，還利用此二種實驗之反應終點去比較毒性試驗結果的敏感性差異。

急慢單一毒性試驗結果如表 5.1.1~表 5.1.2 所示，針對不同毒化物及不同反應終點，經由 Probit model 和 Dunnett's test 分析處理過後，得其 EC_{50} 值、 α 值(截距)、 β 值(斜率)、NOEC 值和 LOEC 值，而劑量-反應曲線如圖 5.1.1~圖 5.1.3 所示。

在單一急毒性方面，由表 5.1.1 可以發現，其 Aniline 和 Malathion 的毒性遠遠高於 Chloroacetonitrile，大約高 2~3 個 order。從文獻中可知，Malathion 屬於有機磷殺蟲劑，其特殊的毒性作用機制為抑制生物體內的乙醯膽鹼酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE)，而失去破壞乙醯膽鹼 (Acetylcholine, ACh) 的能力，進而造成節肢動物與甲殼動物神經失常最後中毒死亡。而在 Manon Vaal *et al.* (1997) 的研究中也提到說，Aniline 這種苯胺類有機物對水蚤類生物具有特殊的毒性影響作用，其毒性來源的推測可能為經過生物代謝後的產物，而水蚤又比其他生物更能代謝苯胺類有機物，使其氧化為更高毒性的產物，造成其對水蚤有較高的毒性結果。腈類對於水蚤的毒性則相對較弱，其毒性作用機制為 Cyanogenic nonelectrolytes，主要是由於腈類上 C 和 N 的三鍵取代基釋放出 CN^- 離子而造成毒性。另外，在劑量-反應曲線的斜率部分可以發現，Chloroacetonitrile 和 Malathion 為大斜率 ($\beta > 2$)，Aniline 為小斜率 ($\beta < 2$)，斜率大表示從生物所能忍受的最

高濃度到完全抑制濃度只存在一個狹小的範圍內，稍有濃度變化，受體的反應就大幅增加，故在處理此類數據時更需要小心。而會做這兩種分類是因為本研究之混合毒性試驗所採用的混合預測模式為 RA(Response addition)模式和 CA(Concentration addition)模式，此兩個模式的差別在於 RA 模式有考慮到斜率的影響，可以使其預測模式更加完整。

水蚤 21days 慢毒性試驗是參照 OECD "Guidelines for the testing of chemicals, Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction test"的 21days 慢毒性標準試驗方法。在本研究中，慢毒性試驗的試驗終點選擇為 21days 的總存活子代數。表 5.1.2 為單一慢毒性試驗結果，以 NOEC 值來看，其與急毒性結果的趨勢大致相符，毒性大小為 Malathion > Aniline > Chloroacetonitrile。

表 5.1.1 48hr 急毒性試驗之單一毒性試驗數據

Chemical	EC ₁₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	α	β (slope)
Chloroacetonitrile	2.7	5.2989	1.82	4.38
Aniline	6.19×10^{-3}	38.6×10^{-3}	7.28	1.61
Malathion	0.45×10^{-3}	1.33×10^{-3}	12.79	2.71

-Slope: from the dose-response curve of Probit model

- Data calculated by Probit model

表 5.1.2 21days 慢毒性試驗之單一毒性試驗數據

Chemical	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)
Chloroacetonitrile	3.7×10^{-2}	0.11
Aniline	1×10^{-2}	3×10^{-2}
Malathion	0.33×10^{-3}	1×10^{-3}

-Data calculated by ANOVA -Dunnett's Test

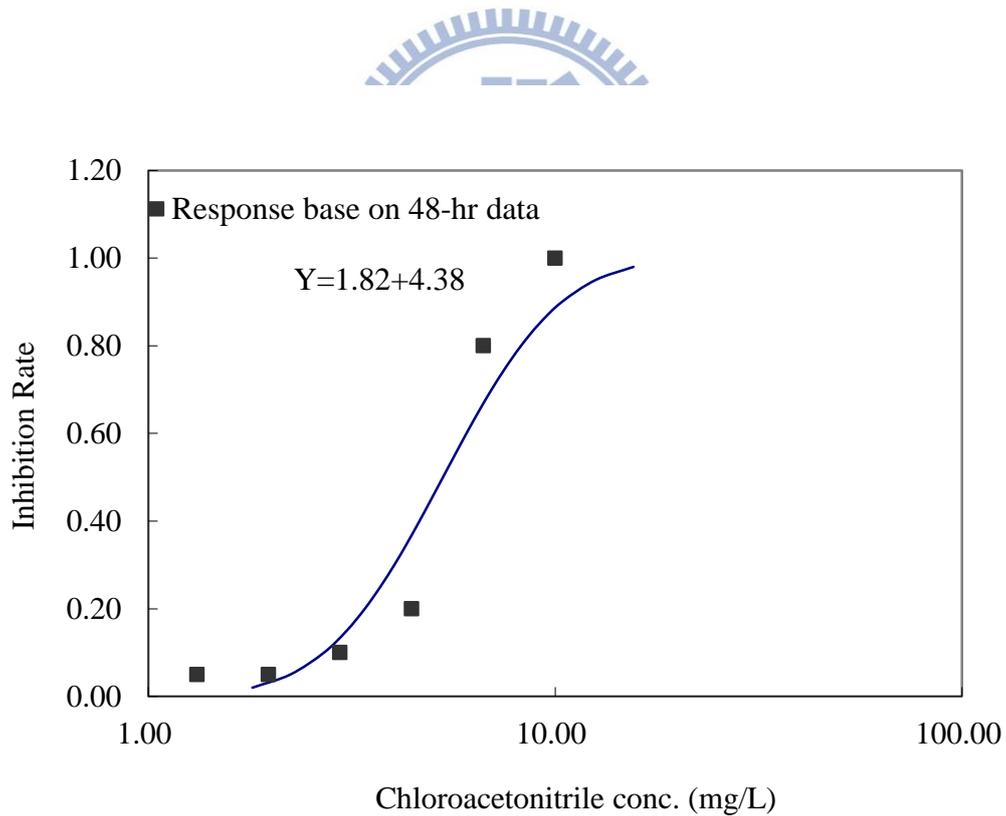


圖 5.1.1 Chloroacetonitrile 之 48hr 急毒性劑量反應曲線

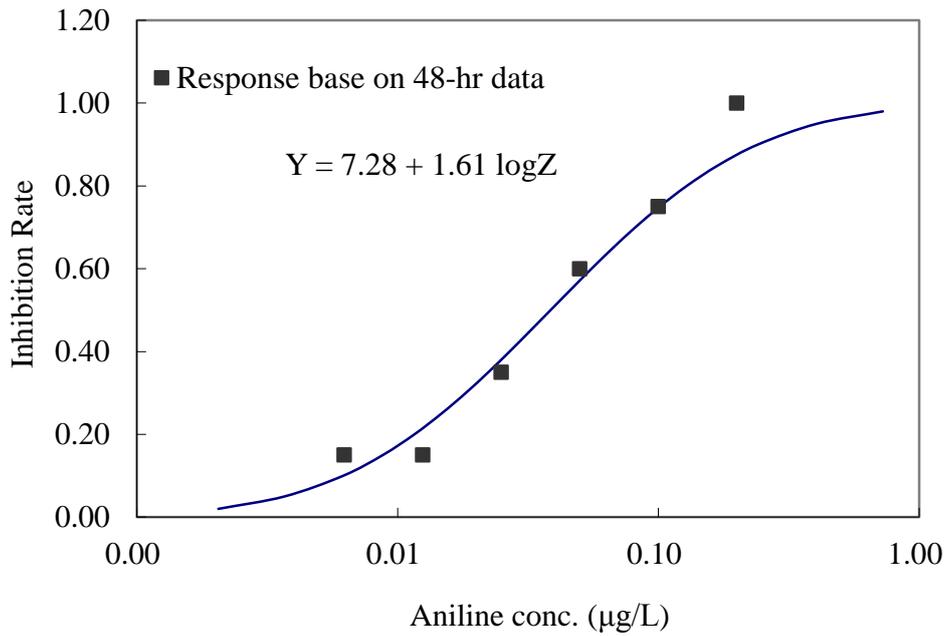


圖 5.1.2 Aniline 之 48hr 急毒性反應劑量曲線

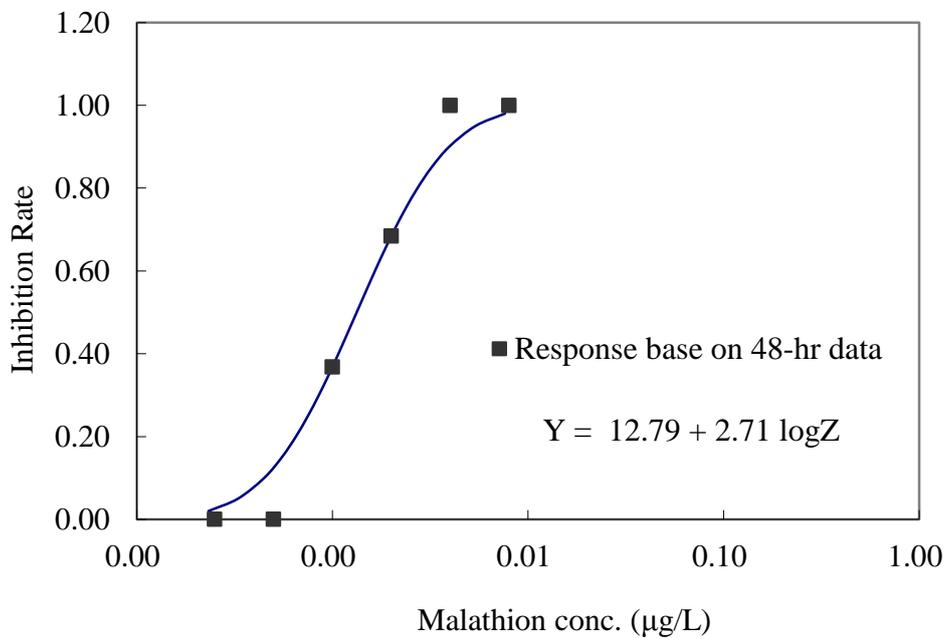


圖 5.1.3 Malathion 之 48hr 急毒性反應劑量曲線

由表 5.1.1 和表 5.1.2 的數據發現，Aniline 的急毒性 EC₅₀ 值低於慢毒性 NOEC 值，推測可能是由於在實驗上挑選慢毒性試驗濃度時，是利用急毒性數據 EC₅₀ 值作為最高濃度的基準，而為了避免誤差，便再從 EC₅₀ 值往上多加 2~3 個濃度。再加上試驗時間拉長，試驗環境的變化會造成試驗生物的健康度受影響，而 Aniline 本身亦對水蚤有特殊毒害反應，故造成之後統計上算出的 NOEC 值大於 EC₅₀ 值。

從表 5.1.3 可知，在本研究室所馴養的試驗物種-水蚤(*Daphnia magna*)，其對毒性物質之急毒敏感性大致上都跟文獻資料所採用的 *Daphnia magna* 差不多。在慢毒性方面，由於從文獻中查不到 Chloroacetonitrile 的相關數據，故利用 ECORSA 的腈類基線毒性(baseline toxicity)推估模式，得到其 NOEC 值，所以會比本研究所得到的實驗觀測值還要大很多。

除了上述的不同文獻中水蚤敏感度的比較以外，本篇研究還蒐集了本研究室過去建立的 48 小時密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗之毒性數據及 15 分鐘 Microtox 螢光菌毒性試驗和其他試驗物種，例如，非密閉型批次式月芽藻和 96 小時 Fathead minnow，作比較。在慢毒性的部分因為實驗所耗費的時間較長，故其研究文獻數據較難以取得，所以單單只採用急毒性數據 EC₅₀ 值去作比較。從表 5.1.4 及圖 5.1.4 來看，水蚤對這三類毒性化學物質的敏感性都很高，而 *Fathead minnow* 對 Chloroacetonitrile 具較高敏感性，其他兩類則比較不敏感，可能原因可以從 Russom et al.(1997)對毒性機制的分類來看，Chloroacetonitrile 的毒性作用機制被分為反應性中的呼吸抑制作用，這種特殊的作用機制對魚類造成的毒性影響會較高，而苯胺和有機磷殺蟲劑對魚類並無特殊的作用機制。

表 5.1.3 *Daphnia magna* 毒性實驗值與其他文獻之 *Daphnia magna* 數據比較

Chemical	This research		Literature	
	Acute toxicity	Chronic toxicity	Acute toxicity ^a	Chronic toxicity ^a
	EC ₅₀ (mg/L)	NOEC(mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	NOEC(mg/L)
Chloroacetonitrile	5.2989	3.7x10 ⁻²	5.23	70.364 ^b
Aniline	38.6x10 ⁻³	1x10 ⁻²	0.08	0.004
Malathion	1.33x10 ⁻³	0.33x10 ⁻³	0.002	3x10 ⁻⁴

-a. Data from QSAR Toolbox 2.1

-b. Data predicted from ECORSA

表 5.1.4 *Daphnia magna* 與其他物種之急毒性 EC₅₀ 值(mg/L)比較

Chemical	<i>Daphnia magna</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		<i>Fathead^c minnow</i>	Microtox ^d
	EC ₅₀ (mg/L)	Closed-system ^a	Batch ^b	LC ₅₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)
	EC ₅₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	LC ₅₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)
Chloroacetonitrile	5.2989	11.45	54.11 [#]	1.35	142.39
Aniline	38.6x10 ⁻³	26.03	41.00 [#]	75.5	16.5
Malathion	1.33x10 ⁻³	1.73	2.14	14.1	67.81

