

國立交通大學
環境工程研究所
碩士論文

以密閉式藻類毒性試驗方法評估醌類化合物之毒

(Assessment of Quinone toxicity using a novel algal
toxicity testing technique)

研究生：董怡湘

指導老師：陳重元教授

中華民國九十六年十月

致謝

終於到了這一天，這一路走來真的很漫長，總算能順利的完成這本論文，非常感謝恩師 陳重元教授的教導與鼓勵，帶領我進入毒物學的領域，且在研究上給予我許多幫助與建議，使我的研究得以順利進行。感謝交大環工所 林志高教授建議我繼續學業，才有今天這本論文的誕生，感謝 中山醫職安系 趙木榮老師對於論文所給予的許多指教，並指出許多值得進一步探討的論點。

感謝詔棻帶領我開始毒物學的實驗，教導我許多實驗上的技巧，感謝裕勝、小柏教導我儀器與軟體的使用，實驗室最重要的母槽也多虧學弟們辛苦細心照顧，我的實驗才能順利進行，所以在此特別謝謝毒物學實驗室的所有成員對我的幫助。同窗好友韻如與嘉玟，更是我不可或缺的好伙伴，在我心情低落時鼓勵我，研究上遇到問題時也無條件幫助我，謝謝你們。

在此也要感謝 3S group 的學長姊，在你們身上我學到了許多，尤其理安學長，不管是研究或是生活上的大小事，遇到問題時總不吝提供幫助。此外我要特別謝謝我的好朋友雪芳一直以來的陪伴支持與鼓勵，知心好友阿貝、珮君的加油我也銘記在心。感謝最了解我的文智，一直是我的精神支柱，生活與研究上，都是我重要的夥伴。

最後要感謝我的所有家人，奶奶的關心、父母在經濟上無條件的支持，讓我能專心的完成研究，還有我的姑姑們，當我遇到問題時總能給我客觀的建議，謝謝！

以密閉式藻類毒性試驗方法評估醌類化合物之毒性

學生：董怡湘

指導教授：陳重元 老師

摘要

本研究使用密閉式藻類毒性試驗，以月芽藻為試驗物種，進行 17 種醌類化合物的毒性分析，並以三種不同的參數作為反應終點，包括溶氧變化量 (ΔDO)、最終細胞產量 (Final Yield) 與生長率 (Growth Rate)，來探討醌類化合物的毒性。由實驗結果可發現，三種參數中，較敏感的為溶氧變化量與最終細胞產量，但其中某些化合物在高濃度時出現消耗溶氧的情形，在此狀況下溶氧較不適合用作為反應終點。

而 17 種化合物中，以對苯醌對月芽藻最毒，毒性最弱的化合物則是四氯對苯醌，兩者 EC_{50} 值相差約 26 倍，大致上 17 種醌類對本研究之月芽藻毒性相差並不是非常大。在低濃度影響方面，則是以 NOEC 最敏感，排名為 $NOEC > EC_{10} > NEC$ 。

在 QSAR 分析方面，只有七種蒽醌類化合物，在以 $\log P$ 為參數時，可看出相關性，其 R^2 最高可至 0.86。與其他試驗物種相比，可發現本研究大致較纖毛蟲、酵母菌、浮萍都來的高，擁有不錯的敏感度。

Assessment of Quinone toxicity using a novel algal toxicity testing technique

Student: Yi-Hsiang Tung

Adviser: Dr. Chung-Yuan Chen

Institute of Environmental Engineering

National Chiao Tung University

ABSTRACT

In this study, the toxicities of 17 quinones to *Pseudokirchneriella subcapitata* were examined by using a closed algal system. This toxic test was carried out based on three endpoint, DO production, final yield and growth rate. According to the results, DO production and final yield are more sensitive than growth rate. Some quinones exhibit the ability to consume dissolved oxygen and result in the unsuitability of DO production as an endpoint. Among 17 quinones, 1,4-benzoquinone reveals the most toxic to *Pseudokirchneriella subcapitata* and Tetrachloro-1,4-benzoquinone is the weakest. Based on the median effective concentration (EC₅₀), 1,4-benzoquinone demonstrates higher toxicity than tetrachloro-1,4-benzoquinone by about 26 fold. In general, the differences of the toxicity in 17 quinones are not very clear. The order of the low effect concentration is NOEC > EC₁₀ > NEC. Using three parameter, log P, E(mv), and E_{LUMO} can not model the toxic potency of 17 quinones to *P. subcapitata*. Only in 7 anthraquinones, quantitative structure-activity relationship (QSAR) is established based on log P with the R² equal to 0.86. Compare to other tested species in literature, *P. subcapitata* is generally the most sensitive among *T. pyriformis*, *S.cerevisiae* and *L.gibba*.

摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
圖目錄.....	VI
表目錄.....	VIII
第一章 前言.....	1
1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究目的.....	2
1.3 研究流程.....	2
第二章 文獻回顧.....	4
2.1 醛類化合物的基本特性.....	4
2.1.1 醛類化合物之物化特性.....	4
2.1.2 醛類化合物在環境中之分布.....	8
2.1.3 醛類化合物之應用.....	9
2.2 醛類化合物之毒理特性.....	10
2.2.1 親電性機制 (electrophilic).....	10
2.2.2 活性含氧物 (reactive oxygen species, ROS)	10
2.3 QSAR	12
2.3.1 QSAR 簡介	12
2.3.2 QSAR 之分類	13
2.3.3 醛類化合物之 QSAR	13
2.4 藻類毒性試驗.....	15
2.4.1 藻類毒性試驗方法.....	16
2.4.2 密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗	18
2.4.3 觀測終點之測量	19
2.4.4 試驗中的重要參數控制.....	20

