

## 第四章、實驗設備與方法

### 4.1 儀器設備與試劑

#### 4.1.1 儀器設備

➤ 純水設備：

生物試驗用水，包括過濾(0.5  $\mu\text{m}$ )，軟水，離子交換，蒸餾設備(Aquatron A4S, Bibly)，蒸餾水儲水桶(60L container, Nalgene)；去離子水製造機(Milli-Q Plus, Millipore, outflow conductivity 18.2M $\Omega\text{cm}$ )。也用於藥品配製用水及實驗器皿之二次清洗用水。

➤ 抽氣幫浦：

SINKU KIKO 公司，型號 ULVACG-5 及 G-50。用於過濾營養鹽及 Isoton II 時使用。



➤ 恆溫室：

五坪大的空調控溫室，能夠控制溫度在  $24 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$ 。

➤ 連續式培養母槽：

使用體積 5 公升，直徑 18 公分之玻璃槽。於體積 4 公升處開口做為溢流，再於體積 2 公升處開口做為取樣之用。連續式培養母槽作為連續式藻類培養之用。

➤ 基質儲存瓶

容量約為 6 公升，直徑為 25 公分大小的玻璃瓶。主要用於培養母槽時，連續入流之基質存放所用；每次使用前皆需經過清洗再滅菌才可使用。

➤ 蠕動幫浦：

培養母槽使用 Masterflex 公司，型號 7533-70 pump drive 及 7518-10

pump head 之定量幫浦，用以控制供應母槽之流量。

➤ 幫浦管：

廠牌 Materflex，用於母槽培養液輸送之型號為 H-96400-14。輸送管材質為矽膠材質，不具毒性，可避免影響毒性試驗結果。

➤ 母槽曝氣幫浦與氣體流量計：

幫浦為一般水族箱所使用之曝氣裝備；另外在加上氣體流量計，為氣體流量之量測用，連續培養之母槽的曝氣量大約為：480 ml/min。

➤ pH meter：

使用 Suntex 公司，型號 SP-7 之 pH 測定儀。其精確度為  $\pm 0.01$ 。

➤ 比導電度計：

CHECK MATE-90, CIBA CORNING 英國製。用於 Isoton 之導電度量測(需在 17 mmho 範圍內)。

➤ DO meter：

美國 YSI 公司數字型溶氧測定器，型號 Model 59 與 Model 5100 兩款；BOD 探頭分別為 YSI5730 與 YSI5010，裝有內部電動攪拌器，可以對樣品進行自動攪拌，精準度為  $\pm 0.01$  mg/L。搭配 DO 59 軟體程式，可以連續監測與記錄水中溶氧值的變化，量測間格可為 3、5、10 及 15 分鐘四種。

➤ 電磁攪拌器：

藻液攪拌用，避免藻類在連續生長母槽中產生沉澱情形，另外可讓進流基質 (medium) 迅速均勻分佈於母槽中及增加藻液曝氣機會，提供所需 CO<sub>2</sub> 之作用。

➤ 曝氣桶：

曝氣設備使用體積 10 公升之純水筒。開口處嵌入一矽膠塞和玻璃管，玻璃管一頭接氣體鋼瓶，一頭接沸石並伸入純水筒底部曝氣，在純水筒開口處附近開一小洞以平衡壓力，曝氣完成後關緊筒蓋以減少外界

空氣之進入。

➤ 毒性試驗瓶：

使用體積 300 毫升，直徑 8 公分之 BOD 玻璃瓶。上頭開口處有玻璃瓶塞，使實驗時可達到水封狀態，讓整個試驗成為一個封閉式系統。

➤ 培養箱：

自行裝配之培養箱三組，台面可拆換，以角鋼為架構主體，長×寬×高為 135×107×90 公分，頂面履以 120 公分白色螢光燈管 6 支，內有迴轉式振盪混合器(WEST 公司, Ferstek Model S103)，搖動速度可超過 100 rpm，機座台面可裝 300 mL BOD 瓶 76 座。培養箱置於溫控室內，控制溫度在 24 ±1°C。作為藻類 BOD 瓶試驗與藻類批次式或連續式試驗之用。

➤ 電子顆粒計數器：

使用 Coulter Counter，型號 MULTISIZER II (Coulter electronics 公司)，計數細胞數。使用前後需用 ISOTON 潤絲 (rinse) 清理。採用 50 μm 孔徑之玻璃管，適用顆粒直徑範圍為 1 μm~30 μm，測試時間約在 11~13 秒間。

➤ 電腦：

使用中央處理器為 P-166 之桌上性電腦，視窗 98 (Windows98 Se) 之程式並配合電子顆粒計數器所需之軟體 (Multisizer Accucomp V. 2.01) 來進行顆粒計數之分析。使用時可直接將電子顆粒計數器之數值輸送至電腦中進行分析。