-a. Data from laboratory

-b. Data from QSAR Toolbox 2.1(-#. Data predicted from ECORSA)

-c. 96 hour LC₅₀ data from QSAR Toolbox 2.1

-d. Data from laboratory

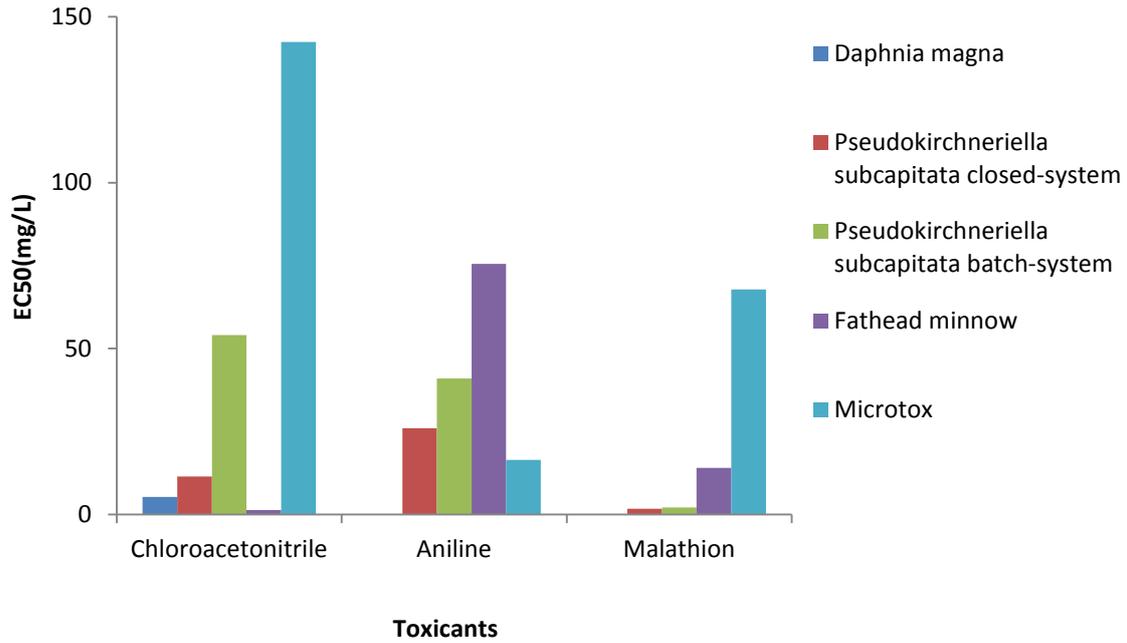


圖 5.1.4 四種試驗物種之急毒性 EC50 值(mg/L)比較

mg/L	control	3	1	0.33	0.11	0.037	Sum	mean	Row effect
1	9	0	2	8	5	5	29	4.8333333	-0.85
2	9	0	1	6	10	10	36	6	0.31666667
3	10	0	1	4	5	9	29	4.8333333	-0.85
4	9	0	2	13	8	5	37	6.1666667	0.48333333
5	10	0	1	6	12	8	37	6.1666667	0.48333333
6	12	0	1	6	8	10	37	6.1666667	0.48333333
7	14	0	1	5	7	10	37	6.1666667	0.48333333
8	8	0	2	1	5	10	26	4.3333333	-1.35
9	12	0	1	6	10	10	39	6.5	0.81666667
10	8	0	1	6	8	11	34	5.6666667	-0.0166667
Sum	101	0	13	61	78	88	341	5.6833333	
mean	10.1	0	1.3	6.1	7.8	8.8	5.68333		
Column ef	4.41667	-5.6833	-4.383333	0.41667	2.11667	3.11667			
Difference	-	-10.1	-8.8	-4	-2.3	-1.3			
d/Sd	-	-11.191	-9.750176	-4.4319	-2.5483	-1.4404			
Sum(Yij^2)	1055	0	19	455	660	816	3005		
c=6	n=10						787		
A	R	K	全部總和	C					
3005	1967.83	2791.9	341	1938.02					
SSqE	msq	Sd	(dut)1-tail	(dut)2-tail					
183.283	4.07296	0.90255	2.3	2.61					

圖 5.1.5 Chloroacetonitrile 之慢毒性數據計算- NOEC & LOEC

μ g/L	control	30	10	3.33	1.11	0.37	Sum	mean	Row effect
1	8	4	11	6	9	12	50	8.3333333	0.9
2	8	10	8	4	6	8	44	7.3333333	-0.1
3	6	3	11	8	9	7	44	7.3333333	-0.1
4	10	0	1	7	9	7	34	5.6666667	-1.7666667
5	12	5	6	7	10	12	52	8.6666667	1.2333333
6	8	11	4	13	11	8	55	9.1666667	1.7333333
7	8	7	9	6	9	8	47	7.8333333	0.4
8	8	5	9	9	3	3	37	6.1666667	-1.2666667
9	13	4	6	2	5	12	42	7	-0.4333333
10	7	3	8	6	13	4	41	6.8333333	-0.6
Sum	88	52	73	68	84	81		7.4333333	
mean	8.8	5.2	7.3	6.8	8.4	8.1	7.43333		
Column eff	1.36667	-2.2333	-0.133333	-0.6333	0.96667	0.66667			
Difference	-	-3.6	-1.5	-2	-0.4	-0.7			
d/Sd	-	-2.6557	-1.106528	-1.4754	-0.2951	-0.5164			
Sum(Yij ²)	818	370	621	540	784	747	3880		
c=6	n=10						1170.5		
A	R	K	全部總和	C					
3880	3380	3401.8	446	3315.27					
SSqE	msq	Sd	(dut)1-tail	(dut)2-tail					
413.46667	9.18815	1.35559	2.3	2.61					

圖 5.1.6 Aniline 之慢毒性數據計算- NOEC & LOEC



μ g/L	control	3	1	0.33	0.11	0.037	Sum	mean	Row effect
1	20	0	11	8	11	14	64	10.666667	1.05
2	13	12	13	13	10	21	82	13.666667	4.05
3	14	13	14	14	10	12	77	12.833333	3.2166667
4	7	0	3	3	11	7	31	5.1666667	-4.45
5	12	0	6	10	12	12	52	8.6666667	-0.95
6	20	0	10	12	12	20	74	12.333333	2.7166667
7	12	0	9	9	11	11	52	8.6666667	-0.95
8	9	0	12	2	14	4	41	6.8333333	-2.7833333
9	13	0	5	16	10	13	57	9.5	-0.1166667
10	11	0	9	9	12	6	47	7.8333333	-1.7833333
Sum	131	25	92	96	113	120	577	9.6166667	
mean	13.1	2.5	9.2	9.6	11.3	12	9.61667		
Column eff	3.48333	-7.1167	-0.416667	-0.0167	1.68333	2.38333			
Difference	-	-10.6	-3.9	-3.5	-1.8	-1.1			
d/Sd	-	-6.5525	-2.410826	-2.1636	-1.1127	-0.68			
Sum(Yij ²)	1873	313	962	1104	1291	1716	7259		
c=6	n=10						1640.5		
A	R	K	全部總和	C					
7259	5955.5	6263.5	577	5548.82					
SSqE	msq	Sd	(dut)1-tail	(dut)2-tail					
588.817	13.0848	1.6177	2.3	2.61					

圖 5.1.7 Malathion 之慢毒性數據計算- NOEC & LOEC

圖 5.1.5~5.1.7 為慢毒性的原始數據與 NOEC、LOEC 之計算，其詳細的計算方式與過程列於附錄五中。由圖可看出，毒化物 control 組間的數據一致性並不佳，推測原因可能為試驗生物本身的健康度有差異加上試驗過程中非人為因子的影響(如：環境溫度變化)，造成再現性較低。而這些因子不單單只會影響 control 組的數據，對於不同毒化物和不同濃度組間也可能造成影響。

參考 Z. Tong *et al.* 在 1996 年所做的研究[32]，其利用 OECD 的 21days 慢毒性標準方法，對兩種腈類作 14days 與 21days 的慢毒性試驗，考慮是否可以選擇用 14days 替代 21days 的試驗時間，以節省其人力和設備成本。本研究亦利用 14days 和 21days 的數據結果作比較，由表 5.1.5 可知，當試驗時間愈長，其毒化物的潛在毒害對試驗生物的影響愈顯劇烈，從總子代數這個試驗終點來看，更可以察覺到其 control 組與濃度組之間和試驗時間的對比差異。跟文獻結果不同，本研究的結果發現若將試驗時間縮短為 14days，則無法顯著的看出各個組別間的差異。

表 5.1.5 *Daphnia magna* 14days 和 21days 慢毒性試驗比較

Chemicals	Conc. (mg/L)	Survival(%)		Total neonates	
		14-days	21-days	14-days	21-days
Chloroacetonitrile	Control	90	90	60	101
	0.037	100	100	60	88
	0.11	90	90	69	78
	0.33	100	50	59	61
	1	40	0	13	13
	3	0	0	0	0
Aniline	Control	90	90	39	88
	0.367x10 ⁻³	100	90	26	81
	1.11 x10 ⁻³	100	100	33	84
	3.33 x10 ⁻³	100	100	37	68
	10 x10 ⁻³	100	100	34	73
	30 x10 ⁻³	90	90	29	52
Malathion	control	100	100	61	131
	0.037 x10 ⁻³	100	100	75	120
	0.11 x10 ⁻³	100	100	65	113
	0.33 x10 ⁻³	100	100	39	96
	1 x10 ⁻³	100	90	31	92
	3 x10 ⁻³	20	20	12	25

