

報告單位：五組（林哲雄）

報告事項：「混合物毒性評估模式與觀念架構」期刊論文 2  
則

說 明：

### 一、化學混合物的預測性環境風險評估：一個觀念架構<sup><1></sup>

化學物的環境風險仍經常評估物質對物質而忽視了混合物效應，這可能導致風險過低評估，典型的暴露是朝向多組成化學“雞尾酒式”(cocktails)混合物。在此使用了兩個建立完成混合物毒性概念：濃度加成(Concentration Addition, CA)和獨立行為(Independent Action, IA)，提供混合物環境危害與風險評估的分層綱要，著眼於一般工業化學物質和推測，數據庫(藻類、甲殼類、魚類的 EC50s)資料是可以利用的；藉由濃度添加方式，較少發現混合物毒性高於預測值。不管混合物組成其作用的方法/機制，建議採用濃度添加方式作為警戒第一層級。特別是證實計算預測環境濃度/預測無效濃度(Predicted Environmental Concentration/ Predicted No Effect Concentration, PEC/PNEC) 比值可以提供當作合理的濃度添加近似值。對於一個暴露生態系統假設只有數據庫資料利用下，為了估計在第一層級評估中是否有潛在風險，這使得善用現有的單一物質評估，要求更嚴格的混合物調查，除非有環境風險的初步跡象。最後，建議以行動模式來驅動分析，除非錯誤估計指示濃度添加和獨立行為為基礎的評估之間有重大分歧的可能性。

### 前言介紹

許多人造化學物質同時使用於任何特定的地區，大部分這些物質和/或降解產物最終排放到環境中。例如，在美國 139 監測溪流中有三分之一包含廣泛化學類之 10 個或更多種不同的化學物質，如合成激

素、其他藥品、工業化學品、農藥殺蟲劑、抗生素和阻燃劑。儘管這些環境中的化學混合物屢見不鮮，甚至現代的法例如歐盟新化學品政策(REACH)幾乎完全集中在個別化學物質的評估，最近已經把它作為一個主要的缺失，需要由歐洲環境部長理事會(Council of the European Environmental Ministers)關切。化學混合物可以藉由生物測試從暴露生態系統（污泥，土壤，沉積物，水）不同樣品中通過評估，但這種做法對現有的污染情況進行回顧性分析顯然是有限的。模型建立方法所需要之期望用途是對個別化合物其可以利用生態毒理學資訊的使用，如混合物對暴露生態系統的影響預測、估計影響環境品質標準的比較。PNEC 是藉由最敏感生物測試（代表最敏感的營養階層）和運用適當的評估因子（Assessment Factor，AF）、實驗室內和實驗室間數據的變異、生物變異，短期至長期外推法和實驗室領域的推斷。然而，對於大多數化合物 REACH 要求只有三個生態毒理學數據資料，這是不足以估計物種敏感度分佈（Species Sensitivity Distributions，SSDs）或更精細的建立模型方法。因此，本文的目的是介紹、合理化和討論對一般在監管範圍內化學混合物環境風險評估預測的層次性。

### **(一) 基本的混合物毒性概念**

濃度加成(Concentration Addition，CA)和獨立行為(Independent Action，IA)是兩個經典的概念，提供計算預期混合物毒性，根據個別成份的毒性和它們在混合物濃度。這兩個概念只適用定義良好的混合物。這些概念已在許多科學文獻中以不同的名稱介紹。CA 最初公式制定是由 1926 年的德國藥理學家 Loewe 發表出版。對於有 n 個組成物的混合物，這一概念可以數學表示為公式(1)：

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i^*}{ECx_i} = 1 \quad (1)$$

其中  $c_i^*$  是有  $n$  個組成之混合物其第  $i$  個組成物的濃度（或劑量），它引起  $x\%$  的總效應， $ECx_i$  表示該物質的濃度，如果單獨應用時它引起  $x\%$  的效應。每一個分數  $c_i/ECx_i$  也被稱為“毒性單位”，是混合物中一個相對優勢化合物的濃度。假如混合物濃度毒性單位的總和等於 1，它引起  $X\%$  的效應，混合物的行為根據 CA。在這種情況下，任何混合物的組成物可以藉由另一種化學物質交換而不改變整體的混合物毒性，只要有關毒性單位的大小是恆定的。這種互換能力普遍認為導致化合物結合到相同的受體，也就是說，有一個類似行為機制的物質，既不在理化等級上也不在它們的毒物動力學和毒效動力學上相互作用。

