

第五章 結果與討論

5.1 藻類毒性試驗數據

本實驗是以一系列不同取代基之鄰苯、間苯、對苯二甲酸酯類作為毒性測試化合物，經由密閉式藻類毒性試驗，分別在實驗前後測溶氧量及細胞密度，作為反應終點；利用求得之數據，計算溶氧變化量(ΔDO)、最終產率(Final Yield ; FY)、生長率 (Growth Rate ; GR) 作為終點參數，求得毒性物質之 EC_{50} 值及劑量反應曲線。

實驗前須以 HPLC 及 COD 測定儀進行濃度上之定量分析。每一組毒物使用 1 個控制組及 5-7 組不同高低的濃度，先經由 range finding 濃度間隔以 5-10 倍數試驗後，取得大致濃度範圍，再依據不同毒物取 1.5~4 為倍數做確定試驗；Table 5.1.1 所顯示的是毒物 DMP 實驗原始數據，為三重複之平均，Initial DO 及 Final DO 為溶氧測定儀所測定出之值，Final cells 為顆粒計數器所測出之細胞顆粒數。 μ specific、 μ relative 及抑制率為利用公式所計算出來之值，其餘完整數據見附錄一。將抑制率與濃度帶入 Probit 模式中，求得劑量與反應曲線之截距(A)與斜率(B)，則可畫出劑量與反應曲線如 Fig 5.1.1~Fig 5.1.20，並得到化合物之 EC_{50} 值。

Table 5.1.2~Table 5.1.4 為不同反應終點利用 Probit 模式所求得各化合物之 EC_{50} 值、95%信賴區間、劑量反應曲線之截距(A)與斜率(B)；表格內打星號代表其為三個參數中最具有敏感性的反應終點，其中只有在 DEP、BBP、B2EHP、

BBOEP、DAtP 這五個化合物是以 Final yield 最為敏感(佔了 25%)，剩餘的 15 個化合物皆以 DO 最為敏感(佔了 75%)，最不具有敏感性的為 Growth rate。

若單看單一參數 DO 的結果，單純接了兩個相同醇類的鄰苯二甲酸酯類 (DMP、DEP、DAP、DPP、DBP、DiBP、DAM、DPHP、DHP)，毒性很明顯的依據碳鏈增長而變強，如 DMP 毒性最低 EC_{50} 值為 126 mg/L 到 DHP 之 EC_{50} 值為 0.037 mg/L；而另外兩個參數 Final yield 及 Growth rate 也是得到相同的結果，DMP 之 EC_{50} 值分別為 147 及 307 mg/L，DHP 之 EC_{50} 值分別為 0.042 及 0.159 mg/L，毒性之間相差達 1900~3500 倍。而 DBP 及 DiBP 這兩個化合物為同分異構物，同樣都接了兩個丁基，但 DBP 為正丁基，DiBP 為異丁基，發現在三個終點之下，DBP 的毒性都是比 DiBP 高，因此可認為直鏈的毒性會較支鏈的高。

若是兩邊接了不同的醇類，如 BBP 接了丁基及苯基，而 B2EHP 接了丁基及 2-乙基己基，雖然 BBP 總碳數為 19 個而 B2EHP 為 20 個，但 BBP 的毒性在三個參數中都明顯的比 B2EHP 強，就結構上而言，兩個化合物差異在苯基及 2-乙基己基，若以相同接了兩個苯基及同樣接了兩個 2-乙基己基的化合物(分別為 DPHP 及 DEHP)來看的話，前者在本研究之三個參數 DO、Final yield 及 Growth rate 分別為 0.11、0.179 及 1.131 mg/L，而過去文獻對於 DEHP 利用不同物種皆顯示在飽和水溶解度之下不具有急毒性^{[1][2][5][11]}，因此推測 B2EHP 很可能因為接了 2-乙基己基這個大分子的醇類導致毒性減低。

除了單純接了直鏈醇類的鄰苯二甲酸酯類，另外有三個鄰苯二甲酸類當中鍵結了氧原子，包括 BMOEP、BEOEP、BBOEP，這類化合物是鄰苯二甲酸先鍵結乙醇再鍵結了氧原子，最外面再接甲基、乙基或丁基；在這樣的結構之下，毒性也是隨著碳數增強，但若是比較含有相同碳數的 Phthalate，毒性較低，反

而若是比較同樣接了甲基醇、乙基醇及丁基醇的 DMP、DEP 及 DBP 毒性上較為相似，因此在這邊認為此類化合物多鍵結了乙醇在其中，並不會增加其毒性，甚至可能會使毒性降低。

再來比較鄰苯和對苯之間毒性的差異，分別有 DEP、DEtP 及 DAP、DAtP 兩組，在三個參數終點都發現對苯的毒性較鄰苯的毒性強，差異介於 8~13 倍，顯示取代基接在對位會具有較高的活性，文獻上也指出若取代基接在 2 的位置毒性會明顯的較低^[46]，鄰苯接的位置即是 1,2-，對苯接的位置是 1,4-，實驗結果與此文獻相符合。

而對苯或間苯在接上胺基(-NH₂)或硝基(-NO₂)如 DMNtP、DMAtP、DMNiP 及 DMAiP 毒性都比 DMP 高出許多，比較起來 DMNiP 及 DMAiP 毒性又較 DMNtP 及 DMAtP 稍高一點。DMNiP 及 DMAiP 的硝基(或胺基)是接在第五個碳上，因此三個取代基分別接於 1,3,5 位置，所以甲基醇與硝基(或胺基)沒有接在鄰的位置；而 DMNtP、DMAtP 的硝基或胺基是接在第 5 個碳上，另兩個甲基醇所接的位置分別在 1,4 上，因此會有一個甲基醇與硝基或胺基接在「鄰」的位置。Abe *et al.*(2001)^[46]對於 aniline 及其衍生物做毒性比較時，發現當取代基(如：Cl 原子)和胺基接在鄰位時的毒性會最低，而若是與胺基接在對位毒性會較強，會造成這個現象是因為若是接在鄰位會對於胺基產生遮蔽作用，因此會降低胺基對於細胞的毒性，若是在對位就不會產生這種遮蔽作用，毒性就會較高。因此在本研究也發現若甲基醇與胺基或硝基是接在鄰位也是會產生此種遮蔽作用，使毒性會比沒有接在鄰位的 DMNiP、DMAiP 低；而發現無論是接在鄰位或間位都以接了胺基(-NH₂)的毒性較強。

Table 5.1.1 The raw data of algal toxicity test about DEP

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	μ_{specific}	μ_{relative}	IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	0.95	7.20	311633	6.24	1.52	1.00	0.00	0.00	0.00
441	1.12	1.64	47067	0.53	0.572	0.377	0.623	0.892	0.916
294	1.09	1.74	79000	0.65	0.831	0.548	0.452	0.784	0.896
196	1.05	2.04	90400	0.99	0.897	0.592	0.408	0.746	0.841
131	1.00	4.10	181767	3.10	1.25	0.822	0.178	0.438	0.504
87.11	1.02	5.21	244233	4.19	1.39	0.919	0.080	0.227	0.329
58.07	1.03	6.62	298300	5.59	1.49	0.985	0.014	0.045	0.105

EC₅₀=126 mg/L (DO)

EC₅₀=147 mg/L (Final Yield)

EC₅₀=308 mg/L (Growth Rate)

IR : Inhibition rate

Final yield : Yield f (Final yield based on cell density)

EC₅₀ (median effective concentration) is conducted by Probit model

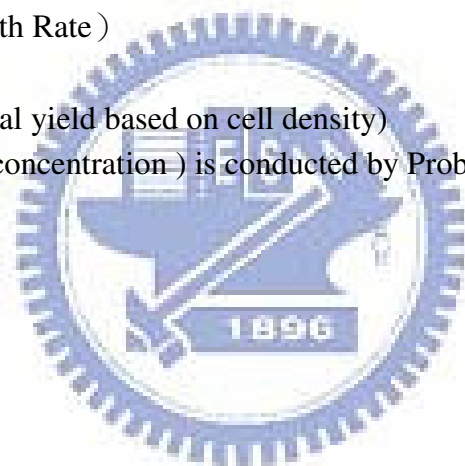


Table 5.1.2 Median effective concentration values (EC₅₀) based on dissolved oxygen production

Toxicants		Response based on Δ DO					
		EC ₅₀ (mg/L)	95% confidence Limit			A	B
DMP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	126*	101	~	157	-1.82	3.24
DEP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	63.0	50.7	~	80.0	1.84	1.75
DAP	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	13.1*	8.74	~	21.3	2.02	2.67
DPP	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	6.62*	4.76	~	9.60	3.28	2.10
DiBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	1.04*	0.787	~	1.33	4.95	3.15
DBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.435*	0.330	~	0.592	5.59	1.64
DAmP	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	0.147*	0.120	~	0.177	5.84	1.01
DPHP	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	0.110*	0.00216	~	0.347	6.01	1.07
DHP	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	0.0371*	0.0141	~	0.0899	6.57	1.10
BBP	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	0.278	0.180	~	0.368	6.13	2.03
B2EHP	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	3.56	1.87	~	8.21	4.59	0.739
BMOEP	C ₁₄ H ₁₈ O ₆	345*	301	~	395	-0.451	2.15
BEOEP	C ₁₆ H ₂₂ O ₆	28.9*	22.6	~	39.0	2.69	1.58
BBOEP	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	1.59	1.26	~	1.97	4.66	1.75
DEtP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	4.66*	3.70	~	5.98	3.85	1.72
DAtP	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	1.48	1.15	~	1.93	4.76	1.40
DMNtP	C ₁₀ H ₉ NO ₆	3.93*	2.56	~	7.45	3.43	2.65
DMAtP	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	1.92*	1.57	~	2.37	4.34	2.33
DMNiP	C ₁₀ H ₉ NO ₆	1.62*	1.29	~	2.10	4.68	1.52
DMAiP	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	0.410*	0.203	~	1.25	5.33	0.851

A : the intercept of the Dose-response Curve

B : the slope of the Dose-response Curve

* : most sensitivity in three end points

Table 5.1.3 Median effective concentration values (EC₅₀) based on final yield

Toxicants		Response based on FY					
		EC50 (mg/L)	95% confidence Limit			A	B
DMP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	147	119	~	175	-1.55	3.02
DEP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	55.5*	47.1	~	64.8	2.06	1.69
DAP	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	15.8	9.37	~	24.1	3.02	1.65
DPP	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	7.66	3.96	~	12.1	2.48	2.85
DiBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	1.47	0.960	~	2.093	4.71	1.77
DBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.609	0.343	~	0.960	5.34	1.59
DAmP	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	0.260	0.224	~	0.302	5.78	1.34
DPHP	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	0.179	0.0238	~	0.434	5.78	1.05
DHP	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	0.0416	0.0148	~	0.0892	6.90	1.37
BBP	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	0.108*	0.0629	~	0.192	5.95	0.981
B2EHP	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	1.77*	1.06	~	3.80	4.80	0.810
BMOEP	C ₁₄ H ₁₈ O ₆	419	372	~	472	-3.95	3.41
BEOEP	C ₁₆ H ₂₂ O ₆	80.3	64.5	~	98.1	-0.0150	2.64
BBOEP	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	1.33*	0.920	~	2.15	4.77	1.90
DEtP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	5.68	3.99	~	7.82	3.73	1.69
DAtP	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	1.22*	0.882	~	1.69	4.88	1.35
DMNtP	C ₁₀ H ₉ NO ₆	6.20	2.56	~	9.96	3.58	1.80
DMAtP	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	2.73	2.24	~	3.19	3.98	2.36
DMNiP	C ₁₀ H ₉ NO ₆	2.18	1.90	~	2.51	4.32	2.02
DMAiP	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	0.505	0.304	~	0.967	5.32	1.06

A : the intercept of the Dose-response Curve

B : the slope of the Dose-response Curve

* : most sensitivity in three end points

Table 5.1.4 Median effective concentration values (EC₅₀) based on growth rate

Toxicants		Response based on GR					
		EC50 (mg/L)	95% confidence limit			A	B
DMP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	308	255	~	404	-0.412	2.18
DEP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	179	157	~	209	1.74	1.45
DAP	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	54.4	37.1	~	87.9	2.71	1.32
DPP	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	14.8	11.6	~	18.6	2.65	2.01
DiBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	4.46	3.65	~	5.59	4.07	1.43
DBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	2.57	1.65	~	4.12	4.61	0.953
DAmP	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	1.19	0.997	~	1.46	4.92	1.09
DPHP	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	1.13	0.520	~	4.22	4.96	0.703
DHP	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	0.159	0.0708	~	0.330	5.75	0.935
BBP	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	0.675	0.364	~	1.30	5.15	0.890
B2EHP	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	>3.00	11.2	~	78.6	4.07	0.685
BMOEP	C ₁₄ H ₁₈ O ₆	716	635	~	810	-3.10	2.84
BEOEP	C ₁₆ H ₂₂ O ₆	181	204	~	162	0.451	2.02
BBOEP	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	2.67	1.72	~	3.93	4.15	1.99
DEtP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	20.3	12.6	~	32.1	3.55	1.11
DAtP	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	5.45	4.59	~	6.48	4.13	1.19
DMNtP	C ₁₀ H ₉ NO ₆	17.2	10.5	~	28.4	3.61	1.12
DMAtP	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	6.25	5.29	~	6.71	3.26	2.25
DMNiP	C ₁₀ H ₉ NO ₆	6.27	5.85	~	6.77	3.66	1.68
DMAiP	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	2.08	1.43	~	3.54	4.65	1.11