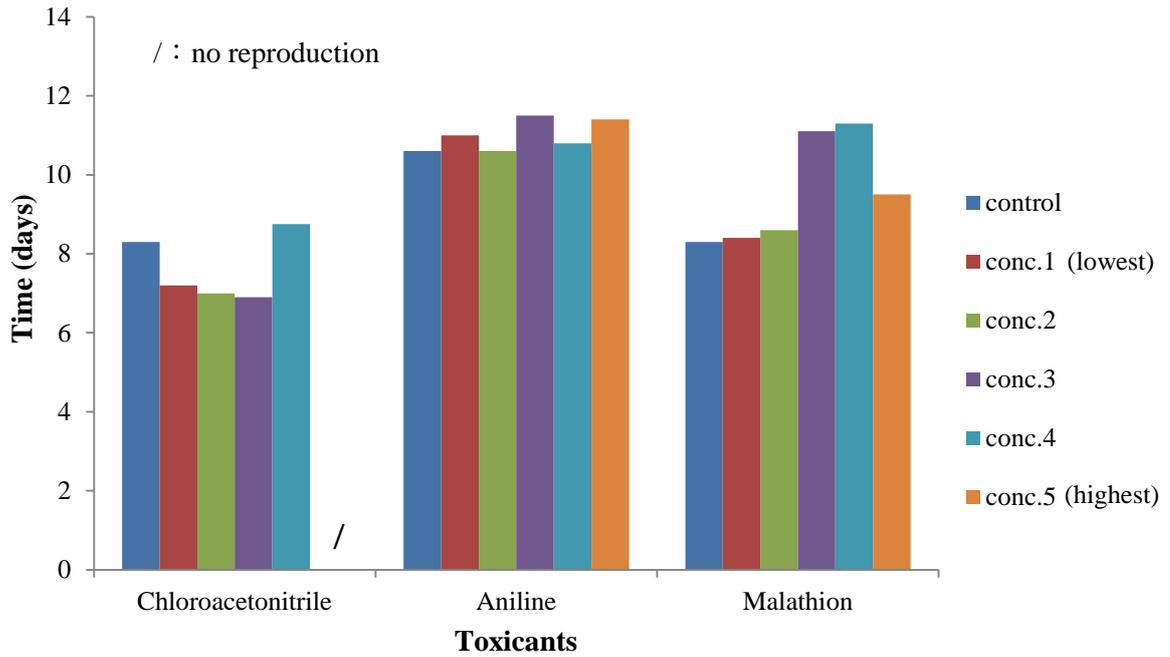


圖 5.1.8 三種毒化物在不同濃度下產生子代的天數

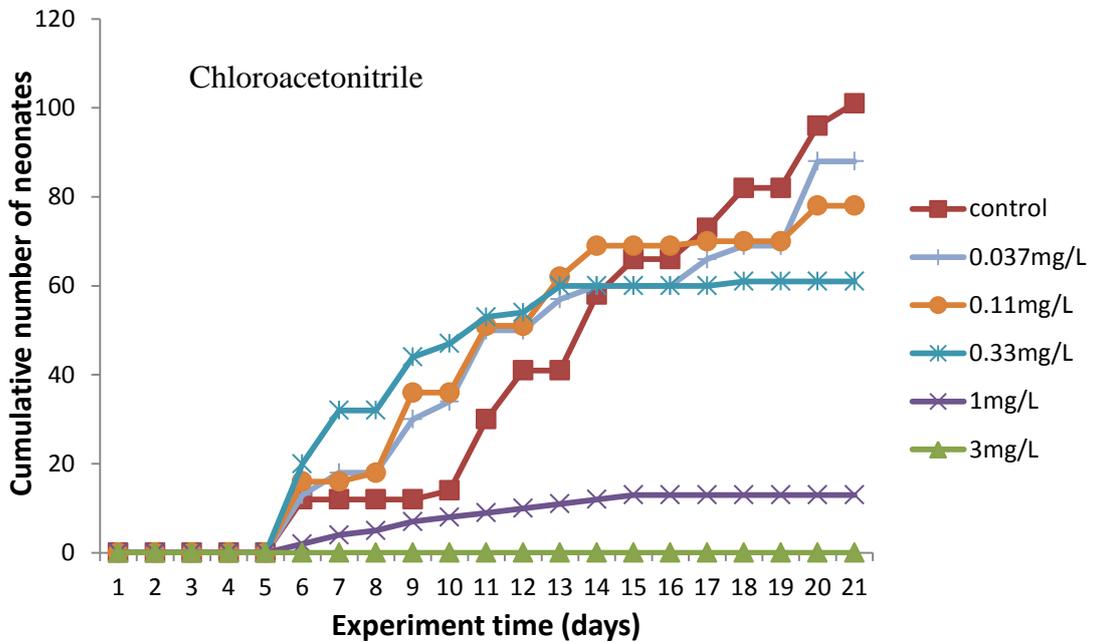


圖 5.1.9 Chloroacetonitrile 21days 慢毒性試驗積累出生子代數

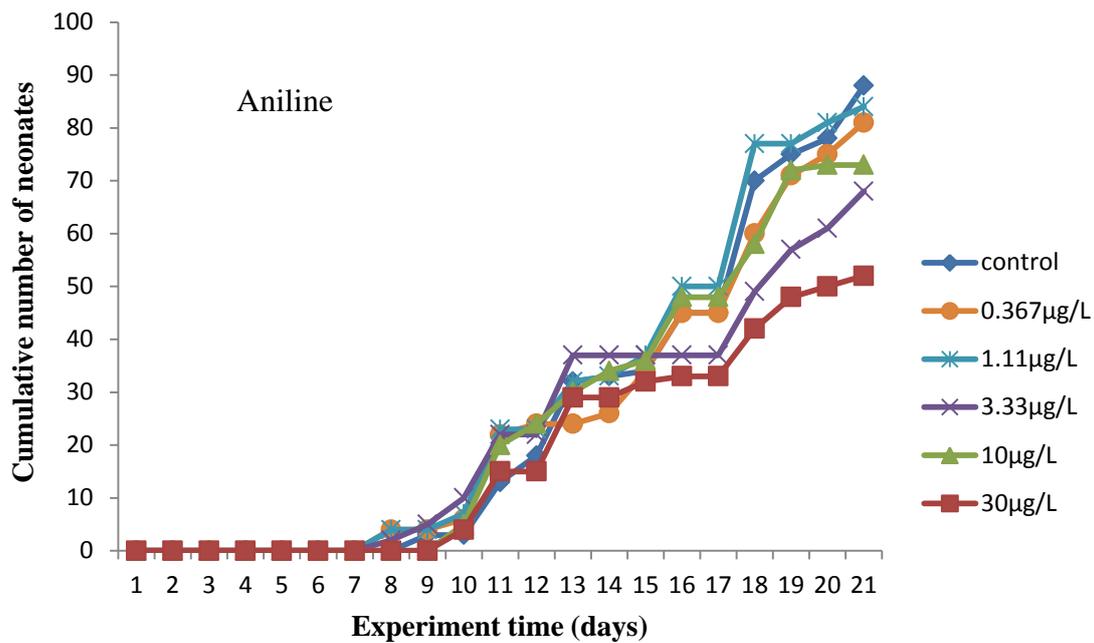


圖 5.1.10 Aniline 21days 慢毒性試驗積累出生子代數

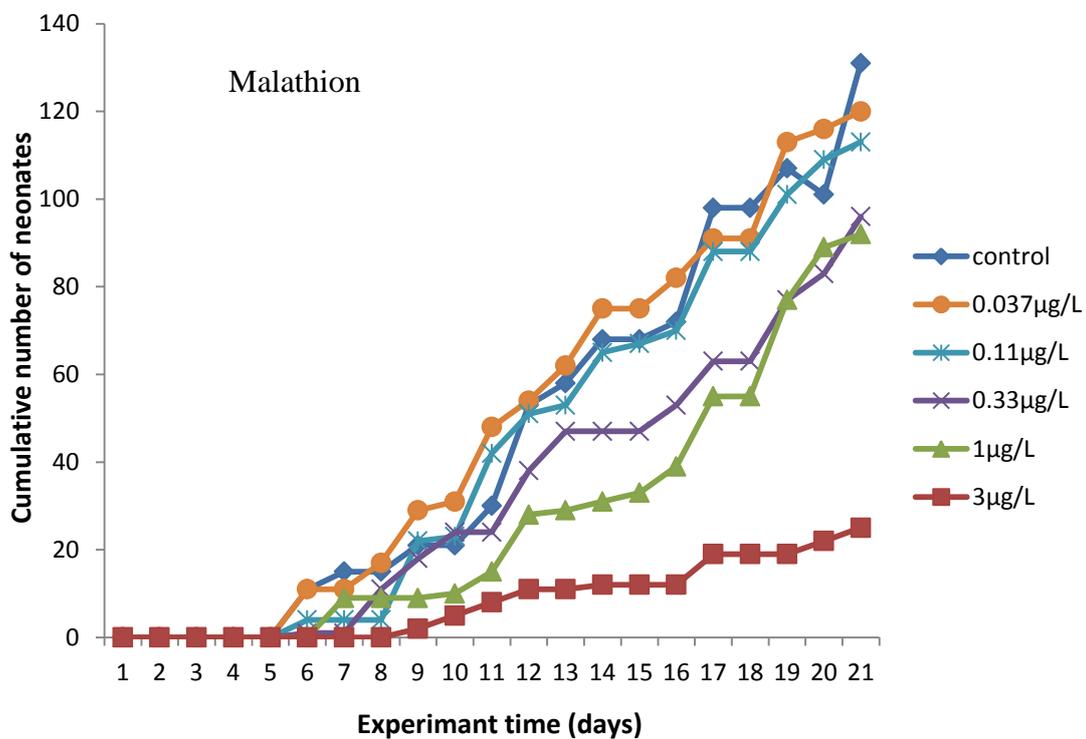


圖 5.1.11 Malathion 21days 慢毒性試驗積累出生子代數

再看到圖 5.1.8~圖 5.1.11 的結果，實驗開始後大約第 6~11 天便出現子代，而後隨著試驗時間增長而增多，這種情形在 control 組和較低的濃度組更容易看出。平均而言，依然是 Aniline 開始產生子代的時間比較晚，從此處也可看出 Aniline 對水蚤具有較強的慢毒性危害。

5.2 混合毒性試驗結果

本研究的急毒性混合試驗是利用毒性單位(Toxic unit, TU)之 95% 信賴區間(Confidence interval, CI)來作判別，當 95% CI 小於 1 時，為協同作用(Synergism)；反過來說，當 95% CI 大於 1 時，則為拮抗作用(Antagonism)；若 95% CI 恰好包含 1 時，則判別為相加作用(Simple addition)。

文獻回顧曾提到說，當毒性物質之作用機制不相同時，其混合毒性試驗結果主要以毒性減弱為主。但依 Chen & Yeh(1996)提出之觀點來看，當兩毒性物質的劑量反應曲線之斜率甚小時，容易呈現協同作用；反之，若兩毒性物質之中有一個的劑量反應曲線之斜率甚大時，則易產生拮抗作用。因此本研究根據 Chen & Yeh 所提出的觀點，利用單一毒性試驗所得之劑量-反應曲線的斜率去探討此三種不同作用機制毒化物的混合毒性效應，並利用混合預測模式來預測這三種毒性物質之兩兩混合效應。

實驗首先以毒性單位比 1:1 作混合毒性試驗。表 5.2.1 為急毒性混合試驗的結果，並和預測之毒性結果做比較，去探討實驗結果和文獻是否有相符合的地方。圖 5.2.1~5.2.3 為劑量-反應曲線圖。

表 5.2.1 48hr 急毒性之混合毒性試驗數據(TU=1:1)

	Observation ^a	Prediction	
		RA ^b	CA ^b
Chloroacetonitrile + Aniline	0.64[+] (0.47-1.01)	1.15[A]	1.00[+]
Chloroacetonitrile + Malathion	1.16[+] (0.81-2.65)	1.29[A]	1.00[+]
Aniline + Malathion	3.61[A] (3.01-4.76)	0.96[+]	1.00[+]

() : 95% Confidence Interval(95% CI)

[] : 毒性混合作用 ; S: synergism ; +: simple addition ; A: antagonism

a : 實驗值之 EC50 值(TU)

b : 實驗預測值，因無 95% CI 值，故將 0.9-1.1 定義為 simple addition ;

RA model($\rho = -1, \lambda = 0$) ; CA model($\rho = 1, \lambda = 1$)

由上表可知，三組結果中，每種作用恰好出現一次，符合 RA model 預測的為 0 組。前文有提到說，在 Chen & Yeh (1996) 的文獻中，若兩毒性物質之中有一個的劑量反應曲線之斜率甚大($\beta > 2$)時，易產生拮抗作用，比對本研究的結果可以發現，只有 Aniline 和 Malathion 的急毒性混合結果為拮抗作用，但卻和 RA model 所預測的結果不符。另外一個大斜率+小斜率的組合為 Chloroacetonitrile + Aniline，由於其 95%CI 過大，造成預測結果呈現簡單相加作用的情況，但其實協同作用亦佔據很大部分，故此兩種毒化物若同時存在，會比預期上還具有危害性。而在本研究中，只有