➤ 光度計：

TOPCON 產牌，型號 IM-2D，單位是 lux。用於每天母槽及震盪培養箱之檯面光度量測。

➤ 氣體鋼瓶：

購於大明行及洽隆，含 0.5% CO<sub>2</sub> 的高壓氮氣鋼瓶，純粹氮氣的純度

達 99.9%，氣體體積為 6 立方公尺。用於實驗中稀釋水之曝氣，以降低營養基中的 DO 值，且能提供實驗期間足夠量的碳源。

➤ 滅菌釜：

使用 HIRAYAMA 公司，型號 HA-300M 的滅菌釜在  $1.1 \text{ kg/cm}^2$ ， $121^\circ\text{C}$  下對實驗器皿滅菌 15 分鐘。

➤ 定量吸管：

使用 SOCOREX 可調式移液器，大小為  $100\sim 1000 \mu\text{l}$  及  $1\sim 5\text{ml}$  兩種。以及 NICHIRO，Nichipet EX， $20\sim 200 \mu\text{l}$ 、 $10\sim 100 \mu\text{l}$  以及  $2\sim 20 \mu\text{l}$  等 3 種。

➤ 操作台：

使用造鑫公司製造的 Laminar Flow 操作台，以防止植種過程及配製營養基時受到污染。

➤ 分析天平：

產牌 Precisa 205A。



➤ 藻種及營養基質之保存：

使用 Whirpool 冰箱將藻、藥品以及營養基質保存於  $4^\circ\text{C}$  以下。

➤ 烘箱：

產牌 Memmet，做為烘乾玻璃器皿用，溫度約在  $50^\circ\text{C}$  上下。

➤ 分析儀器

高效能液相層析儀 (HPLC)，Waters Model I。其裝置的設定於表 4.1.1 所示。

表 4.1.1 The analysis conditions and apparatuses of HPLC

Item	Model and Condition
HPLC	Waters Model I
Detector	UV( $\lambda = 200$ 、 $304$ 或 $273$ nm)
Column	Nova-Pack C <sub>18</sub> 60A 4mm 3.9 mm × 150 mm The filler in column is Silica
Injection Volumn	10 $\mu$ l
Mobile Phase	Acetonitrile:H <sub>2</sub> O = 80% : 20%
Mobil Phase Flow Rate	0.5 或 1 mL/ min

#### 4.1.2 實驗用試劑及耗材



➤ 濾紙：

使用 Gelman Science 九型號 66191 之  $0.45 \mu\text{m}$  (過濾營養基、及水樣前處理) 及 60301 之  $0.2 \mu\text{m}$  (過濾 Isoton II) 兩種孔徑之濾紙。

➤ 藥品：

1. HPLC 用藥：Acetonitrile，99.97% HPLC grade。
2. 毒性物質：農藥標準品，Merck；包括有
  - (1). Atrazine(C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>)：98.0%
  - (2). Parathion(C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>PS)：99.0%
  - (3). Marathion(C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>PS<sub>2</sub>)：99.5%
  - (4). Dichlorvos(C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>4</sub>P)：99.0%
  - (5). Fenthion(C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>PS<sub>2</sub>)：95.5%

(6). Pentachlorophenol( $C_6HCl_5O$ ) : 99.5%

(7). MCPA( $C_9H_9ClO_3$ ) : 99.5%

上述化學物質的物化特性，（水溶性、揮發性、分子量等），收錄於表 4.1.2。

3. 其他試驗中所需藥品使用 Chem. Service、Merck 或 Riedel-deHaen 公司 G. R.級以上之化學藥品。如藻類營養鹽配置用、酸液配製等。

表 4.1.2 Physical and chemical characteristics of pesticides

pesticides	W.t	molecular formulas	B.P	M.P	V.P.	Log(Kow)*	Solubility (mg/L)
MCPA	200.62	$C_9H_9ClO_3$	-	120	0.2 mPa <sup>c</sup>	2.52	825.00 <sup>a</sup>
Atrazine	215.69	$C_8H_{14}ClN_5$	-	176	0.04 mPa <sup>a</sup>	2.82	28.00 <sup>a</sup>
Dichlorvos	220.98	$C_4H_7Cl_2O_4P$	140	-	290 mPa <sup>c</sup>	0.60	10,000 <sup>a</sup>
Fenthion	278.33	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	87	7.5	0.37 mPa <sup>c</sup>	4.08	4.20 <sup>c</sup>
Malathion	330.36	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	157	2.85	5.3 mPa <sup>b</sup>	2.29	145.00 <sup>c</sup>
parathion	291.27	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	375	6	4mPa <sup>c</sup>	3.73	6.54 <sup>a</sup>
PCP	266.34	$C_6HCl_5O$	309	191	14.672 mPa <sup>c</sup>	4.74	80.00 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 25°C ; <sup>b</sup> 30°C ; <sup>c</sup> 20°C ; the units of B.P and M.P were Centigrade (°C)

- : shows no data

\*Data are estimated by KOWWIN v1.67 (U.S)

➤ Above these chemicals, there were both evaporable or semi- evaporable

The discriminate between these chemicals is under this line.

“The definition of VOCs is that the vapour pressure of chemical is up  $10^{-2}$  Kpa in general; then, the vapour pressure of chemical is between  $10^{-2}$  to  $10^{-8}$  Kpa in semi- evaporable chemical, like DDT; Finally, when the vapour pressure of chemical is below  $10^{-8}$  Kpa, the chemical is non- evaporable.”