IA 的選擇概念亦假定所有混合物之組成物影響相同的終點。但與 CA 相比較，IA 假設混合物的組成物作用在暴露生物體不同的子系統（組織，細胞，分子受體）和觀察相互獨立下受損子系統影響終點。IA 與 CA 假設混合物之組成物之間沒有相互作用，也就是說，它們不影響彼此的吸收，分佈或代謝。預期的混合效應可以根據統計 IA 的聯合概率計算如公式(2a)：

$$E(c_{\text{mix}}) = E(c_1 + \dots + c_n) = \prod_{i=1}^n E(c_i) \quad (2a)$$

如果反應參數值（生物終點）隨濃度的增加（例如，當存活率被記錄）而減少，或當反應參數值（如死亡率）隨著濃度增加而增加，計算如公式(2b)：

$$E(c_{\text{mix}}) = E(c_1 + \dots + c_n) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)] \quad (2b)$$

$E(c_{\text{mix}})$  是 IA 期望的混合物總體效應（等級範圍 0-1）包括在全部濃度  $c_{\text{mix}}$  的  $n$  個化學物質。 $E(c_i)$  是化學物質  $i$  的作用，如果單獨在濃度  $c_i$  對應到該混合物中的組成物濃度。混合物中個別化合物的 IA 通常被解釋為化合物具有不同的行為機制，計算 IA 預期的混合物效應對於典型生態毒理學終點，它構成數據基本設定（如死亡率，生長，繁殖）。此外，獨立行為預期的混合物效應  $E(c_{\text{mix}})$  總是高於混合物中的每個個別組成物效應  $E(c_i)$ ，這意味著化合物的數量增加則效應越來越低，為了預測一個可靠的混合物效應，對於每一組成物必須被描述。由 Posthuma 和他的同事提出，允許使用標準的  $EC_{50}$  和/或  $NOEC$  值計算 IA 預期的 SSDs，對於每個混合物之組成有足夠的類群數量推測數據。

## (二) 濃度加成 (CA) 和獨立行為 (IA) 在生態毒理學評估績效的實證分析

濃度加成 (CA) 和獨立行為 (IA) 都沒有對暴露生物體的生物學作出任何假設。歐洲化學毒理及生態毒物學中心 (ECETOC) 在 2001 年對水生生物化學混合物的毒性提出報告。CA 和 IA 在生態毒理學方面的表現方面與現有的證據可簡要歸納如下：

1. 大部分已經發表的實驗研究探討 CA 的適用性，只有小部分適用 IA 或甚至比較調查混合物兩個概念預測能力。
2. CA 和 IA 的執行已經在這些情況下被比較評估，CA 通常預測略高於混合物毒性或 CA 和 IA 預測幾乎相等混合物毒性。
3. 大多數研究進行選定淡水生物物種。在海洋和陸地生態系統的混合物研究仍然很少，這些研究生態等級較高，生物層級複雜。

4. 大多數研究調查含有 2-3 個組成物的混合物。多組成混合物的實驗研究主要受限於特殊設計即所謂的“參考混合物”，混合物其組成和濃度比並無法反映任何真實的環境狀況，但它是專門設計針對混合物毒性問題概念的探索。
5. CA 通常提供了良好的混合物毒性預測。Belden 和同事在他們的評論中得出結論，認為農藥混合物藉由 CA 預測有 88% 落在觀察的 2 個因素內，即混合物成分作用機制相似或相異的獨立，這藉由 Cedergreen 和她的同事觀察得到證實，他們還觀察到從 CA（超過 2 因素在預測和觀察之間）調查的 158 數據中只有 6% 有較大的偏差。
6. 對於 CA 和 IA 預測不同的毒性情況，其作用分子機制的相似或相異性，對於選擇最合適的概念是有效的標準。