A : the intercept of the Dose-response Curve

B : the slope of the Dose-response Curve

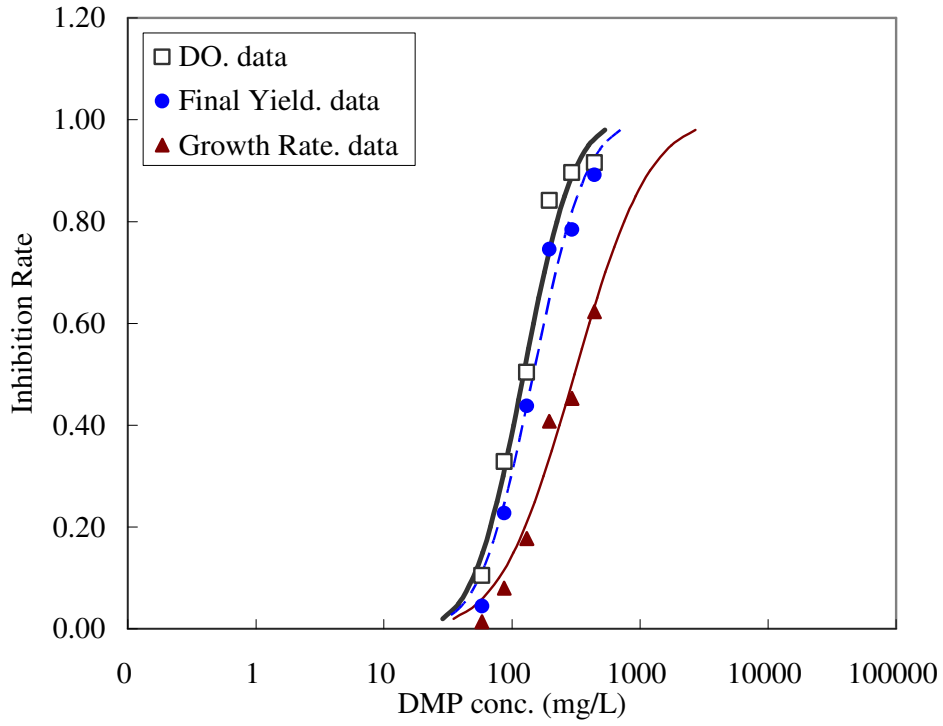


Fig 5.1.1 The Dose-response Curve of DMP

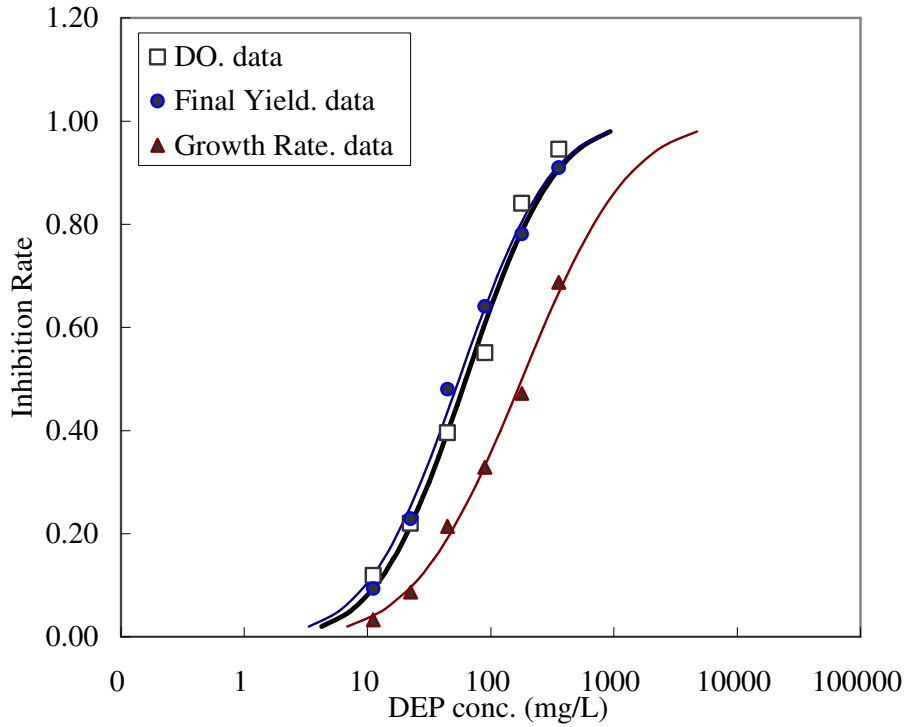


Fig 5.1.2 The Dose-response Curve of DEP

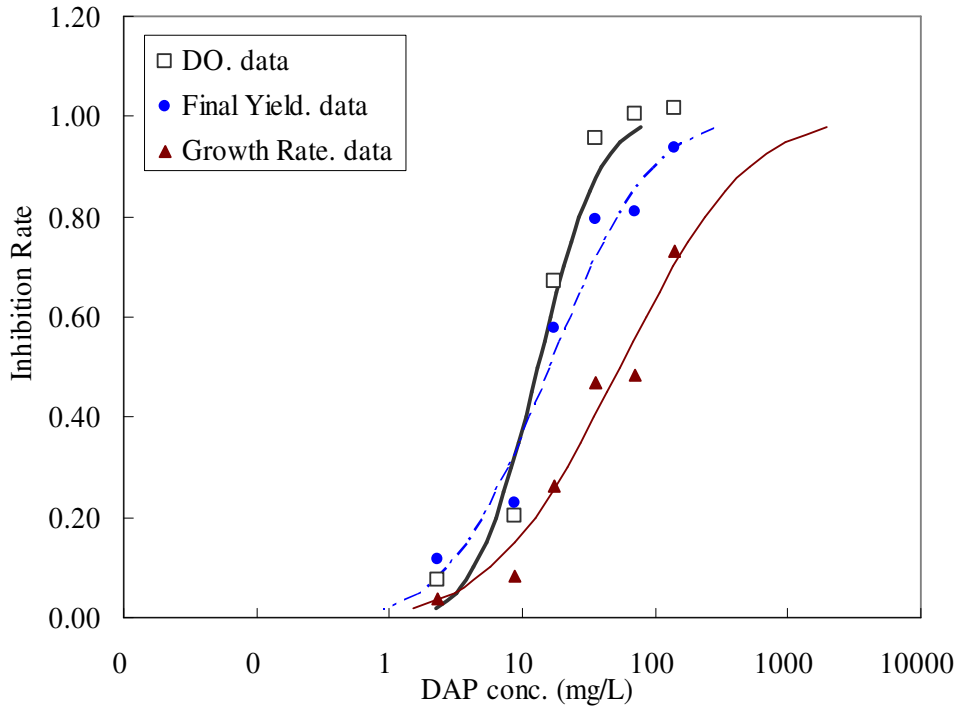


Fig 5.1.3 The Dose-response Curve of DAP

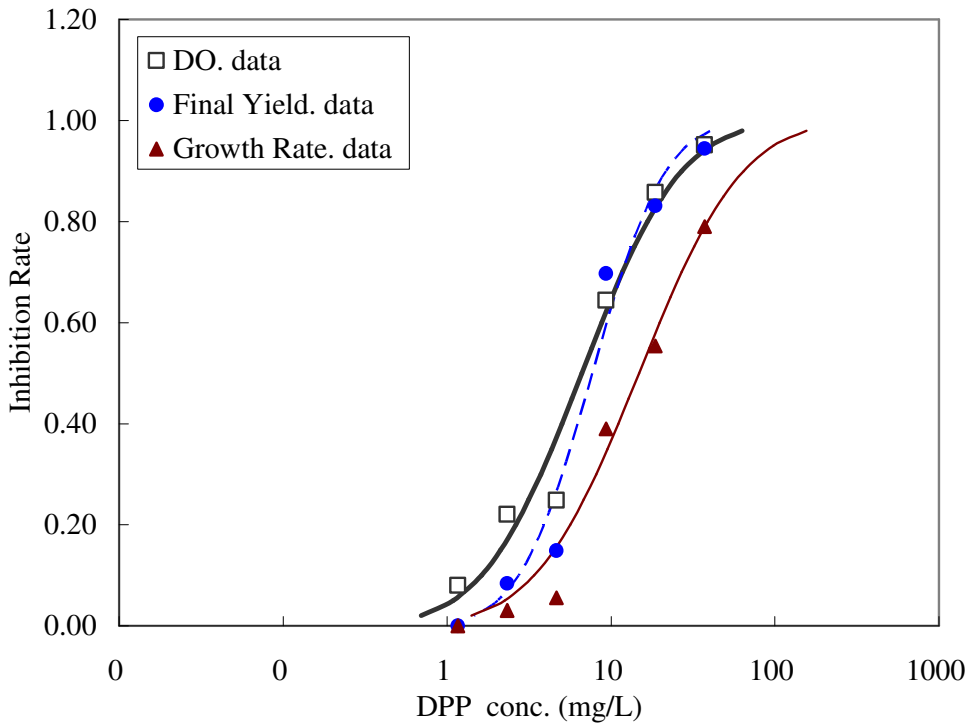


Fig 5.1.4 The Dose-response Curve of DPP

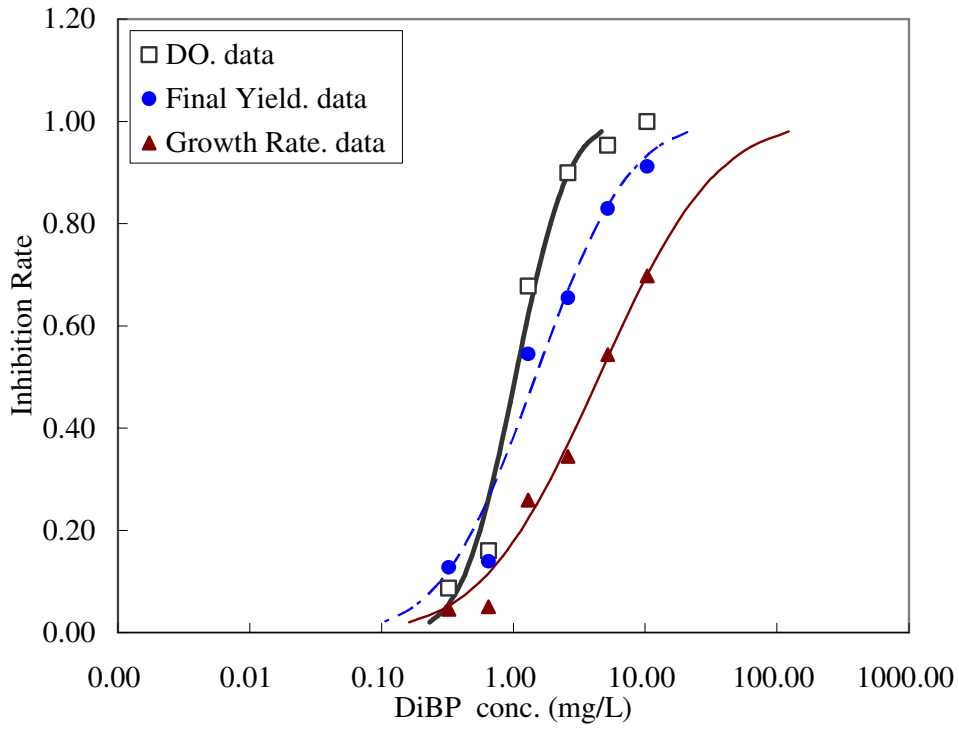


Fig 5.1.5 The Dose-response Curve of DiBP

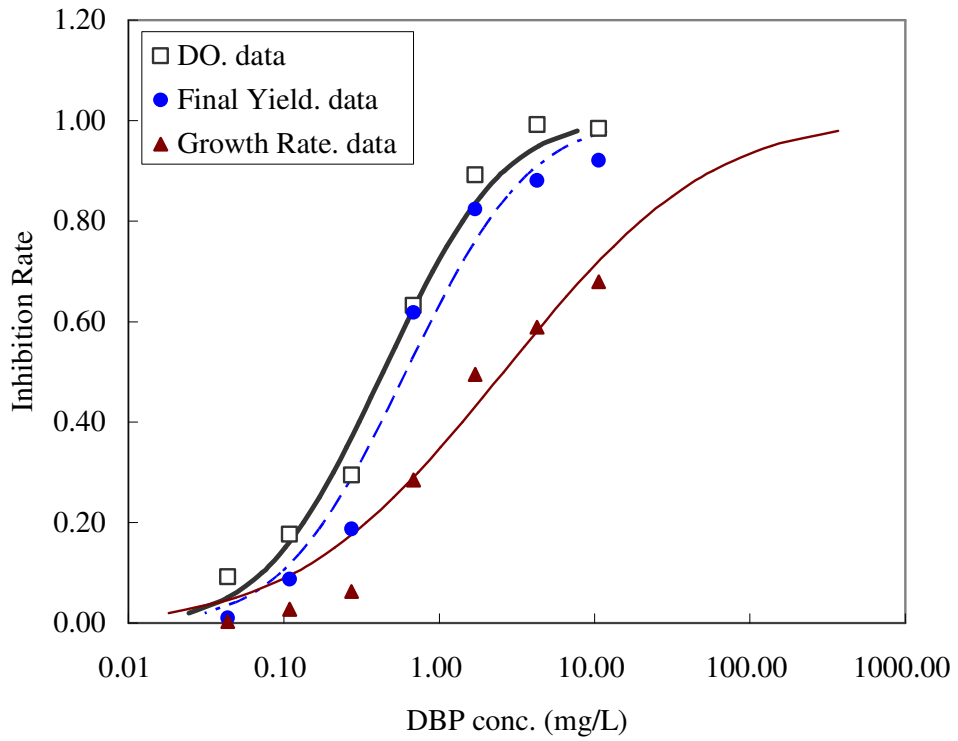


Fig 5.1.6 The Dose-response Curve of DBP

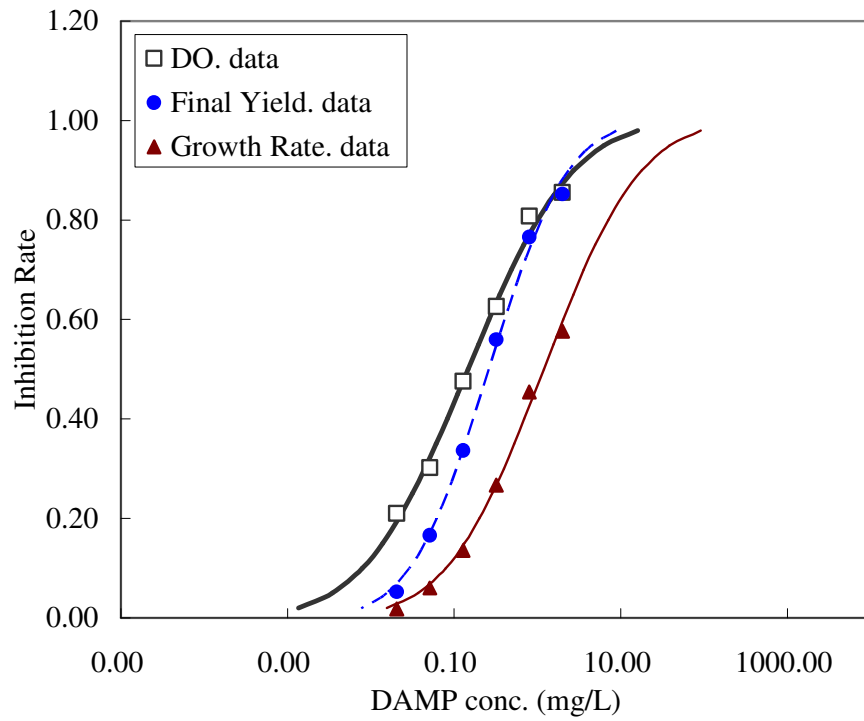


Fig 5.1.7 The Dose-response Curve of DAMP

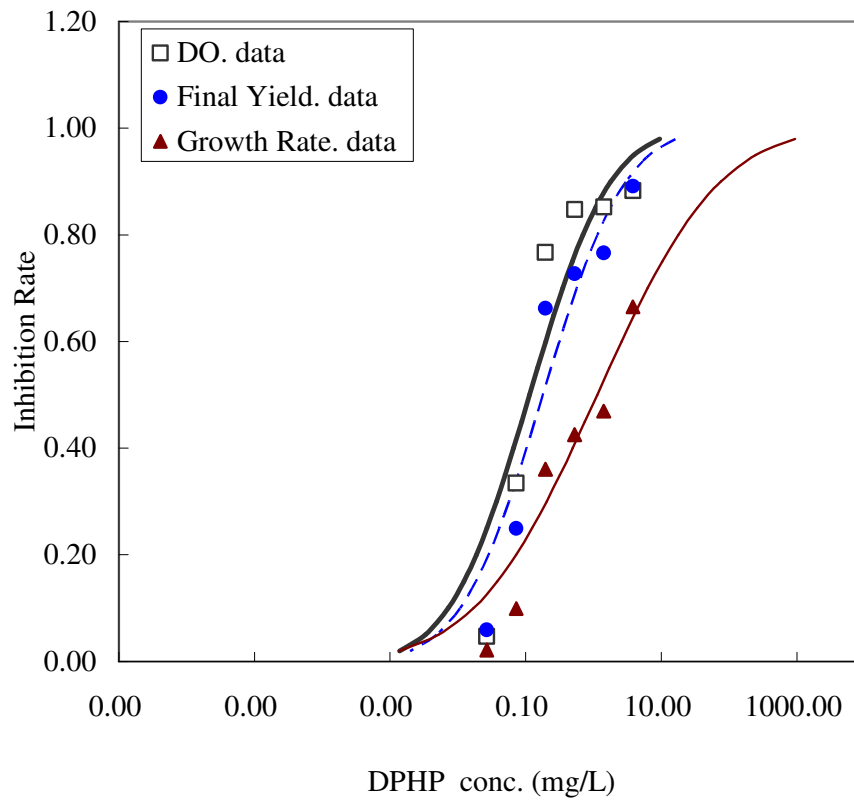


Fig 5.1.8 The Dose-response Curve of DPHP

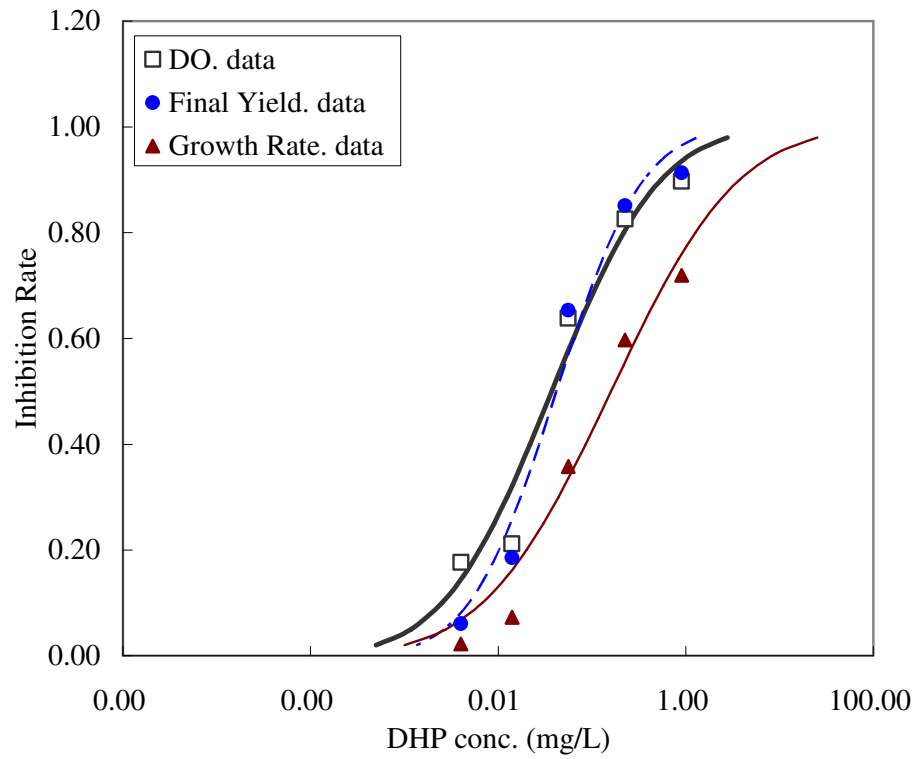


Fig 5.1.9 The Dose-response Curve of DHP

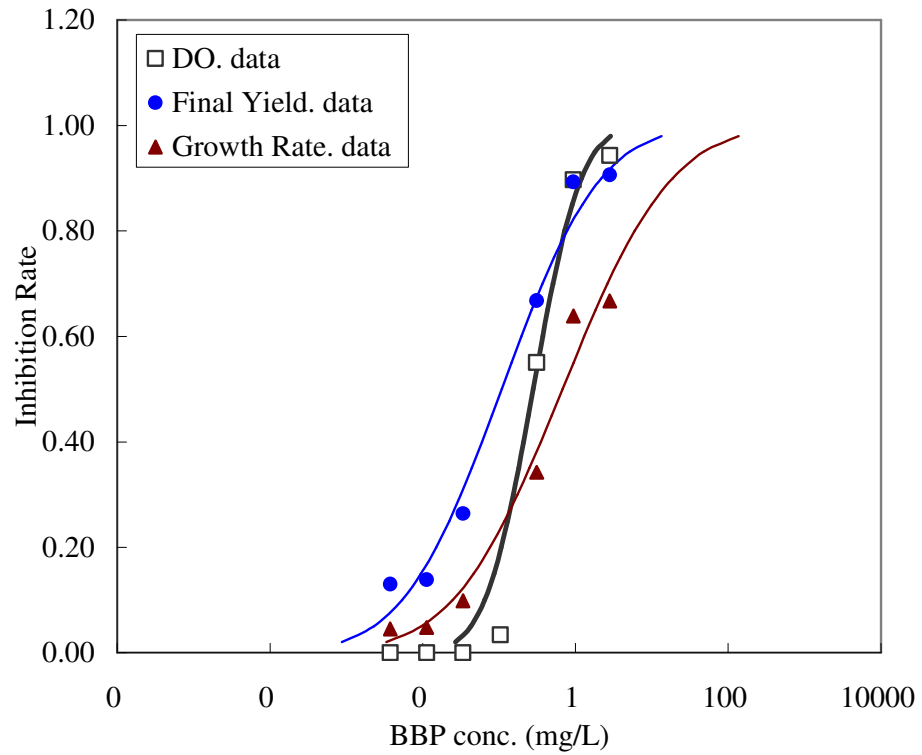


Fig 5.1.10 The Dose-response Curve of BBP

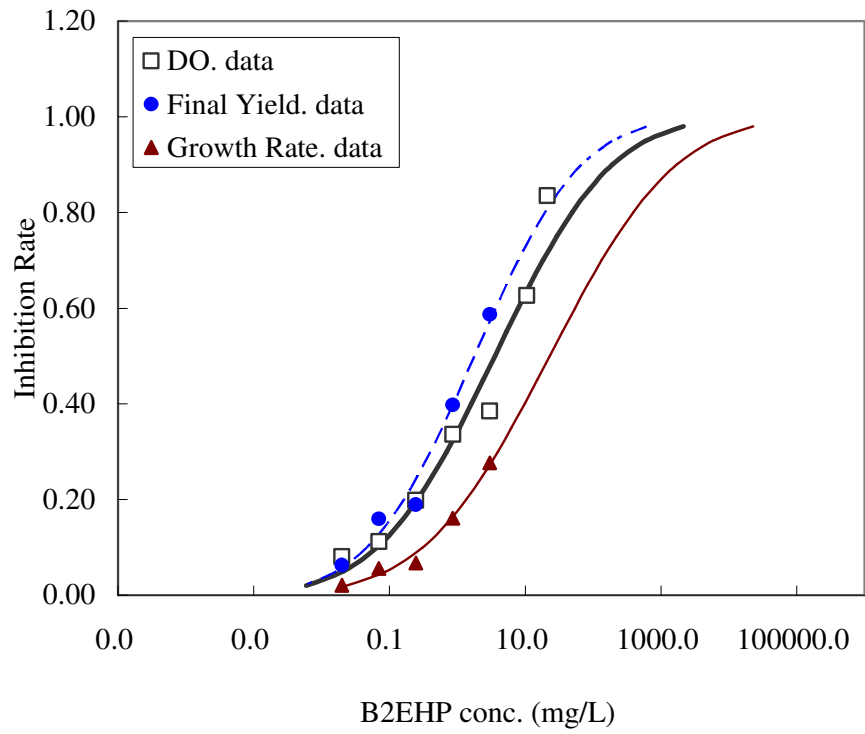


Fig 5.1.11 The Dose-response Curve of B2EHP

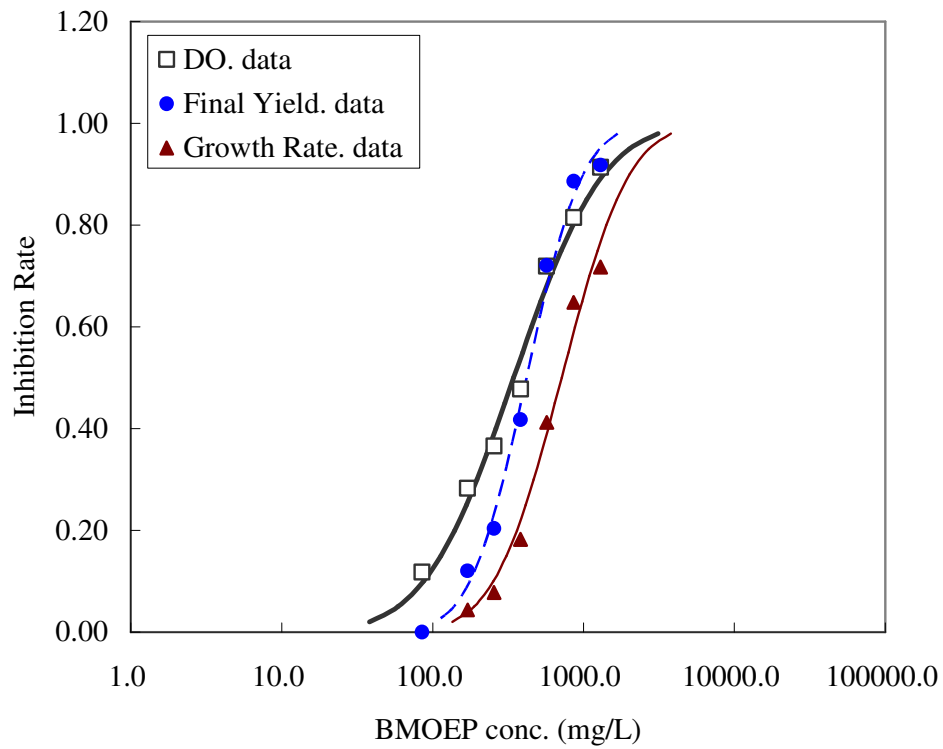


Fig 5.1.12 The Dose-response Curve of BMOEP

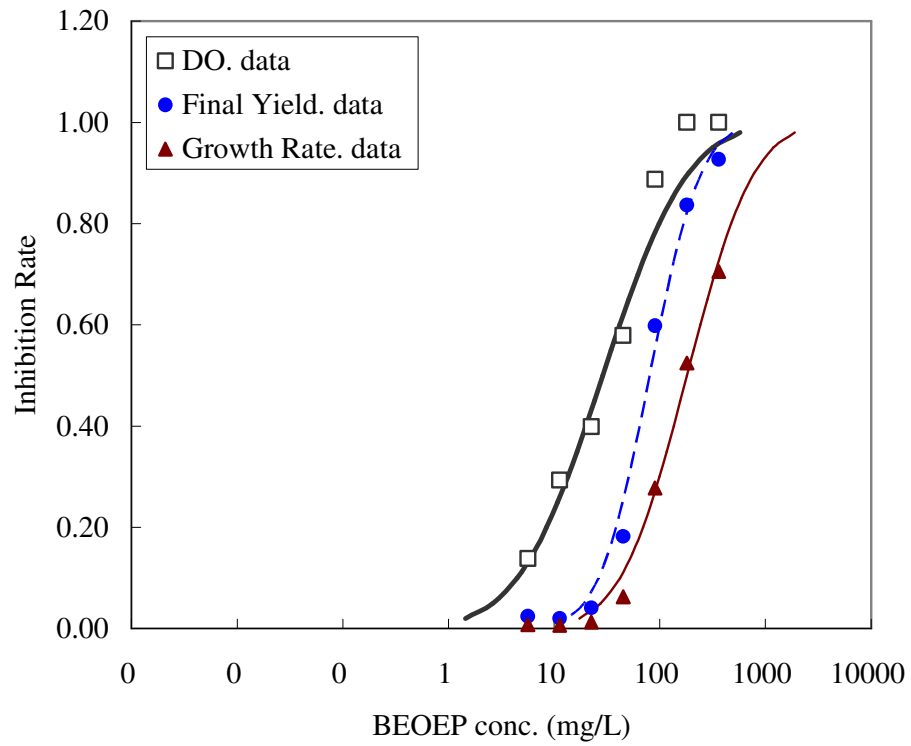


Fig 5.1.13 The Dose-response Curve of BEOEP

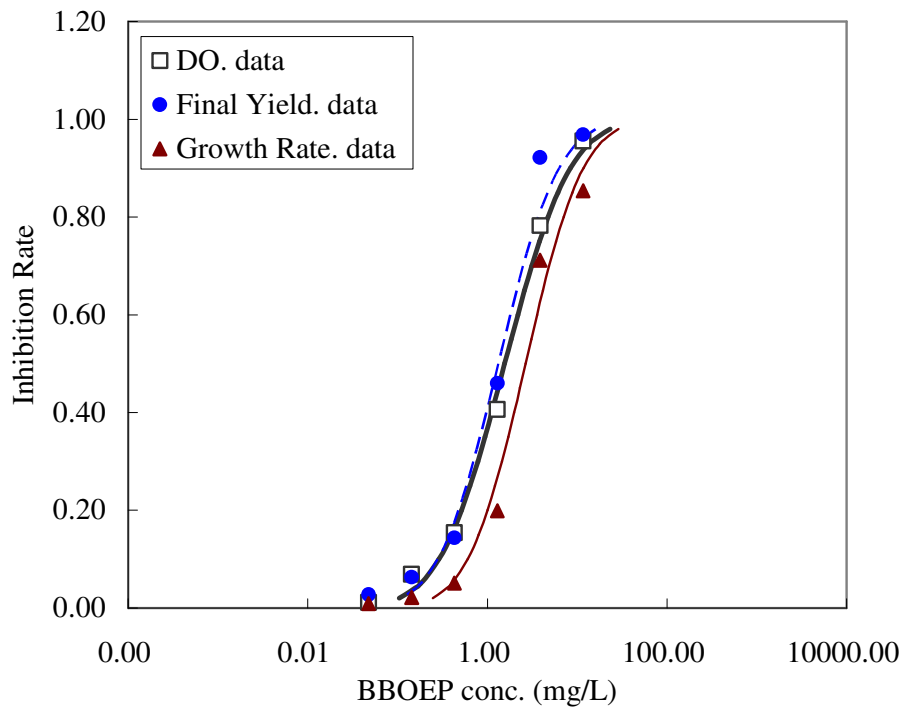


Fig 5.1.14 The Dose-response Curve of BBOEP

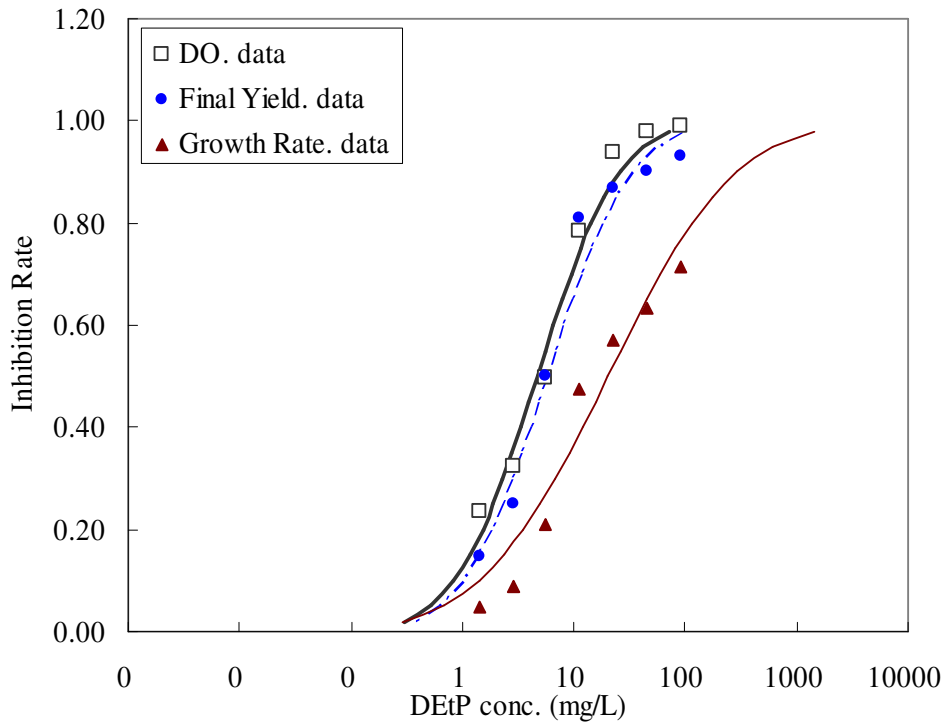


Fig 5.1.15 The Dose-response Curve of DEtP

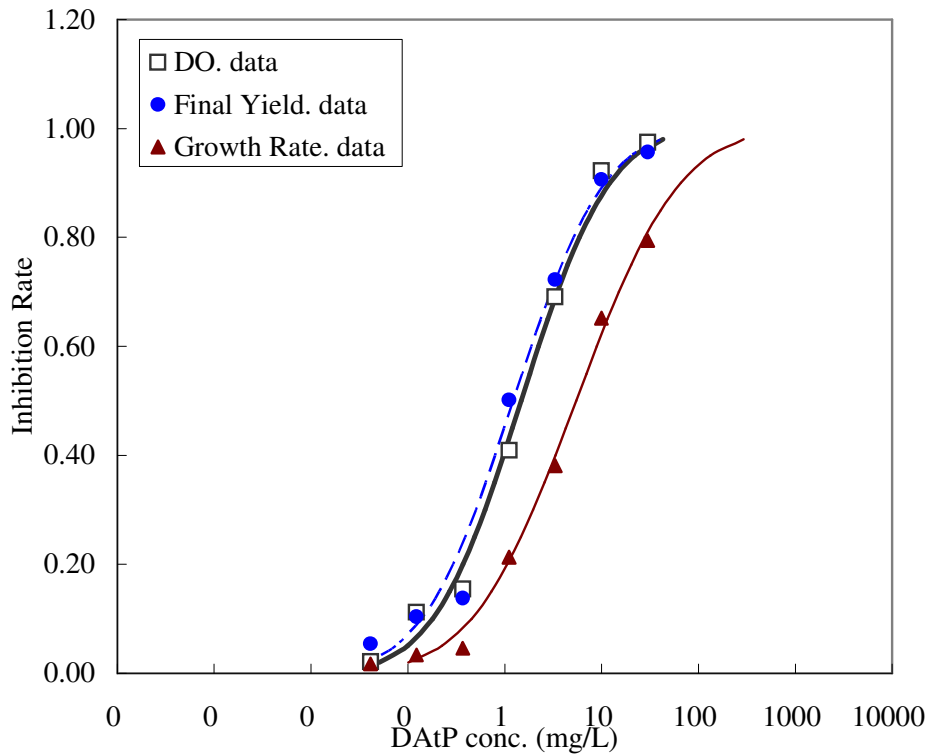


Fig 5.1.16 The Dose-response Curve of DATP

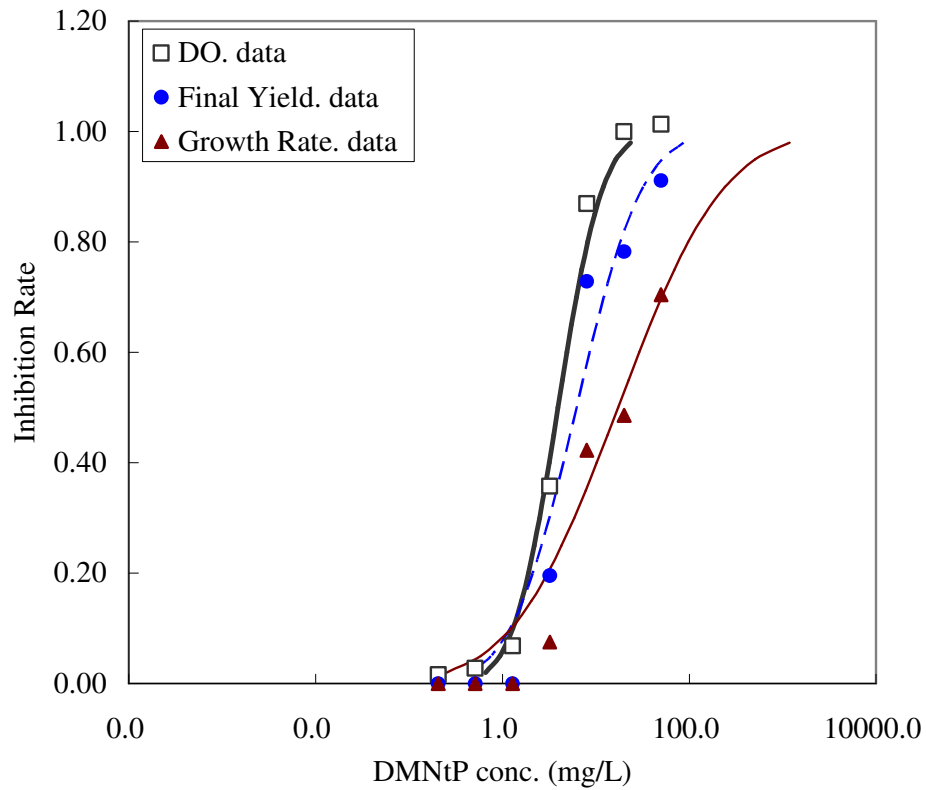


Fig 5.1.17 The Dose-response Curve of DMNtP

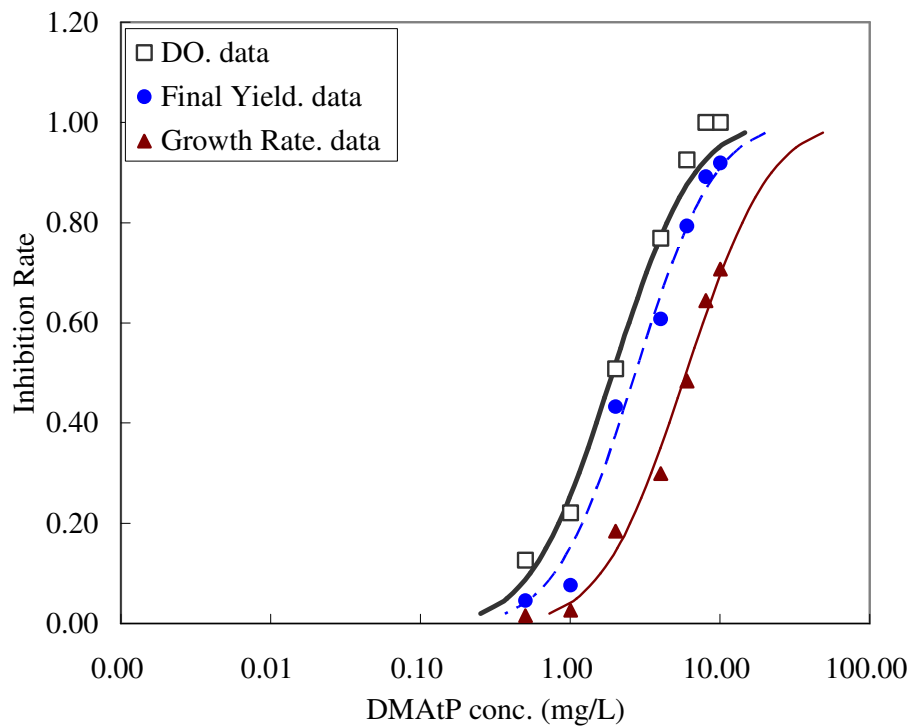


Fig 5.1.18 The Dose-response Curve of DMAtP

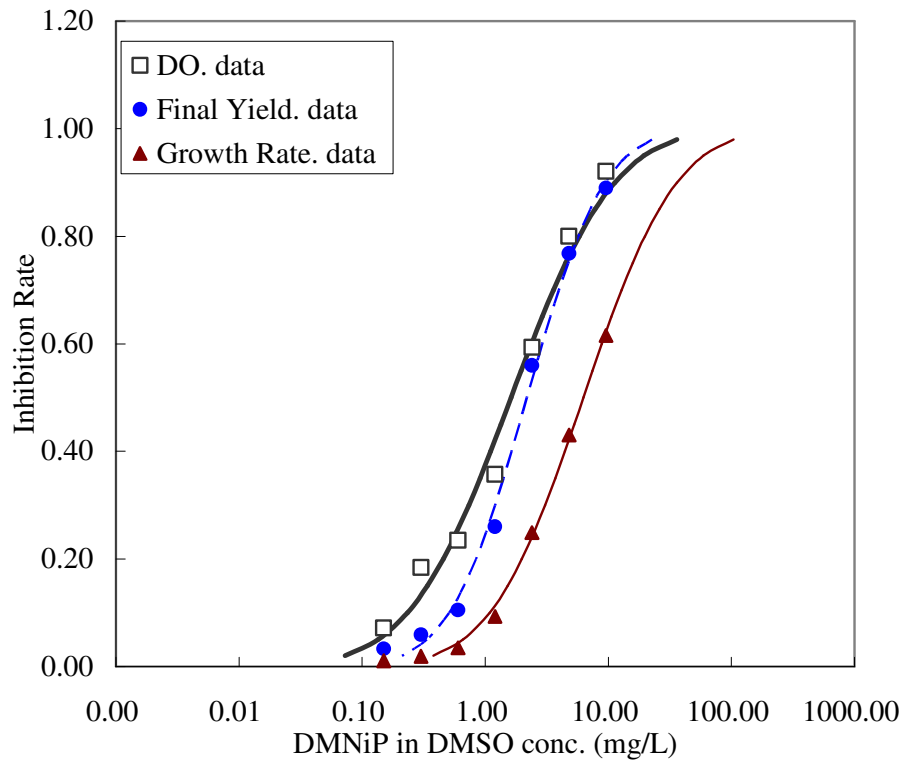


Fig 5.1.19 The Dose-response Curve of DMNiP

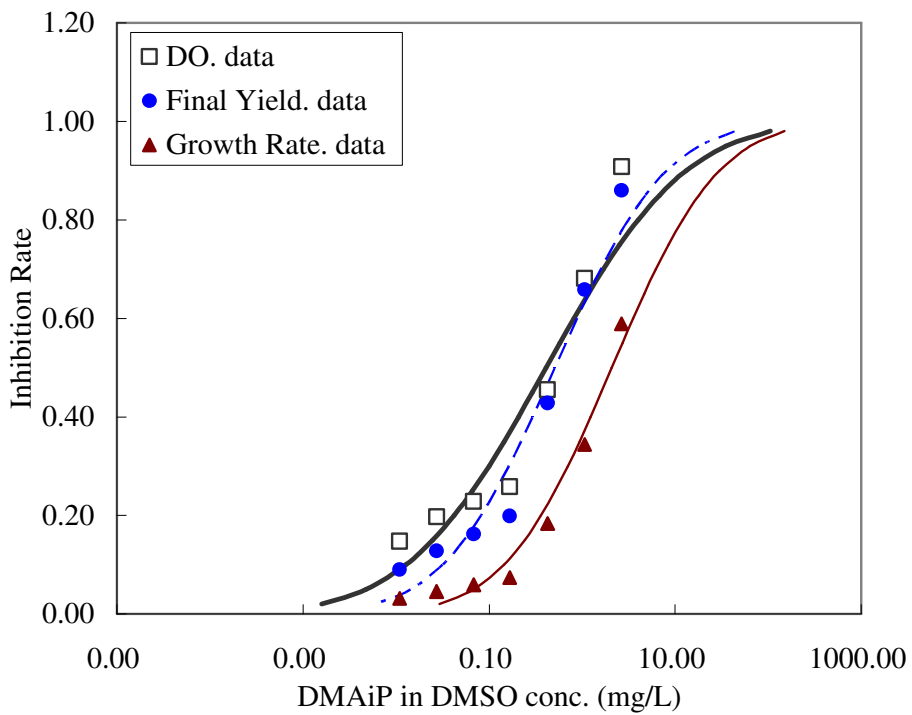


Fig 5.1.20 The Dose-response Curve of DMAiP

5.2 最佳化模式

為了了解實驗系統在不同受測物種下對不同毒性物質的敏感度，一般來說，皆是經由利用不同的數學模式來轉換實驗數據為 EC 值或 LC 值，用以方便比較或判定不同條件下的敏感度高低。在毒理學中常見的數學模式有 Probit、Weibull 與 Logit 三種，是以不同分析理論下所建立的模式，同一組數據經由不同模式所計算出的結果也會不一樣。大多以這三種迴歸模式所計算出的 EC₅₀ 值較為穩定，分析差距皆不大，較具有代表性。