## 4.2 實驗方法

### 4.2.1 藻類毒性試驗

整個實驗架構主要以生長率與產氧率為參數之改良後之密閉式 BOD 瓶試驗。

#### (一)、 試驗藻種：

本實驗所選用的藻種為 *Raphidocelis subcapitata*，月芽藻，是一種於現今廣用於藻類生物試驗研究之物種。像是 US EPA、ISO、OECD 及 APHA 等單位之藻類毒性試驗法，皆以此物種為標準試驗種之一。實驗藻種購自於 University of Texas, Austin，2003 年 2 月初。

#### (二)、 培養基：

本研究是採用 U.S. EPA “The *Selenastrum capricornutum* printz algal assay bottle test: Experimental design, Application , and Data interpretation protocol” 所使用的營養鹽組成，再以此營養鹽為基礎，對其組成加以研究而用於連續式母槽與光合抑制藻類毒性試驗中。其中 U.S. EPA 營養鹽的配製方法如下：將下列 (a) ~ (g) 的貯備液 (stock solution) 各加 1 mL 至去離子水中，再稀釋至 1 升。接著以 0.1 N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養鹽之 pH 值調至  $7.50 \pm 0.10$  並立即以  $0.45 \mu\text{m}$  的濾膜加以過濾。

以下為營養鹽之配置：

- (a)、硝酸鈉貯備液：溶解 12.750g  $\text{NaNO}_3$  於 500 mL 去離子水。
- (b)、氯化鎂貯備液：溶解 6.082 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  於 500 mL 去離子水。
- (c)、氯化鈣貯備液：溶解 2.205 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  於 500 mL 去離子水。
- (d)、微營養鹽貯備液：溶解下列所有藥品於 500 mL 去離子水。

92.760 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.714 mg CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O
207.690 mg MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	3.630 mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
1.635 mg ZnCl <sub>2</sub>	0.006 mg CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O
79.880 mg FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	150 mg Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O

(e) 硫酸鎂貯備液：溶解 7.350 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 於 500 mL 去離子水中。

(f) 磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 於 500 mL 去離子水中。

(g) 碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g NaHCO<sub>3</sub> 於 500 ml 去離子水中。

最後配成的營養鹽其巨量及微量營養素濃度列於表 4.2.1 及表 4.2.2。而表中之”結果濃度”表示各元素在水溶液中所存在之實際濃度。營養鹽的滅菌是以 0.45 μm 的濾膜過濾，過濾滅菌後的營養鹽須保存在 4 °C 且置於陰暗無光線照射處，以免產生光化學反應。



表 4.2.1 The consist of macro-algal medium

chemicals	concentration mg/L	element	Final conc. mg/L
NaNO <sub>3</sub>	25.5	N	4.2
NaHCO <sub>3</sub>	15.0	Na	11.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.04	C	2.14
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	14.7	K	0.649
MgCl <sub>2</sub>	5.7	P	0.186
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	4.41	S	1.91
		Mg	2.9
		Ca	1.20



表 4.2.2 The consist of micro-algal midium

chemicals	concertration µg/L	element	Final conc. µg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	186	B	32.5
MnCl <sub>2</sub>	264	Mn	115
ZnCl <sub>2</sub>	3.27	Zn	1.57
CoCl <sub>2</sub>	0.780	Co	0.354
CuCl <sub>2</sub>	0.009	Cu	0.04
Na <sub>2</sub> MnO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	7.26	Mo	2.88
FeCl <sub>3</sub>	96.0	Fe	30.0
Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O	300		

(三)、母槽實驗條件的控制：

- 溫度：利用恆溫室，控制溫度在 24±1℃。
- 光度：利用白冷光從系統的一方平行連續照射，使培養槽及試驗瓶中間段之光度在 4300±10% lux。
- 曝氣：以 480 ml/min 之空氣流速將培養母槽做曝氣動作。
- pH 值控制：毒性試驗之 pH 值控制在 7.3 到 7.8 之間。

以上各個參數皆要每天量測，來保證實驗的穩定度。

(四)、實驗前的準備

a、玻璃器皿：

先經不含磷的清潔劑清洗後再用自來水沖洗數次，而後泡至 10% HCl 溶液至少 1 小時，取出後以 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中和。最後再以自來水沖洗約 5-6 次，去離子水沖洗 3、4 次後放入烘箱中加以烘乾（溫度約保持於 50℃ 上下）。使用前面通口處封上鋁箔，然後置於設定為 1.1 kg/cm<sup>2</sup>，121℃ 的滅菌釜中滅菌 15 分鐘。

b、母槽：

先用不含磷的清潔劑清洗後再用自來水沖洗數次，直到不見泡沫為止；之後再用去離子水清洗，瀝乾後，在母槽上的各個通口覆上錫箔紙，放入滅菌釜中滅菌 15 分鐘後，取出放至室溫後才使用。

c、藻類的保存：

開始時先進行固態培養基的培養，固態培養基組成和液態營養鹽相同；但加 1% 之洋菜膠 (Agar)，通常可保存六個月 (在 4°C 下)。藻類每四個星期移植至新的培養皿以保持菌種的健康。另外也做液態營養鹽的培養，通常可保存四個星期 (4°C 下)，四個星期後繼續做移植以保存菌種。