Chloroacetonitrile + Malathion 的混合毒性試驗皆為大斜率的毒化物，為相加作用。

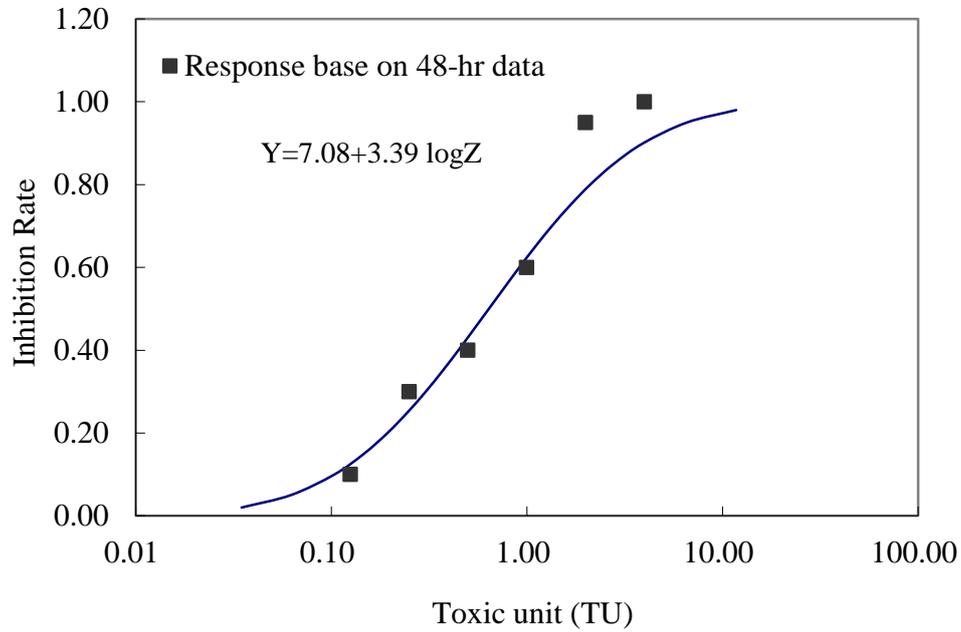


圖 5.2.1 Chloroacetonitrile & Aniline 之 48hr 混合毒性反應劑量曲線

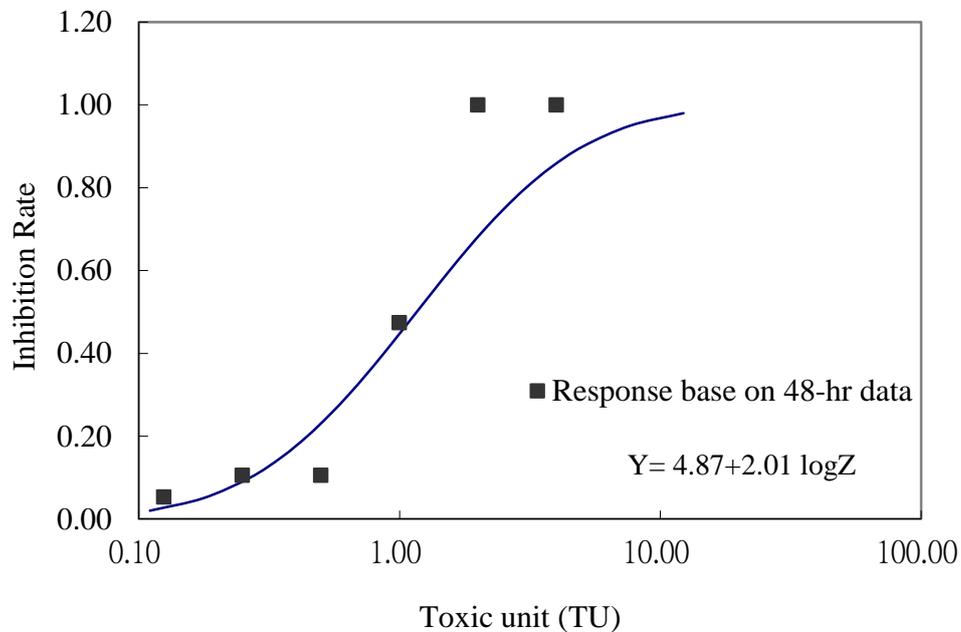


圖 5.2.2 Chloroacetonitrile & Malathion 之 48hr 混合毒性反應劑量曲線

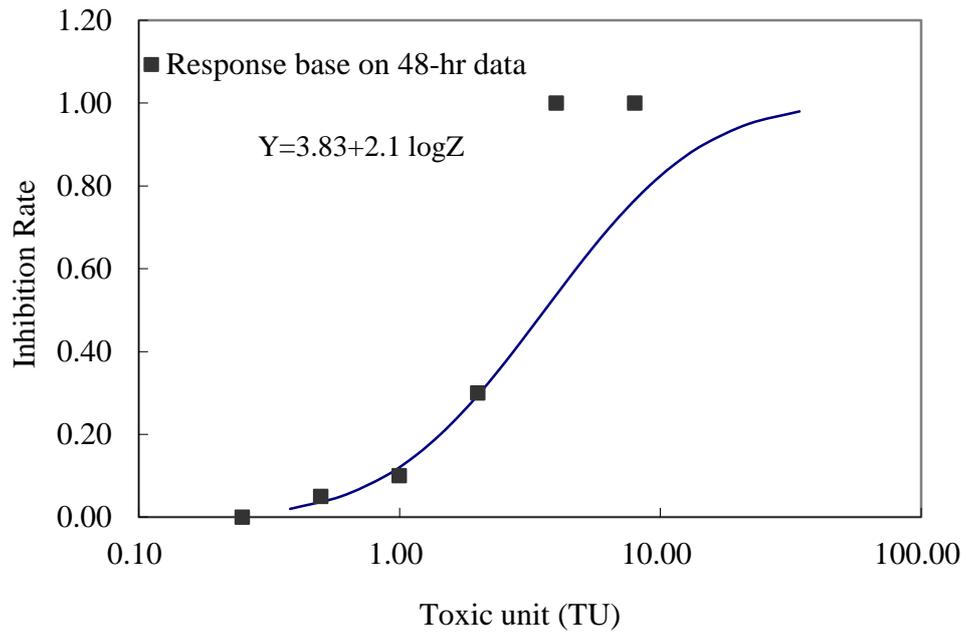


圖 5.2.3 Aniline & Malathion 之 48hr 混合毒性反應劑量曲線

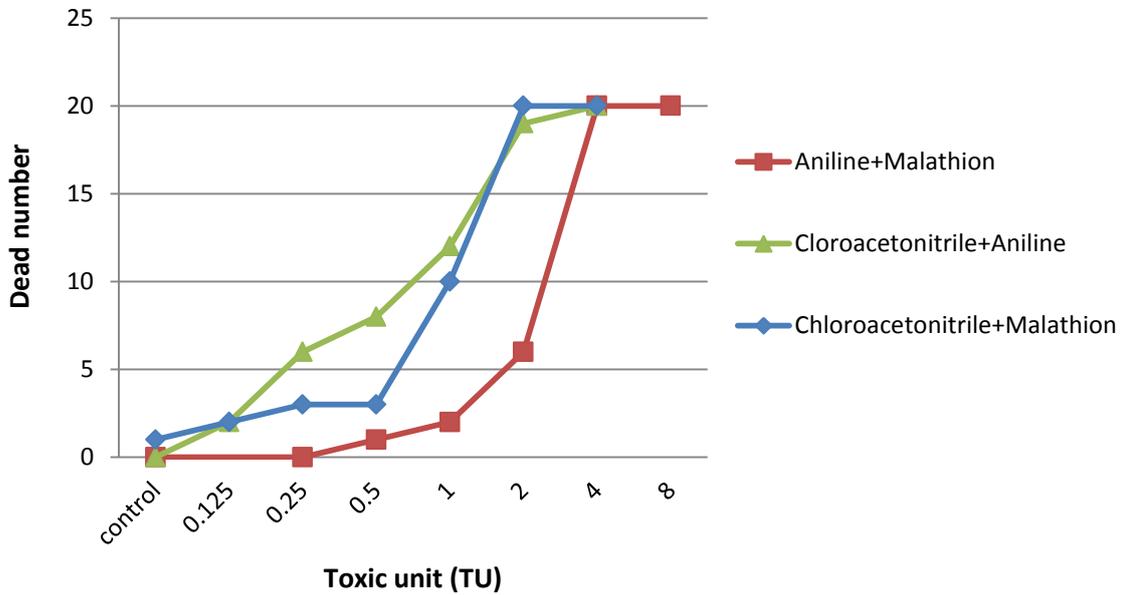


圖 5.2.4 48hr 混合毒性反映曲線-總死亡水蚤數

由於單一慢毒性的結果分析是利用 ANOVA Dunnett's test，不會有 α 和 β 值，故無法利用模式預測其混合後的毒性。另外一點與急毒性不同的是，慢毒性的毒性比例混合是利用 NOEC 值而非 EC_{50} 值，故理論上若實驗觀測出的結果小於 $TU=2$ (即 $TU_1:TU_2=1:1$)，則有可能代表此兩兩混合後的效應對水體環境有潛在的慢毒性危害。圖 5.2.5~5.2.7 為混合慢毒性的原始數據與 NOEC、LOEC 之計算，其詳細的計算方式與過程列於附錄五中。由此可看出，不管是 control 組還是濃度組，其 replicates 間的數據變異度過大，推測原因可能為慢毒性的試驗時間較長(21 天)，且試驗生物本身也容易受到周遭環境影響造成健康度不一致，這些變動因子都可能是使數據再現性不佳的原因。由表 5.2.2 慢毒性之混合慢毒性結果，若環境中同時存在著 Chloroacetoneitrile 和 Malathion，則可能在極低的暴露濃度下，甚至是觀察不到危害的濃度下，便會對水體環境生物造成破壞及影響。

表 5.2.2 21days 慢毒性之混合毒性試驗數據(TU=1:1)

	Observation NOEC(TU)	Observation LOEC(TU)
Chloroacetoneitrile		
+	2	4
Aniline		
Chloroacetoneitrile		
+	0.25	0.5
Malathion		
Aniline		
+	16	32
Malathion		

-Data calculated by ANOVA -Dunnett's Test

TU	control	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	Sum	mean	Row effect
1	15	0	1	6	11	19	12	8	11	83	9.2222222	-1.5666667
2	15	0	6	10	8	11	17	16	14	97	10.7777778	-0.0111111
3	20	0	10	14	12	14	10	12	19	111	12.3333333	1.5444444
4	17	0	14	10	11	15	10	16	11	104	11.5555556	0.7666667
5	13	0	4	4	2	9	9	15	16	72	8	-2.7888889
6	1	0	9	10	14	11	21	12	18	96	10.6666667	-0.1222222
7	11	0	9	11	13	13	8	12	13	90	10	-0.7888889
8	18	0	10	10	15	9	7	12	15	96	10.6666667	-0.1222222
9	18	0	8	11	11	10	20	15	20	113	12.5555556	1.7666667
10	21	0	13	14	9	8	12	18	14	109	12.1111111	1.3222222
Sum	149	0	84	100	106	119	126	136	151	971	10.7888889	
mean	14.9	0	8.4	10	10.6	11.9	12.6	13.6	15.1	10.7889		
Column ef	4.11111	-10.789	-2.388889	-0.7889	-0.1889	1.11111	1.81111	2.81111	4.31111			
Difference	-	-14.9	-6.5	-4.9	-4.3	-3	-2.3	-1.3	0.2			
d/Sd	-	-9.0783	-3.960349	-2.9855	-2.6199	-1.8279	-1.4014	-0.7921	0.12186			
Sum(Yij ²)	2519	0	844	1086	1246	1519	1812	1926	2369	13321		
c=9	n=10									6994.3333		
A	R	K	全部總和		C							
13321	10644.6	12182.7	971	10476								
SSqE	msq	Sd	(dut)1-tail	(dut)2-tail								
969.756	13.4688	1.64127	2.434	2.722								

圖 5.2.5 Chloroacetonitrile & Aniline 之混合慢毒性數據計算-

NOEC & LOEC



TU	control	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	Sum	mean	Row effect
1	20	0	0	6	17	18	4	15	15	95	10.5555556	-0.3555556
2	20	0	0	16	11	22	8	15	21	113	12.5555556	1.6444444
3	14	0	0	11	11	15	10	13	16	90	10	-0.9111111
4	8	0	0	6	15	14	15	10	20	88	9.7777778	-1.1333333
5	15	0	0	12	14	9	20	18	14	102	11.3333333	0.4222222
6	20	0	0	16	9	10	16	10	22	103	11.4444444	0.5333333
7	21	0	0	12	18	16	15	14	10	106	11.7777778	0.8666667
8	17	0	0	17	18	16	10	8	17	103	11.4444444	0.5333333
9	13	0	0	15	13	11	16	11	13	92	10.2222222	-0.6888889
10	19	0	0	12	13	13	8	9	16	90	10	-0.9111111
Sum	167	0	0	123	139	144	122	123	164	982	10.9111111	
mean	16.7	0	0	12.3	13.9	14.4	12.2	12.3	16.4	10.9111		
Column ef	5.78889	-10.911	-10.91111	1.38889	2.98889	3.48889	1.28889	1.38889	5.48889			
Difference	-	-16.7	-16.7	-4.4	-2.8	-2.3	-4.5	-4.4	-0.3			
d/Sd	-	-10.646	-10.64593	-2.8049	-1.7849	-1.4662	-2.8687	-2.8049	-0.1912			
Sum(Yij ²)	2945	0	0	1651	2019	2212	1706	1605	2816	14954		
c=9	n=10									6401.5		
A	R	K	全部總和		C							
14954	10784.4	13998.4	982	10714.7								
SSqE	msq	Sd	(dut)1-tail	(dut)2-tail								
885.867	12.3037	1.56867	2.434	2.722								

圖 5.2.6 Chloroacetonitrile & Malathion 之混合慢毒性數據計算-

NOEC & LOEC

TU	control	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	Sum	mean	Row effect
1	13	0	12	9	11	2	4	9	2	62	6.8888889	-0.6555556
2	9	0	6	7	11	10	8	8	16	75	8.3333333	0.7888889
3	12	2	5	7	11	10	11	11	5	74	8.2222222	0.6777778
4	5	0	6	9	13	5	5	8	7	58	6.4444444	-1.1
5	12	0	11	10	14	11	8	16	14	96	10.6666667	3.1222222
6	4	0	3	9	13	13	12	5	7	66	7.3333333	-0.2111111
7	14	0	0	13	7	11	6	11	6	68	7.5555556	0.0111111
8	6	2	9	13	9	0	5	4	4	52	5.7777778	-1.7666667
9	9	0	12	9	5	4	5	11	8	63	7	-0.5444444
10	12	0	12	12	9	6	1	1	12	65	7.2222222	-0.3222222
Sum	96	4	76	98	103	72	65	84	81	679	7.5444444	
mean	9.6	0.4	7.6	9.8	10.3	7.2	6.5	8.4	8.1	7.54444		
Column ef	2.05556	-7.1444	0.0555556	2.25556	2.75556	-0.3444	-1.0444	0.85556	0.55556			
Difference	-	-9.2	-2	0.2	0.7	-2.4	-3.1	-1.2	-1.5			
d/Sd	-	-5.9046	-1.283604	0.12836	0.44926	-1.5403	-1.9896	-0.7702	-0.9627			
Sum(Yij^2)	1036	8	740	1004	1133	692	521	870	839	6843		
c=9	n=10									2587		
A	R	K	全部總和		C							
6843	5267	5824.7	679	5122.68								
SSqE	msq	Sd	(dut)1-tail	(dut)2-tail								
873.978	12.1386	1.55811	2.434	2.722								

圖 5.2.7 Aniline & Malathion 之混合慢毒性數據計算- NOEC & LOEC

表 5.2.3 急慢毒性之混合毒性作用

	Acute toxicity	Chronic toxicity
Chloroacetonitrile + Aniline	Simple addition [+]	Simple addition [+]
Chloroacetonitrile + Malathion	Simple sddition [+]	Synergism [S]
Aniline + Malathion	Antagonism [A]	Antagonism [A]

表 5.2.3 為混合急慢毒性作用比較，除了 Chloroacetonitril + Malathion 這組的作用不相同外，其餘兩組在兩種毒性試驗下所呈現的毒性作用為相似的。

由表 5.2.4 可觀察到，Chloroacetonitrile 和 Malathio 這組的最高兩個 TU 均無母蚤存活亦無子代數，也可以對應到上述所提到的結果。而在總出生子代數的部分可以發現，除了母蚤全數死亡的 TU 以外，其餘的總出生子代數在 TU 值間或 control 組間並無明顯的變化。

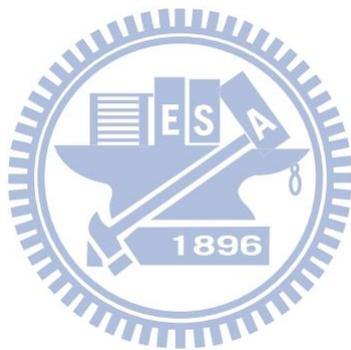


表 5.2.4 *Daphnia magna* 14days 和 21days 慢毒性混合試驗比較

Chemicals	TU	Survival(%)		Total neonates	
		14-days	21-days	14-days	21-days
Chloroacetonitrile + Aniline	Control	100	100	78	149
	0.25	100	90	92	151
	0.5	100	100	74	136
	1	100	100	84	126
	2	100	100	65	119
	4	100	100	63	106
	8	100	100	62	100
	16	90	90	53	84
	32	0	0	0	0
Chloroacetonitrile + Malathion	Control	90	90	84	167
	0.25	100	100	82	164
	0.5	90	90	72	123
	1	100	100	63	122
	2	100	90	86	144
	4	100	100	68	139
	8	90	80	66	123
	16	0	0	0	0
	32	0	0	0	0