### **(三)、分層方法 1 的元素：整合化學混合物基本毒性數據集評估風險商數(Risk Quotients, RQs)**

對於混合物“生態系統的風險商數”計算（預期暴露和混合物風險之間的比率），這是基於一個單一物質從不同的營養等級（類群）的生態毒性數據集，涉及兩個外推步驟：(a) 實驗毒性數據的外推法，係針對測試物種在整個生態區域某些暴露期間無限的暴露後，這個步驟執行係針對單一物質藉由使用 AF 計算 PNEC；(b) 從單一物質到化學混合物，可以 CA 和/或 IA（圖 1）應用取得推斷。

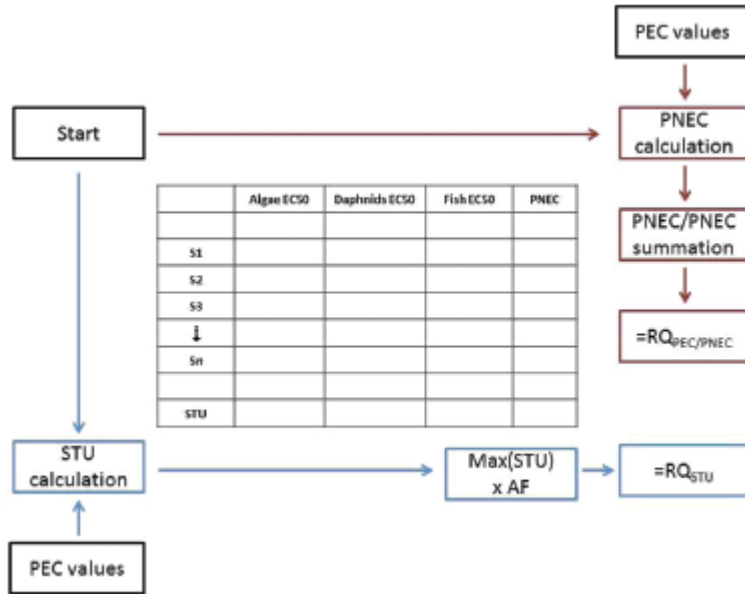


圖 1. 計算混合物風險商數的 2 個方法，藍色框為  $RQ_{STU}$  計算，紅色框為  $RQ_{PEC/PNEC}$  計算。毒性單位(toxic unit=TU，PEC/EC<sub>50</sub>)，毒性單位的總和(sum of toxic units=STU)

早在 1992 年 Calamari 和 Vighi 建議使用基礎生態毒理學數據集為發展水質標準的做法，在隨後的出版物中也再被提到。在所建議的方法中首先計算個別化合物的 PNECs，第二步，然後藉由計算 PEC/ PNEC 比率（即個別物質的風險商數）推斷從單一的物質到混合物，以產生最終的混合物風險商數  $RQ_{PEC/PNEC}$ ，如公式(3)：

$$\begin{aligned}
 RQ_{PEC/PNEC} &= \sum_{i=1}^n \frac{PEC_i}{PNEC_i} \\
 &= \sum_{i=1}^n \frac{PEC_i}{\min(EC50_{algae}, EC50_{daphnids}, EC50_{fish})_i \times (1/AF_i)} \quad (3)
 \end{aligned}$$

根據這一辦法如果  $RQ_{PEC/PNEC}$  大於 1 則環境品質標準將超過。然而，雖然 PEC/ PNEC 比率的總和可能密切類似 CA 方程式，但它與 CA 的概念不同乃因為涉及 PNECs 可能會根據不同物種（群）。這意味著，最終的風險商數可能導致總結不同物種的毒性評估。這當然違反

了 CA 的基本假設，即所有個別的毒性數據是指相同的生物終點和生物體。因此，最近有人認為 PEC/PNECs 總和不應該被用於混合物的毒性評估。此外，混合物中組成物的 PNECs 可以藉由使用不同的個別評估因子(AF<sub>i</sub>)得出，這將使所產生的總和很難直接解釋。