(五)、 ISOTON II 溶液的配製：

加 200g NaCl 於 20 公升的超純水中完全混合，並以電導計測其導電度，其導電度應為 17 mmho。若超過 17 mmho，則以超純水稀釋直到導電度為 17 mmho，若低於 17 mmho，則加入少量 NaCl 直到導電度為 17 mmho。此溶液以 0.2  $\mu$ m 濾紙過濾即得 Isoton II 溶液。其主要作用在於當作電子顆粒計數器之導電溶液用。

(六)、 電子顆粒計數法及操作原理：

在電子顆粒計數器內有一根玻璃管，操作中需浸入含有 Isoton II 稀釋樣品的燒杯中，水樣在量測的過程須加以攪拌以使顆粒均勻分佈。而在玻璃管近底端的側面鑲有紅寶石的精準小圓孔，藉以吸取水樣。在玻璃管內外各有一電極片通以直流電，當水樣中所含之顆粒經過圓孔時，會暫時性地干擾到電流，行程某特定量的電阻。而電阻量化透過示波器的波峰顯示，其高度正比於顆粒的大小，且脈衝數即是顆粒的數目，直接由電子記

數器記錄顯示。電子顆粒計數器主要條件設定如下表 4.2.3。本實驗採用 50  $\mu\text{m}$  孔徑之毛細玻璃管，其設定之量測粒徑上下限為 2.622  $\mu\text{m}$  至 30  $\mu\text{m}$ 。量測時，取 1 ml 的藻液置入 50 ml 之量瓶內，再加入 Isoton II 至 50 ml。將之倒入燒杯，放進顆粒計數器內量測。以顯示之讀數值扣除空白顆粒數之數值（純 Isoton II 之背景值）【\*註 1】，連續三次其值相差在 2% 者之平均值為量測值。

\*註 1：藻液每毫升顆粒數 (cells/ml) =

(扣除空白組數值後之三次讀值平均值 / 0.5 ml)  $\times$  50

表 4.2.3 The conditions of Coulter Counter

conditions	values
Full scale	10mA
Polarity	+
Currents , I	100
Diameter Lower Threshold , Tl	2.622 $\mu\text{m}$
Diameter Lower Threshold , Tu	30 $\mu\text{m}$
Attenuation , A	1
Preset Gain	1
Alarm Threshold	OFF
Analysis amount	500 $\mu\text{L}$

(七)、溶氧測定器的校正：

一般溶氧測定器可使用飽和空氣於水中校正與空氣校正兩種，但因前者須將水曝氣至 100% 相當困難，因此建議採用空氣校正法。茲將空氣校

正法介紹於下：將電極置於 2.5 公分左右水量之 BOD 瓶(可視同 100%溼度)，轉鈕至校正鍵，輸入校正值 (100%)，確認後轉回一般測定鍵，連續反覆校正三次。每個月定期更換 CLARK-TYPE 薄膜與 3M 氯化鉀電解質；若有必要時，需以亞硫酸鈉 30% 將 PROBE 表面清洗乾淨，不要殘留任何化學物質，而得 0% 之 DO 溶液，進行零點校正。

(八)、 實驗步驟：

(a). 單一毒性試驗

先將欲移植的藻類由 4°C 的冰箱中取出，進行批次式培養三天，以活化藻細胞，使其達到對數生長期。然後以藻液培養基 1：10 之比例植入 4 L 之連續式培養槽中。

將連續式培養槽培養於 24±1°C 之恆溫室中，槽底放置磁石攪拌器，轉動的磁石可讓藻液均勻混合，避免藻類沉澱及少量供應 CO<sub>2</sub> 之作用，另外經由曝氣裝置之進流氣體則供應 CO<sub>2</sub> 及均勻混合之作用。連續式白冷光從培養槽一邊照射，讓培養槽中段之光照強度介於 4300±10% lux 之間。

而後，當培養槽的藻類數達到相當的數量（約最大可能藻類數之 80~90%），即以蠕動幫浦進流營養液。由於培養槽體積固定（母槽設有溢流口），故可直接由流量控制所需之稀釋率（約為 0.25/d），亦即控制培養槽內藻類之生長率。

經由每天更換新鮮的進流基質，並量測槽中細胞數量、pH 值、及觀察粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形（細胞平均體積；MCV），以判定連續式培養槽是否達到穩定狀態。以連續 3 天之細胞數量、pH 值、MCV 等參數皆在控制的範圍且粒徑分析儀中藻類細胞之分佈為一常態分佈，即可認定為系統達到穩定狀態。範圍約在：細胞數量（ $1.7 \times 10^4 \sim 1.9 \times 10^4$  cells/ml）、pH 值（7.3~7.8）及粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形（MCV

在 39~50 之間) 即可。

毒性試驗的營養鹽參考 U.S. EPA 建議配製，適當地修正濃度作為本試驗的營養鹽；以含 0.5% CO<sub>2</sub> 的 N<sub>2</sub> 氣體 (流量為 600 ml/min) 對營養鹽進行曝氣，降低水中的溶氧值並提高其 CO<sub>2</sub> 含量，再以 0.1N 的 NaOH 和 HCl 將營養鹽的 pH 值調整至 7.5 ± 0.1，完成營養鹽的配製。

