

第四章、實驗設計與方法

4.1 儀器設備與試劑

4.1.1 儀器設備

- ✓ 恆溫室：
五坪大的空調控溫室，能夠控制溫度在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- ✓ 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。
- ✓ 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 $18.2\text{M}\Omega\text{cm}$)。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。
- ✓ 基質儲存瓶
容量約為 5 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。

- ✓ 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。
- ✓ 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。
- ✓ 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 CO₂ 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。
- ✓ pH meter：

使用 Suntex 公司，型號 SP-7 之 pH 測定儀。其精確度為 ±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 ±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。

✓ 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 66 座。培養箱置於溫控室內，控制溫度在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。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 $50 \mu\text{m}$ 孔徑之玻璃管，適用顆粒直徑範圍為 $1 \mu\text{m} \sim 30 \mu\text{m}$ ，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_2 的高壓氮氣鋼瓶，純粹 N_2 的純度達 99.5%，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。

- ✓ 定量吸管：
使用 SOCOREX 可調式移液器，大小為 100~1000 μL 及 1~5mL 兩種。以及 NICHIRO，Nichipet EX，20~200 μL 、10~100 μL 以及 2~20 μL 等 3 種。
- ✓ 分析天平：
產牌 Precisa 205A。
- ✓ 滅菌釜：
使用 HIRAYAMA 公司，型號 HA-300M 的滅菌釜在 1.1 kg/cm²，121°C 下對實驗器皿滅菌 15 分鐘。
- ✓ 烘箱：
產牌 Memmet，做為烘乾玻璃器皿用，溫度約在 50°C 上下。
- ✓ 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。
- ✓ 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°C 以下。
- ✓ 分析儀器
高效能液相層析儀 (HPLC)，Waters 2996。其裝置的設定於 [Table 4.1.1](#) 所示。

Table 4.1.1 The analysis conditions and apparatuses of HPLC

Item	Model and Condition
HPLC	Waters 2996
Detector	Photodiode Array Detector UV (λ - Table 4.1.2)
Pump	Pump Control Module Waters HPLC 515 × 2
Column	Nova-Pack C ₁₈ 60A 4mm 3.9 mm × 150 mm The filler in column is Silica
Injection Volumn	20 μ L
Mobile Phase	Acetonitrile : H ₂ O = 80% : 20%
Mobil Phase Flow Rate	0.5 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 μ m (過濾營養基、及水樣前處理) 及 60301 之 0.2 μ 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；所購買的二十種包括有
 - (1). Hexazinone (C₈H₁₅N₅S)：99.0%
 - (2). Dicamba (C₈H₆C₁₂O₃)：99.0%
 - (3). Carbetamide (C₁₂H₁₆N₂O₃)：99.5%
 - (4). Dimethachlor (C₁₃H₁₈ClNO₂)：99.5%
 - (5). Metribuzin (C₈H₁₄N₄OS)：99.0%

- (6). Monolinuron ($C_9H_{11}ClN_2O_2$) : 99.0%
- (7). Bromacil ($C_9H_{13}BrN_2O_2$) : 99.5%
- (8). Propachlor ($C_{11}H_{14}ClNO$) : 98.5%
- (9). Fenuron ($C_9H_{12}N_2O$) : 99.0%
- (10).Ethidimuron ($C_7H_{12}N_4O_3S_2$) : 99.5%
- (11).Tebuthiuron ($C_9H_{16}N_4OS$) : 99.0%
- (12).Tebutam ($C_{15}H_{23}NO$) : 93.5%
- (13).Clopyralid ($C_6H_3Cl_2NO_2$) : 99.0%
- (14).Chloramben ($C_7H_5Cl_2NO_2$) : 98.5%
- (15).Desmetryne ($C_8H_{15}N_5S$) : 98.5%
- (16).Bentazone ($C_{10}H_{12}N_2O_3S$) : 98.0%
- (17).Triclopyr ($C_7H_4Cl_3NO_3$) : 99.0%
- (18).Picloram ($C_6H_3Cl_3N_2O_2$) : 96.0%
- (19).Propyzamide ($C_{12}H_{11}Cl_2NO$) : 99.0%
- (20).Oryzalin ($C_{12}H_{18}N_4O_6S$) : 97.2%