表 5.2.4(續) *Daphnia magna* 14days 和 21days 慢毒性混合試驗比較

Chemicals	TU	Survival(%)		Total neonates	
		14-days	21-days	14-days	21-days
Aniline + Malathion	control	100	100	60	96
	0.25	100	100	61	81
	0.5	100	100	60	84
	1	100	100	50	65
	2	100	90	58	72
	4	100	100	78	103
	8	100	100	56	98
	16	90	90	35	76
	32	30	20	2	4

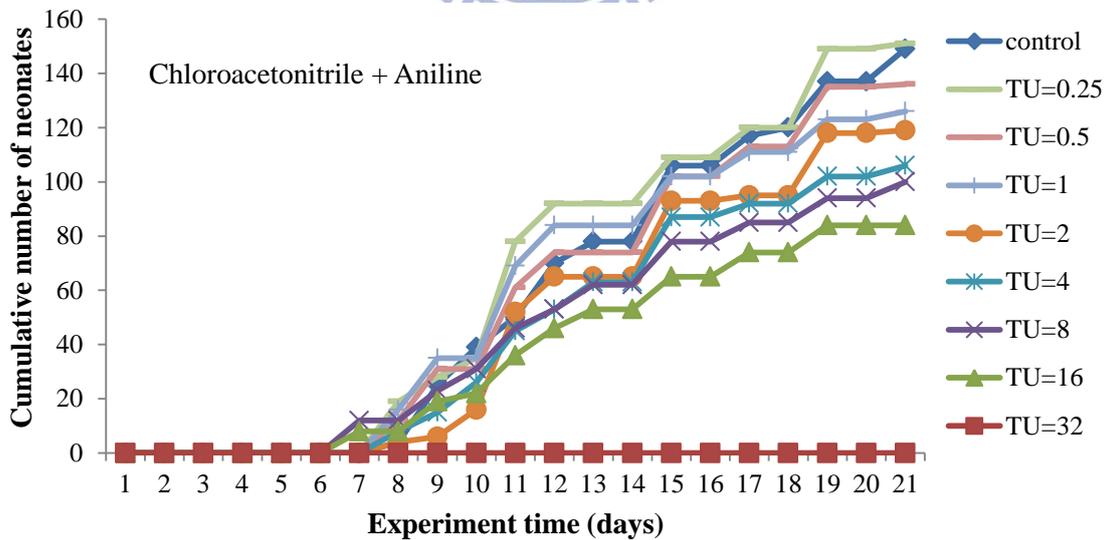


圖 5.2.8 Chloroacetonitrile+Aniline 21days 慢毒性混合試驗積累性出生子代數

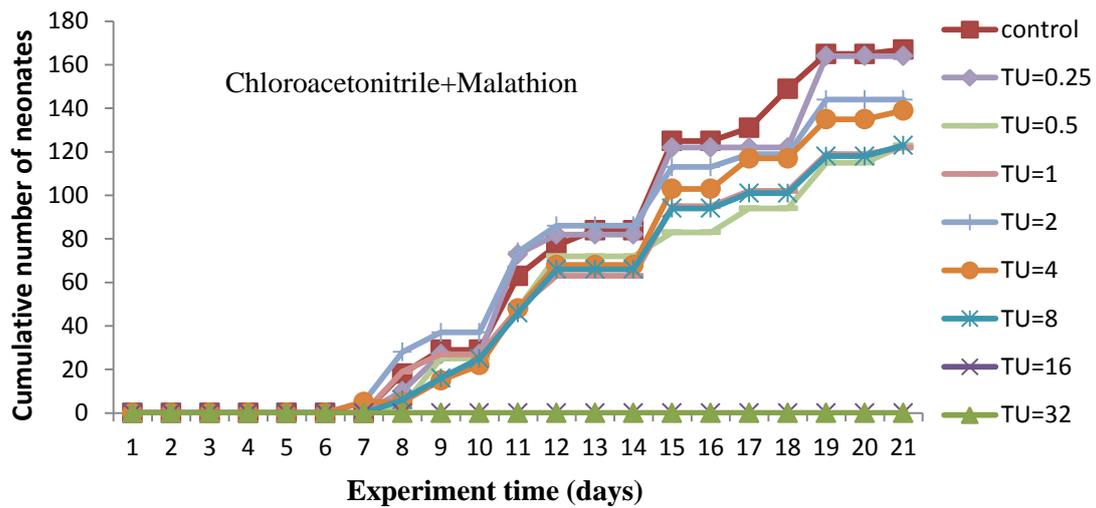


圖 5.2.9 Chloroacetonitrile+Malathion 21days 慢毒性混合試驗積累性出生子代數

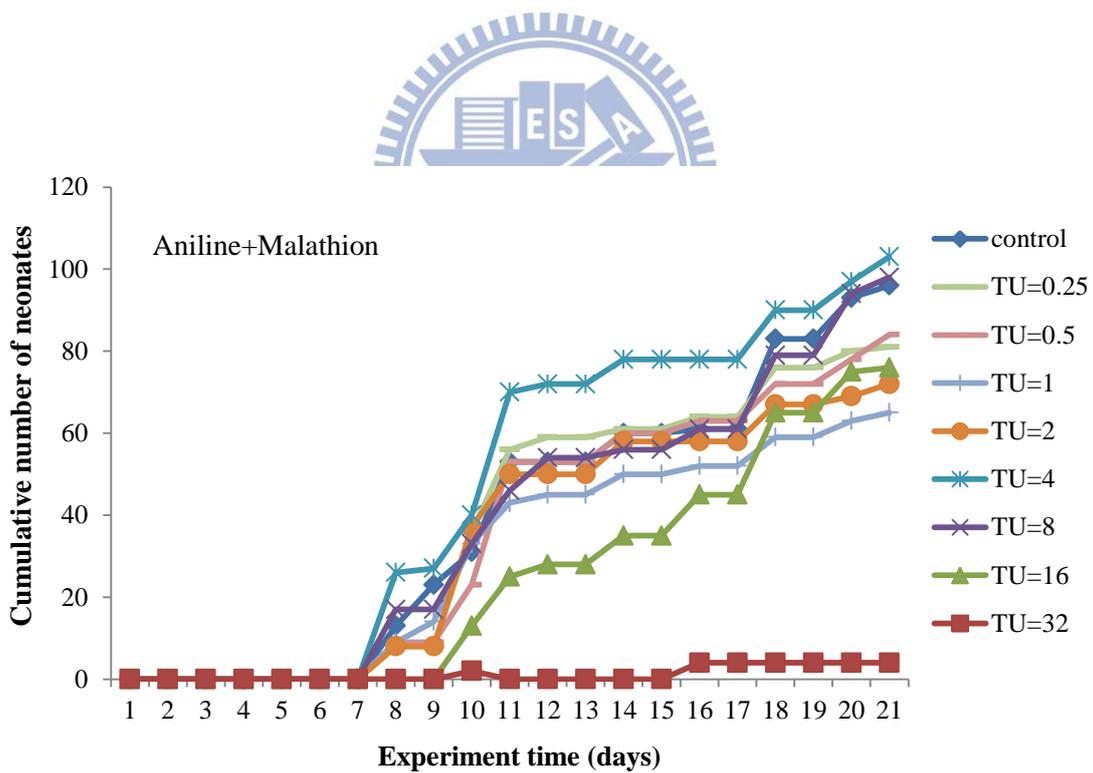


圖 5.2.10 Aniline+Malathion 21days 慢毒性混合試驗積累性出生子代

圖 5.2.8~5.2.10 為 21days 慢毒性混合試驗的每日出生子代數累積量，發現最高 TU 的部分(TU=32)與 control 組有最顯著的差異，而其他 TU 值的趨勢則大約為隨著 TU 值增加，每日出生子代數的累積量減少。可對照圖 5.2.11，可以更清楚的看出 TU 值和子代數的關係。再加上圖 5.2.14 可以發現，實驗開始後約第 8~13 天開始出現子代，而後一樣隨著試驗時間拉長而增加，跟單一毒性結果比較不一樣的地方是，除了最高 TU 外，其餘隨試驗時間的增加量較不明顯，出生時間也較延緩，推測可能的原因為水蚤，因為是自行養殖，加上一些外在因素的影響，可能會導致每次實驗的水蚤自身健康度不一致，這種自身影響因子在慢毒性試驗中比急毒性試驗更容易對結果有影響。