從培養母槽 (steady state 狀態) 取出之藻液與上述之營養鹽混合成所需濃度，接下來再加入不同之毒物濃度 (含一組控制組及五組處理組) 的試驗瓶，一組實驗做三重複組；此時須注意各瓶中的營養鹽濃度與初始細胞密度應該相同，本實驗之初始細胞密度設定在 15,000 cells/ml，進行毒性試驗，且另外再量測開始之溶氧值 (initial DO，在此要注意曝氣的時間及狀況，盡量讓初始溶氧降為最低)。

經過 48 hr 的毒性物質曝露後，量測各加入不同毒物濃度後的試驗瓶之溶氧值 (final DO)，扣除起始之溶氧值可得淨溶氧值 ( $\Delta$ DO)，同時測量瓶中細胞密度以求得藻類生長率。利用水樣濃度與上述參數，透過 Probit 模式分析，求出毒性物質之 EC<sub>50</sub> 值與劑量曲線圖。

#### (b). 混合毒性試驗

基本的操作步驟與批次實驗相同；將農藥樣品以單一實驗下所測知的 EC<sub>50</sub> 值，利用 Addition index、Toxic Unit 等原理操作，求得反應變化；另外再以不同混合比例方式運用在實驗中，確定其效應。

整個實驗的程序，可由圖 4.2.1 表示。

## 4.2.2 農藥藥品之配置與定量

藥品之配置分成標準品及測試溶液。

### (一)、 標準品之配置

先將取 20 mg 的藥品，溶於有機溶劑（如 Acetonitrile）中，定量至 0.2L（200 ml，濃度應為 100 mg/L）讓它完全溶解後，當作標準儲備液；並用此部份所配置的樣品做 HPLC 標準品校正定量用。

### (二)、 儲備液之配置

待至標準品校正後，再取適量儲備液加入裝有去離子水的血清瓶中稀釋，迅速蓋上瓶蓋封緊，快速混合約 30 秒；但因大多數的農藥在水中的溶解度有限，故混合時，先將樣品包覆錫箔紙後，置於震盪器上，以 24°C，100rpm 混合至隔夜，確保混合完全。並馬上用於毒性試驗中。

而在每次實驗前，再利用 HPLC 將樣品定量分析，測得水中確實的農藥溶解量（nominal concentration），確保實驗的準確度。且因此類有機物具有揮發性性質，所以在擱置一段時間後，即需重新配置。實驗中的藥品濃度配置則是依照梯度方式稀釋至理想濃度來進行實驗。

### (三)、 HPLC 之操作

#### (a).前處理

在定量前，要先對 HPLC 做校正程序：去除氣泡，以減少誤差。

#### (b).HPLC 操作步驟

開機後先將偵測器之燈關掉，然後用乙腈（acetonitrile）以流速 1mL/min 流洗 30 分鐘。將偵測器（此為紫外光偵測器）之燈打開，儀器歸零。設定操作條件：波長（ $\lambda$ ）為 200、273 nm（除 pentachlorophenol 為 273 外，其餘皆為 200），滯留時間（Run time）為 10 分鐘（滯留時間可以隨不同的分析物質而改變），樣品入流量為 10 $\mu$ L，mobile phase 流速為 0.5 或 1.0mL/min（其中 pentachlorophenol 所使用的流量是 1.0mL/min）。

於電腦上輸入所要分析之毒物及日期。用注入針頭取樣品打入注入孔中，開始分析。當分析結束之後，即可在電腦螢幕上觀察脈衝（peak）之變化情形，並可進一步求得樣本中所含物質之種類及濃度。