上述化學物質的物化特性，（溶解度、揮發性、分子量等），收錄於 [Table 4.1.2](#)。

3. 其他試驗中所需藥品使用 Chem. Service、Merck 或 Riedel-de Haën 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。

Table 4.1.2 Physical and chemical characteristics of herbicides

Herbicides	M. W.	Formula	Solubility* (mg/L)	V. P.* (mmHg)	M. Pt (°C)	HPLC λ value (nm)	CAS NO.
Desmetryne	213.30	C ₈ H ₁₅ N ₅ S	580**	9.98E-07	85	200	1014-69-3
Hexazinone	252.32	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₂	33000**	2.25E-07**	116	206	51235-04-2
Metribuzin	214.29	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	1050	4.35E-07	126	207	21087-64-9
Bromacil	261.12	C ₉ H ₁₃ BrN ₂ O ₂	815**	3.07E-07**	158	201	314-40-9
Monolinuron	214.65	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	930	0.00015	81.5	200	1746-81-2
Ethidimuron	264.33	C ₇ H ₁₂ N ₄ O ₃ S ₂	3000	-	156	202	30043-49-3
Fenuron	164.21	C ₉ H ₁₂ N ₂ O	4030**	3.75E-05**	133.5	253	101-42-8
Tebuthiuron	228.31	C ₉ H ₁₆ N ₄ OS	2500**	2.00E-06**	163	218	34014-18-1
Bentazone	240.28	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	500	3.45E-06	138	236	25057-89-0
Oryzalin	346.36	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₆ S	2.5**	9.75E-09**	141	208	19044-88-3
Propyzamide	256.13	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	15**	4.35E-07**	155	200	23950-58-5
Tebutam	233.36	C ₁₅ H ₂₃ NO	790	0.000668**	<25	203	35256-85-0
Carbetamide	236.27	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	3500	-	119	200	16118-49-3
Dimethachlor	255.75	C ₁₃ H ₁₈ ClNO ₂	2300	1.13E-05**	46	203	50563-36-5
Propachlor	211.69	C ₁₁ H ₁₄ ClNO	700	2.30E-04**	77	215	1918-16-7
Dicamba	221.04	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	8310**	3.38E-05**	115	200	1918-00-9
Chloramben	206.03	C ₇ H ₅ Cl ₂ NO ₂	700**	1.00E-07**	200	200	133-90-4
Clopyralid	192.00	C ₆ H ₃ Cl ₂ NO ₂	7850	1.20E-05**	151	212	1702-17-6
Picloram	241.46	C ₆ H ₃ Cl ₃ N ₂ O ₂	430**	7.21E-11	218.5	203	1918-02-1
Triclopyr	256.47	C ₇ H ₄ Cl ₃ NO ₃	440**	1.26E-06**	149	200	55335-06-3

* 20°C, ** 25°C

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 *Pseudokirchneriella 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. EPA-600/9-78-018.” 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 0.1N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養鹽之 pH 值調至 7.50 ± 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 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_3BO_3	0.714 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
207.690 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.630 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.635 mg ZnCl_2	0.006 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
79.880 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	150 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(e)硫酸鎂貯備液：溶解 7.350 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 於 500 mL 去離子水中。

(f)磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522 g K_2HPO_4 於 500 mL 去離子水中。

(g)碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g NaHCO_3 於 500 ml 去離子水中。

其中微營養鹽貯備液中，EDTA 分別有 100%、10%及 0%三種。100%是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時使用 10%，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。最後配成的營養鹽其巨量及微量營養素濃度列於 [Table 4.2.1](#) 及 [Table 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 $0.45 \mu\text{m}$ 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。

(三)、母槽實驗條件的控制：

- ✓ 溫度：利用恆溫室，控制溫度在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- ✓ 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 $4300 \pm 10\%$ lux。
- ✓ 曝氣：以 480 mL/min 之空氣流速將培養母槽做曝氣動作。
- ✓ 溢流率控制：母槽溢流率控制在 950-1050 mL/day。