雖然使用這三種模式的 EC₅₀ 值較穩定，但在計算低濃度時（例：EC₁₀），模式之間的差異性及信賴區間變大都會造成相當的分析誤差。為了避免上述情況的產生，因此以下試驗即針對實驗所求得的結果，經由三種常用的模式所求得的 EC₅₀ 值進行 G test 最佳化選擇（Goodness of fit）分析，以此選擇出最適合的計算模式來計算低濃度毒物的 EC₁₀ 值，經由對重覆試驗的每一處理組與期望值的誤差比較，所得絕對值最小的 G 值，即為適合的最佳模式。Table 5.2.1-5.2.3 為 G test 分析的結果，其中有幾組無法計算出 G 值，有些是因為實驗濃度取決不夠完善或無法在信賴區間 95% 計算出 EC₁₀ 及 EC₅₀ 而無法作比較。

經由計算後的結果可看出在本研究當中，以三種不同的參數（ Δ DO, Final Yield 與 Growth Rate）來說， Δ DO 得到與另外兩個參數不同的結果，是以 Weibull 模式最為適用(84.21%)，而 Final Yield 及 Growth Rate 都是以 Probit 得到最適模式(89.47%及 73.68%)；由此顯示出不同參數所得到最適的模式不盡相同，若要確實了解化學物質的低影響濃度(EC₁₀)應該依據各參數所適用的模式來計算較為準確。

上一節的 EC_{50} 值是由 Probit 模式算出來的，但本節 DO 參數得到最佳化模式是 Weibull 模式，因此，在 Fig 5.2.1 中表示出在此參數下進行兩種模式的比較。發現兩個模式在除了低抑制或高抑制會有較大的差距，抑制率在 50% 時，兩個模式計算出的結果是沒有太大差距的，因此雖然在統計的觀點上來看，Weibull 模式是較好的，但通用性與普遍性仍以 Probit 模式較佳，因此在前一節使用 Probit 模式來計算 EC_{50} 也是可行的。

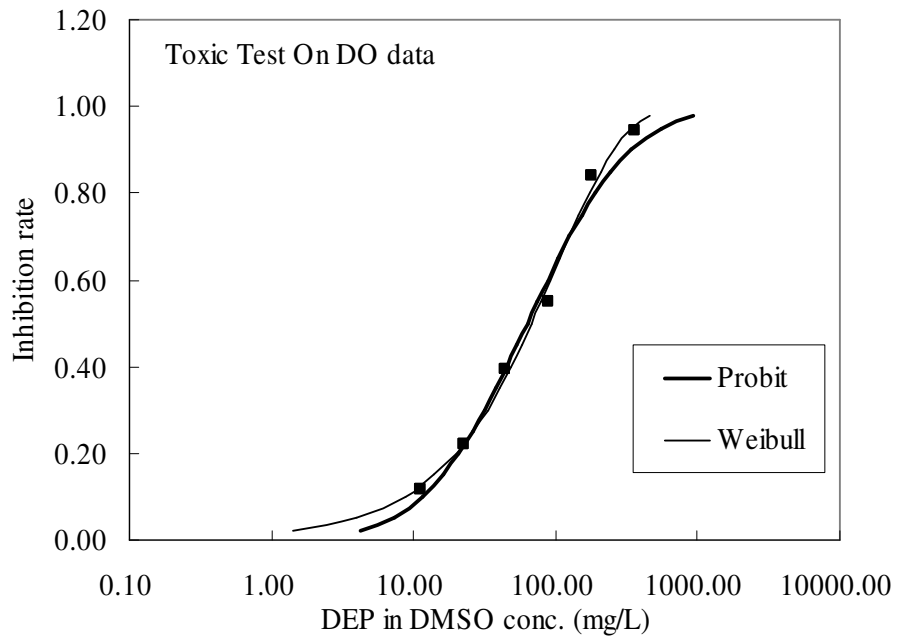


Fig 5.2.1 The Dose-response Curve of dissolved oxygen production between Weibull and Probit model

Table 5.2.1 G values of dissolved oxygen production in three models

Toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
DMP	54.2	20.6	-0.379*	
DEP	53.5	63.0	9.93*	
DAP	125	124	40.8*	
DPP	40.6	40.8	-10.7*	
DiBP	-3.61*	-7.35	-53.0	
DBP	77.8	88.7	10.9*	
DAmP	60.8	14.5	0.778*	
DPHP	24.2	17.4*	-34.4	
DHP	13.9	8.96*	-15.3	
BBP	-	-	-	Weibull
B2EHP	71.6	72.0	32.1*	(84.21%)
BMOEP	16.1	23.1	-2.13*	
BEOEP	54.1	61.4	23.1*	
BBOEP	50.3	44.9	-4.88*	
DEtP	59.7	89.2	6.17*	
DAtP	58.0	58.4	-5.77*	
DMNtP	93.3	85.2	32.8*	
DMAtP	32.3	35.6	0.552*	
DMNiP	47.9	50.4	2.78*	
DMAiP	110	116	50.9*	

* : The lowest absolute G value in three models is the optimum values

Table 5.2.2 G values of Final yield in three models

Toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
DMP	-94.1*	-97.5	-122	
DEP	-101*	-111	-136	
DAP	-47.6*	-49.6	-91.3	
DPP	-112*	-119	-167	
DiBP	-124*	-131	-165	
DBP	-112*	-126	-169	
DAmP	-96.9*	-101	-122	
DPHP	-149*	-157	-199	
DHP	-126*	-134	-168	
BBP	-163	-159*	-186	Probit
B2EHP	-22.9*	-26.6	-32.1	(89.47%)
BMOEP	-101*	-110	-140	
BEOEP	-38.3*	-63.4	-127	
BBOEP	8.27	-1.78*	-71.8	
DEtP	-99.6*	-105	-128	
DAtP	-77.3*	-83.4	-143	
DMNtP	-	-	-	
DMAtP	-141*	-143	-185	
DMNiP	-39.0*	-51.8	-99.8	
DMAiP	-29.4*	-33.0	-70.8	