為了遵循 CA 的概念基礎，兩個外推步驟的順序必須先反轉：首先毒性單位的總和 (STU) 是針對每個營養階層/生物體群 (從單一化學物質到混合物的推斷) 計算。其次，STU 可以被視為在第二個步驟，就好像是對一個別化學物評估 (圖 1)。因此生物體群對於混合物的選擇最敏感 (即計算最高毒性單位)，藉由運用相應的評估因子的混合物風險商數然後計算 (後來被稱為 RQ<sub>STU</sub>) 如公式(4)：

$$\begin{aligned}
 RQ_{STU} &= \max(STU_{\text{algae}}, STU_{\text{daphnid}}, STU_{\text{fish}}) \times AF \\
 &= \max \left( \sum_{i=1}^n \frac{PEC_i}{EC50_{i,\text{algae}}}, \sum_{i=1}^n \frac{PEC_i}{EC50_{i,\text{daphnids}}}, \right. \\
 &\quad \left. \sum_{i=1}^n \frac{PEC_i}{EC50_{i,\text{fish}}} \right) \times AF \quad (4)
 \end{aligned}$$

AF 描述一個共同的評估因子，用於從短期的實驗室研究到慢性暴露領域情況下推斷。如果僅有基礎數據集，AF 在 REACH 法規下湖沼水生環境等於 1000。表 1 顯示比較一個簡單的兩種化合物混合物苯和 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 兩種方法評估。苯對魚具有高的毒性，而水蚤只有中等毒性，相比之下，重鉻酸鉀是顯著對水蚤有毒性。

計算結果顯示 RQ<sub>PEC/PNEC</sub> (0.43) 高於 RQ<sub>STU</sub> (0.24)，這反映了兩者之間風險商數的基本關係。可以證明 RQ<sub>PEC/PNEC</sub> 將始終高於 RQ<sub>STU</sub>，而 RQ<sub>PEC/PNEC</sub> 對 RQ<sub>STU</sub> 比率將始終等於或小於生物體組群數量 (營養階層，營養階層是指處於食物鏈某環節上所有生物的總和)。

Table 1. Example of the Relationship Between  $RQ_{STU}$  and  $RQ_{PEC/PNEC}$  Using a Simple 2-Compound Mixture of Benzene and  $K_2Cr_2O_7$ <sup>a</sup>

	benzene	$K_2Cr_2O_7$
EC50 (algae)	3202 $\mu\text{mol/L}$	24.44 $\mu\text{mol/L}$
EC50 (daphnids, acute)	4117 $\mu\text{mol/L}$	5.22 $\mu\text{mol/L}$
EC50 (fish, acute)	0.85 $\mu\text{mol/L}$	14 560 $\mu\text{mol/L}$
resulting PNEC (AF=1000)	0.85 nmol/L	5.22 nmol/L
PEC	0.2 nmol/L	1 nmol/L
$RQ_{PEC/PNEC}$ (based on sum of PEC/PNECs)	$RQ_{PEC/PNEC} = \frac{PEC_{\text{benzene}}}{PNEC_{\text{benzene}}} + \frac{PEC_{K_2Cr_2O_7}}{PNEC_{K_2Cr_2O_7}} = 0.43$	
$RQ_{STU}$ (based on sum of Toxic Units)		
algae	$STU_{\text{algae}} = \frac{0.2 \text{ nmol/L}}{3202 \mu\text{mol/L}} + \frac{1 \text{ nmol/L}}{24.44 \mu\text{mol/L}} = 0.04 \times 10^{-3}$	
daphnids	$STU_{\text{daphnids}} = \frac{0.2 \text{ nmol/L}}{4117 \mu\text{mol/L}} + \frac{1 \text{ nmol/L}}{5.22 \mu\text{mol/L}} = 0.19 \times 10^{-3}$	
fish	$STU_{\text{fish}} = \frac{0.2 \text{ nmol/L}}{0.85 \mu\text{mol/L}} + \frac{1 \text{ nmol/L}}{14560 \mu\text{mol/L}} = 0.24 \times 10^{-3}$	
final $RQ_{STU}$	$RQ_{STU} = \max(STU_{\text{algae}}, STU_{\text{daphnids}}, STU_{\text{fish}}) \times AF = 0.24$	

<sup>a</sup>Toxicity data were collected from ECETOC's EAT-5 database.<sup>66</sup> Exposure data are arbitrary figures. RQ = risk quotient, STU = sum of toxic units, PNEC = predicted no effect concentration, PEC = predicted environmental concentration (arbitrary values), TU = PEC/EC50, AF = Assessment Factor (1000, according to ref 6).