以上各個參數皆要每天量測，來保證實驗的穩定度。

Table 4.2.1 The consist of macro-algal medium

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

Table 4.2.2 The consist of micro-algal medium

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

(四)、實驗前的準備

✓ 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 Na₂CO₃ 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°C 上下)。使用前面通口處封上鋁箔，然後置於設定為 1.1 kg/cm²，121°C 的滅菌釜中滅菌 15 分鐘。

✓ 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。

✓ 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 μm 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 Table 4.2.3。本實驗採用 50 μm 孔徑之毛細玻璃管，其設定之量測粒徑上下限為 2.622 μm 至 30 μm 。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



Table 4.2.3 The conditions of Coulter Counter

conditions	values
Full scale	10mA
Polarity	+
Currents , I	100
Diameter Lower Threshold , Tl	2.622 μm
Diameter Lower Threshold , Tu	30 μm
Attenuation , A	1
Preset Gain	1
Alarm Threshold	OFF
Analysis amount	500 μL

(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，進行批次式培養數天，以活化藻細胞，使其達到對數生長期。接著依比例再將達對數生長期的藻液和培養基植入 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達均勻混合，避免藻類沉澱及少量供應 CO₂ 之作用，另外經由曝氣裝置之進流氣體則供應 CO₂ 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、溢流率、

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、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（ $1.7 \times 10^6 \sim 1.9 \times 10^6$ cells/mL）及粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形（MCV 在 $39 \sim 46 \mu\text{m}^3$ 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_2 的 N_2 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_2 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（含一組控制組及六組處理組）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），扣除起始之溶氧值得淨溶氧值（ ΔDO ），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_{50} 值與劑量曲線圖。整個操作流程圖如 Fig. 4.2.1。