* : The lowest absolute G value in three models is the optimum values

Table 5.2.3 G values of Growth rate in three models

Toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
DMP	-18.3*	-28.9	-43.8	
DEP	12.8	6.16	-5.77*	
DAP	14.2	3.44*	-	
DPP	-11.9*	-22.2	-38.5	
DiBP	-8.50*	-18.3	-31.4	
DBP	-43.0*	-56.3	-72.6	
DAmP	-3.40*	-12.3	-23.4	
DPHP	-28.4*	-38.5	-51.0	
DHP	-24.1*	-35.1	-49.6	
BBP	-35.1*	-42.6	-78.6	
B2EHP	10.0	7.62	6.55*	Probit (73.68%)
BMOEP	-0.405*	-11.8	-39.2	
BEOEP	-5.31*	-24.8	-44.4	
BBOEP	30.9	7.52*	-50.8	
DEtP	-34.5*	-51.5	-81.1	
DAtP	7.82*	-9.37	-40.1	
DMNtP	-	-	-	
DMAtP	-18.8*	-28.4	-43.7	
DMNiP	10.2*	-	-25.0	
DMAiP	37.8	28.9	17.2*	

* : The lowest absolute G value in three models is the optimum values

5.3 低濃度影響之比較

5.3.2 NOEC、EC10 及 NEC 之比較

本節主要利用三個不同參數(Δ DO, Final Yield 及 Growth Rate)了解化合物之低濃度抑制值 NOEC(No Observed Effect Concentrations)、LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)、EC10 (Effect Concentrations, 10%)及 NEC(No Effect Concentrations), NOEC、LOEC 是使用 Dunnett's test 方法, 利用與控制組之間是否具有明顯差異性的關係計算得之, 通常和實驗濃度的取決、重複組的數量和選定參數有所關聯, 若重複組間的差異變小, 與處理組的差距便較為明顯, 所求得的 NOEC 值也較為準確, 通常較不嚴謹的實驗易出現較高的 NOEC 值; 而此節之 EC₁₀ 會利用上一節之最佳模式來得到各毒物之值; NEC 是利用回歸分析法所求得。

Table 5.3.1 是 NEC 在三個不同終點參數下所計算出來的結果, 在自然環境中, 毒性化學物質對於生物體的影響可能存在一個閾值(Threshold), 此閾值指生物體可以容忍或抵抗毒性物質的影響最高限度, 而可計算出來的值即為 NEC; 而此值計算過程需要 P 值 < 0.05 在統計上才具有可信賴度, 在這裡所得到的平均 P 值為 0.01, 因此所求得之 NEC 值是具有可靠度的。

附錄二所呈現為三個終點參數(Δ DO、FY 及 GR)對於不同評定標準的低濃度抑制值(NOEC、LOEC、EC₁₀ 及 NEC); 在終點參數敏感度比較方面, 因濃度取決不夠低導致某些數據是以小於的形式表示, DO 較多因濃度取決不夠低導致無法計算(佔了 70%), FY 比較起來只有 30%無法計算, 而 GR 幾乎都能計算

出 NOEC 值，僅有 3 組無法計算。由這點可判斷出 DO 這個參數對於 NOEC 值是較敏感的，因為當最低濃度的生長率已經和控制組沒有明顯的差異時，毒化物還是會對藻類溶氧產生量造成抑制，因此在這樣的濃度下對於藻類還是會造成危害；若直接由值來判斷發現有 9 組 DO 之 NOEC 值是較 FY 及 GR 敏感，8 組敏感度與 FY 相同，這 8 組再進一步以 EC10 作為判斷標準，發現有 7 組是以 DO 為較敏感參數，由附錄二對於不同終點參數敏感度比較結果，Table 5.3.2 中比較 NOEC、EC10 及 NEC 敏感度的部分只有 4 組是選擇 FY 當作終點參數，其餘 16 組皆是以 DO 為終點參數。

Table 5.3.2 所顯示之數據是選擇 NOEC 最敏感之終點參數表示之，在 NOEC 與 EC₁₀ 的比較之下，EC₁₀/NOEC 的比值>1 的組數有 11 組，平均為 1.37；NOEC 與 NEC 比較之下 NEC/NOEC 值>1 的佔了 95%，平均為 5.24；而 EC10 與 NEC 比較之下，NEC/EC10 值>1 的佔了 100%，平均為 5.03；由此結果可以表示 NOEC 敏感度是比 EC₁₀ 稍高的，但 NEC 是比 NOEC 及 EC₁₀ 敏感度更低，因此敏感度排名順序如下：NOEC>EC₁₀>NEC。