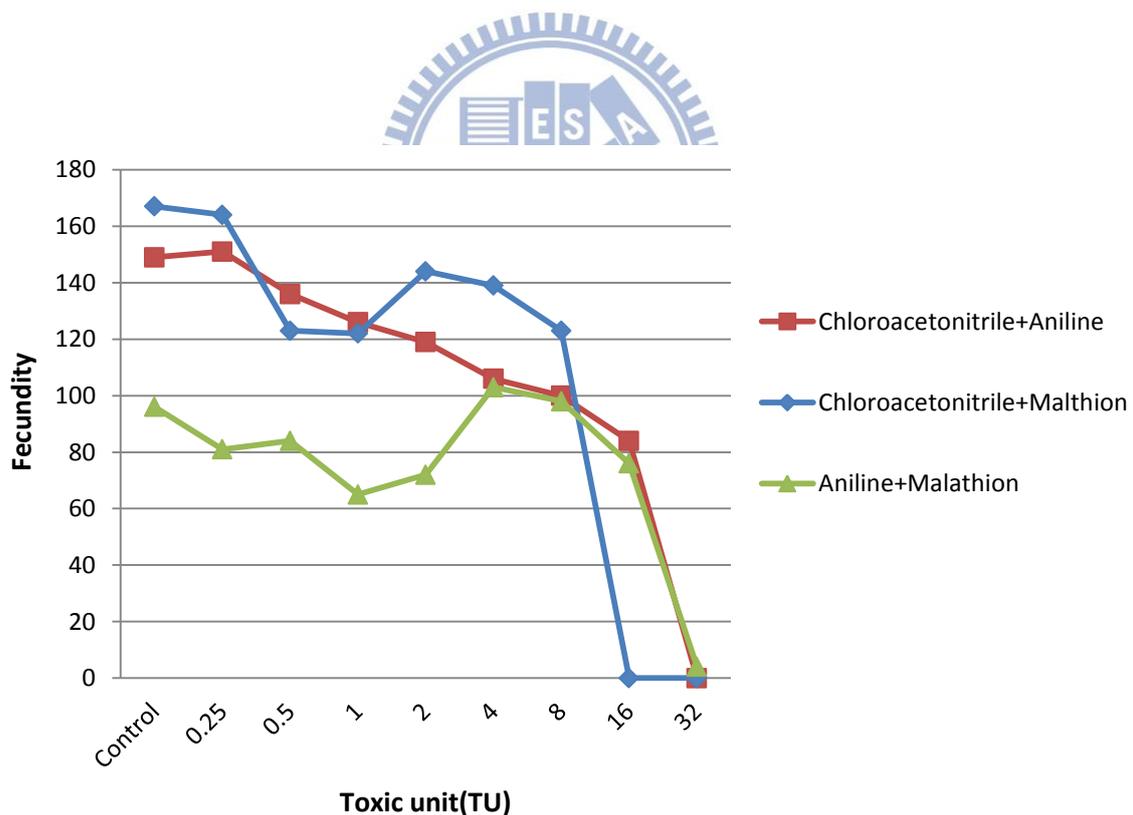


圖 5.2.11 21days 混合毒性反應曲線-總出生子代數

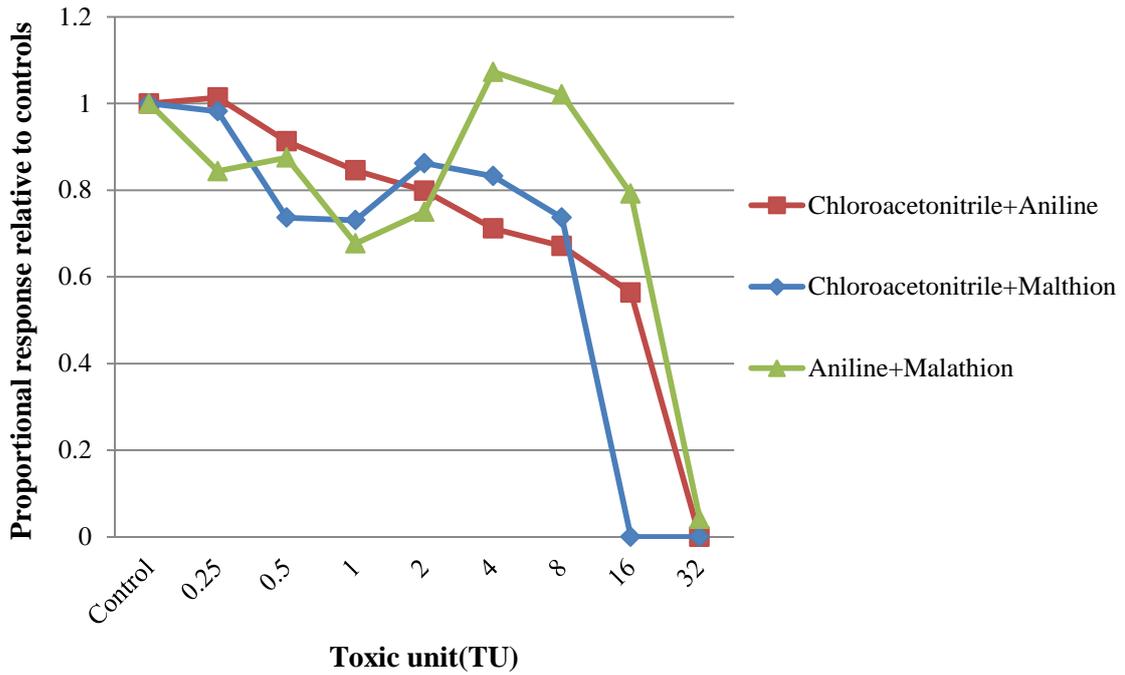


圖 5.2.12 21days 混合毒性反應曲線-總出生子代數

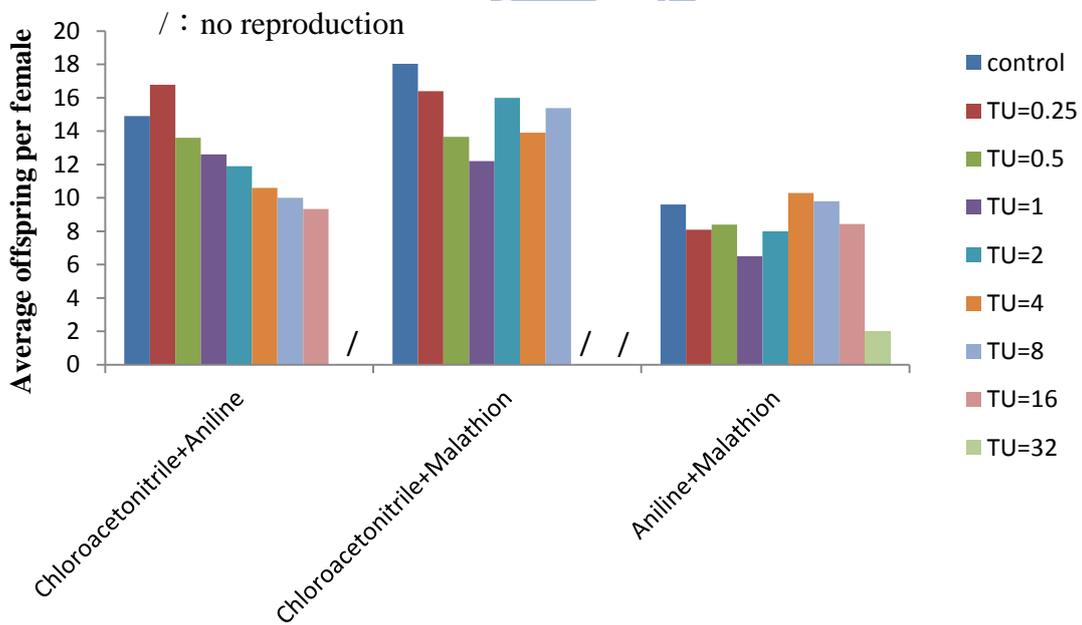


圖 5.2.13 21days 混合毒性反應曲線-平均子代數

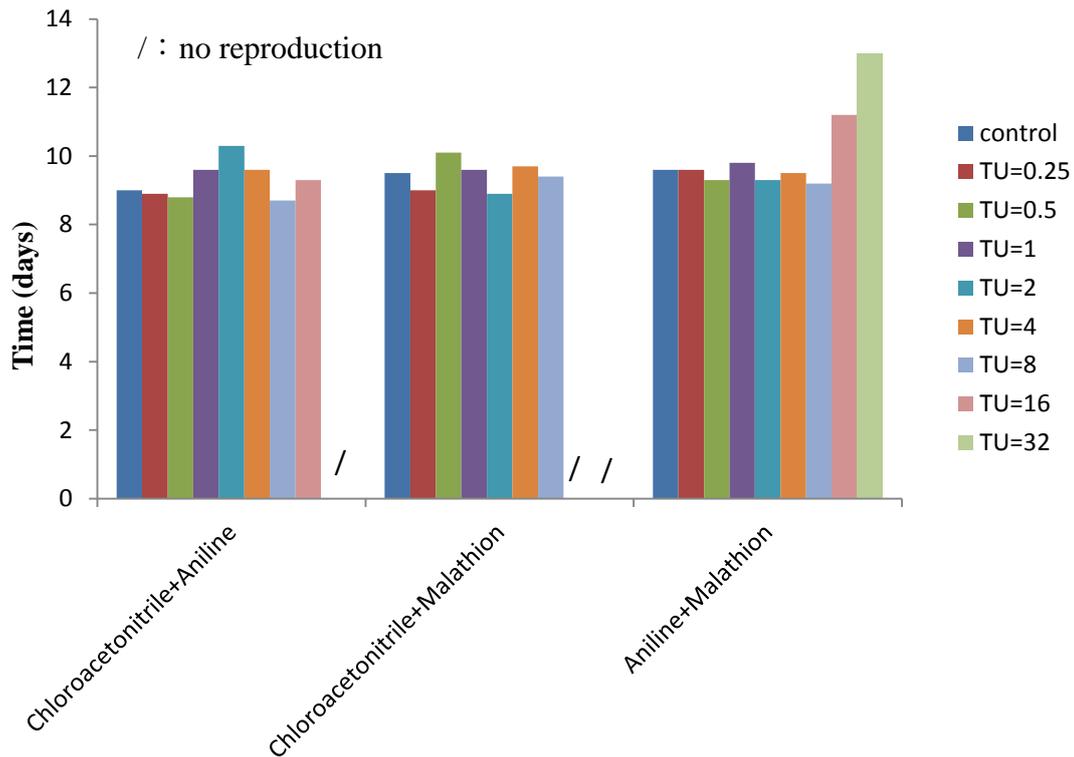


圖 5.2.14 21days 混合毒性反應曲線-平均出生子代天數



5.3 Isobologram

本實驗亦利用 isobologram 來描述混合毒性效應，主要是藉由不同的毒性比例來進行毒性物質混合，以求得其完整的混合毒性結果，並觀察分析是否有“非交互作用”以外的情形產生。挑選的試驗組別分別為 Chloroacetonitrile+Aniline、Chloroacetonitrile+Malathion 及 Aniline+Malathion 之 48hr 急毒性試驗，下圖 5.3.1~5.3.3 分別為 isobologram 的分析結果。

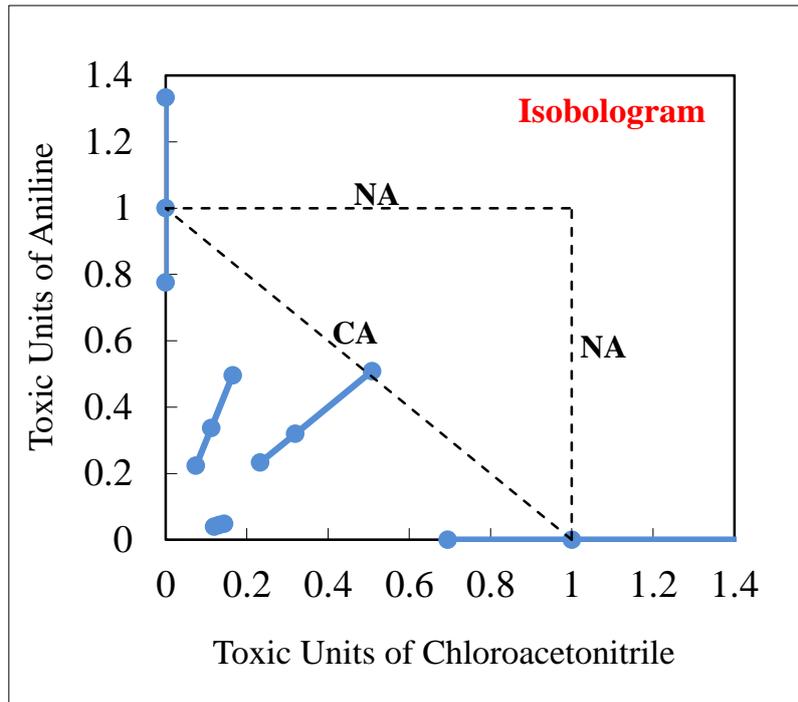


圖 5.3.1 Chloroacetonitrile + Aniline 之 Isobologram 分析圖

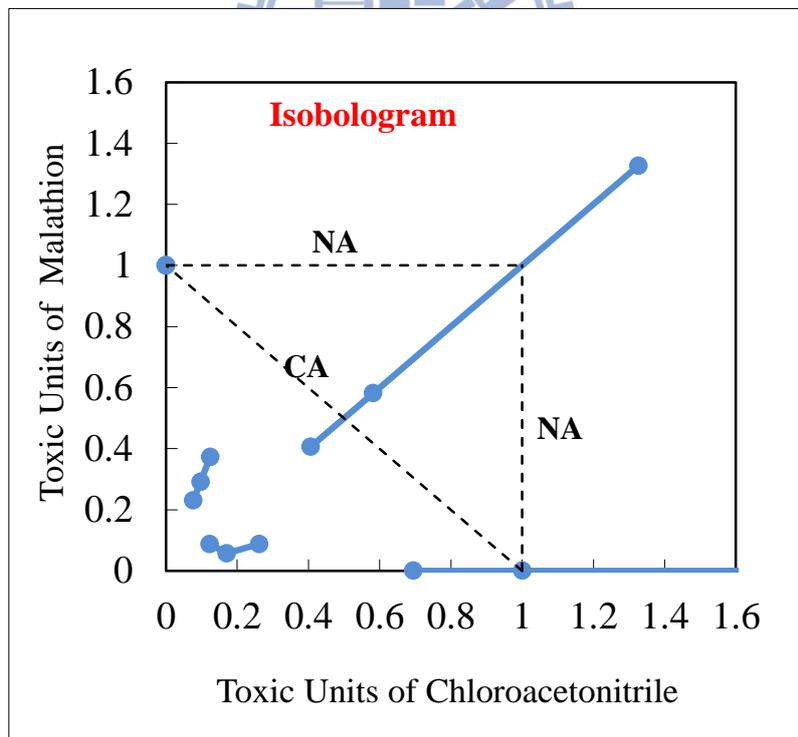


圖 5.3.2 Chloroacetonitrile + Malathion 之 Isobologram 分析圖

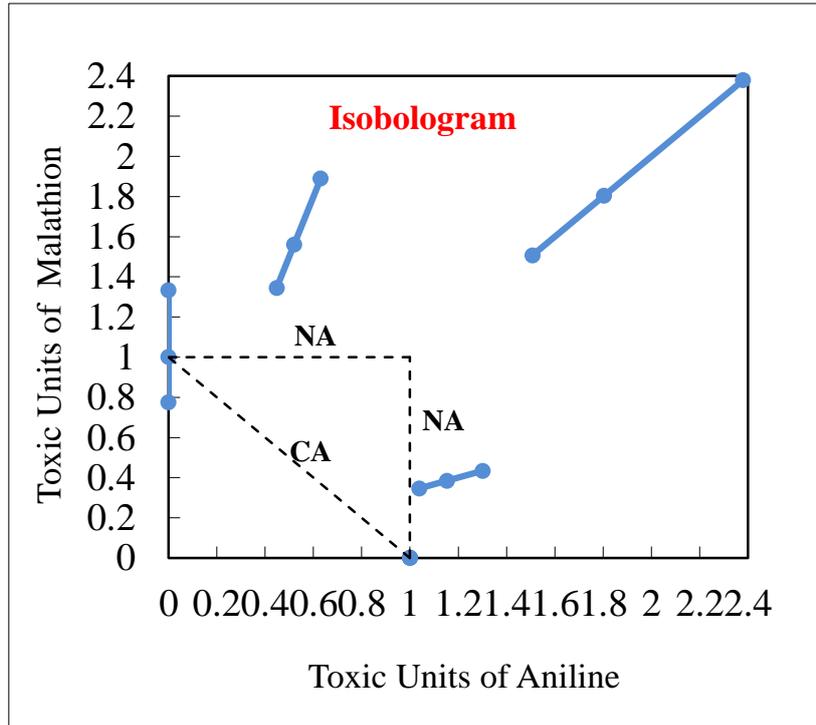


圖 5.3.3 Aniline + Malathion 之 Isobologram 分析圖

可以看到在圖 5.3.2，即 Chloroacetonitrile + Malathion，有部分落在代表非交互作用的虛線區塊以外，而在圖 5.3.3，也就是 Aniline + Malathion 的組別，幾乎全部都落在虛線區塊以外，由此可以判定在這兩組的混合試驗中，可能存在著交互作用的毒性效應，才會使得 isobologram 的圖中有落於虛線外的點。另外一組 Chloroacetonitrile + Aniline 的 isobologram 圖，其點皆落在 CA(Concentration Addition)作用的虛線下方，呈現出協同的毒性效應，推測可能是由於非交互作用即交互作用皆存在於這兩種毒化物之間，而此兩種作用混合後的結果，造成其混合效應並不如非交互理論條件下之 RA 模式預測的結抗作用。

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

在毒性試驗中，由於慢毒性試驗所需花費的時間較長，少為 10 幾天，多則幾年，對於人力和金錢的花費也較大，因此就發展出一利用固定因子來評估毒化物在環境中的慢毒性影響的方法，即為急慢毒性比值(ACR)。