第三章 基本理論.....	25
3.1 藻類生長動力學.....	25
3.2 劑量反應模式與選擇.....	26
3.3 NOEC 與 Cut-Off value	30
3.3.1 判定 NOEC 和 LOEC	30
3.3.2 平均中斷值 (Cut-Off value)	30
3.4 NEC.....	31
第四章 材料與方法	32
4.1 儀器設備與使用藥劑.....	32
4.1.1 儀器設備	32
4.1.2 使用藥劑.....	36
4.2 實驗方法.....	37
4.2.1 藻類培養	37
4.2.2 藻類毒性實驗	42
4.2.3 化學物質之配製與定量.....	47
4.3 實驗數據之處理.....	49
第五章 結果與討論	50
5.1 密閉式藻類毒性試驗結果.....	50
5.1.1 七種單苯環醌類 (對苯醌) 之毒性結果討論	51
5.1.2 萍醌類之毒性結果討論	52
5.1.3 蔥醌類之毒性討論	52
5.1.4 苯環數對毒性的影響	53
5.2 最佳化模式比較.....	65
5.3 低濃度影響之比較.....	69
5.3.1 NOEC 、 EC10 與 NEC.....	69

5.3.2 中斷值 (Cut-off value).....	74
5.4 急慢毒性比.....	76
5.5 QSAR 分析結果.....	78
5.6 試驗物種比較.....	80
第六章 結論與建議	83
6.1 結論	83
6.2 建議.....	84
第七章 參考文獻.....	85



圖目錄

圖 1.3.1 研究架構流程圖	3
圖 2.1.1 苯醌與萘醌之結構 [3].....	4
圖 2.2.1 對苯醌的烷基化與氧化還原循環 [2].....	11
圖 2.3.1 QSAR 分類 [20]	13
圖 2.4.1 月芽藻圖示	16
圖 4.2.1 藻類毒性實驗流程圖	46
圖 4.2.2 HPLC 操作流程	48
圖 5.1.1 三種試驗終點下 BQ 之劑量反應曲線.....	56
圖 5.1.2 三種試驗終點下 2-Cl-BQ 之劑量反應曲線	56
圖 5.1.3 三種試驗終點下 2,5-diCl-BQ 之劑量反應曲線	57
圖 5.1.4 三種試驗終點下 tetraCl-BQ 之劑量反應曲線	57
圖 5.1.5 三種試驗終點 2-CH ₃ -BQ 之劑量反應曲線	58
圖 5.1.6 三種試驗終點下 2,5-diCH ₃ -BQ 之劑量反應曲線	58
圖 5.1.7 三種試驗終點下 tetraCH ₃ -BQ 之劑量反應曲線.....	59
圖 5.1.8 三種試驗終點下甲萘醌之劑量反應曲線	59
圖 5.1.9 三種試驗終點下 1,4-NAP 之劑量反應曲線.....	60
圖 5.1.10 三種試驗終點下 2-OH-1,4-Nap 之劑量反應曲線.....	60
圖 5.1.11 三種試驗終點下 ATQ 之劑量反應曲線.....	61
圖 5.1.12 三種試驗終點下 1-hATQ 之劑量反應曲線	61
圖 5.1.13 三種試驗終點下 2-hATQ 之劑量反應曲線	62
圖 5.1.14 三種試驗終點下 1,2-dhATQ 之劑量反應曲線	62
圖 5.1.15 三種試驗終點下 1,4-dhATQ 之劑量反應曲線	63
圖 5.1.16 三種試驗終點下 1,8-dhATQ 之劑量反應曲線	63

圖 5.1.17 三種試驗終點下 1,2,4-trihATQ 之劑量反應曲線	64
圖 5.5.1 三種終點之 EC50 與 Log P 值之 QSAR	79
圖 5.6.1 與文獻中其他物種比較毒性試驗結果 單位: mmole/L	82



表目錄

表 2.1.1 本研究中所使用之醣類物化特性	6
表 3.2.1 Weibull、Probit 與 Logit 容忍度分布模式	29
表 4.1.1 實驗用毒化物	37
表 4.2.1 基質中之巨量營養鹽濃度	41
表 4.2.2 基質中之微量營養鹽濃度	41
表 4.2.3 The conditions of Coulter counter	43
表 5.1.1 對苯醣之毒性試驗結果原始數據	54
表 5.1.2 17 種醣類化合物之毒性試驗數據	55
表 5.2.1 以溶氧為終點的三種模式之 G 值	66
表 5.2.2 以 final yield 為終點的三種模式之 G 值	67
表 5.2.3 以 growth rate 為終點的三種模式之 G 值	68
表 5.3.1 三種試驗終點之 NEC 值 B96	71
表 5.3.2 三個不同參數下之低濃度抑制值	72
表 5.3.3 NEC、EC10 與 NOEC	73
表 5.3.4 三種試驗終點之統計參數	75
表 5.4.1 各種慢毒性參數之 ACR	77
表 5.6.1 不同物種之 EC ₅₀ 值	81

第一章 前言

1.1 研究緣起

醌類（quinones）化合物，為芳香族衍生而出，在苯環上有兩個碳以雙鍵與氧原子結合之化合物。醌類化合物廣泛存在於一些天然產物中，在工業上常作為染料製造與醫藥中間體，某些醌類化合物可用於抗癌劑，此外，某些醌類為 PAHs 之光氧化物，另外在空氣污染物懸浮微粒中也可以發現醌類的存在。由於醌類化合物在結構上的特性，導致可能引起細胞毒性與致癌性，藉此對生物造成傷害，再加上用途廣泛，因此在毒理學上倍受重視，然而，醌類之毒性機制研究在許多文獻上皆可發現，相形之下毒性數據方面卻較為缺乏。

化學物質對生態的影響，可藉由生物毒性試驗的方法得到。一般生物毒性試驗所使用的測試物種，包括有藻類、魚類、水蚤、浮游生物、原生動物等等，而藻類位於食物鏈的底部，若藻類遭受到毒性物質污染，極易連帶影響其他物種，再加上使用藻類來進行毒性試驗，具有快速、簡易、經濟且再現性高等優點，因此本研究選用藻類中的月芽藻為指標物種進行生物毒性試驗，探討醌類對月芽藻之毒性影響。

一般標準毒性試驗方法與傳統的藻類毒性試驗，多為開放式之批次式試驗，此種試驗方法有缺點，若受測之毒性化學物質具有揮發性時，使用此類實驗系統可能由於毒化物揮發而使毒性降低，導致得到的結果低估了毒性，基於上述原因，本研究使用密閉式試驗，改善傳

統開放式系統之缺點，以 BOD 瓶製造密閉環境進行毒性試驗，並且不含有 head space，盡量降低化學物質之揮發性所產生的影響，在實驗終點方面，選用藻類光合作用之產氧量與細胞密度為測試終點進行比較。