儀器關閉前，需再用乙腈以 1mL/min 之流速流洗 30 分鐘始可關閉。待流洗完畢，關掉儀器及電腦。整個操作流程圖如圖 4.2.2。

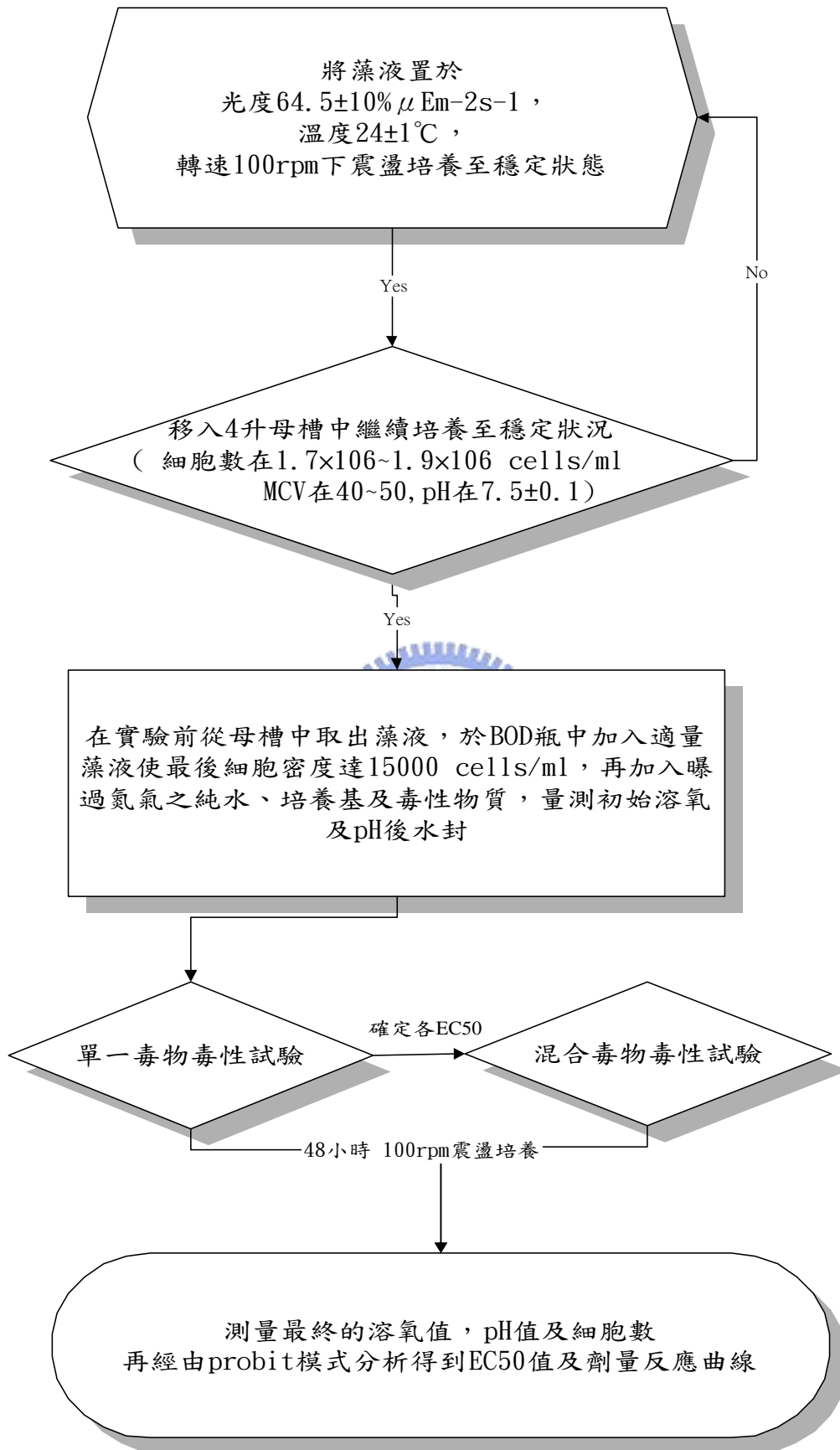


圖 4.2.1 The flow chart in algal toxicity test



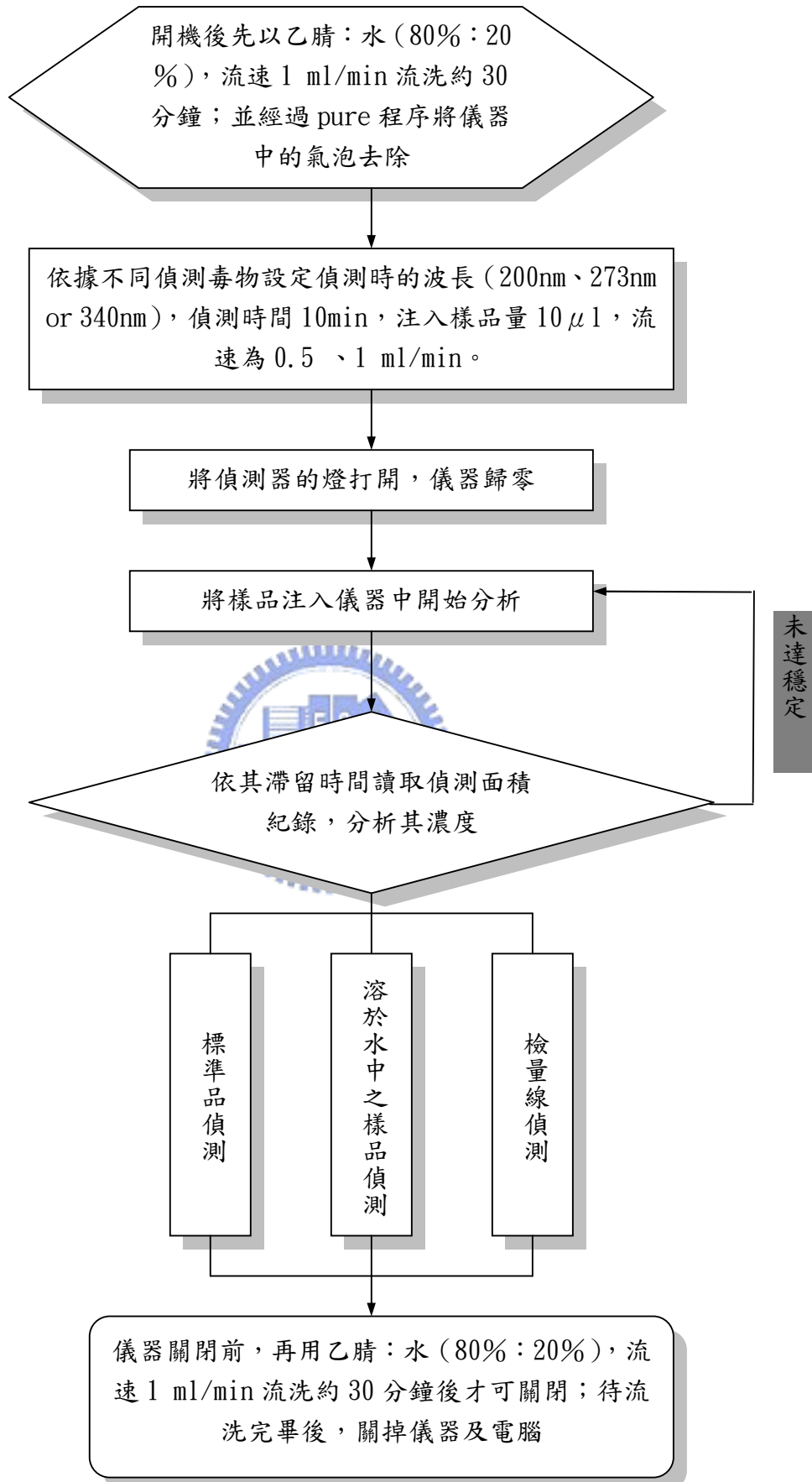


圖 4.2.2 The operating steps in HPLC

## 4.3 實驗數據之處理

### 4.3.1 模式的運用

將實驗所測出之各參數值（如淨生長細胞數及淨產氧量）與對應之有機物濃度帶入模式（probit）中計算，得到各模式的劑量-反應曲線及 EC50 值；並且由圖中求得生長曲線斜率，作為日後討論。

### 4.3.2 混合毒性指標

主要是一毒性單位（Toxic Unit；TU）原理求得的。依定義得到

TU > 1，為拮抗效應(antagonism)

TU = 1，為相加作用(additive)

TU < 1，為協同效應(synergism)



## 4.4 實驗之 QA/QC

### 4.4.1 定量之再現性

為了整個實驗的準確度，對於 HPLC 定量所呈現的再現性需做探討。其中可分成以積分面積及滯留時間兩種來評量。將這七種農藥毒物做標準品定量，重複十次分析過程，得到的積分面積和滯留時間做統計上的整理。彙整表如表 4.4.1 與表 4.4.2。發現這兩者在 10 次重複分析中，其變異係數 (C.V 值) 皆小於 5%，顯示分析條件之再現性良好。而就目前已進行的毒物所表現出的滯留時間 (min) 依序為 parathion : dichlorvos : atrazine : MCPA : fenthion : malathion : PCP = 2.337 : 2.368 : 3.021 : 3.286 : 3.8284 : 5.483 : 5.812。



### 4.4.2 檢量線配置

利用於 HPLC 定量時的標準品濃度及積分面積做線性迴歸製作檢量線方程式，供日後濃度定量時應用。基本上在此所製作的檢量線線性關係迴歸值 ( $r^2$ ) 均大於 0.97 以上為很好的相關度，這樣的分析品質才能讓實驗過程的誤差值減少，增加實驗的準確度。各個化學物依據定量濃度及面積做線性分析結果皆列於附錄中。