#### (四)、分層方法 2 的元素：評估只有從 CA 考量結果的錯誤

為使 CA 提供更為謹慎的風險評估和適用於使用標準的生態毒性數據，建議應用這個概念於任何類型混合物，忽略所涉及化合物相似或相異的作用機制。本步驟應該加以補充最大可能的誤差，其可能會導致一個簡化的估算。Junghans 和其同事已經對農藥(殺蟲劑)的混合物提出了一個合適的方法，可以適用於一般的化學混合物。最大可能比在混合物 EC50s 預測間，藉公式(5)概念：

$$\frac{EC50^{IA}}{EC50^{CA}} \leq \frac{\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC50_i}}{\max_{i \in (1...n)} \left( \frac{c_i}{EC50_i} \right)} \quad (5)$$

也就是說 IA 和 CA 預測 EC50s 之間的比率等於或小於所有毒性單位的總和( $c_i/EC50_i$ )除以混合物中組成物最高個別毒性單位 ( $c_i/EC50_i$ )。因此，預測 EC50s 之間的最大可能比發生在混合物中的所有組成物其相等的毒性單位貢獻 ( $c_1/EC50_1 = c_2/EC50_2 = \dots = c_n/EC50_n$ ，所謂“等毒性”的混合物)，在這種情況下最大可能的 n 比率 (混合物組



成物的數量)結果,對於2個化合物的混合物公式(5)給予 $EC50^{IA}$ 和 $EC50^{CA}$ 之間理論上最大比率,這也解釋了為什麼這種混合物的兩個概念經常預測幾乎相同的混合物毒性。如果混合物是由某些化合物毒性單位為主,最大的可能比在 $EC50^{IA}$ 和 $EC50^{CA}$ 間相對減少。

環境現實的混合物可能包含幾十甚至上百個化合物。在這些情況下,根據特殊毒性單位分布和組成物形式的相似性(不相似性)/作用機制,CA可能導致實際混合物風險過度評估;公式(5)允許估計這個最大誤差,可能會導致忽略IA對於特定的混合物和 $EC50^{IA}/EC50^{CA}$ 比。

#### (五) 對預測化學混合物生態毒理學風險評估的分層方法建議

對於預測混合物環境風險評估,建議使用兩個層級方法(圖2),第一層級建議方法使用專有CA作為所關注混合物初步風險評估的基礎。必要的數據輸入對於計算混合物毒性可以得出實驗數據,或從定量結構活性關係(quantitative structure activity relationships, QSAR)估計。這個層級本身包含兩個連續步驟,根據 $RQ_{PEC/PNEC}$ 和 $RQ_{STU}$ 。前者提供了較為保守的做法,往往更容易適用(對混合物組成物假設PNECs在手),但可能會違反一個共同的生物終點推測。因此,如果 $RQ_{PEC/PNEC}$ 大於1,即表示關注的理由潛力, $RQ_{STU}$ 可以被計算在下一個步驟。只要假設潛在風險(當 $RQ_{STU} >$ 閾值)第二層級開始仍有指示,這需要考慮到IA(單獨,或在上述兩個階段的預測形式)。這一層級由於IA的數據需求,往往需要更多的實驗研究。