1.2 研究目的

1. 使用密閉式藻類毒性試驗研究一系列醌類化合物之毒性，以溶氧量、細胞密度為實驗終點，求出 EC_{50} 值與劑量反應曲線，藉此評估醌類化合物對月芽藻的毒性，並比較不同測試終點之敏感度。
2. 將結果與過去文獻之毒性數值做比較，比較文獻中不同物種與本研究之實驗結果，以了解本研究結果與其他實驗物種敏感度的差異。
3. 嘗試選用不同參數，建立 QSAR 來評估醌類化合物之毒性



1.3 研究流程

本研究之架構如下圖 1.3.1，由參考文獻之收集開始，確定試驗所需之化合物種類，收集其物化參數，確立實驗目的以後，再建立實驗方法與化合物濃度分析方法，便開始進行密閉式藻類毒性實驗，進一步分析實驗所得之數據並討論其結果，最後完成此研究。

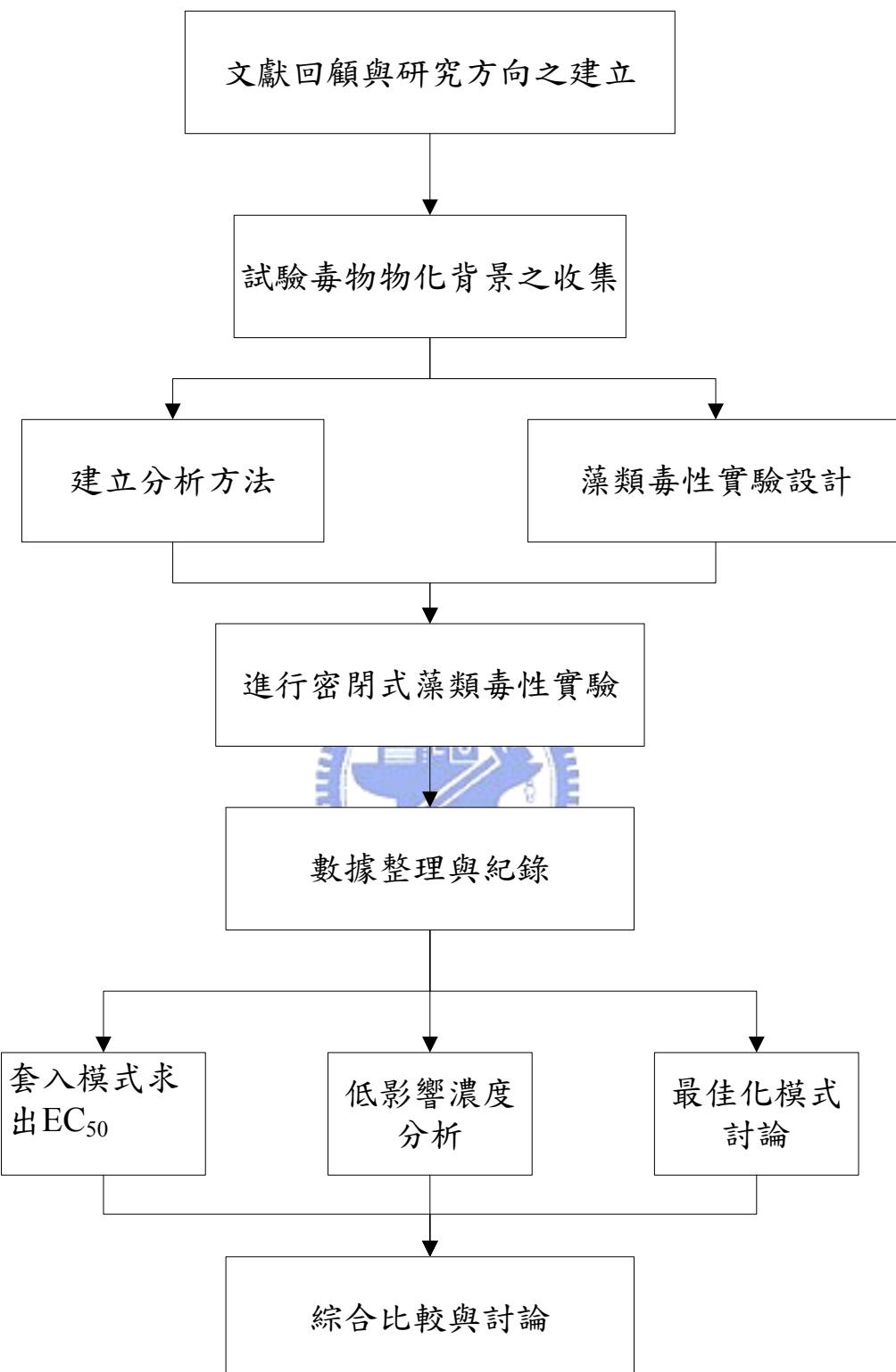


圖 1.3.1 研究架構流程圖

第二章 文獻回顧

2.1 醣類化合物的基本特性

醣類化合物 (quinones) 為多環芳香族上，含有兩個酮稱之 [1]，最簡單的醣類化合物為苯醣 (benzoquinone)，又稱為環己二烯二酮，一個苯環上有兩個碳原子以雙鍵與氧原子結合稱之，可由酚以強氧化劑處理而得，結構上可分為鄰苯醣 (o-benzoquinone) 與對苯醣 (p-benzoquinone) 兩大類，但鄰苯醣較為不穩定，故自然界中存在的大多以對苯醣為主。醣類化合物以衍生來源之芳香族為主命名，例如，由苯加上兩個酮的化合物稱為苯醣，若是由萘接上兩個酮的則稱為萘醣，同理蒽接上兩個酮則稱為蒽醣 [2]。

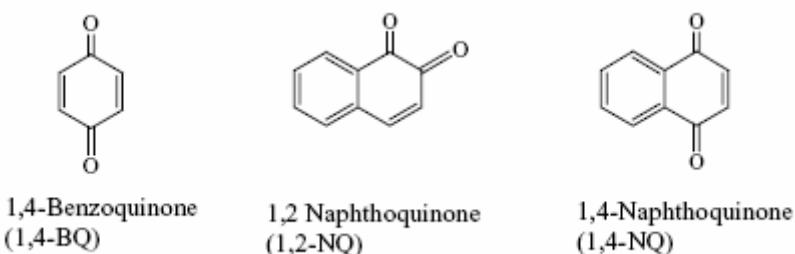


圖 2.1.1 芬醣與萘醣之結構 [3]