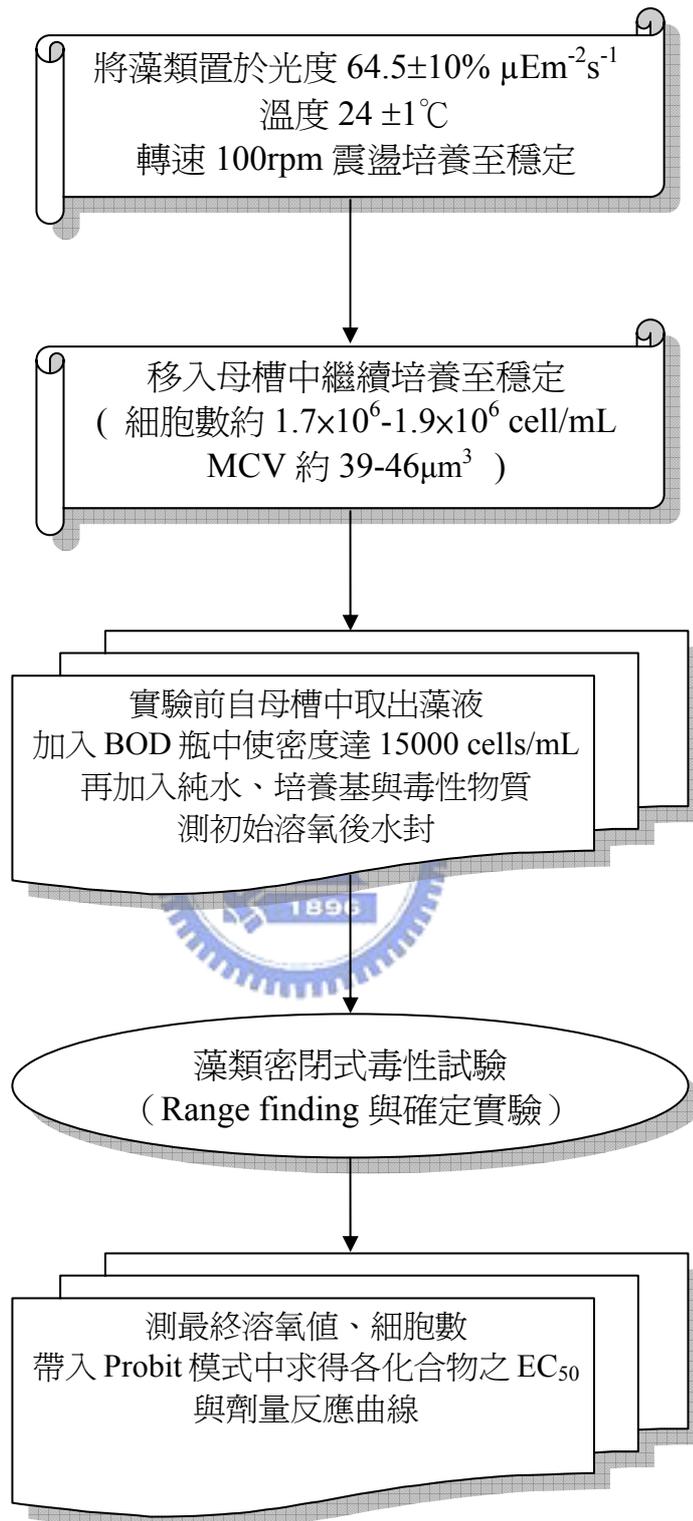


Fig. 4.2.1 The flow chart in algal toxicity test

4.2.2 除草劑藥品之配置與定量

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，測得水中確實的除草劑溶解量（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比例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，要先進行 HPLC 的校正程序：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）的燈打開，儀器歸零。設定操作條件：波長、量測時間（Run time）為 20 分鐘（皆可以隨不同的分析物質而改變），樣品入流量為 20 μ L，mobile phase 流速為 0.5 mL/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 [Fig. 4.2.2](#)。