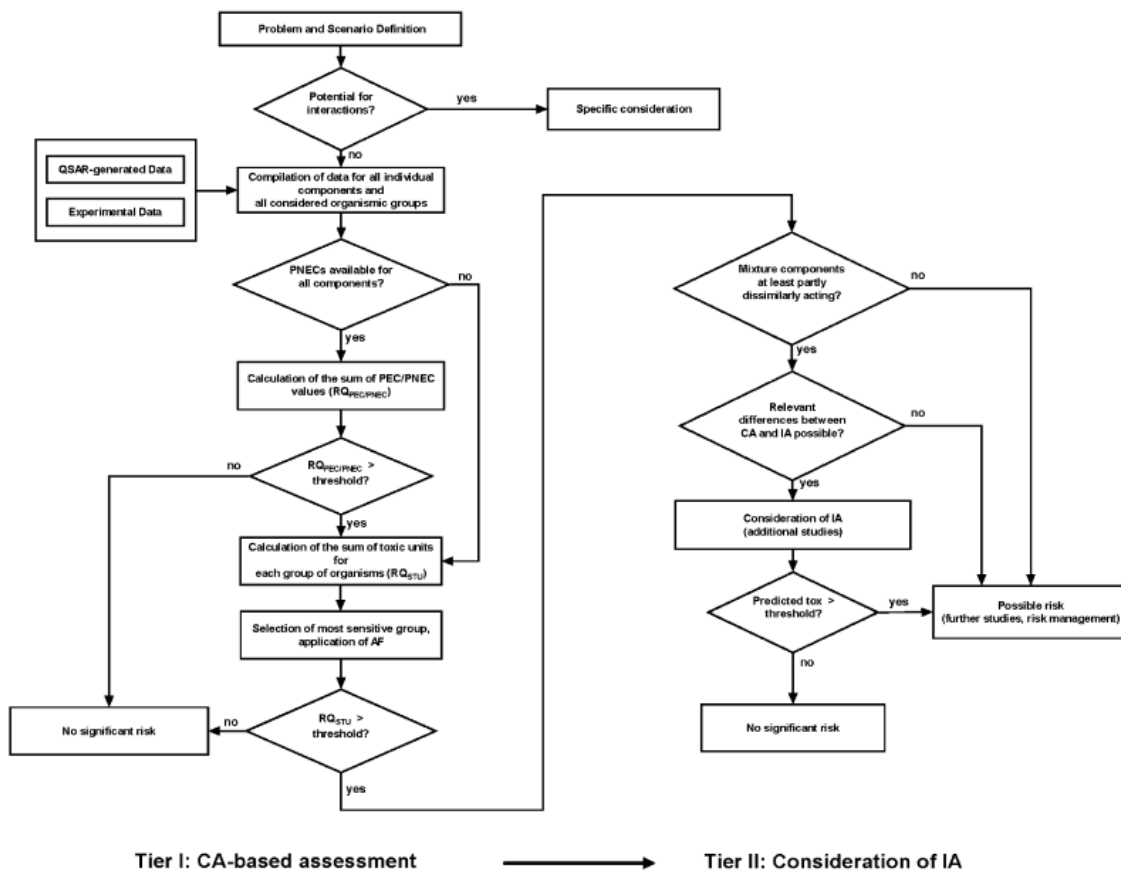


圖 2. 預測化學混合物生態風險評估的架構。

## 二、從毒理基因體學(toxicogenomic)角度看混合物毒性<sup><2></sup>

新基因體科技來臨已經提昇了期望，混合物毒理學的核心問題例如低劑量交互作用機制現在已被解答。本篇回顧是從過去 10 年的實驗研究中提供一個概述，針對化學混合物的聯合效應(combined effect) 使用毒理基因體學科技提出診斷和機制問題，著眼於 2002 年到 2011 年混合物毒性評估的 41 篇已出版論文之研究。目前基因轉錄多重定量已執行，參與的暴露物其代謝體學與蛋白體學分析也已著手進行，對於選擇濃度標準到明確狀態規範，提供了數據轉換和統計處理以減少不必要的變異來源。相較之下，毒理基因體學數據的生物資訊分析，仍然是多樣化領域及快速發展工具；本報告在聯合效應評估中述及毒理學劑量反應和混合物毒性模型的建立，受體基本分析更加先進地朝向建立暴露物和生物反應之間的定量關係；通常轉錄體學反應的討論主要在訊息之有無，解釋常保留含糊不清乃因方法學上的問題，大多數的混合物研究設計是比較紀錄混合物和個別單一組成物反應結果，這種明顯對比使我們對參與生物活性的化學標的交互作用與頂端聯合效應(apical combined effects)層級有更深瞭解。藉由建立混合物作用模型結合毒物動力學(toxicokinetic)與毒效動力學(toxicodynamic)想法，在此提議一個概念上的架構，它可以幫助克服現行混合物作用在主要證據提供上的限制。為了達成目標，建議如下：(1)以設計研究來建立劑量和時間依存反應的定量關係。(2)採用混合物毒性模型。(3)新穎生物資訊工具的利用。(4)壓力反應概念可被產生以利轉譯多重反應，成為生物體一般壓力與專一毒性反應之間關係的假說。