2.1.1 醣類化合物之物化特性

由於醣類具有不飽和酮結構，屬於特殊的 α,β -不飽和酮類，因此某些特性亦類似 α,β -不飽和酮類 [4]，醣可還原為含兩個 -OH 基的氫醣類，但氫醣較為不安定，在適當條件下容易重新氧化為醣。若醣外接上其他的官能基，如 -OH 或是-OMe，則會呈現顏色，自然界

動植物色素中常可發現醌類化合物。

天然醌類多為有色晶體，對苯醌為黃色，萘醌為白色粉末，水溶性方面，對苯醌微溶於水，水溶解度為 10g/L ，隨著苯環數的增加其水溶解度越低，萘醌微溶於水，取代基也會影響水溶解度，若接有 $-\text{OH}$ 取代基則會大幅增加溶解度，本研究所使用之醌類化合物其 $\log P$ 值最低為 0.25，最高為 3.99。揮發性方面，小分子的苯醌與萘醌類具有揮發性，且苯醌會昇華，隨著化合物之分子量變大，其揮發性會降低。揮發性最大的苯醌類其蒸氣壓為 0.005 Kpa ， $1,2,4\text{-trihydroxyanthraquinone}$ 的蒸氣壓最小，為 $1.33*10^{-12}$ ，屬不揮發性有機物，本研究所使用之醌類大多屬於半揮發性，半揮發性有機物之定義為蒸氣壓介於 $10^{-2}\text{~}10^{-8}\text{ Kpa}$ 。在分子量方面，選用之毒物其分子量介於 108~242 間。物化特性與結構詳見表 2.1.1。



表 2.1.1 本研究中所使用之醌類物化特性

化合物名稱	CAS NO.	化學式	分子量	溶解性 mg/L	logP	蒸汽壓 kpa	亨利常數 atm-m ³ /mole	結構式
1,4-benzoquinone	106-51-4	C ₆ H ₄ O ₂	108.1	10000	0.25	3.41*10 ⁻³	4.89*10 ⁻⁸	
2-chloro-1,4-benzoquinone	695-99-8	C ₆ H ₃ ClO ₂	142.5	15660	0.74	5.07*10 ⁻³	4.55*10 ⁻⁷	
2,5-dichloro-1,4-benzoquinone	615-93-0	C ₆ H ₂ Cl ₂ O ₂	177	5056	1.23	9.12*10 ⁻⁴	3.15*10 ⁻⁷	
Tarachloro-1,4-benzoquinone	118-75-2	C ₆ Cl ₄ O ₂	245.9	250	2.22	3.04*10 ⁻⁷	2.31*10 ⁻⁹	
2-methyl-1,4-benzoquinone	553-97-9	C ₇ H ₆ O ₂	122.1	5984.5	0.79	4.57*10 ⁻³	2.30*10 ⁻⁷	
2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone	137-18-8	C ₈ H ₈ O ₂	136.1	7010	1.34	3.21*10 ⁻³	6.15*10 ⁻⁷	
Taramethyl-1,4-benzoquinone	527-17-3	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.2	815.7	2.44	1.68*10 ⁻⁴	3.34*10 ⁻⁷	
1,4-naphthoquinone	130-15-4	C ₁₀ H ₆ O ₂	158.2	2471	1.66	2.25*10 ⁻⁵	1.46*10 ⁻⁸	
2-hydroxy-naphthoquinone	83-72-7	C ₁₀ H ₆ O ₃	174.2	3895	0.78	6.92*10 ⁻⁹	3.05*10 ⁻¹²	

化合物名稱	CAS NO.	化學式	分子量	溶解性 mg/L	logP	蒸汽壓 kpa	亨利常數 atm-m ³ /mole	結構式
Mnadione	58-27-5	C ₁₁ H ₈ O ₂	172.2	793.8	2.21	1.92*10 ⁻⁵	4.11*10 ⁻⁸	
9,10-anthraquinone	84-65-1	C ₁₄ H ₈ O ₂	208.2	1.35	3.34	5.11*10 ⁻⁹	2.68*10 ⁻⁹	
1-hydroxyanthraquinone	129-43-1	C ₁₄ H ₈ O ₃	244.2	9.51	3.64	4.33*10 ⁻⁹	1.01*10 ⁻⁹	
2-hydroxyanthraquinone	605-32-3	C ₁₄ H ₈ O ₃	224.2	34.5	2.86	1.84*10 ⁻¹⁰	1.18*10 ⁻¹¹	
1,2-dihydroxyanthraquinone	72-48-0	C ₁₄ H ₈ O ₄	240.2	15.79	3.16	9.53*10 ⁻¹²	1.43*10 ⁻¹²	
1,4-dihydroxyanthraquinone	81-64-1	C ₁₄ H ₈ O ₄	240.2	3.42	3.94	9.49*10 ⁻¹¹	6.57*10 ⁻¹¹	
1,8-dihydroxyanthraquinone	117-10-2	C ₁₄ H ₈ O ₄	240.2	3.43	3.94	9.33*10 ⁻¹²	7.01*10 ⁻¹²	
1,2,4,-trihydroxyanthraquinone	81-54-9	C ₁₄ H ₈ O ₅	256.2	7.18	3.46	1.33*10 ⁻¹²	6.43*10 ⁻¹³	

2.1.2 醣類化合物在環境中之分布

醣類在自然界中是一種普遍存在的化合物，分布於許多天然產物中，許多植物萃取物中即含有醣類化合物，例如大黃與蘆薈萃取物，這類萃取物被用作瀉藥已有四千多年的歷史。茜草中的茜素，是一種紅色的天然染料，來源為茜草屬植物 *Rubia tinctorum* 的根，屬於蒽醣類化合物，在人造染料尚未問世前，醣類化合物曾在染料工業中占有重要地位，其中最知名的就是蒽醣染料茜素，古埃及人時期就已使用此天然染料，茜素 (alizarin) 對鈣有很高的親和力，在埃及木乃伊的骨骼與包裹木乃伊的亞麻布中皆可發現。而指甲花染劑，由指甲花的葉子中萃取而得，其活性成分也是醣類化合物，早在中世紀前就被使用作化妝品染劑，至今仍被廣泛用來作為天然染髮劑。胡桃木中所含的胡桃醣 (juglone)，具有強烈毒性，可遏止其他競爭性植物物種的生長，確保自身的環境優越性 [5]。