### 4.4.3 實驗條件之控制

本研究除了在整個實驗期間的溫度約維持在  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  情況下，其他的操作條件皆須依據 Lin[11]所訂制出的範圍內；另外需注意的是 48 小時間過程中震盪檯面上的光度變化影響；基本上我們都將暴露的光度維持在約  $4300 \pm 2\sim 3\%$  ( $65 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ )，約 1 個禮拜的時間測量一次各個試驗位置的光度，以確保整個實驗過程前後的一致性。如圖 4.4.1。圖 4.4.1 中的光度為某實驗時段所測的分布圖，其分析後的變異係數值約在 3.116%，差異不大，增加實驗的準確性與可信度。



表 4.4.1 The reproduction in detecting area of pesticides using HPLC

Pesticides	重複分析										平均值	C.V
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
atrazine	1134294	1121750	1088836	1101905	1068535	1118323	1093235	1080788	1161885	1162415	1113197	2.640
parathion	1175359	1150879	1155676	1137310	1138178	1268084	1108845	1062124	1092809	1237268	1152653	4.904
dichlorvos	2982747	2951914	3067021	3070451	3015499	2948301	2970989	3006893	2963578	3085236	3006263	1.556
malathion	406653	411974	408481	404096	410990	407922	418693	419972	414749	398915	410244.5	1.428
MCPA	3001304	3172161	3003875	3062351	3074653	3020556	3005123	3010726	2965327	2994753	3031083	1.758
Fenthion	25527256	26443388	26186917	24336044	25208051	24638902	26941710	24117428	27005776	26452381	25685785	3.779
PCP	685352	692938	707540	687259	698053	691162	703302	698599	703269	713442	698091.6	1.170