根據文獻指出，有些研究利用急毒性的 EC_{10} 取代慢毒性 NOEC，以便計算 ACR。在本研究中，我們利用實驗所求得的急慢毒性的毒性值(EC_{50} 和 NOEC)去求取 ACR 值，再和用急毒性 EC_{10} 求出的 ACR 值作比較。

下表 5.4.1.的結果指出，利用急毒性數據 EC_{10} 得到的 ACR 值(即 ACR_2)會小於利用慢毒性數據 NOEC 得到的 ACR 值(即 ACR_1)，這表示在環境風險評估中，若因為慢毒性的試驗時間過長，而改用急毒性數據 EC_{10} 取代慢毒性數據 NOEC，可能會低估毒性化學物質在環境中的慢毒性影響。但由於本研究之慢毒性試驗，其重複組(replicates)間的變異度(variability)過大，對計算出的 NOEC 值會產生 error，即會受其組間變異影響而使 ACR_1 值較不可靠。

表 5.4.1. 急慢毒性比值

	ACR_1^a	ACR_2^b
Chloroacetonitrile	143.21	1.96
Aniline	3.86	6.24
Malathion	4.03	2.96

-. No data

a. $ACR_1 = \text{Daphnia acute toxicity } EC_{50} / \text{Daphniac chronic toxicity NOEC}$

b. $ACR_2 = \text{Daphnia acute toxicity } EC_{50} / \text{Daphnia acute toxicity } EC_{10}$

在過去的研究，Z. Tong *et al.*(1996)以丙烯腈和乙腈這兩種毒性物質來進行水蚤 48 小時急毒性實驗和 14 天及 21 天慢毒性實驗，但其中計算 ACR

值的方法跟本研究稍有不同，故為了方便作比較，便利用其文獻中所給的毒性實驗值 48-hr LC_{50} 和 NOEC 去進行 ACR 值的運算。計算出的丙烯腈之 ACR 為 20，乙腈之 ACR 為 22.5，值都略低於本研究中的氯乙腈 (ACR=143.21)，但亦沒有很大的差異。



第六章 結論與建議

6.1 結論

本研究針對極性麻醉性的 Aniline 以及反應性的 chloroacetonitrile 和 Malathion，使用水蚤急慢毒性試驗方法進行單一以及混合毒性試驗，並探討毒性試驗的結果以及混合毒性效應與預測模式，以下為本研究的結論：

1. 單一急毒性結果中，以 Malathion 的毒性為高， EC_{50} 值為 38.6×10^{-3} mg/L；Chloroacetonitrile 的毒性最低， EC_{50} 值為 5.2989 mg/L，其劑量反應曲線斜率亦為三種毒化物中最高的。在單一慢毒性的結果中，NOEC 值最小的為 Malathion，其值為 0.33×10^{-3} mg/L；而 Chloroacetonitrile 的 NOEC 值最大，為 3.7×10^{-2} mg/L。
2. 三種毒化物中，不管是急毒性或是慢毒性結果，其單一的毒性大小均為 Malathion > Aniline > Chloroacetonitrile。
3. 在慢毒性試驗中，Chloroacetonitrile 和 Malathion 混合後發現，若在水體中有此兩種毒化物同時存在時，便可能造成毒性協同的情況發生，即對環境有較大的慢毒性危害。
4. 由急慢毒性混合毒性作用之比較，Chloroacetonitrile+Aniline 和 Aniline+Malathion 這兩組在不同的試驗中均呈現出相似的毒性交互作用，分別為簡單相加作用(Simple addition)與拮抗作用(Antagonism)。另一組 Chloroacetonitrile+Malathion 在急毒性部分呈現簡單相加作用，在慢毒性部分卻為協同作用(Synergism)，可能因為慢毒性作用時間較長，造成毒化物對生物的危害增加，另外也可能是慢毒性數據的變異度過大，造成急慢毒性混合試驗結果不同。
5. 以急毒性的 EC_{10} 取代慢毒性 NOEC 計算急慢毒性比值(ACR) 可能會低估毒性化學物質在環境中的慢毒性影響。

6.2 建議

1. 本研究的慢毒性試驗上，由於實驗空間的關係，並無法一次把單一與混合毒性一起做完，必須要分成兩批次，故以試驗物種來說，不是在相同的時間，即並非同一批次的試驗水蚤，故物種本身的健康度差異加上周遭環境變化便會對實驗結果造成極大的影響。
2. 慢毒性試驗需要較長時間的暴露，或是需依據其試驗物種的繁殖週期而定，花費的人力時間金錢較高，毒性資料也較缺乏，但卻為一環境生態評估的重要因子，故需要訂定更完整的試驗流程與評估方式，才能有效地評估毒性物質在環境中的潛在危害。
3. 一個完整的預測模式必須要有龐大的毒性數據資料作後盾，故未來不只是急毒性試驗，連慢毒性試驗也要利用多種營養階層的試驗物種進行毒性試驗，且要增加受評估的毒物種類，進一步的運用於環境風險評估上，相信對未來的環境保護一定有很大的貢獻。
4. 混合毒性牽涉的範圍很廣，要考慮的影響因子很多，除了毒化物本身在生物體的作用位置不同，還包括毒化物間的化學反應、毒化物本身的降解、毒化物和環境間的反應、毒化物動力學等等，都是會造成毒性效應複雜的原因，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。

第七章 參考文獻

1. Kolpin, D., et al., *Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams*. Environmental Science&Technology, 2002. **36**: p. 1202-1211.
2. Neuwoehner, J., et al., *QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids*. Aquatic Toxicology, 2010. **97**(1): p. 58-67.
3. Nunes-Halldorson, V.d.S., R.L. Steiner, and G.B. Smith, *Residual toxicity after biodegradation: interactions among benzene, toluene, and chloroform*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004. **57**(2): p. 162-167.
4. Altenburger, R., M. Nendza, and G. Schüürmann, *Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2003. **22**(8): p. 1900-1915.
5. BARATA, C., et al., *A Daphnia magna feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for Environmental Risk Assessment of toxic effluents*. Science of the Total Environment, 2008. **405**: p. 78-86.
6. Chen, C.-Y. and C.-L. Lu, *An analysis of the combined effects of organic toxicants*. Science of the Total Environment, 2002. **289**(1-3): p. 123-132.
7. Chen, C.-Y. and J.-T. Yeh, *Toxicity of binary mixtures of reactive toxicants*. Environmental Toxicology and Water Quality, 1996. **11**(2): p. 83-90.
8. Vaal, M., et al., *Pattern analysis of the variation in the sensitivity of aquatic species to toxicants*. Chemosphere, 1997. **35**(6): p. 1291-1309.
9. Wang, Y.-S., K.-T. Tai, and J.-H. Yen, *Separation, bioactivity, and dissipation of enantiomers of the organophosphorus insecticide fenamiphos*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004. **57**(3): p. 346-353.
10. Tatarazako, N. and S. Oda, *The water flea Daphnia magna (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans*. Ecotoxicology, 2007. **16**: p. 197-203.

11. Munzinger, A. and F. Monicelli, *Heavy metal co-tolerance in a chromium tolerant strain of Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 1992. **23**(3??): p. 203-216.
12. 環境檢驗所, *生物急毒性檢測方法—水蚤靜水式法*, 民國 100 年.
13. USEPA, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms.*, 2002: U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
14. OECD, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test.*, in 2004.
15. USEPA, *Sort-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*, 2002: U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
16. OECD, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 202: Daphnia magna Reproduction Test*, 2004.
17. Villarroel, M.J., et al., *Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on Daphnia magna*. *Chemosphere*, 2003. **53**: p. 857-864.
18. Little, E.E. and S.E. Finger, *Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1990. **9**(1): p. 13-19.
19. 王凱淞, et al., *殺蟲劑(Malathion, Cypermethrin, Paraquat)對圓水蚤(Daphnia pulex)之急毒性及趨光行爲之探討*. *中山醫學雜誌*, 2007. **18**: p. 271-289.
20. Schultz, T., G. Sinks, and A. Bearden, *QSAR in aquatic toxicology: A mechanism of action approach comparing toxic potency to Pimephales promelas, Tetrahymena pyriformis, and Vibrio fischeri*. *Comparative QSAR*, 1998: p. 51-109.
21. S, R. and F. PD, *Modeling the toxicity of polar and nonpolar narcotic compounds to luminescent bacterial SHK1*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002. **21**: p. 2649-2653.
22. Verhaar, H.J.M., C.J. van Leeuwen, and J.L.M. Hermens,

- Classifying environmental pollutants*. Chemosphere, 1992. **25**(4): p. 471-491.
23. Liao, Y.Y., et al., *Toxicity QSAR of Substituted Benzenes to Yeast Saccharomyces cerevisiae*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1996. **56**(3): p. 460-466.
 24. Russom, C.L., et al., *Predicting modes of toxic action from chemical structure: Acute toxicity in the fathead minnow (Pimephales promelas)*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1997. **16**(5): p. 948-967.
 25. Bliss, C.I., *THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY I*. Annals of Applied Biology, 1939. **26**(3): p. 585-615.
 26. Plackett, R.L. and P.S. Hewlett, *Quantal Responses to Mixtures of Poisons*. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), 1952. **14**(2): p. 141-163.
 27. Christensen, E.R. and C.-Y. Chen, *A General Noninteractive Multiple Toxicity Model Including Probit, Logit, and Weibull Transformations*. Biometrics, 1985. **41**(3): p. 711-725.
 28. Lin, Z., et al., *Development of QSARs for Predicting the Joint Effects between Cyanogenic Toxicants and Aldehydes*. Chemical Research in Toxicology, 2003. **16**(10): p. 1365-1371.
 29. Lin, Z., et al., *Development of a Fragment Constant Method for Estimating the Mixture Toxicity*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2004. **46**(1): p. 1-7.
 30. 王順成, *農藥的毒性*. 2011.
 31. Damásio, J., et al., *Biochemical mechanisms of resistance in Daphnia magna exposed to the insecticide fenitrothion*. Chemosphere, 2007. **70**(1): p. 74-82.
 32. Tong, Z., Z. Huailan, and J. Hongjun, *Chronic Toxicity of Acrylonitrile and Acetonitrile to Daphnia magna in 14-d and 21-d Toxicity Tests*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1996. **57**(4): p. 655-659.

附錄一 單一毒性原始數據

實驗毒物：Chloroacetonitrile

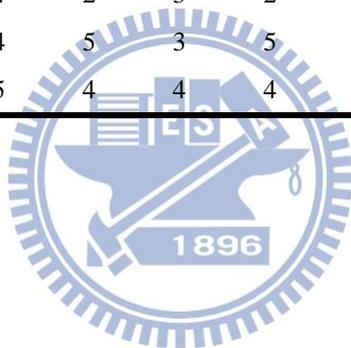
Test duration: 48hr

Conc (mg/L)	Initial number	Final number				Final number (sum)	Q (%)	IR
Control	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0
10	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
6.667	5 隻 x4 杯	0	0	4	0	4	0.2	0.8
4.44	5 隻 x4 杯	3	4	5	4	16	0.8	0.2
2.96	5 隻 x4 杯	5	5	4	4	18	0.9	0.1
1.975	5 隻 x4 杯	5	5	4	5	19	0.95	0.05
1.317	5 隻 x4 杯	5	5	5	4	19	0.95	0.05
Control	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0
10	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
6.667	5 隻 x4 杯	0	1	2	0	3	0.15	0.85
4.44	5 隻 x4 杯	4	3	4	3	14	0.7	0.3
2.96	5 隻 x4 杯	4	5	5	5	19	0.95	0.05
1.975	5 隻 x4 杯	5	4	5	5	19	0.95	0.05
1.317	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0

實驗毒物：Aniline

Test duration: 48hr

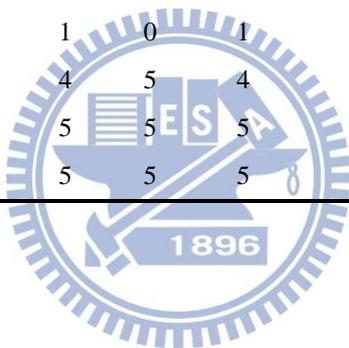
Conc. mg/L	Initial number	Final number				Final number (sum)	Q (%)	IR
Control	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0
0.2	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
0.1	5 隻 x4 杯	1	2	0	2	5	0.25	0.75
0.05	5 隻 x4 杯	1	2	3	2	8	0.4	0.6
0.025	5 隻 x4 杯	3	3	4	3	13	0.65	0.35
0.0125	5 隻 x4 杯	5	3	4	5	17	0.85	0.15
0.00625	5 隻 x4 杯	4	4	4	5	17	0.85	0.15
Control	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0
0.2	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
0.1	5 隻 x4 杯	1	1	3	1	6	0.3	0.7
0.05	5 隻 x4 杯	3	3	3	3	12	0.6	0.4
0.025	5 隻 x4 杯	4	2	3	2	11	0.55	0.45
0.0125	5 隻 x4 杯	4	5	3	5	17	0.85	0.15
0.00625	5 隻 x4 杯	5	4	4	4	17	0.85	0.15