除了存在於天然植物以外，許多醣類化合物也可由生物合成來產生，例如經由植物細胞的莽草酸循環與多烯酮循環，可合成出醣類化合物，而雖然哺乳動物細胞缺乏上述代謝途徑，但也可經由代謝一些芳香族前驅物的過程中產生醣類，例如兒茶酚氨與雌激素的代謝 [6]、苯或是多環芳香族的代謝，含有氧原子的芳香族，如酚、苯硫二酚，皆可經由鐵離子、單氧氧化酶或是過氧化酶的催化在生物體中轉換為醣 [5]。

醣類化合物與許多環境汙染物有關，醣類普遍存在於空氣污染物中，在柴油廢氣中可發現 [7]，因而造成環境毒性。另外醣也是多環芳香族碳氫化合物的光氧化與代謝產物，多環芳香族碳氫化合物，簡稱為 PAHs，是一種普遍存在於環境中之污染物，環境中約有三百多種 PAHs，具有致癌性與致突變性，也可能引發皮膚病與神經系統損

害 [8]，PAHs 吸收紫外光後，可轉換為醌類，文獻中也可發現芥與蔥的光解途徑會產生芥醌與蔥醌類衍生物 [9, 10]，除了光氧化，PAHs 經由細胞內的代謝路徑也會產生醌類，而且 PAHs 的致毒機制與醌類的致毒機制息息相關。此外，褐媒與腐植酸中含有多環醌類衍生物，煉油廢棄物中也含有醌 [11]，煉油廠排出之廢水可能污染環境。五氯酚，是重要的環境汙染物，通常用於木材的防腐，五氯酚可能導致神經系統疾病，Tarachloro-1,4-benzoquinone 為五氯酚之過氧化酶代謝產物 [12]。由此可見，醌類不但廣泛的存在於環境中，而且也是許多環境汙染物之中間代謝物。

2.1.3 醌類化合物之應用

醌類化合物由於具有顏色，在工業上常作為染料的原料，也可用於光碟製造原料中的染料，此外，由於其特殊的氧化還原特性，因此可利用來作為底片的顯像劑 [4]；也用於合成樹脂之聚合、殺真菌劑與殺藻劑等。

在醫藥方面，醌類化合物用途廣泛，由於醌本身的氧化還原特性，參與許多細胞內的氧化還原作用，許多生化反應都與醌類有關。例如其中之泛醌，又稱為輔酶 Q10，以苯醌為結構主幹，是一種抗氧化劑，目前也廣泛的作為化妝保養品中的添加物，也是粒線體中重要的電子攜帶者；而甲芥醌，屬於維生素 K 群的一種，結構為芥醌上接有一個甲基，與凝血有關，若維生素 K 不足，會導致出血 [6]。此外，醌類化合物也可作為抗癌藥劑，和惡性腫瘤細胞結合可達到抗癌的效果 [13]。

綜合上述，醌類化合物在環境中是非常普遍的存在，不但存在於天然植物中，且在醫藥、工業上都常被使用作為產物之中間體。故本篇研究選用醌類中最簡單之對苯醌與三種含氯取代基對苯醌、三種含

甲基取代基之對苯醣類共七種，以及三種萘醣與六種三環的蒽醣 (PAHs 之光變產物)，進行 17 種醣類的毒性試驗。

2.2 醣類化合物之毒理特性

文獻中可找到許多關於醣類化合物毒性機制的研究，一般而言，醣類化合物之毒性機制大致可分成兩種，分別為親電性機制與產生活性氧化物造成的氧化壓力兩種。

2.2.1 親電性機制 (electrophilic)

親電性機制牽涉到共價鍵結，由於醣在結構上類似 α,β -不飽和酮類，因此醣可作為親電性物質，與細胞類大分子的親核端反應，例如含有親核性氨基的蛋白質，形成共價鍵結，導致細胞內大分子失去原有的功用 [14]，例如，會與 DNA 形成加合物、造成蛋白質分子的烷基化而失去功能 [2]。

2.2.2 活性含氧化物 (reactive oxygen species, ROS)

活性含氧化物 (reactive oxygen species, ROS)，可簡稱為 ROS，是指具有高度氧化能力的含氧化物種及其衍生物質，有許多種類，包括自由基與非自由基物種，如氫氧自由基 ($\cdot\text{OH}$)、過氧化氫 (H_2O_2)、超氧化陰離子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、單重態氧 (1O_2) 等。可依產生過程是否有生物系統的參與，將 ROS 分成經由細胞媒介生成與非細胞媒介生成兩類，在這邊討論的屬於經由細胞媒介生成的 ROS。反應性含氧化物種皆具有高度氧化能力 [15]，可藉由破壞 DNA 與蛋白質、引起脂質過氧化作用、氧化體內重要之酵素等機制而引起細胞傷害，進而造成健康上的危害。

醣進入細胞後，可被許多細胞內原就含有的酵素催化 (如細胞色

素 P450)、或者經由非酵素催化之氧化還原循環還原，若失去一個電子則形成半醌，失去兩個電子則還原為氫醌，半醌在細胞中為不穩定的自由基，容易與氧氣分子反應，半醌會氧化回醌，氫醌也會氧化回醌，此時氧化的過程會伴隨著 superoxide 超氧化陰離子 (O_2^-) 的生成，此超氧化陰離子自由基就造成了細胞的氧化壓力，對細胞造成傷害，超氧化陰離子自由基 (O_2^-) 進一步反應，會自發性的歧化 (dismutation，也稱為自身氧化還原反應) 為過氧化氫 (H_2O_2)，過氧化氫也會由微量過渡金屬或是細胞內酵素催化形成氫氧化自由基 ($\cdot OH$)，由此引發一連串的反應，造成細胞的氧化壓力，會氧化蛋白質，使蛋白質形成雙硫鍵而變性，也會造成脂質的氧化，以及 DNA 的損害，因而危害細胞 [2, 3, 16]。