Table 5.3.1 No effect concentration (NEC) based on three end points

	DO		FY		GR	
	NEC	P	NEC	P	NEC	P
DMP	98.7	0.00736	130	0.00800	143	0.0188
DEP	35.6	0.0250	16.3	0.000956	22.4	0.00758
DAP	8.64	0.0198	5.53	0.003670	7.98	0.0107
DPP	3.99	0.00333	3.55	0.00943	4.56	0.0161
DiBP	0.566	0.00285	0.491	0.000508	0.791	0.00319
DBP	0.299	0.0431	0.137	0.00401	0.205	0.000247
DAmP	0.0273	0.00150	0.0419	0.00102	0.083	0.00360
DPHP	0.0169	0.00469	0.0219	0.000873	0.0311	0.00151
DHP	0.00774	0.00354	0.00696	0.0142	0.0113	0.00100
BBP	0.103	0.0128	0.0558	0.0408	0.0764	0.0331
B2EHP	0.0528	0.0171	0.114	0.0384	0.134	0.0613
BMOEP	243	0.00641	223	0.00202	304	0.00948
BEOEP	3.93	0.0313	36.5	0.00161	44.8	0.00827
BBOEP	0.507	0.0372	0.406	0.03024	0.54	0.0295
DEtP	3.52	0.000402	1.42	0.00138	2.2	0.000127
DAtP	0.463	0.00464	0.311	0.000373	0.484	0.00473
DMNtP	3.74	0.0437	1.54	0.00360	1.795	0.00573
DMAtP	0.96	0.0526	1.03	0.000377	1.21	0.00336
DMNiP	0.593	0.00700	0.644	0.00199	0.749	0.0128
DMAiP	0.148	0.0480	0.133	0.0165	0.168	0.0421

NEC : no effect concentration

Unit : mg/L

Table 5.3.2 The relationship of NOEC、EC₁₀ and NEC

	Most sensitivity endpoint	NOEC	LOEC	EC ₁₀	NEC	EC ₁₀ /NOEC	NEC/NOEC	NEC/EC ₁₀
DMP	DO	<43.9	43.9	61.1 ^W	98.7	>1.39	>2.25	1.62
DEP	DO	<11.2	11.2	8.72 ^W	35.6	>0.780	>3.18	4.08
DAP	DO	<2.34	2.34	4.38 ^W	8.64	>1.87	>3.69	1.97
DPP	DO	<1.16	1.16	1.62 ^P	3.99	>1.40	>3.43	2.46
DiBP	DO	<0.324	0.324	0.406 ^P	0.566	>1.25	>1.75	1.39
DBP	DO	0.0430	0.109	0.0559 ^W	0.299	1.30	6.95	5.35
DAmP	DO	<0.0210	0.0210	0.00320 ^W	0.0273	>0.152	>1.30	8.53
DPHP	DO	<0.0270	0.0270	0.00700 ^L	0.0169	>0.259	>0.626	2.41
DHP	DO	<0.00400	0.00400	0.00239 ^L	0.00774	>0.598	>1.94	3.24
BBP	FY	<0.00400	0.00400	0.00514 ^L	0.0558	>1.29	>14.0	10.9
B2EHP	FY	0.0200	0.0700	0.0464 ^P	0.114	2.32	5.70	2.46
BMOEP	DO	<170	170	61.2 ^W	243	>0.360	>1.43	3.97
BEOEP	DO	<5.64	5.64	3.49 ^W	3.93	>0.619	>0.697	1.13
BBOEP	FY	0.0480	0.144	0.301 ^L	0.406	6.27	8.46	1.35
DEtP	DO	<1.41	1.41	0.560 ^W	3.52	>0.397	>2.50	6.29
DAtP	DO	0.041	0.123	0.126 ^W	0.463	3.07	11.3	3.68
DMNtP	FY	1.28	3.20	1.20 ^W	1.54	1.06	1.20	1.28
DMAtP	DO	<0.502	0.502	0.437 ^W	0.960	>0.871	>1.91	2.20
DMNiP	DO	<0.150	0.150	0.177 ^W	0.593	>1.18	>3.95	3.35
DMAiP	DO	<0.0110	0.0110	0.0107 ^W	0.148	>0.972	>13.5	13.8

unit : mg/L

NOEC、LOEC is conducted by Dunnett's test, EC₁₀ is conducted by three models; P for Probit, L for Logit and W for Weibull

5.3.2 NOEC 與 Cut of value

然而由上節的分析方法無法描述 NOEC 值與 EC_{10} 何者較為嚴謹，為了更深入比較 EC_{10} 與 NOEC，本研究將更進一步地利用 ANOVA (analysis of variance) 檢定三項重要參數：Sw、F ration 以及中斷值 (cut-off value)。Sw 代表的是試驗的組內變異，而 F ration 為組間變異與組內變異的比值，用以表示組間與組內變異的差異程度。

由 Table 5.3.3 發現到 Sw 值在三種參數下的差異性皆很大，主要是溶氧產生量的單位是 mg/L，細胞密度變化量的單位是 cells/mL，使得 Sw 不能用以直接比較三種反應終點的組內變異，也因此 F ration 基於相同理由，同樣無法判斷哪一個觀測參數較為精準。為了能夠比較不同參數的準確度，本研究使用了一判斷參數中斷值，此中斷值與 Sw 成比例關係，且介於 NOEC 與 LOEC 之間，能夠更嚴謹地判斷藻類受到抑制的顯著性，並使之包含單位的複雜參數與控制組的平均值比較並以抑制的百分率作為單位，使其能夠用於不同單位的試驗終點間比較。

由 Table 5.3.3 以 ΔDO 、Final yield 及 Growth rate 為反應終點的平均中斷值分別是 6.81、7.07、5.44，一個較小的 cut-off value 顯示此試驗組內變異相對地較小，因而有一定的精準度。可發現到平均值以 Growth rate 最低，其次為 ΔDO ，最高為 Final yield；全部試驗中以溶氧和生長率為反應終點所得到的中斷值最小的分別佔了全部的 40% 及 50%，顯示以這兩項參數作為反應終點組間變異較小，因此會比 Final yield 作為終點佳。

因為中斷值介於 NOEC 與 LOEC 之間，但高於 NOEC，故當中斷值小於 10% 時，生物受到 NOEC 的影響濃度會比 10% 的抑制濃度要低，也就是說，此時建議選擇 NOEC 值會比 EC_{10} 提供更加嚴謹的保護標準。Table 5.3.3 中，三種不同反應終點的中斷值分別有 95%、90%、95% 是小於 10

的，由此可知以本研究的毒性物質而言，NOEC 值比 EC_{10} 能提供更佳的保護標準。而整個分析中，其中幾組中斷值大於 10% 造成的原因可能來自於所使用的藻類未達穩定狀態、或試驗過程不夠嚴謹以及毒性物質濃度設定不理想，都會產生分析上的偏差。



Table 5.3.3 The important statistical parameters in three test end-points

Toxicants	DO			FY			GR		
	Sw	F ratio	cut-off value	Sw	F ratio	cut-off value	Sw	F ratio	cut-off value
DMP	2.62E-01	1.96E+02	8.84	1.01E+04	3.00E+02	6.81	2.53E-02	6.13E+02	3.51
DEP	1.74E-01	1.75E+02	9.15	1.26E+04	1.02E+02	10.8	5.11E-02	1.37E+02	7.68
DAP	9.31E-02	3.97E+03	2.44	1.81E+04	9.04E+01	12.3	5.08E-02	1.89E+02	7.07
DPP	9.98E-02	7.70E+02	4.82	9.56E+03	2.58E+02	9.10	6.81E-02	1.28E+02	10.7
DPHP	8.45E-02	1.63E+03	3.95	9.84E+03	1.71E+02	3.07	2.76E-02	5.15E+02	4.03
DiBP	7.64E-02	2.36E+03	3.68	8.44E+03	7.35E+02	8.78	2.82E-02	7.53E+02	4.22
DBP	2.25E-01	1.06E+02	3.08	4.70E+03	7.49E+02	5.15	2.35E-02	5.33E+02	3.78
BBP	9.50E-02	1.03E+03	4.01	3.09E+03	1.32E+03	5.44	2.53E-02	4.76E+02	3.71
DAmP	1.90E-01	3.52E+02	9.36	7.80E+03	2.98E+02	4.05	5.23E-02	2.09E+02	3.55
DHP	1.23E-01	1.70E+03	6.73	7.15E+03	5.09E+02	8.14	2.57E-02	7.56E+02	8.44
BMOEP	3.61E-01	3.88E+01	6.36	1.30E+04	7.96E+01	8.99	3.97E-02	1.55E+02	6.45
BEOEP	1.50E-01	2.17E+02	7.09	9.59E+03	1.72E+02	4.42	4.14E-02	2.72E+02	4.26
BBOEP	1.64E-01	4.13E+02	7.88	6.53E+03	1.00E+03	4.23	3.07E-02	6.00E+02	5.50
B2EHP	1.92E-01	3.39E+02	16.3	5.24E+03	1.21E+03	9.66	3.73E-02	6.27E+02	5.66
DEtP	7.06E-02	2.78E+03	2.22	5.89E+03	9.74E+02	3.69	2.08E-02	1.25E+03	2.81
DAtP	2.15E-01	2.61E+02	8.95	9.84E+03	4.37E+02	6.50	2.69E-02	9.66E+02	3.70
DMNtP	1.85E-01	3.13E+02	9.64	5.95E+03	7.11E+02	5.71	3.18E-02	4.87E+02	4.98
DMAtP	1.17E-01	3.43E+02	7.67	1.12E+04	1.79E+02	9.29	6.48E-02	1.04E+02	9.64
DMAiP	1.17E-01	1.84E+02	7.71	9.80E+03	1.56E+02	8.41	3.30E-02	2.38E+02	4.97
DMNiP	2.14E-01	3.49E+02	6.35	1.06E+04	3.13E+02	7.01	2.98E-02	4.43E+02	4.10
AVE	1.60E-01	8.76E+02	6.81	8.95E+03	4.88E+02	7.07	3.67E-02	4.73E+02	5.44

Sw : Variation between columns

F-ratio : The ration of variation within columns to variation between column

5.3.2 ACR

毒性化學物質在環境危害的評估過程當中，缺乏長時間暴露的毒性試驗研究數據。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。ACR 值的計算可經由物種的急毒性結果(LC50)除以慢毒性結果(NOEC or LOEC)。計算方式如下：

$$ACR = \frac{\text{Acute toxicity}}{\text{Chronic toxicity}}$$

由於本研究的 NOEC 值有大部分無法求的，因此在做 ACR 比較時，只有使用 LOEC。除此之外，也同樣針對 EC₁₀ 與 NEC 和 EC₅₀ 做比較。Table 5.3.4 所呈現的結果同樣只選擇三個終點參數下最敏感的 NOEC 值所得到的 ACR 值。

首先討論利用 LOEC 所計算出來的 ACR 值，大部分是介於 1~12 之間，除了三個化合物 BBP、B2EHP 及 DMAiP 值分別為 27、25.3、37.3，此三個化學物質之化學劑量曲線的斜率都偏低，是造成 ACR 值會較高的結果；而若以 EC₁₀ 計算出的結果，ACR 值介於 2~15 之間，其中較大的值為除了前述的三個化合物還多了 DAmP，此化合物的 ACR 值為 45.9，會造成較高的值是因為這組實驗為低濃度只有 20% 的抑制率，因此 EC₁₀ 的值是以外插法求得，變動較大。若以 NEC 所計算出的 ACR 值介於 0.5~6，值偏高的化合物是 B2EHP，值為 15.5，這個化合物再三種低濃度抑制所計算出來的 ACR 值都明顯的偏高，會造成這樣的原因可能與此化合物毒理特性或是實驗過程不夠嚴謹造成。

現在通常是利用一外插因子來得到環境品質的標準，假設在此求得的結果下，對於現地中的影響及環境來說都是安全的，低於此安全的層級之下，毒性化學物質對於自然環境有負面的影響。而固定的外插因子通常採用 10、100 或 1000 應用到可獲得的 EC₅₀ 或 LC₅₀ 以求得最大可接受的危害

程級。在本研究利用不同低濃度抑制值所得到的 ACR 值平均約為 8，而大部分實際應用上所使用的值為 10，因此使用這個參數是在合理範圍之內的。



Table 5.3.4 ACR for 20 chemicals

	Most sensitivity endpoint	EC ₅₀ /LOEC	EC ₅₀ /EC ₁₀	EC ₅₀ /NEC
DMP	DO	4.06	2.92	1.81
DEP	DO	5.64	7.22	1.77
DAP	DO	5.59	2.99	0.940
DPP	DO	5.69	4.08	1.66
DiBP	DO	3.25	2.6	1.86
DBP	DO	3.99	7.78	1.45
DAmP	DO	7.00	45.9	5.38
DPHP	DO	4.08	15.7	6.52
DHP	DO	9.25	15.5	4.78
BBP	FY	27.0	21.0	1.94
B2EHP	FY	25.3	38.1	15.5
BMOEP	DO	2.02	5.63	1.42
BEOEP	DO	5.12	8.27	0.661
BBOEP	FY	9.20	4.40	3.26
DEtP	DO	3.31	8.32	1.32
DAtP	DO	12.0	11.8	3.19
DMNtP	FY	1.94	5.16	4.03
DMAtP	DO	3.83	4.39	0.500
DMNiP	DO	10.8	9.18	2.74
DMAiP	DO	37.3	38.2	2.77
AVG.		9.32	13.0	3.18

5.4 試驗物種數據收集與比較

5.4.1 敏感度比較

本實驗主要只針對月芽藻來進行實驗，但基於毒物對物種的影響力、成本或便利性不盡相同，幾十年來也發展出不同實驗裝置，無論是開放式或半密閉式、密閉式設備，其中更包括了許多各式各樣的實驗物種。雖然無法在這麼多的生物中判定其中哪個為最為敏感的生物，但是毒性數據與其他物種研究結果之間的比較仍略顯得必要；這樣的比較可以提供出較為明確且完整評估毒性物質的方法。

本研究將收集以往文獻裡利用不同物種所做的毒性試驗結果，數據表列於 Table 5.4.1 及 Table 5.4.2，由於過去文獻沒有完整對於此種結構之化合物之實驗數據，因此在這邊只顯示出過去文獻中曾有人利用不同物種作過的化合物，其中分別包括了魚類、水蚤、原生動物及藻類等的毒性數據。在 Table 5.4.1 每一筆數據後面會以中括弧表示其敏感度的排名，敏感度越高數字越低，若不同物種在同一個化合物之 EC_{50} 值皆為大於的形式，則排名都相同；之後可利用排名的平均值比較出敏感度高低，BOD-DO> BOD-FY> Bluegill> Fathead minnow> BOD-GR> Rainbow trout> Water flea> Protozoa。

Fig 5.4.1 是分別將以水體動物當作測試物種的毒性數據與本研究所利用三種不同反應參數所描繪出的敏感性比較圖(EC_{50} 值倒數後取 log 作圖，因此值越大代表越敏感)，經由畫出 45 度的對角線來判別物種敏感性的差別。X 軸為本實驗室之實驗結果，Y 軸為其他物種之實驗結果，若點是分步於對角線之上半部，代表其他物種較敏感，反之則為本實驗室之敏感度較高。

以這兩個參數(ΔDO 及 FY)來看的話，本研究室之 BOD 瓶藻類毒性試驗顯示出較高或是與魚類差不多的敏感度，但是在低分子的兩個化合物

DMP 及 DEP 敏感度卻比魚類低，因為過去文獻曾指出鄰苯二甲酸酯類在魚體內會進行水解作用，此作用會將化合物水解成鄰苯二甲酸及相關醇類，當進入到魚體內的化合物都被水解時，體內外的濃度就無法達到平衡，此時體外的化合物就會不斷進入魚體內累積造成毒性，而且這個水解化合物的能力會隨鄰苯二甲酸酯類之分子越低能力越高^[28]；雖然在較低階生物(如：纖毛蟲或藻類)也會進行水解作用，但體內對於這種水解能力活性較低，且若跟魚類比起來更是可忽略的能力，因此敏感度相對的也會變低。

另外除了 DMP 及 DEP 敏感度較低外，還有一個化合物 DPHP 敏感度也相對的比魚低，此化合物的結構被魚水解之後會產生一個鄰苯二甲酸及兩個酚，一般而言酸類是屬於非極性麻醉化學物質，而酚是屬於極性麻醉性化學物質，在這邊會因為毒性作用機制改變而造成較高毒性^[28]。

傳統批次式藻類毒性試驗是以開放式為主，因此若是具有揮發性的有機化合物在實驗過程會因逸散造成低估毒性，本實驗室就開發了 BOD 瓶密閉式藻類毒性試驗，降低有機物之揮發；在本研究室過去針對揮發性有機物試驗結果與其他物種比較皆顯示較高的敏感度^[49]；Table 5.4.2 顯示是以文獻中藻類毒性數據與本研究室之 BOD 瓶藻類毒性數據作比較，發現本研究室之實驗結果敏感度並不如以往結果敏感，可能是此類化學物質之揮發性較低，若為傳統實驗過程的逸散程度並不明顯，因此敏感度不如過去結果高。若比較 *Pseudokirchneriella subcapitata*、*Scenedesmus subspicatus* 及 *Skeletonema costatum* 三個藻種發現彼此敏感度差不多，且試驗終點對於敏感度差異性也很高，且每間實驗室試驗方法不盡相同，因此會受到試驗時間、初始植種密度、實驗基質、溫度、pH 值等條件的影響。