### (一)、前言介紹

生物體經由暴露化學混合物所引起之聯合效應(combined effect)已經成為藥理和毒理科學長期研究的課題，混合物在環境風險評估的主要

進展為預期聯合效應假說，此乃根據各個組成物活性對實際混合效果觀察比較而得，目前有兩種不同藥物相互作用評估模型，LOEWE 相加模型與 BLISS 獨立性準則。毒理基因體學允許在觀測影響環境條件和生物體基因、蛋白質或代謝物級別動力反應之間的相互作用，特別是現代檢測技術在基因轉錄和蛋白質表現或代謝反應方面為多元與非標的性的。毒理基因體學的方法在於提供對參與化學物作用方式的知識，這方面的知識是在診斷評估去鑑定試劑導致複合污染的樣品毒性。

## (二)、工具與概念架構

1. 毒理基因體學反應檢測：轉錄體學(transcriptomics)是指根據在不同情況下不同程度的基因活性分析，使用微陣列或 RNA 定序差異現在已是非常普遍技術。蛋白質體學(proteomics)提供的研究領域是全面生物系統蛋白非標的補體，包括它們的轉譯後修飾和變種。代謝體學(metabolomics)旨在藉由核磁共振或質譜為基礎的方法，全面檢測細胞或組織的小生物分子，如醣類，胺基酸，脂肪酸。

### 2. 混合物的毒性分析：

環境毒理學的重大進展源於藥理學受體思想導入。特別是以參考模型來制定預期聯合效應對實驗結果的比較。假說的關鍵是從所謂的虛假實驗和標的位置範圍及行動模式所衍生。表 1 中提供對於組成物的個別效應和預期的聯合效應之間關係的指導推測和模型。但是，提供共同效應的定量準確預測是只有當混合物中之組成物不顯示任何相互作用時。濃度加成(concentration addition, CA)是物質單一毒性的簡單總和，要求各物質的毒性作用機制相似，其中的一種物質可以用另一種物質按一定的濃度比例代替。獨立行為(Independent Action, IA)則適用於毒性作用機制相異的物質。

表 1. 使用於混合物毒理學的參考模型

mode of action	target/mechanism	
	same	different
noninteractive	$\sum_{i=1}^n (c_{Si}/EC_x(Si)) = 1$ concentration addition	$X = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - F_i(p_{Si}(EC_{x,mix})))$ independent action
interactive	no quantitative prediction model	no quantitative prediction model

“Abbreviations used:  $c_{Si}$ , concentration of substance  $i$  (Si) in the mixture;  $EC_x$ , effect concentration at the response level  $x$ ;  $F_i$ , function describing the relation between concentration and response for the individual component;  $p_{Si}$ , fraction of substance  $i$  (Si) in the mixture;  $X$ , expected combined response; mix, mixture.

圖 1 顯示一個嘗試以毒理基因體學研究新方法的使用，去建構對於混合物作用既存的瞭解。從圖左至右，說明毒物動力學和毒效動力學流程，它可被視為決定濃度反應關係間的因果關係。藉由內部已鑑別的劑量等級有潛力提高環境影響評估，事實上它有助於不同混合物發生毒物動力學相互作用機制時更好地理解。毒理基因體學技術的到來，對於一個細胞或生物體所導致的頂端效應，開啟了更好的事件理解順序途徑。此外，多元分子反應檢測可能有助於去區分不同的化學物質反應其相似或不同的作用，從而打開新的途徑去使用混合物研究以探究藥理作用。

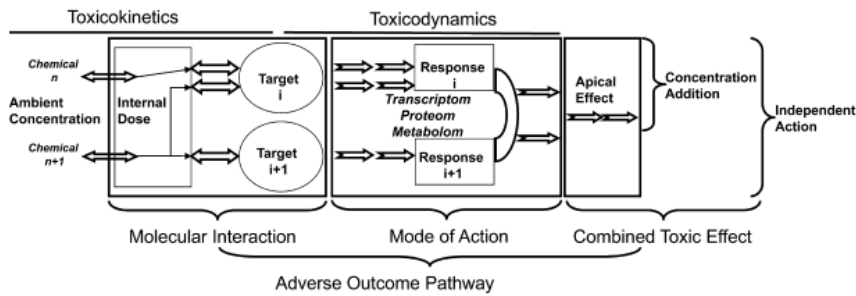


圖 1. 毒理基因體學混合物研究的概念架構，對於無交互作用的虛無假說，混合物模型建議聯合毒理基因體學反應可藉由濃度加成(Concentration addition, CA)和獨立行為(Independent Action, IA)模型來解釋。