綜合上述兩機制，以對苯醌為例，詳細流程如下圖 2.2.1，對苯醌進入細胞後，可直接造成細胞內大分子的烷基化，或者經由氧化還原循環，還原為氫醌或半醌，接著氫醌與半醌在氧化回對苯醌的過程中，產生活性氧化物造成細胞的氧化損害。

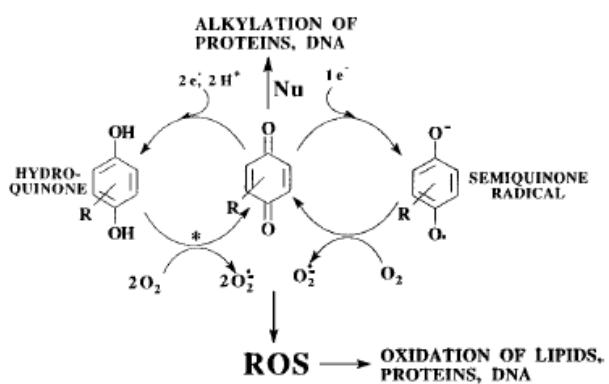


圖 2.2.1 對苯醌的烷基化與氧化還原循環 [2]

與醌類化合物相關的疾病有很多，正因其為許多毒性物質的中間產物與中間代謝物，以苯舉例如下，苯是一種常用的溶劑，苯進入細胞後，會經由肝細胞色素 P450 的催化轉換為氫醌與兒茶酚，再經由過氧化酶的催化而氧化形成對苯醌與鄰苯醌，會累積在骨頭與脊髓中，長期暴露於此種溶劑下易患急性骨髓白血病 [17]，而苯醌與硫醇類大分子共價鍵結後，具有更高的氧化能力，與含氨基分子行形成共價鍵結後，可能與帕金森氏症或其他神經系統紊亂之疾病有關 [18]。醌類化合物，具有致癌性、免疫毒性，對腎臟、心臟及神經系統皆會造成危害 [2]。

2.3 QSAR

2.3.1 QSAR 簡介



QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) 定量結構—活性關係，是利用化學物質的物理或化學性質，使用化學物質的各種物化參數來推測描述化學物質對生物體的影響，以便預測與了解化學物質對生物體所造成的干擾程度，最早是被使用於藥物學，用以研究發展具療效且副作用小的藥物，在 1970 年代被引入了環境工程的領域中 [19]，使用於預測某有機化合物之急毒性。

利用化合物毒性作用機制所建立的 QSAR 模式會比依據化合物的種類建立來得適當，這是因為同一類化合物所產生的不同的毒性機制，會破壞 QSAR 模式之品質。而對於毒性作用機制可大致分為兩大類：一般性 (general) 及特異性 (specific)。一般性主要指化合物並非以特定位置對生物體造成攻擊，而是與生物體之細胞膜進行反應；特異性則是針對生物體內某特定胞器進行攻擊，造成毒性。進一步分類可見圖 2.2.1 之圖示，在下節中描述。

2.3.2 QSAR 之分類

Russom *et al.* [20] 在 1997 年發表的研究中，將有機化學物質分為以下幾種毒性機制，先以一般性與特異性分為兩大類，再接著往下細分。分類中的一般性，也稱之為麻醉性，主要可分為兩類：非極性與極性。非極性麻醉性通常是較遲鈍的化合物，也被稱作第一類化合物 (class I compound)，在 QSAR 分析上，與辛醇與水係數 (log Kow) 有著良好的線性關係，一般所定義的基線毒性 (baseline toxicity) 就是指非極性麻醉性化合物。極性麻醉性之化合物常會比非極性麻醉性化合物活潑，包括了酚類與苯胺類等具有氫鍵給體 (hydrogen bond donor acidity) 特性的化合物。

而反應性有機化合物，也稱作特異性，此類型化合物主要的毒性機制為與生物體內特殊胞器或者位置反應，產生化學變化，這類型的有機化合物仍然具有非反應有機物的毒性機制，也就是擁有麻醉效應毒性，因此通常此類有機物質的毒性超過基線毒性，比非反應性有機物之毒性還要來得強。

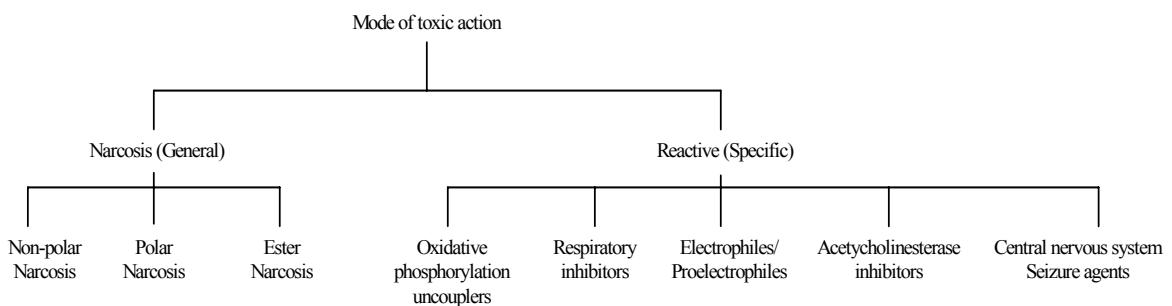


圖 2.3.1 QSAR 分類 [20]

2.3.3 醛類化合物之 QSAR

文獻中甚少醛類化合物之 QSAR 分析，Schultz *et al.* [1] 在 1997

年發表的醌類化合物對纖毛蟲之毒性實驗結果顯示，使用辛醇與水分配係數 ($\log P$)；氧化還原電位 (Emv)；或是親電性參數 (E_{LUMO}) 皆無法與毒性試驗數據得到良好的相關性，只有其中四個含甲基取代基與一個含甲氧基取代基之對苯醌毒性試驗結果，可與氧化還原電位得到不錯的相關性。其 R^2 值為 0.88。