Table 5.4.3 及 Table 5.4.4 是過去文獻對於其他物種及其他藻種低濃度影響之結果，同樣也是除了兩個低分子化合物 DMP、DEP 敏感度較低之外，其餘化合物與其他物種比較起來都是更具有敏感度的，若與其他藻類比較結果，雖然數據不多，但發現敏感度也是有較高；因此在環境評估上

利用月芽藻 NOEC 當作評估標準的話，也幾乎同時可以保護到水體的其他物種。



Table 5.4.1 Comparisons of algal toxicity test results with literature data

Toxicants	BOD-test			<i>Fathead minnow</i>	<i>Bluegill</i>	<i>Rainbow trout</i>	<i>Sheepshead minnow</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>T. pyroformis</i>
	DO	BIO	GR						
	48 hr EC ₅₀	48 hr EC ₅₀	48 hr EC ₅₀	96 hr LC ₅₀	96 hr LC ₅₀	96 hr LC ₅₀	96 hr LC ₅₀	48 hr EC ₅₀	48 hr EC ₅₀
DMP	126 [6]	147[7]	308[8]	121 ^a [5]	50 ^a [2]	56 ^c [3]	58 ^a [4]	45.9 ^a [1]	537 ^a [9]
DEP	63.0[6]	55.5[5]	179[9]	24.045 ^a [3]	16.7 ^a [2]	12 ^c [1]	29.6 ^a [4]	86 ^a [7]	132 ^a [8]
DAP	13.1[1]	15.8[2]	54.4 [4]	—	—	—	—	*26 ^a [3]	—
DPHP	0.110[2]	0.179 [3]	1.13[4]	0.08 ^a [1]	—	—	—	—	—
DiBP	1.04[2]	1.47[3]	4.46[4]	0.9 ^a [1]	—	—	—	—	—
DBP	0.435[1]	0.609[3]	2.57[5]	1.27 ^a [4]	0.48 ^a [2]	4.52 ^a [7]	>0.6 ^a [9]	3.0 ^a [6]	7.0 ^a [8]
BBP	0.278[2]	0.108[1]	0.675[3]	>0.78 ^a [8]	1.7 ^a [4]	3.33 ^a [7]	3.0 ^a [6]	#2.36 ^d [5]	—
DHP	0.04[1]	0.04[1]	0.16[3]	>0.1 ^a [4]	>0.11 ^a [4]	>0.2 ^c [4]	>0.78 ^a [4]	**>0.18 ^a [4]	—
B2EHP	3.56[2]	1.77[1]	>3.00[3]	>0.12 ^a [3]	>0.11 ^a [3]	>0.19 ^c [3]	>1.36 ^a [3]	>0.07 ^a [3]	—
DMNtP	3.93[1]	6.20[2]	17.2 [4]	6.52 ^b [3]	—	—	—	—	—
DMAtP	1.92[1]	2.73[2]	6.25[3]	8.94 ^b [4]	—	—	—	—	—
Ave.	2.27	2.73	4.55	3.6	2.83	4.17	5	4.14	8.33

Unit : mg/L

a. Staples *et al.*(1997)^[1]

b. Geiger *et al.*(1985)^[47]

c. Adams *et al.* (1995)^[5]

d. Barera *et al.* (1983)^[48]

* 24hr

** 96hr

average(1-4.7 mg/L)

Table 5.4.2 Comparisons of algal toxicity test results with literature data

End point duration Toxicants	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>							<i>Scenedesmus subspicatus</i>					<i>Skeletonema costatum</i>	
	BOD-test			GR	Cell number	Chlorophyll a	population growth	CMI ^b	GR	CMI ^b	GR	CMI ^b	Chlorophyll a	Cell number
	DO	BIO	GR											
DMP	126	147	308	228 ^a	39.8/142 ^b	42.7 ^c							26.1 ^c	29.8 ^c
DEP	63.0	55.5	179	70.4 ^a	85.6/16.0 ^b	90.3 ^c	30.1 ^c	35.0 ^c	62.0 ^c	23.0 ^c	45.0 ^c	21.0 ^c	65.5 ^c	85.0 ^c
DAP	13.1	15.8	54.4					5.30 ^c	11.0 ^c	3.80 ^c	5.50 ^c	4.50 ^c		
DiBP	1.05	1.47	4.46											
DBP	0.487	0.609	2.60		0.400 ^b			3.50 ^c	9.00 ^c	1.20 ^c	2.0 ^c			
BBP	0.278	0.108	0.675	0.960 ^a	*0.247 ^{b,c}	0.110 ^c							0.170 ^c	0.190 ^c
DHP	0.0410	0.0412	0.158		>0.330 ^b									
B2EHP	3.56	1.77	>3.00		>3.20 ^b									

Unit : mg/L

CMI : Cell multiplication inhibition

a. Jonsson et al.(2003)^[9]

b. Adams et al. (1995)^[5]

c. Staples et al.(1997)^[1]

* avg

Table 5.4.3 Comparisons of other species no observed effect concentration with literature data

Toxicants	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>			<i>Fathead minnow</i>	<i>Bluegill</i>	<i>Rainbow trout</i>	<i>Sheepshead minnow</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>T. pyroformis</i>
	BOD-test			Mortality	Mortality	Mortality	Mortality	survival	Growth inhibition
	DO 48hr	BIO 48hr	GR 48hr	96 hr	96 hr	96 hr	96 hr	21d	24hr
DMP	<43.9	65.8	98.8	66.0 ^a	15.3 ^a	10.0 ^a	21.5 ^a	9.60 ^a	100 ^a
DEP	<11.2	11.2	11.2	4.00 ^a	1.65 ^a	3.80 ^a	22.2 ^a	25.0 ^a	50 ^a
DAP	<2.34	2.34	2.34					3.20 ^a	10 ^a
DiBP	<0.324	<0.324	<0.324						10 ^a
DBP	0.0435	0.0435	0.109	0.320 ^a	0.420 ^a	0.500 ^a	0.600 ^a	0.960 ^a	1 ^a
BBP	0.103	<0.00400	<0.00400	0.440 ^a	0.360 ^a	0.480 ^a	1.00 ^a	0.280 ^a	50 ^a
DHP	<0.00400	0.00400	0.0140	<0.100 ^a	0.110 ^a	0.200 ^a	0.780 ^a	0.0840 ^a	
B2EHP	0.245	0.0200	0.0200			0.190 ^a	1.36 ^a	0.0560 ^a	

unit : mg/L

a. Staples *et al.*(1997)^[1]

Table 5.4.4 Comparisons of other speices no observed effect concentration with literature data

Effect measure	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>			<i>Skeletonema costatum</i>		<i>Scendesmus subspicatus</i>	
	BOD-test			Chlorophyll a	Cell number	Chlorophyll a	GR
	DO 48hr	BIO 48hr	GR 48hr	96hr		96hr	72hr
DMP	<43.9	65.8	98.8	<11.9 ^a	^{6d} <64.7 ^a	<11.9 ^a	
DEP	<11.2	11.2	11.2	22.2 ^a	^{8d} 3.64 ^a	<39.4 ^a	
DAP	<2.34	2.34	2.34		^{10d} 0.400 ^a		
DBP	0.0430	0.0430	0.109		^{10d} 0.210 ^a		0.500 ^a
BBP	0.103	<0.00400	<0.00400	<0.0700 ^a	^{10d} <0.100 ^a	<0.0300 ^a	
DHP	<0.00400	0.0040	0.0140		^{7d} 0.180 ^a		
B2EHP	0.245	0.0200	0.0200		^{6d} 3.20 ^a		

unit : mg/L

a. Staples *et al.*(1997)^[1]

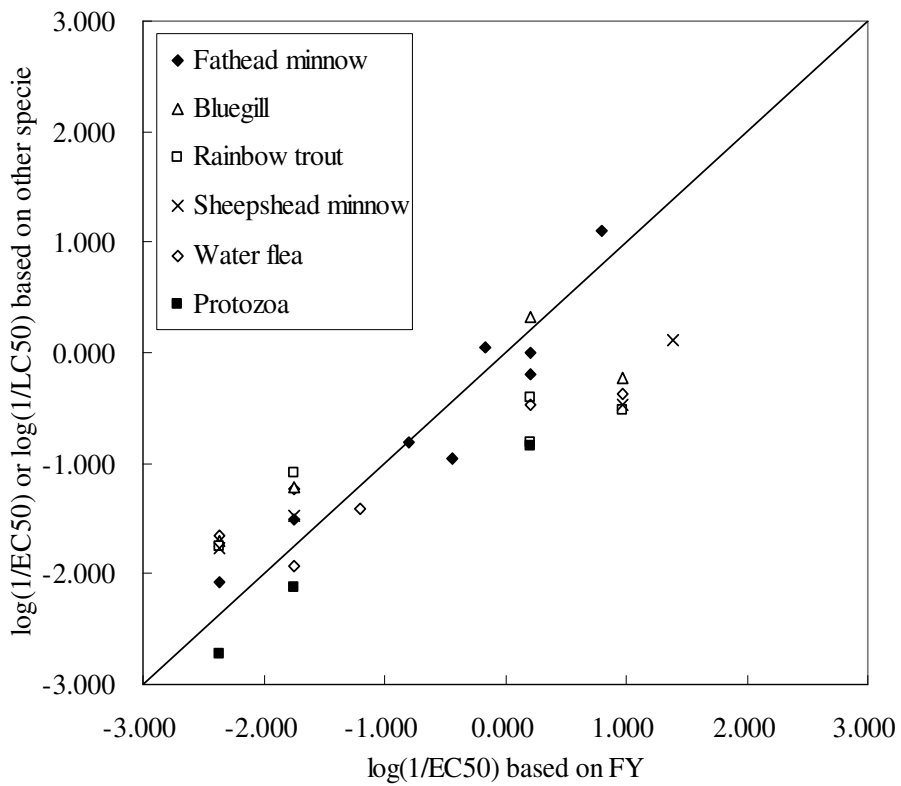
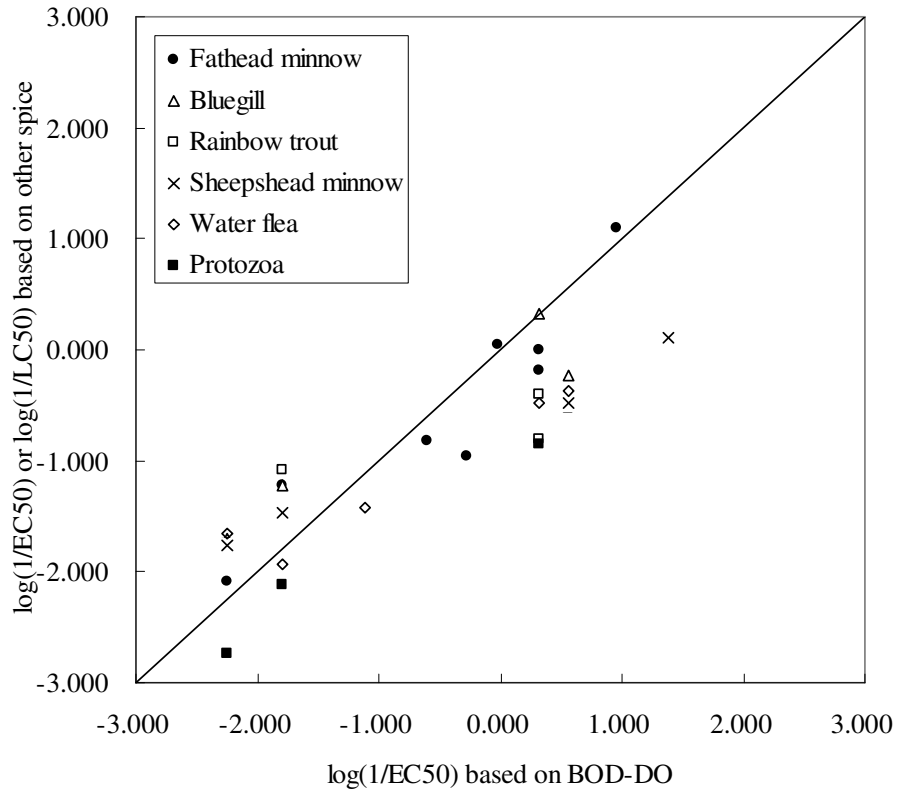


Fig 5.4.1 Comparison of relative sensitivity of *P. subcapitata* and other species
Unit: mmol/L

5.4.1 替代物種比較

一般而言，我們會選擇某一種生物來進行毒性試驗，例如藻類、魚類或是細菌等，並且以毒性物質造成生物體的半致死濃度，來當作它的毒性指標；而此章節所呈現的希望能了解某一毒性物質對於藻類所造成的毒性影響，是否在其他物體種上也是否觀察得到。因此本節會收集過去文獻所收集的其他物種資料，來進行替代物種分析，進而觀察生物體之間的毒性劑量反應是否接近，以及其敏感性。而這種所選擇的生物體，即稱為替代實驗物種(Surrogate)。

生物為了維持生命都必須從外界攝取能量和營養，以這種能量和營養的聯繫而形成的各種生物之間的鏈索稱為食物鏈。其中一種為捕食性食物鏈，生物間以捕食的關係而構成的食物聯繫，由較小的生物開始逐漸到較大的生物，後者捕食前者。如：藻類(algae)→甲殼類(water flea)→鱖(fathead minnow)→青鱸^[50]。由此可大致了解藻類是屬於最低階層的生物，水蚤及魚類皆在其上，因此利用藻類當作試驗物種即可了解此類化合物對於較高等生物會造成如何的影響；但不同物種會因為生物之間的不同機制，例如酵素傳遞、水解作用等，對於化合物容忍度也會有所不同，因此這種替代物種的方法不見得能成立。

Fig5.4.2 及 Fig5.4.3 表示本研究室之 BOD 瓶藻類毒性試驗分別與 Fathead minnow 及 Water flea 迴歸後的結果，與魚類的 R^2 達 0.91~0.93，與水蚤類也有 0.89~0.92 的相關性，顯示在這兩種物種間有高度相關性。了解在這種酯類結構之下，我們可利用藻類來預估較高營養階層的水蚤及魚類的急毒性。

環境毒理學發展至今日，已有許多的毒性試驗標準檢測方法，但這些使用標準物種進行實驗的缺點，主要在於難以準確地預測其他地區不存在的物種毒性影響，因此標準檢測方法將受限於地區的代表物種。由此可知，若我們能進一步對於台灣地區本有的物種進行急毒性試驗，發現與本實驗室之結果同樣有高度相關性，我們也就可以利用標準試驗方法，藉由