聯合效應的結果也可能取決於混合物中其組成物的濃度比。圖 2 顯示對於一個二元混合物的三個最常見的設計，藉著相同的實驗工作分配。混合物可以包括研究一個組成物在其他單一固定量的稀釋系列中出現而被使用，或是一個組成物在其他數個固定量的稀釋系列中出現

而被使用，前者可以標記為  $a \times n$  設計，後者可以標記為  $n \times n$  設計。此外，這些組成物可以被混合在一個恆定的混合比例然後進行稀釋，這就是所謂的對角線或射線的設計。如果混合物比率來自相等毒性單位 (toxic units, TU)，即組成物的暴露濃度超過相同化合物作用濃度，這是有時候也會特別提到的等毒性(equitoxic)設計，雖然在這個設計上毒性並不一定要相等，如果構成作用的濃度稀釋被研究。此外也發現混合物與個別濃度變化設計，可能系統性地含括到混合物組成 (表面設計) 所有層面。

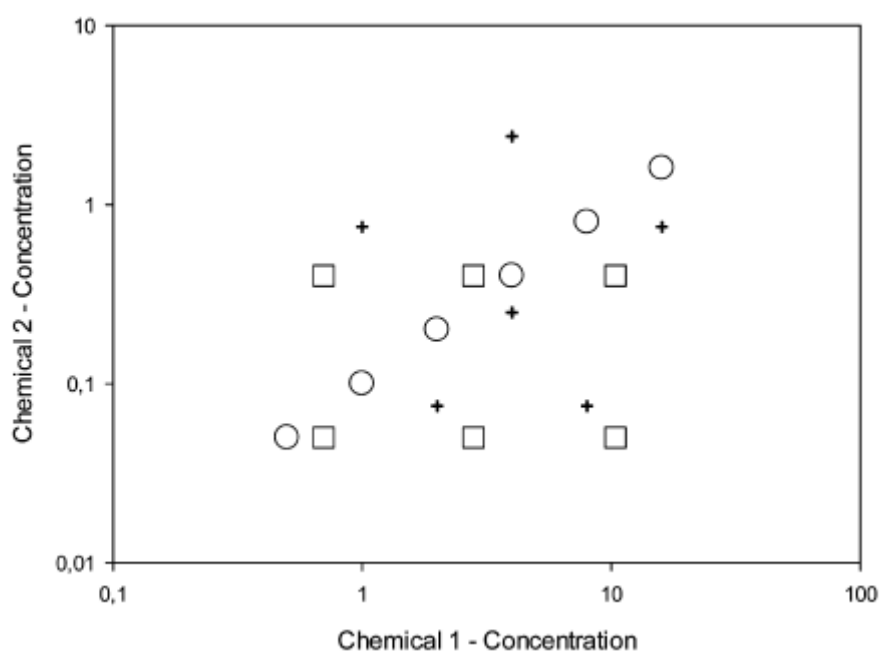


圖2. 設計混合物在聯合效應研究的選擇。闡述化學物質二元混合物在不同濃度使用固定實驗的結果，作為理論設計點案例，對於觀測相同數量的二元混合物根據  $n \times n$  設計 (方形), 射線設計  $n$  (圓形), 和表面設計 (十字) 如圖示。對於  $n \times n$  和表面設計，混合物比率變異可能與組成物稀釋系列或者是在二維平面上選定的觀測點有關。

## 參考資料

1. Backhaus T, Faust M. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. Environ Sci Technol.

2012, 46(5):2564-73.

2. Altenburger R, Scholz S, Schmitt-Jansen M, Busch W, Escher BI.  
Mixture toxicity revisited from a toxicogenomic perspective. *Environ  
Sci Technol.* 2012, 46(5):2508-22.