表 4.4.2 The reproduction in retention time of pesticides using HPLC

Pesticides	重複分析(min)										平均值	C.V
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
atrazine	3.022	3.019	3.01	3.02	3.011	3.032	3.027	3.029	3.019	3.021	3.021	0.212
parathion	2.327	2.323	2.335	2.269	2.351	2.337	2.339	2.366	2.374	2.352	2.3373	1.121
dichlorvos	2.382	2.382	2.381	2.354	2.38	2.374	2.324	2.39	2.331	2.381	2.3679	0.891
malathion	5.577	5.55	5.489	5.495	5.386	5.369	5.422	5.481	5.56	5.504	5.4833	1.179
MCPA	3.207	3.285	3.309	3.292	3.289	3.291	3.296	3.3	3.297	3.296	3.2862	0.787
Fenthion	3.855	3.868	3.888	3.797	3.839	3.789	3.767	3.8	3.855	3.826	3.8284	0.924
PCP	5.152	5.861	5.927	5.997	5.892	5.913	5.774	5.892	6.02	5.696	5.8124	3.905

3989	4120	4220	4255	4300	4400	4200	4100	3990	3950
3910	4010	4300	4290	4310	4360	4410	4180	4000	3990
4010	4200	4260	4290	4326	4410	4220	4220	3980	4000
4025	4210	4250	4320	4290	4450	4230	4290	4050	3980
3980	4130	4310	4330	4250	4290	4160	4120	4000	3890
3970	4000	4280	4280	4220	4250	4180	4090	4080	3870

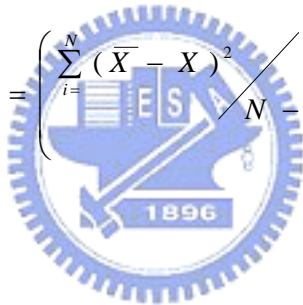
\*The unit is lux, and range around  $4300 \pm 2\%$ ; The C.V. (coefficient of variation) is about 3.116%

圖 4.4.1 The display of luminosity upper the shaker

#### 4.4.4 偵測極限 (MDL)

MDL 的計算則依標準計算方式計算得到

1. 預估偵測極限值：相當於儀器訊號與雜訊比例 2.5~5.0 之濃度
2. 測定試劑水中待測物之方法偵測極限：
  - a..準備試劑水
  - b..於試劑水中加入待測物，使濃度為估計偵測極限值的 1~5 倍
  - c..重複分析水樣八次，並將測得結果依檢驗方法規定求得濃度
  - d..求八次測定值的標準偏差 S


$$S = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (\bar{X} - X)^2}{N - 1} \right)^{1/2}$$

方法偵測極限值為 3S

3. 方法偵測極限之確認
  - a..準備估計偵測極限值的 1~5 倍濃度，重複分析水樣八次
  - b..計算 S，3S，S2
  - c..重新配置 3S 濃度，重複分析水樣八次
  - d..由兩次求得的 S2 計算 F 值，若 < 2.98，則計算

MDL 值 = 2.64 × Spooled

$$F = \frac{S_A^2}{S_B^2} \quad ; \text{Spooled} = \left[ \frac{(7S_A^2 + 7S_B^2)}{14} \right]^{1/2}$$

- e..若 > 2.98 則重新配置 3S 濃度，重複上列步驟

本實驗選擇 PCP 及 Atrazine 當作分析的主要毒物。表 4.4.3 為 PCP 之偵測極限值測定。表 4.4.4 為 Atrazine 之偵測極限值測定。得到 HPLC 值為 0.0128~0.0149 間。

表 4.4.3 MDL of HPLC by analysis in PCP

濃度值				濃度值				F 值
滯留面積	換算濃度	平均	標準偏差	滯留面積	換算濃度	平均	標準偏差	
1.	49382	0.251		1.	3020.854	0.0154		
2.	48282	0.245		2.	2530.456	0.0129		
3.	48973	0.249		3.	2844.311	0.0145		
4.	50837	0.258	0.251	4.	2824.695	0.0144	0.0152	2.778
5.	48811	0.248	0.00425	5.	2883.543	0.0147		<2.98
6.	49371	0.251		6.	3020.854	0.0154		
7.	49855	0.253		7.	2530.456	0.0129		
8.	48375	0.246		8.	4119.347	0.0210		

$$\text{MDL}=3\text{S}=0.0128$$

表 4.4.4 MDL of HPLC by analysis in atraine

濃度值				濃度值				F 值
滯留面積	換算濃度	平均	標準偏差	滯留面積	換算濃度	平均	標準偏差	
1.	8389	0.251		1.	2864	0.0146		
2.	8356	0.252		2.	2923	0.0149		
3.	8225	0.248		3.	2138	0.0109		
4.	8299	0.250	0.251	4.	2060	0.0105	0.013	2.945
5.	8198	0.247	0.00373	5.	2177	0.0111		<2.98
6.	8426	0.254		6.	2275	0.0116		
7.	8512	0.256		7.	3040	0.0155		
8.	8522	0.257		8.	2962	0.0151		

$$\text{MDL}=3\text{S}=0.0149$$