實驗毒物：Malathion

Test duration: 48hr

Conc. (mg/L)	Initial number	Final number				Final number (sum)	Q (%)	IR
Control	5 隻 x4 杯	5	5	5	4	19	1	0
0.008	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
0.004	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
0.002	5 隻 x4 杯	0	0	2	4	6	0.32	0.68
0.001	5 隻 x4 杯	2	4	2	4	12	0.63	0.37
0.0005	5 隻 x4 杯	5	4	5	5	19	1	0
0.00025	5 隻 x4 杯	4	5	5	5	19	1	0
Control	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0
0.008	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
0.004	5 隻 x4 杯	0	1	0	0	1	0.05	0.95
0.002	5 隻 x4 杯	2	1	0	1	4	0.2	0.8
0.001	5 隻 x4 杯	5	4	5	4	18	0.9	0.1
0.0005	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0
0.00025	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0



附錄二 混合急毒性原始數據

實驗毒物：Chloroacetonitrile (A) + Aniline (B)

Test duration: 48hr

TU(A):TU(B)=1:1

EC₅₀(A) : 5.2989mg/L EC₅₀(B) : 38.6x10⁻³mg/L

Total TU	Conc. A (mg/L)	Conc. B (mg/L)	Initial number				Final number				Final number (sum)	Q (%)	IR
			5 隻 x4 杯	5	5	5	5	5	5	5			
Control	0	0	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0			
4	10.5978	77.2x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	0	1		
2	5.2989	38.6x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	1	0	1	0.05	0.95			
1	2.6495	19.3x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	3	2	2	1	8	0.4	0.6			
0.5	1.3247	9.65x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	2	4	3	3	12	0.6	0.4			
0.25	0.6624	4.825x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	4	4	3	3	14	0.7	0.3			
0.125	0.3312	2.4125x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	4	4	5	5	18	0.9	0.1			
Control	0	0	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0			
4	10.5978	77.2x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1			
2	5.2989	38.6x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1			
1	2.6495	19.3x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	2	1	2	2	7	0.35	0.65			
0.5	1.3247	9.65x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	2	4	3	2	11	0.55	0.45			
0.25	0.6624	4.825x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	4	5	4	18	0.9	0.1			
0.125	0.3312	2.4125x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	5	5	4	19	0.95	0.05			

實驗毒物：Chloroacetonitrile (A) + Malathion (B)

Test duration: 48hr

TU(A):TU(B)=1:1

EC₅₀(A) : 5.2989mg/L EC₅₀(B) : 1.33x10⁻³mg/L

TU	Conc. A (mg/L)	Conc. B (mg/L)	Initial number	Final number				Final number (sum)	Q (%)	IR
Control	0	0	5 隻 x4 杯	5	5	5	4	19	1	0
4	10.5978	2.66x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
2	5.2989	1.33x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
1	2.6495	0.665x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	3	3	3	1	10	0.53	0.47
0.5	1.3247	0.333x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	5	3	4	17	0.89	0.11
0.25	0.6624	0.166x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	4	3	5	17	0.89	0.11
0.125	0.3312	0.083x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	4	5	4	5	18	0.95	0.05
Control	0	0	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0
4	10.5978	2.66x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
2	5.2989	1.33x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
1	2.6495	0.665x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	3	3	2	2	10	0.5	0.5
0.5	1.3247	0.333x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	3	4	3	4	14	0.7	0.3
0.25	0.6624	0.166x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	3	2	4	5	14	0.7	0.3
0.125	0.3312	0.083x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	4	5	4	18	0.9	0.1

實驗毒物：Aniline (A) + Malathion (B)

Test duration: 48hr

TU(A):TU(B)=1:1

EC₅₀(A) : 38.6x10⁻³mg/L EC₅₀(B) : 1.33x10⁻³mg/L

TU	Conc. A (mg/L)	Conc. B (mg/L)	Initial number	Final number				Final number (sum)	Q (%)	IR
Control	0	0	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0
8	0.1544	5.32x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
4	77.2x10 ⁻³	2.66x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
2	38.6x10 ⁻³	1.33x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	4	2	4	4	14	0.7	0.3
1	19.3x10 ⁻³	0.665x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	3	5	5	18	0.9	0.1
0.5	9.65x10 ⁻³	0.333x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	4	5	5	19	0.95	0.05
0.25	4.825x10 ⁻³	0.166x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0
Control	0	0	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0
8	0.1544	5.32x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	0	0	0	0	0	0	1
4	77.2x10 ⁻³	2.66x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	1	0	0	1	2	0.1	0.9
2	38.6x10 ⁻³	1.33x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	3	4	4	16	0.8	0.2
1	19.3x10 ⁻³	0.665x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	5	4	4	18	0.9	0.1
0.5	9.65x10 ⁻³	0.333x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	4	5	5	5	19	0.95	0.05
0.25	4.825x10 ⁻³	0.166x10 ⁻³	5 隻 x4 杯	5	5	5	5	20	1	0

附錄三 單一慢毒性原始數據

實驗毒物: Chloroacetonitrile

Test duration: 21days

Acute toxicity EC₅₀: 5.2989mg/L

Conc. (mg/L)	Replicates										Total neonates	Survival adults
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
control	9	9	10	9	10	12	14	8	12	8	101	9
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0*	0
1	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	13*	0
0.33	8	6	4	13	6	6	5	1	6	6	61*	5
0.11	5	10	5	8	12	8	7	5	10	8	78*	9
0.037	5	10	9	5	8	10	10	10	10	11	88	10

*. Indicated this value is statistically significant difference.

	df	SSq	msq	Estimated error variance (S ²)	The standard error of d (Sd)
Block(row)	9	29.816667	3.312962963	-	-
Treatment(columns)	5	853.88333	170.7766667	-	-
Error	45	183.28333	4.072962963	4.072963	0.9025478

實驗毒物: Aniline

Test duration: 21days

Acute toxicity EC₅₀: 38.6µg /L

Conc. (µg/L)	Replicates										Total neonates	Survival adults
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
control	8	8	6	10	12	8	8	8	13	7	88	9
30	4	10	3	0	5	11	7	5	4	3	52*	9
10	11	8	11	1	6	4	9	9	6	8	73	10
3.33	6	4	8	7	7	13	6	9	2	6	68	10
1.11	9	6	9	9	10	11	9	3	5	13	84	10
0.37	12	8	7	7	12	8	8	3	12	4	81	9

*. Indicated this value is statistically significant difference.

	df	SSq	msq	Estimated error variance (S ²)	The standard error of d (Sd)
Block(row)	9	64.733333	7.192592593	-	-
Treatment(columns)	5	86.533333	17.30666667	-	-
Error	45	413.46667	9.188148148	9.188148	1.35559198

實驗毒物: Malathion

Test duration: 21days

Acute toxicity EC₅₀: 1.33µg /L

Conc. (ug/L)	Replicates										Total neonates	Survival adults
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
control	20	13	14	7	12	20	12	9	13	11	131	10
3	0	12	13	0	0	0	0	0	0	0	25*	2
1	11	13	14	3	6	10	9	12	5	9	92*	9
0.33	8	13	14	3	10	12	9	2	16	9	96	10
0.11	11	10	10	11	12	12	11	14	10	12	113	10
0.037	14	21	12	7	12	20	11	4	13	6	120	10

*. Indicated this value is statistically significant difference.

	df	SSq	msq	Estimated error variance (S ²)	The standard error of d (Sd)
Block(row)	9	406.68333	45.18703704	-	-
Treatment(columns)	5	714.68333	142.9366667	-	-
Error	45	588.81667	13.08481481	13.084815	1.617703

附錄四 混合慢毒性原始數據

實驗毒物：Chloroacetonitrile (A) + Aniline (B)

Test duration: 21days

TU(A):TU(B)=1:1

NOEC(A) : 3.7×10^{-2} mg/L NOEC(B) : 1×10^{-2} mg/L

Total TU	Replicates										Total neonates	Survival adults
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
control	15	15	20	17	13	1	11	18	18	21	149	10
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0*	0
16	1	6	10	14	4	9	9	10	8	13	84*	9
8	6	10	14	10	4	10	11	10	11	14	100*	10
4	11	8	12	11	2	14	13	15	11	9	106*	10
2	19	11	14	15	9	11	13	9	10	8	119	10
1	12	17	10	10	9	21	8	7	20	12	126	10
0.5	8	16	12	16	15	12	12	12	15	18	136	10
0.25	11	14	19	11	16	18	13	15	20	14	151	9

*. Indicated this value is statistically significant difference.

	df	SSq	msq	Estimated error variance (S^2)	The standard error of d (Sd)
Block(row)	9	168.54444	18.72716049	-	-
Treatment(columns)	8	1706.6889	341.3377778	-	-
Error	72	969.75556	13.46882716	13.468827	1.6412695

實驗毒物：Chloroacetonitrile (A) + Malathion (B)

Test duration: 21days

TU(A):TU(B)=1:1

NOEC(A) : 3.7×10^{-2} mg/L NOEC(B) : 0.33×10^3 mg/L

Total TU	Replicates										Total neonates	Survival adults
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
control	20	20	14	8	15	20	21	17	13	19	167	9
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0*	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0*	0
8	6	16	11	6	12	16	12	17	15	12	123*	8
4	17	11	11	15	14	9	18	18	13	13	139	10
2	18	22	15	14	9	10	16	16	11	13	144	9
1	4	8	10	15	20	16	15	10	16	8	122*	10
0.5	15	15	13	10	18	10	14	8	11	9	123*	9
0.25	15	21	16	20	14	22	10	17	13	16	164	10

*. Indicated this value is statistically significant difference.

	df	SSq	msq	Estimated error variance (S^2)	The standard error of d (Sd)
Block(row)	9	69.733333	7.748148148	-	-
Treatment(columns)	8	3283.6889	656.7377778	-	-
Error	72	885.86667	12.3037037	12.303704	1.5686748

實驗毒物：Aniline (A) + Malathion (B)

Test duration: 21days

TU(A):TU(B)=1:1

NOEC(A) : 1×10^{-2} mg/L NOEC(B) : 0.33×10^3 mg/L

Total TU	Replicates										Total neonates	Survival adults
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
control	13	9	12	5	12	4	14	6	9	12	96	10
32	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	4*	2
16	12	6	5	6	11	3	0	9	12	12	76	9
8	9	7	7	9	10	9	13	13	9	12	98	10
4	11	11	11	13	14	13	7	9	5	9	103	10
2	2	10	10	5	11	13	11	0	4	6	72	9
1	4	8	11	5	8	12	6	5	5	1	65	10
0.5	9	8	11	8	16	5	11	4	11	1	84	10
0.25	2	16	5	7	14	7	6	4	8	12	81	10

*. Indicated this value is statistically significant difference.

	df	SSq	msq	Estimated error variance (S^2)	The standard error of d (Sd)
Block(row)	9	144.32222	16.03580247	-	-
Treatment(columns)	8	702.02222	140.4044444	-	-
Error	72	873.97778	12.13858025	12.13858	1.558113

附錄五 Dunnett's test 運算表使用

Microsoft Excel [相容模式] - Microsoft Excel (簡)										
檔案 常用 插入 版面配置 公式 資料 校閱 檢視										
N22 fx										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
2	μ g/L	control	30	10	3.33	1.11	0.37	Sum	mean	Row effect
3	1	8	4	11	6	9	12	50	8.3333333	0.9
4	2	8	10	8	4	6	8	44	7.3333333	-0.1
5	3	6	3	11	8	9	7	44	7.3333333	-0.1
6	4	10	0	1	7	9	7	34	5.6666667	-1.7666667
7	5	12	5	6	7	10	12	52	8.6666667	1.2333333
8	6	8	11	4	13	11	8	55	9.1666667	1.7333333
9	7	8	7	9	6	9	8	47	7.8333333	0.4
10	8	8	5	9	9	3	3	37	6.1666667	-1.2666667
11	9	13	4	6	2	5	12	42	7	-0.4333333
12	10	7	3	8	6	13	4	41	6.8333333	-0.6
13	Sum	88	52	73	68	84	81		7.4333333	
14	mean	8.8	5.2	7.3	6.8	8.4	8.1	7.43333		
15	Column eff	1.36667	-2.2333	-0.133333	-0.6333	0.96667	0.66667			
16	Difference	-	-3.6	-1.5	-2	-0.4	-0.7			
17	d/Sd	-	-2.6557	-1.106528	-1.4754	-0.2951	-0.5164			
18	Sum(Yij ²)	818	370	621	540	784	747	3880		
19	c=6	n=10						1170.5		
20	A	R	K	全部總和	C					
21	3880	3380	3401.8	446	3315.27					
22	SSqE	msq	Sd	(dut)1-tail	(dut)2-tail					
23	413.46667	9.18815	1.35559	2.3	2.61					
24										
25								Sum		
26	Eij ²	1.44	1.96	1.69	1.44	0.04	0.25		6.82	
27		0.217778	1.137778	8.80111111	12.01778	17.08444	14.69444		53.9533333	
28		21.46778	0.587778	0.75111111	19.06778	8.801111	18.77778		69.4533333	
29		1.44	2.56	1.69	0.04	27.04	12.25		45.02	
30										
31									175.246667	
32		df	SSq	msq	Sd					
33	Block(row)	9	64.73333	7.19259259						
34	Treatment(co)	5	86.53333	17.3066667						
35	Error	45	413.4667	9.18814815	1.355592					
36										

1. 資料輸入

- (1) 調整適合的實驗組數(5 組、6 組、7 組)，輸入試驗濃度
- (2) 輸入試驗終點參數-生殖率。

2. 輸出結果

最後可得各個計算參數值(A、R、K、C、d、Sd)，再由(3)中所計算得到的值(d/Sd)與統計分析(4)上的值相比較，求得 NOEC 與 LOEC。

附錄六 Daphnia 毒性試驗品質管制圖