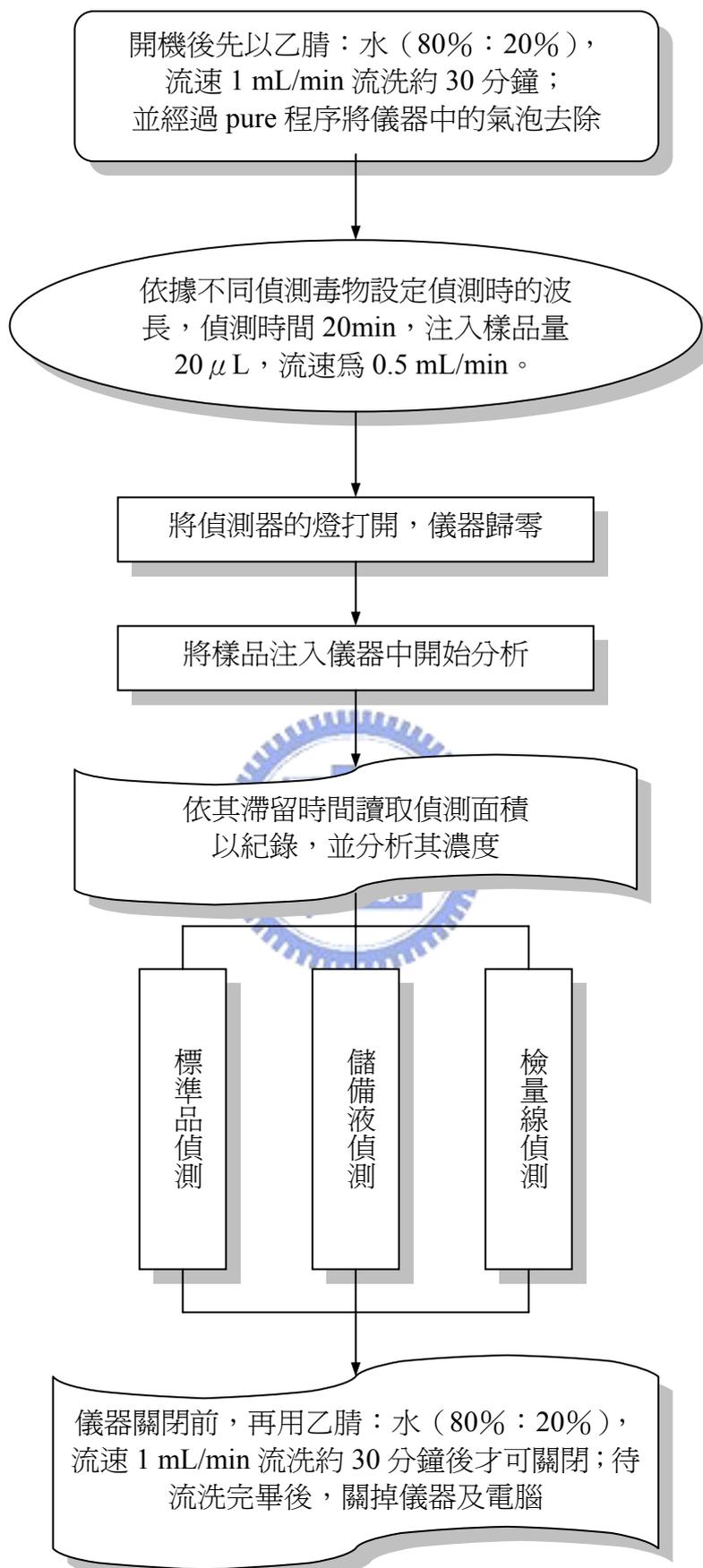


Fig. 4.2.2 The operating steps in HPLC

4.3 實驗數據之處理

4.3.1 試驗濃度的產生

實驗一開始先進行 range finding 的測試，濃度範圍須至少橫跨 3 個 order，再逐步縮小至確定的試驗濃度值，當濃度確定後，至少進行 2 次的藻類密閉式毒性試驗，當實驗結果的差距在 10% 內才算完成實驗，以求得更準確的實驗數據。

4.3.2 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。

4.4 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。將目前的除草劑毒物做標準品定量，重複九至十次分析過程，得到的積分面積和滯留時間做統計上的整理。彙整表如 Table 4.4.1 與 Table 4.4.2。發現這兩者在多次的重複分析中，其變異係數（C.V 值）皆小於 5%，顯示分析條件之再現性良好。

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 0.990 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。各個受測毒性物質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^[12] 所訂制出的範圍內；另外需注意的是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 $4300 \pm 5\%$ lux，約平均七天測量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 Fig. 4.4.1。Fig. 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 3.8%，差異不大，增加實驗的準確性與可信度。



Table 4.4.1 The reproduction in detecting area of herbicides using HPLC

Group	Toxicants	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average	C.V.
C1	desmetryne	11046824	10924486	10898825	11055015	11540257	11527265	11190086	11030186	10860669	11347247	11142086	2.251
	hexazinone	10975880	11144116	11069776	11188121	11157946	11250992	11026569	11072058	10974749	10940458	11080067	0.930
	metribuzin	11911674	12043725	12036894	11974843	11815683	12092170	12089914	11842580	12141834	12160529	12010985	1.007
	bromacil	6747126	6823871	6837093	6697774	6843303	6941908	6692294	6822285	6892749	-	6810934	1.237
C2	monolinuron	26798080	26531285	26589649	26858753	27098884	27032054	26687580	26773377	27094221	27046933	26851082	0.783
	ethidimuron	12467378	12526042	12505564	12628736	12699896	12452855	12496616	12577312	12600065	12500963	12545543	0.628
	fenuron	10130586	10122752	10106982	10129572	10132725	10166142	10172888	10158377	10100105	10049151	10126928	0.359
	tebuthiuron	13393206	13471588	13427293	13320638	13355304	13356831	13365720	13300149	13351274	13334085	13367609	0.382
C3	bentazon	8806267	8820737	8827721	8869476	8855939	8820726	8891795	8812239	8861774	8826551	8839323	0.321
K1	oryzalin	20670205	20549907	20663926	20557620	20501040	20560712	20685038	20443187	20549496	20447825	20562896	0.424
	propyzamide	34471418	34841695	34413653	34732176	34212840	34114492	34595432	34665724	34442629	34734179	34522424	0.683
	tebutam	10165223	10062308	10207010	10091786	9936643	10016384	10194354	10078053	10179349	10126727	10105784	0.853
K2	carbetamide	27114986	27075319	27306980	27553332	27371581	27402136	27236864	27592743	27199826	27387336	27324110	0.629
K3	dimethachlor	17340124	17418773	17436608	17373761	17471963	17486561	17695267	17347328	17536562	17482755	17458970	0.602
	propachlor	12313207	12201640	12347809	12230874	12372978	12347620	12322796	12371549	12452686	12472068	12343323	0.685
O	dicamba	6494675	6445142	6451213	6534100	6403129	6428817	6492237	6506090	6514688	6550741	6482083	0.740
	chloramben	17899483	17994944	17750608	17885903	17885357	17877982	17855212	17965861	18023643	17974129	17911312	0.448
	clopyralid	14243820	14279223	14297835	14027407	14197527	14309021	14305030	14253656	14286540	14152636	14235270	0.622
	picloram	11534089	11518191	11308679	11304796	11418646	11402792	11489191	11436914	11334624	11581379	11432930	0.852
	triclopyr	34467540	34441516	34109121	34484498	34850715	34223363	34930479	34566919	34658393	34963139	34569568	0.828