這種替代物種的方式來預估化學物質對於本地區會造成多少的影響，如此一來對於環境影響評估的準確度將會提升。



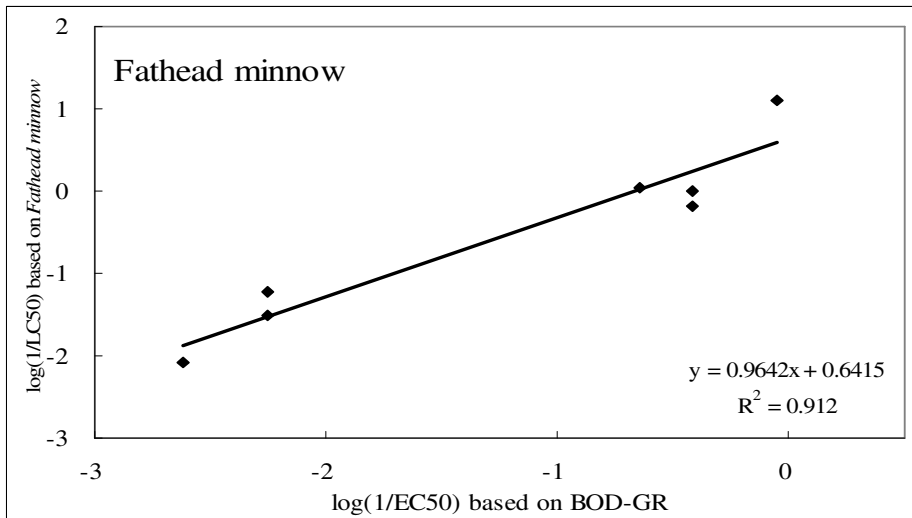
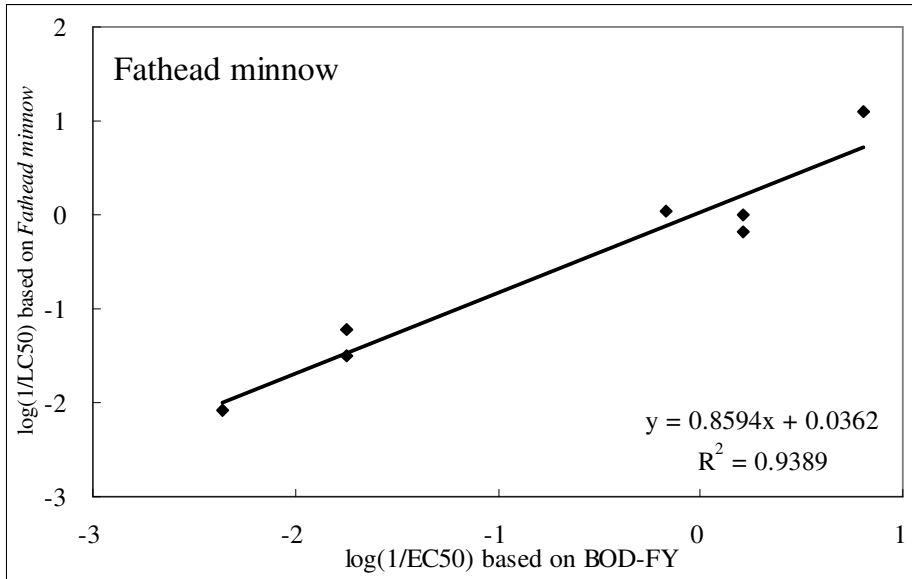
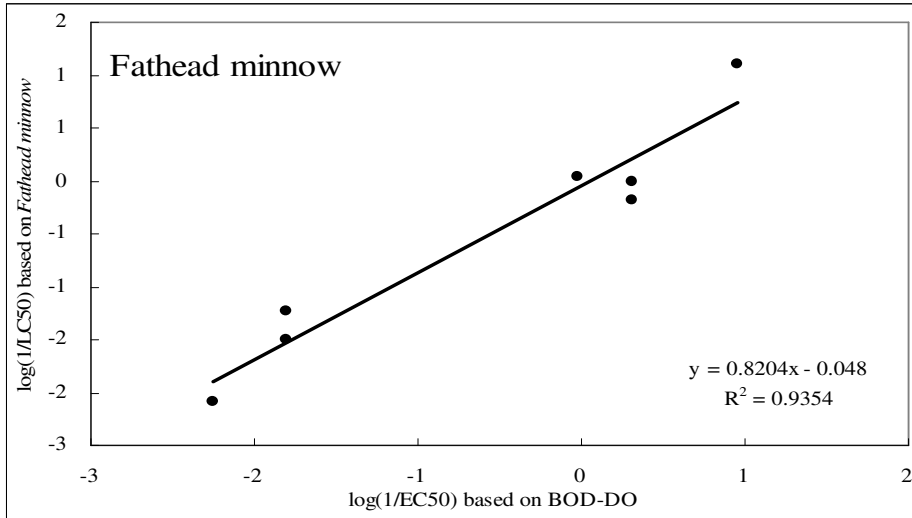


Fig 5.4.2 Relationship between BOD-test and *Fathead minnow* data
Unit: mmol/L

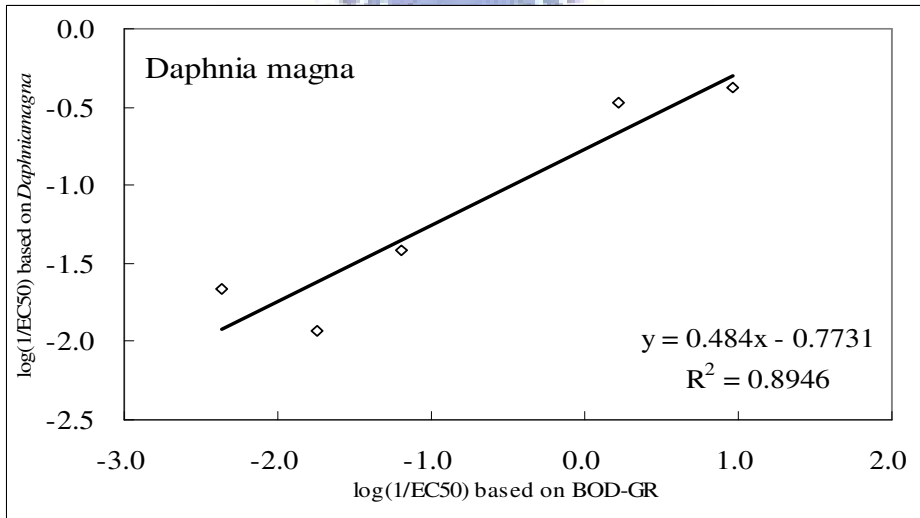
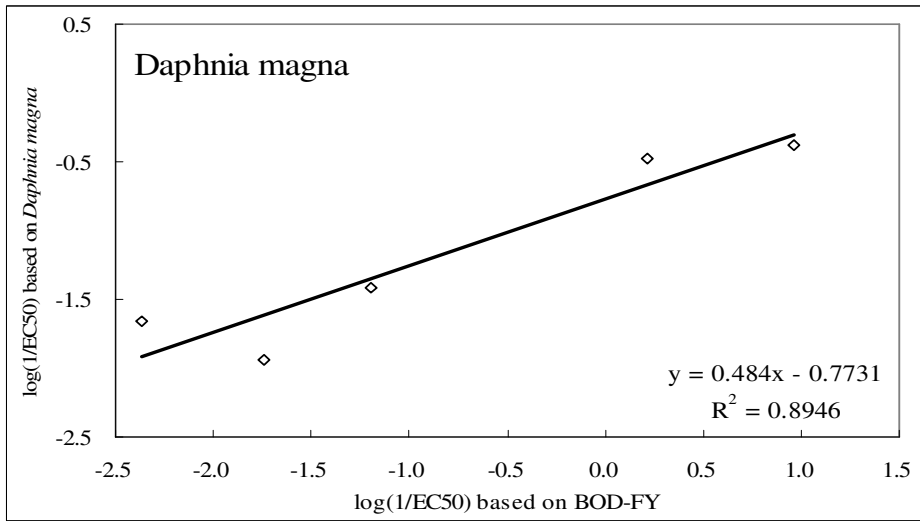
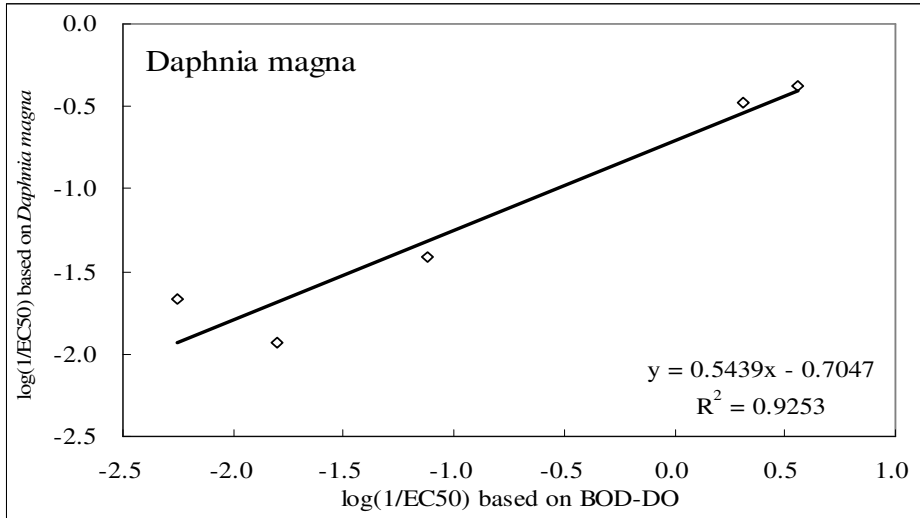


Fig 5.4.3 Relationship between BOD-test and *Water flea* data
 Unit: mmol/L

5.5 定量結構與活性關係(QSAR)

5.5.1 利用 QSAR 預估急毒性

QSAR 是利用將化學物質之物理及化學特性量化，與化學物質對於生物體活性的一個相關性；依據不同化學物質之毒性作用機制，可大致分為麻醉性及反應性，在預估不同作用機制所使用的參數也會有所不同，例如在非極性麻醉機制之下通常是利用疏水性參數，最常見的是辛醇與水分配係數(log P 值)。雖然不能明確了解非極性麻醉機制的的作用方式，但一般認為是化學物質以被動滲透的方式累積在細胞膜而造成毒性，因此可利用「辛醇」模擬細胞膜，藉以了解化學物質與細胞膜之親和力^[51]；故一般非極性麻醉性機制即可單純利用此參數來描述化學物質之急毒性。

由於在過去學者^{[51][28]}認為此類化合物之毒性作用機制會依據不同物種之水解能力而改變，受到測試物種之水解能力、水解程度、水解後產物等的影響，因此在這一節希望了解利用藻類當作測試物種是否會受到水解能力影響，及鄰苯二甲酸酯類之毒性作用機制。

Table 5.5.1 是將化合物之 EC50 值倒數後取 log 值，及各化合物之 log P 值，首先假設 20 個化合物皆為非極性麻醉性物質，因此利用所有化合物與其 log P 值下去進行迴歸發現結果如下：

$$\log(1/EC50) = 0.399\log P + 0.676 \quad n=20, R^2=0.403, \text{based on DO. (1)}$$

$$\log(1/EC50) = 0.440\log P + 0.475 \quad n=20, R^2=0.464, \text{based on FY. (2)}$$

$$\log(1/EC50) = 0.363\log P + 0.201 \quad n=20, R^2=0.391, \text{based on GR. (3)}$$

由相關係數 R^2 可發現此迴歸效果很差，過去文獻指出一個高品質的 QSAR 應該是以同樣作用機制之化合物去建構，因此在這邊首先將類似結構物但接了胺基(-NH₂)及硝基(-NO₂)的對苯及間苯二甲酸(DMNtP、DMAtP、DMNiP、DMAiP)去除，得到以下結果：

$$\log(1/EC50) = 0.621\log P - 0.391 \quad n=16, R^2=0.693, \text{based on DO. (4)}$$

$$\log(1/EC50) = 0.662\log P - 0.593 \quad n=16, R^2=0.745, \text{based on FY. (5)}$$

$$\log(1/EC50) = 0.562\log P - 0.762 \quad n=16, R^2=0.665, \text{based on GR. (6)}$$

由 R^2 值發現去除了接了胺基及硝基的化合物有提高，文獻中指出接了胺基或硝基的苯環(aniline and nitrobenzene)是屬於 polar 或是 reactive 的作用機制^[52]，因此我們在這邊也同樣可以假設若 aniline 或 nitrobenzene 接了兩個甲酸甲酯同樣會有較高的毒性產生，且很有可能是屬於 polar 機制的。

但這樣的 R^2 值還是不是一個很高的結果，因此就利用(4)(5)(6)預測值與實際值之殘差(>1)來判斷 outlier，發現 DO 及 FY 當中，有兩個>1 的殘差出現，分別是 B2EHP 及 DPHP，而 GR 當中只有 B2EHP 是>1 的，因此分別將這幾點去除之後，得到以下結果：

$$\log(1/EC50) = 0.758\log P - 0.863 \quad n=14, R^2=0.922, \text{based on DO. (7)}$$

$$\log(1/EC50) = 0.780\log P - 0.998 \quad n=14, R^2=0.903, \text{based on FY. (8)}$$

$$\log(1/EC50) = 0.723\log P - 1.23 \quad n=15, R^2=0.884, \text{based on GR. (9)}$$

Eq(7)(8)(9)當中 R^2 比前兩步建立的結果高出許多，在這邊認為 B2EHP 之 $\log P$ 值為 6.5，文獻中指出若 $\log P$ 值大於 5.5 時，在試驗期間會因為水溶解度過低、分子過大無法進入生物體或是在試驗期間內無法達到平衡以至於毒性無法顯示^[53]，雖然 DHP、DAMP 這個兩個化合物之 $\log P$ 值也 >5.5，但結構上 B2EHP 接了一個丁基及一個乙基己基，而 DHP 及 DAMP 是分別各接了兩個己基及兩個戊基，在這邊認為 B2EHP 會是 outlier 的原因應是結構上的乙基己基分子過大，因此無法順利進入生物體造成毒性，顯示的毒性也就較低；而 DPHP 的結構是接了兩個酚，雖然藻類的水解作用能力很低，但酚是屬於 polar 作用機制，若是有些微的水解作用產生了酚可能造成毒性作用改變，造成毒性較高。

再經由檢查殘差值發現 Eq(7)(8)(9)沒有>1 的情形產生，因此在這邊可利用 $\log P$ 來描述此類化合物之毒性。Fig5.5.1 為三個不同參數去除 outlier 後進行迴歸之結果，另外也將 outlier 點在圖上表示之。

在這邊希望能更深入了解鄰苯二甲酸酯類的毒性關係，在之後的分析會將兩個對苯二甲酸酯類(DEtP 及 DAtp)去除作討論；首先利用剩下來的

鄰苯二甲酸酯類建立 QSAR 結果如下(同樣去除 DPHP 及 B2EHP)：

$$\log(1/EC_{50}) = 0.777\log P - 1.03 \quad n=12, R^2=0.958, \text{based on DO. (10)}$$

$$\log(1/EC_{50}) = 0.808\log P - 1.20 \quad n=12, R^2=0.946, \text{based on FY. (11)}$$

$$\log(1/EC_{50}) = 0.743\log P - 1.37 \quad n=13, R^2=0.905, \text{based on GR. (12)}$$

結果顯示是較(7)(8)(9)有更好的 R^2 關係，而鄰苯二甲酸酯類當中有三個化合物其中是接有氧基(-O-)的，若用 $\log P$ 也是可以成功的描述毒性，但發現接有氧基的若與差不多 $\log P$ 值的未接氧基之化合物比較起來，分子量是較大的，且 $\log P$ 值是比未接氧基的低，因此以下希望了解分子量對於此類化合物的毒性影響是如何，由 Fig5.5.2 可發現利用分子量迴歸結果會明顯將未接氧基及接了氧基分成兩個部分，且接了氧基的是在未接氧基的下方，表示未接氧基的分子量雖然較大，但是毒性卻較低，因此認為若單純用 $\log P$ 或分子量當作參數可能沒辦法完整的描述此類化合物之毒性，在這邊就將 $\log P$ 乘以分子量當作參數進行迴歸，得到以下結果：

$$\log(1/EC_{50}) = 0.002\log P * MW - 0.516 \quad n=12, R^2=0.965, \text{based on DO. (13)}$$

$$\log(1/EC_{50}) = 0.002\log P * MW - 0.665 \quad n=12, R^2=0.952, \text{based on FY. (14)}$$

$$\log(1/EC_{50}) = 0.002\log P * MW - 0.921 \quad n=13, R^2=0.941, \text{based on GR. (15)}$$

因為毒性機制是很複雜的， $\log P$ 值代表的只是化學物質溶在辛醇及水之間的分配係數，也就是進入生物細胞膜的能力，但化學物質進入細胞膜的機制可能還包含了其他層面的影響(分子大小、取代基等)，所以單單用 $\log P$ 可能會造成些許的誤差，在這邊利用這個參數就能更廣面的描述化學物質進入細胞膜造成毒性的能力。

5.5.2 利用基線毒性預測毒性

過去文獻曾指出，利用基線毒性預測毒性的結果與實際觀測毒性之差若介於 log 單位±1 之間則代表此化合物同樣為非極性麻醉毒性機制^[54]。本研究室利用一系列非極性麻醉毒性之化合物與 log P 值迴歸後分別得到反應終點△DO 與 Growth rate 之基線毒性(baseline toxicity)^[55]：

$$\log (1/ EC_{50,DO}) = 0.978 \log P - 1.83. \quad (16)$$

$$n = 26, r^2 = 0.94, Q^2=0.932, S=0.332, F=380.2$$

$$\log (1/EC_{50,growth\ rate}) = 0.974 \log P - 1.95 \quad (17)$$

$$n = 26, r^2 = 0.943, Q^2=0.933, S=0.325, F=393.5$$

在本節就希望利用此基線毒性預測鄰苯、對苯、間苯二甲酸酯類之毒性，進而判斷毒性作用機制。

Table 5.5.2 就是利用基線毒性預測結果與實際毒性之殘差，發現其中 B2EHP 毒性比基線毒性預測低，一般而言基線毒性代表的就是最低的毒性，若是毒性比基線毒性更低的情形，會因為水溶解度、無生命的散失或因離子化造成毒性過低^[53]，在這邊認為 B2EHP 毒性較基線毒性預測低是因為水溶解度過低造成的。而以 DO 參數來看 DPHP、DMNtP、DMAtP、DMAiP 毒性都比預測毒性高，最高的 DMAiP 甚至大了 3 個單位的 log P 值，文獻中指出若超過 3~4 個 log 單位，則代表此化合物作用機制可能是屬於反應性機制；DMNtP、DMAtP 因為接了胺基及硝基，因此具有較強氫鍵結酸的能力，屬於 polar 的作用機制，毒性較高。

將化合物毒性與 log P 迴歸結果與 baseline toxicity 做個比較，如 Fig 5.5.2 顯示，圖上同樣標示超過或是低於 baseline 的點，相差在±1log 單位以黑色實心圈表示之，發現整體趨勢與 baseline 很接近，藉由這樣的結果就判定此類化合物是屬於非極性麻醉毒性機制。

Table 5.5.1 $\log(1/EC_{50})$ value in three endpoints and $\log P$ 、molecular weight