由於醌的第二個毒性機制，與氧化還原電位有關，而細胞中可將醌還原以致產生一連串活性氧化物之最有可能的酵素為 flavin-containing enzyme，因此同時考慮此類酵素與醌之氧化還原電位，可發現當醌類化合物之一個電子氧化還原電位落在 -240~-170 E/mv 或是 -50~25 E/mv 時，就可能經由一連串的氧化還原循環產生活性氧化物 (ROS)，造成細胞傷害 [16]，因此 Schultz *et al.* [22] 選用七種落在上述還原電位範圍內的萘醌對纖毛蟲作 QSAR 分析，發現以一個電子的氧化還原電位 (E/mv) 為參數時，可得到不錯的相關性， R^2 為 0.88。

而 Siraki 等人在 2004 年使用 14 種對苯醌衍生物所進行的小鼠肝細胞毒性實驗 [6]，以親電性參數 EA 值，所得到之 QSAR 關係之 R^2 值為 0.7，其中四甲基對苯醌為 outlier，進一步結合空間性參數 VOL 可提高其 R^2 值至 0.86。

由於醌類化合物之機制複雜，雖文獻上已歸納出兩個主要機制，但由於兩個機制可以同時並存，具親電性機制之醌類也可能會產生活性氧化物，再加上對於不同生物物種，作用機制也不同，因此導致醌類化合物不易得到成功的 QSAR。

2.4 藻類毒性試驗

目前排放於環境中的化學物質約有 100,000 種，但其中有毒性資料的只有約 1~5%，只由一般化學參數不易看出化學物質的毒性效應，必須以生物毒性為依據。一般常用的毒性評估實驗所使用的生物，包括魚類、無脊椎動物如水蚤、細菌與藻類等，由於藻類毒性試驗具有以下優點：

1. 藻類為最低階的生產者，在食物鏈中位於底部，影響藻類的物質也會經由生物濃縮作用傷害較高階的物種。
2. 藻類生長迅速，因此可在短時間內經歷幾個生命週期，因此實驗不會受幼年期或衰老期的影響。
3. 與魚類及無脊椎動物試驗比較，藻類試驗是相當簡單、快速且便宜的生物試驗。與細菌試驗比較，藻類試驗較不易因生物體內基因多樣性而產生變異。
4. 藻類生物試驗一般來講比其他微生物實驗來得敏感

因此本研究選用單細胞藻類作為測試物種，進行醜類之毒性試驗。

在本實驗中所選用的藻種為月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 屬於綠藻綱 (Chlorophceae)，為 2006 年八月購自 the Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin，其特徵為單細胞、成群體但不糾結、不能移動，一般細胞體積為 $40-60 \mu\text{m}^3$ ，月芽藻圖見圖 2.4.1。

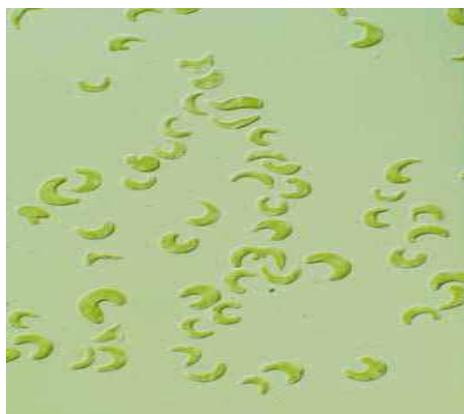


圖 2.4.1 月芽藻圖示

一般典型的月芽藻體積約為 $45 \mu\text{m}^3$ ，重量介於 10~20 pg/cell 之間 [23]，是一種淡水單細胞藻類，因為體型呈半月型，所以稱為月芽藻，擁有取得容易、培養簡單、容易觀察、生長期短、可以大量生長、具有地區代表性等實驗用的藻種需具有的特點，且一般較其他微生物之毒性試驗來得敏感 [24]。此月芽藻的健康情形可輕易由外觀觀察得到，當生長狀況不佳時，藻體會呈現明顯的黃綠色，且粒徑也會出現明顯變化，使用顆粒計數器測量可發現大粒徑的藻顆粒分布變多，此時代表生長狀況不良，可能是生長環境中營養鹽濃度不適當，或溫度、光線、pH 值控制不當，也可能是有毒物質侵害、細菌滋生等環境條件不佳所導致，這時必須找出原因改善藻類健康狀況，以利後續實驗進行。

2.4.1 藻類毒性試驗方法

一般藻類毒性試驗可依據培養方式分為批次式和連續式兩種試驗。批次式藻類毒性試驗在實驗開始時，提供藻類足量的生長基質，在之後的毒性試驗實驗過程中，沒有基質的加入與移除，藻類暴露於毒性物質中一段時間後，觀測紀錄其測試終點。實驗期間經歷完整的藻類成長週期，遲滯期 (lag phase)、指數生長期 (exponential

phase)、穩定期 (stationary phase) 及死滅期 (death phase)。由於此類批次式藻類毒性試驗操作簡便、實驗成本低廉、可處理大量樣品且實驗數據取得容易，因此被廣泛的使用。目前現有的標準藻類毒性試驗方法多為批次式的，如 U.S. EPA 所採用的 "Fresh water algae acute toxicity test"、OECD 所採用的 "Algal growth inhibition test guideline"、ISO 所採用的 "Water quality-algal growth inhibition test"、APHA 所採用的 "Toxicity testing with phyto-plankton" 及 ASTM 所採用 "Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae" 等。但批次式實驗仍然具有其缺點，在實驗過程中，基質的消耗與藻類代謝廢棄物的累積，皆可能影響藻類敏感性，此外，為了確保藻類生長，大多使用高於自然水體甚多的營養鹽濃度，如此將會影響藻類對毒性物質的容忍度，亦會造成 pH 的改變，並且也無法反應自然水體真實狀況 [25]。

相對於批次式實驗，連續式藻類毒性試驗則是連續供應新鮮的基質至反應系統中，並持續的將槽中的代謝廢棄物移出，故藻類能保持在最佳的生長狀態。由於低濃度的營養鹽不斷注入系統中，所加入之營養鹽與藻類生長產生呈現動力平衡，此系統也較接近自然水體環境。但連續式藻類毒性試驗系統需要一段相當的時間操作才能達到平衡狀態，再加上每次進行完實驗即需重新培養，非常耗費人力、物力及時間，所以目前尚未有標準試驗方法的建立。連續式系統又可以分為兩種：The chemostat 及 The turbidostat。Chemostat 及 turbidostat 之差異在於控制藻類生長方式的不同，turbidostat 反應槽中，細胞濃度是由光電附著方式維持在一固定常數，當細胞密度超過預先設定位時，光電池將管閥開啟使新基質自儲備槽流入以稀釋反應槽內的細胞密度，同時將等量的細胞及基質自槽中溢流出去，隨時監控槽內生物