Table 4.4.2 The reproduction in retention time of herbicides using HPLC

Group	Toxicants	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average	C.V.
C1	desmetryne	10.636	10.574	10.521	10.423	10.365	10.29	10.301	10.211	10.165	10.167	10.365	1.632
	hexazinone	2.551	2.551	2.551	2.548	2.548	2.546	2.544	2.542	2.541	2.541	2.546	0.161
	metribuzin	2.434	2.433	2.435	2.434	2.433	2.434	2.433	2.434	2.433	2.436	2.434	0.041
	bromacil	2.336	2.335	2.333	2.333	2.335	2.334	2.335	2.334	2.334	-	2.334	0.043
C2	monolinuron	2.527	2.527	2.526	2.524	2.526	2.527	2.526	2.525	2.525	2.528	2.526	0.047
	ethidimuron	2.250	2.242	2.256	2.258	2.255	2.256	2.241	2.249	2.242	2.269	2.252	0.392
	fenuron	2.377	2.343	2.344	2.359	2.338	2.337	2.333	2.349	2.341	2.345	2.347	0.548
	tebutiuron	2.498	2.491	2.492	2.501	2.500	2.492	2.497	2.499	2.494	2.490	2.495	0.163
C3	bentazon	2.327	2.329	2.335	2.331	2.325	2.334	2.333	2.324	2.334	2.331	2.330	0.168
K1	oryzalin	2.821	2.809	2.825	2.819	2.823	2.821	2.833	2.829	2.814	2.834	2.823	0.280
	propyzamide	2.967	2.954	2.969	2.951	2.972	2.965	2.960	2.955	2.956	2.960	2.961	0.239
	tebutam	3.346	3.343	3.339	3.336	3.333	3.349	3.341	3.331	3.340	3.333	3.339	0.177
K2	carbetamide	2.257	2.255	2.256	2.255	2.256	2.256	2.257	2.255	2.255	2.255	2.256	0.036
K3	dimethachlor	2.842	2.837	2.838	2.840	2.846	2.838	2.853	2.843	2.838	2.841	2.842	0.172
	propachlor	2.758	2.748	2.749	2.768	2.764	2.757	2.748	2.762	2.757	2.766	2.758	0.270
O	dicamba	2.325	2.330	2.343	2.333	2.295	2.293	2.289	2.290	2.291	2.294	2.308	0.934
	chloramben	2.249	2.242	2.244	2.262	2.271	2.252	2.211	2.253	2.262	2.255	2.250	0.724
	clopyralid	2.191	2.190	2.175	2.192	2.194	2.202	2.179	2.205	2.191	2.188	2.191	0.413
	picloram	2.186	2.216	2.204	2.188	2.180	2.203	2.189	2.201	2.203	2.204	2.197	0.503
	triclopyr	2.514	2.510	2.510	2.523	2.518	2.526	2.508	2.519	2.520	2.529	2.518	0.283

3730	3870	4030	4210	4230	4310	4310	4130	4030	3940
3860	3950	4130	4250	4270	4320	4320	4200	4090	4000
4000	4050	4130	4240	4270	4310	4350	4210	4110	4000
3980	4050	4180	4230	4230	4210	4260	4190	4140	4030
3950	3950	4130	4220	4140	4200	4230	4190	4150	4010
3870	3850	3920	4150	4150	4130	4100	4050	4000	3900

*The unit is lux, and range around $4300 \pm 5\%$; The C.V. (coefficient of variation) is about 3.771%

Fig. 4.4.1 The display of luminosity upper the shaker