	DO	FY	GR	$\log P$	MW	$\log P \cdot MW$
	$\log(1/EC_{50})$	$\log(1/EC_{50})$	$\log(1/EC_{50})$			
DMP	0.037	-0.075	-0.331	1.66	194.19	322.36
DEP	0.548	0.603	0.093	2.65	222.24	588.94
DAP	1.275	1.193	0.656	3.36	246.27	827.47
DPP	1.578	1.514	1.229	3.63	250.30	908.59
DPHP	3.461	3.250	2.450	4.10	318.33	1305.15
DiBP	2.422	2.279	1.796	4.46	278.35	1241.44
DBP	2.806	2.660	2.030	4.61	278.35	1283.19
BBP	3.051	3.461	2.665	4.84	312.37	1511.87
DAmP	3.319	3.071	2.412	5.59	306.41	1712.83
DHP	3.956	3.901	3.323	6.57	334.46	2197.40
BMOEP	-0.087	-0.171	-0.404	1.11	282.30	313.35
BEOEP	1.031	0.587	0.234	2.10	310.35	651.74
BBOEP	2.327	2.405	2.101	4.06	336.46	1366.03
B2EHP	1.973	2.276	1.164	6.50	334.46	2173.99
DEtP	1.678	1.592	1.039	2.65	222.24	588.94
DAtP	2.222	2.305	1.655	3.36	246.27	827.47
DMNtP	1.784	1.586	1.142	1.48	239.19	354.00
DMAtP	2.037	1.885	1.524	2.10	209.20	439.32
DMNiP	2.168	2.040	1.581	1.48	239.19	354.00
DMAiP	2.708	2.617	2.002	1.14	209.20	238.49

$\log(1/EC_{50})$: mmol/L

Table 5.5.2 Used baseline toxicity predicted toxicity and residual between observed.

	logP	DO			GR		
		$\log(1/EC50)_{\text{observed}}$	$\log(1/EC50)_{\text{predict}}$	Residual	$\log(1/EC50)_{\text{observed}}$	$\log(1/EC50)_{\text{predict}}$	Residual
DMP	1.660	0.186	-0.207	0.393	-0.200	-0.333	0.133
DEP	2.650	0.548	0.762	-0.214	0.093	0.631	-0.538
DAP	3.360	1.275	1.456	-0.181	0.655	1.323	-0.667
DPP	3.630	1.578	1.720	-0.142	1.229	1.586	-0.357
DiBP	4.460	2.422	2.532	-0.110	1.796	2.394	-0.598
DBP	4.610	2.757	2.679	0.078	2.030	2.540	-0.510
BBP	4.840	3.051	2.904	0.147	2.665	2.764	-0.099
DAmP	5.590	3.291	3.637	-0.346	2.412	3.495	-1.083
DHP	6.570	3.913	4.595	-0.683	3.327	4.449	-1.123
BMOEP	1.110	-0.087	-0.744	0.658	-0.404	-0.869	0.465
BEOEP	2.100	1.031	0.224	0.808	0.234	0.095	0.139
BBOEP	4.060	2.327	2.141	0.186	2.101	2.004	0.097
DEtP	2.650	1.678	0.762	0.916	1.039	0.631	0.408
DAtP	3.360	2.222	1.456	0.766	1.655	1.323	0.333
DPHP	4.100	3.461	2.180	1.281	2.450	2.043	0.406
B2EHP	6.500	1.973	4.527	-2.554	1.164	4.381	-3.217
DMNtP	1.480	1.782	-0.383	2.165	1.142	-0.508	1.651
DMAtP	2.100	2.039	0.224	1.815	1.527	0.095	1.431
DMNiP	1.480	2.168	-0.383	2.551	1.581	-0.508	2.090
DMAiP	1.140	2.708	-0.715	3.423	2.010	-0.840	2.850

Residual = $\log(1/EC50)_{\text{Observed}} - \log(1/EC50)_{\text{Predicted}}$

unit : mmol/L

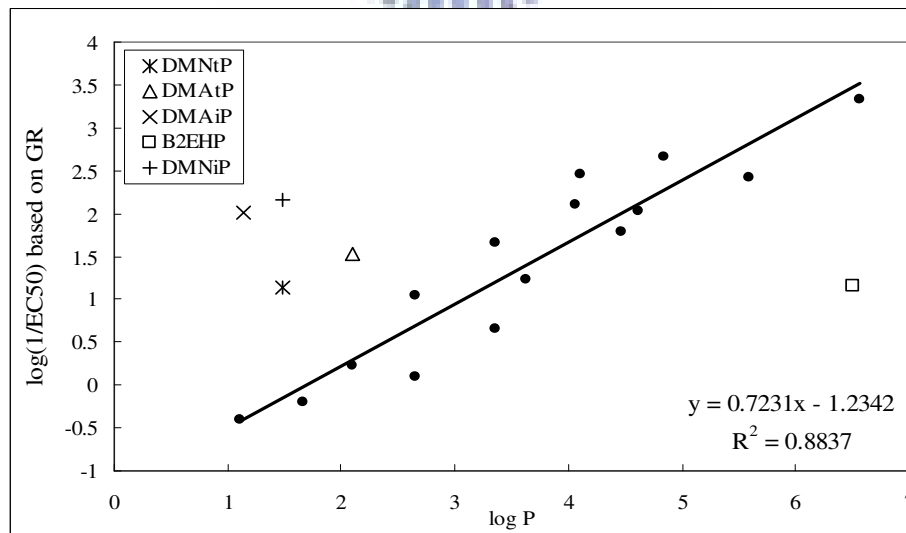
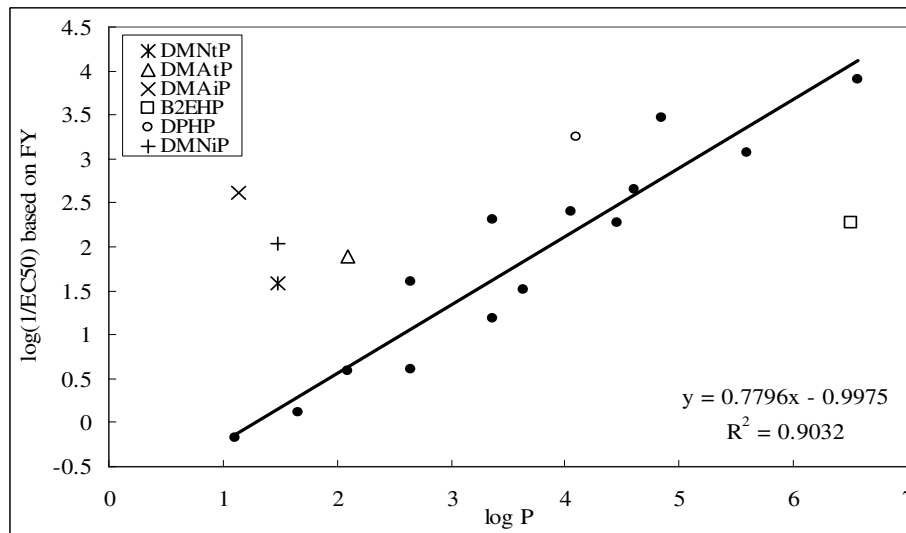
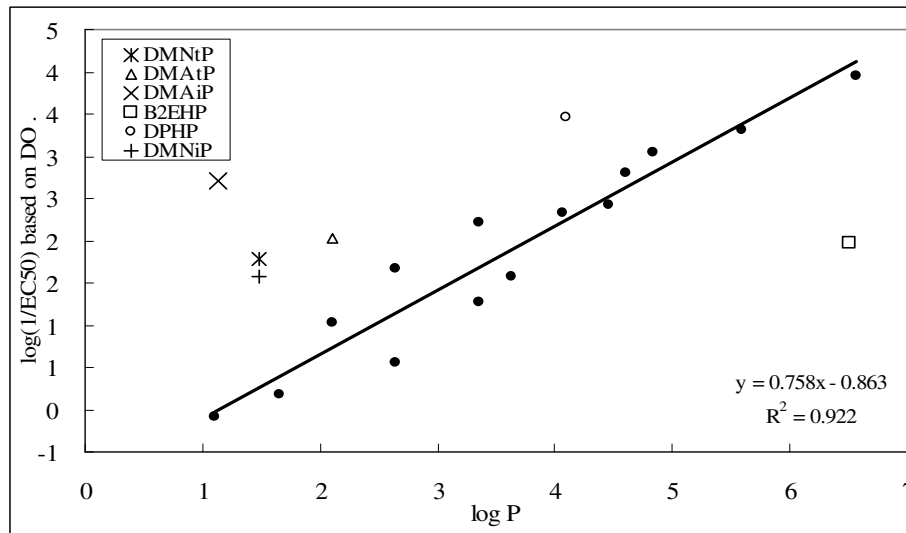


Fig 5.5.1 Correlation between $\log(1/EC_{50})$ and $\log P$

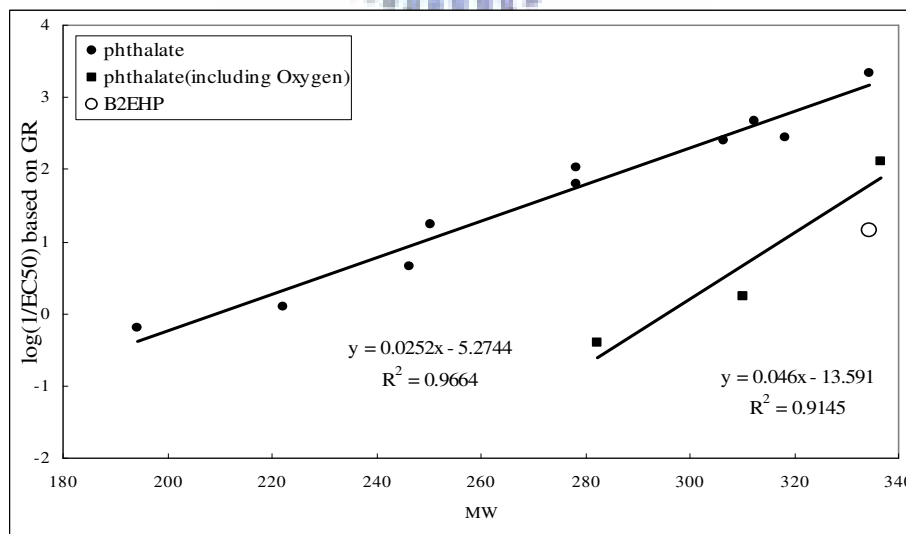
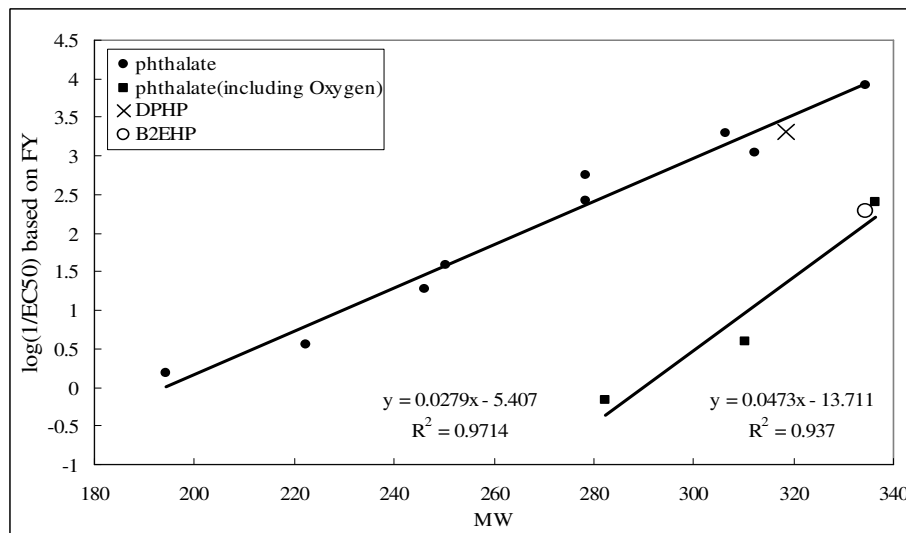
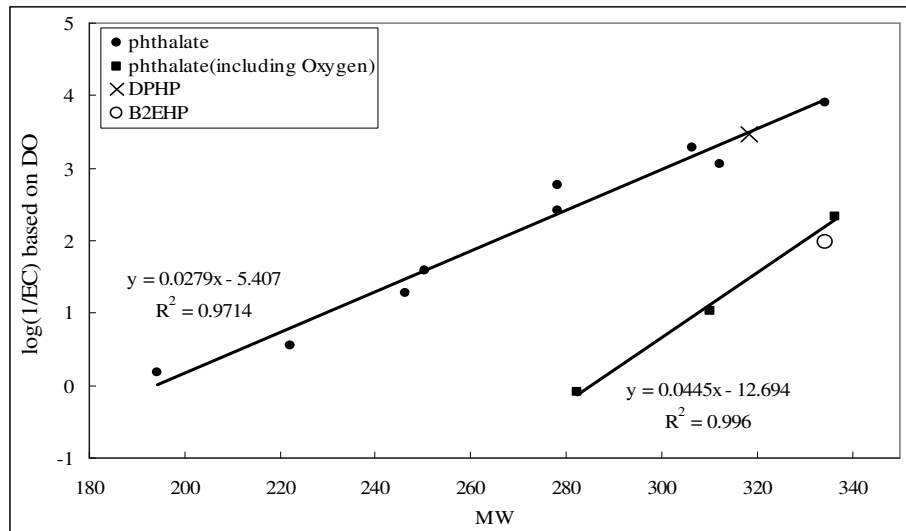


Fig 5.5.2 Correlation between $\log(1/EC_{50})$ and Molecular weight

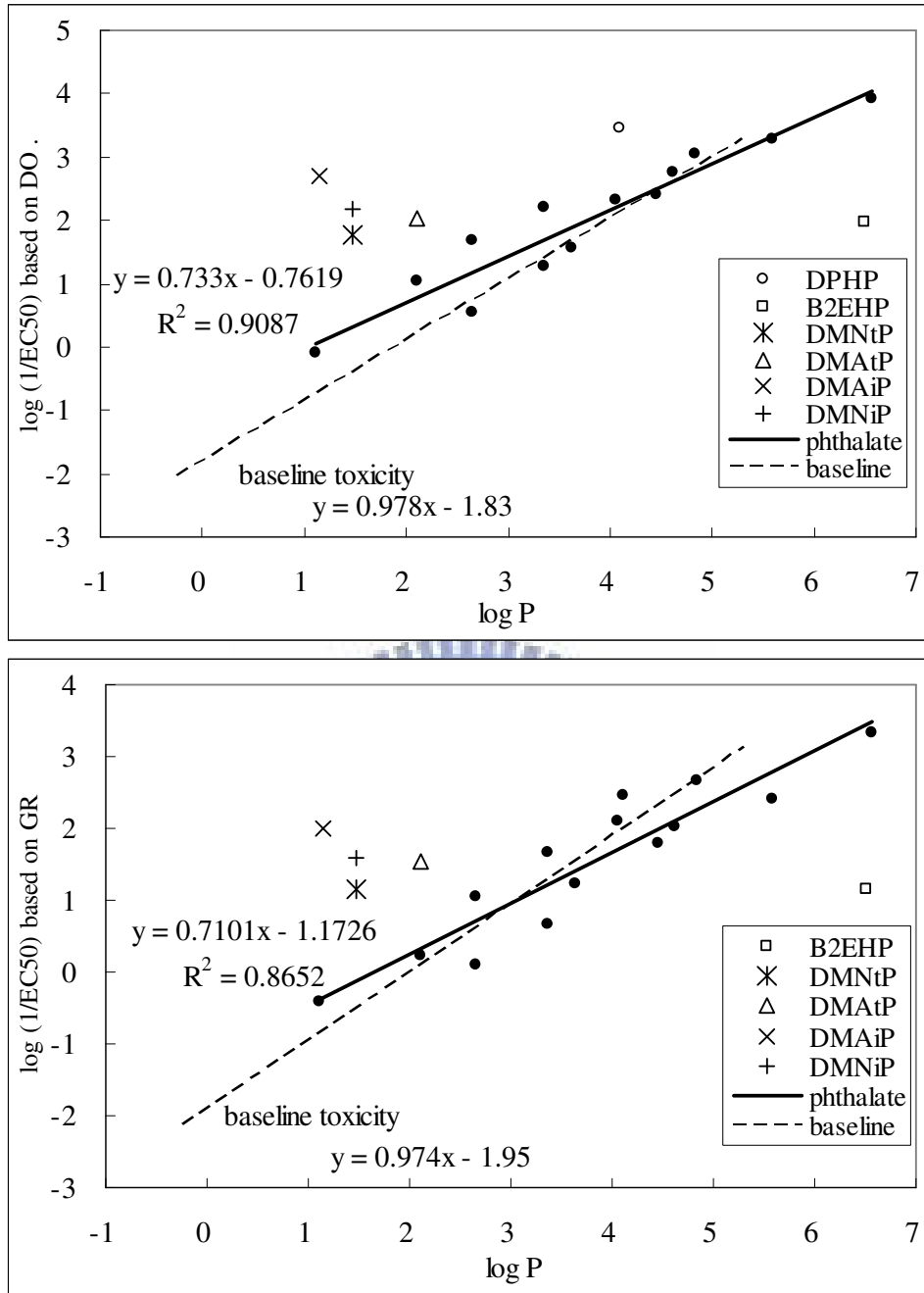


Fig 5.5.2 Correlation between Baseline and phthalate ester toxicity based on DO and Growth rate