濃度，基質流入速率由細胞密度所控制。Chemostat 系統則是由培養槽連續加入及移除基質，細胞密度是由營養基的濃度及進流速率控制，Chemostat 以調整新鮮基質的濃度及進流速率來控制生長，常運用於研究限制性營養源對藻類生長之影響。一般而言，Chemostat 較 turbidostat 受歡迎，因 chemostat 其架設費用較低，器材也較易取得。

綜合上述不同實驗方式的優缺點，Chen and Lin 以 Chemostat 系統為基礎，結合連續式與批次式實驗，發展出一套兼具實用性、敏感性及簡便性的藻類毒性試驗法。使用連續式藻類培養之方法，利用四公升的連續式母槽培養藻類，在整個培養過程中不斷有新鮮基質流入，與藻類代謝物的流出，使母槽內之藻細胞更為健康穩定，待系統達到穩定後，即可在不汙染母槽的情形下由母槽中取出藻液進行批次式毒性試驗，並將毒性試驗的時間縮短為 48 小時，大大增加試驗的頻率，也因而改善了批次式培養中藻類代謝物之累積導致影響敏感度，並更能模擬自然水體之環境 [26]。

2.4.2 密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗

標準藻類毒性試驗方法為開放式系統，使用震盪方式進行氣體交換提供藻類生長所需之碳源，若使用此種系統進行毒性試驗，當受測化學物質具有揮發性時，會導致揮發性化學物質在實驗期間揮發逸散，因而低估揮發性化學物質之毒性。為解決此問題，密閉式系統被使用來改善開放式系統的缺點，但使用密閉式系統時，碳源是否充足很重要，因為碳源不足會抑制藻類生長。目前已有許多學者發表密閉式實驗的研究，Brack and Rottle 設計了一個間接提供碳源的密閉系統，採用雙層構造的玻璃瓶，將藻液及有機物置放於上方，下方則注入 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 緩衝液 [27]。Kuhn and Pattard 以柵藻 (*Scenedesmus*

subspicatus) 為測試物種來進行毒試驗，使用無機碳與有機碳作為藻類生長所需碳源，並指出密閉的環境於 48 小時之內對藻類不會造成重大的衝擊 [28, 29]。Glaassi and Vighi 利用一密閉式且恆溫的條件，可保証水中揮發性物質的濃度不變，發展出一套 AAPBT 的系統來測定揮發性物質的毒性。其使用一 2 升之密閉容器，其中試驗溶液僅 100 ml，目的在於利用剩餘大空間提供足夠之 CO₂，以避免碳源匱乏而影響藻類敏感度，但實驗中物質濃度僅由亨利定律推算，並無真正測得溶液中實際濃度 [30]。Herman *et al.* 改善此項缺點，在密封之 125 ml 試管中進行試驗，除了於 50 ml 試驗溶液中添加 0.4% NaHCO₃ 提供充份的碳源，且同時監測試驗溶液與其上空間(head space)之濃度，證明濃度無顯著不同 [31]。Mayer *et. al.* 指出在不含 head space 之完全密閉式批次實驗系統，是評估揮發性有機物較佳的實驗方法 [32]。



綜合上述，Chen and Huang 利用連續式的藻類培養方法，配合 BOD 瓶發展出 48 小時的批次式 BOD 瓶藻類毒性試驗，將藻類、營養基質和試驗毒物加入 300mL 的 BOD 瓶，然後以蓋子密封進行密閉式毒性試驗，讓藻類與毒性物質接觸 48 小時後，由觀測終點量測實驗組與控制組的抑制情形並進行比較分析。整個實驗過程中沒有新鮮基質的加入，也沒有藻類之代謝物移出，屬於批次式毒性試驗，操作簡單，時間與成本的耗費也大幅減少，且可處理較大量的樣品數、實驗數據取得容易，所以相對了提高實驗的再現性 [33]。是故本研究採用此”連續式藻液培養配合批次式毒性試驗”之方式，以密閉式 BOD 瓶進行藻類毒性實驗。

2.4.3 觀測終點之測量

進行藻類毒性試驗前後，需要一個能夠正確的反應出藻類生長情

況之方法，以便判定藻類之生長情形。一般藻類生長情況之參數有下列幾種：細胞密度、細胞總體積、乾重、葉綠素、活體內螢光值、營養基濁度、產氧量、碳源攝取量、ATP 及 DNA 等等之參數。一個理想的測定方法應為迅速、精確、高敏感度、低偵測極限最好可以低成本，適合這些條件之藻類生長質量之方法有下列幾種：(1) 顯微鏡計數法 (2) 電子顆粒計數法 (3) 直接乾重量測法 (4) 光學顆粒計數法 (5) 分光光度計測葉綠素 A 法 (6) 螢光光度計測葉綠素 A 法 (7) DNA 測定法 (8) ATP 測定法 (9) ^{14}C 輻射標定法 (10) 溶氧測定法 [34] 等。

一般所公告的藻類毒性試驗標準方法，例如 U.S. EPA [35]、OECD [36]、ISO [37]、ASTM [38]、APHA [39]，皆使用藻類生物質量作為試驗終點。而量測生物質量的方法可分為直接測定法與間接測定法兩種，直接測定法就是量測生物之乾重，但此直接稱重的方法，花費的時間也較多，因此間接測定法就被發展出來，包括電子顆粒計數器、光學顆粒計數器等間接量測生物質量的方法也逐漸將直接稱重法取代，因為這些方法簡單、快速，所需藻液量少，且與生物乾重之間具有良好的相關性。

溶氧測定法為直接量測水中溶氧之變化，再依此計算出藻類生長之情形，優點為成本低廉，試驗時間短。Hostetter [40] 發展出一套量測水中溶氧之藻類試驗方法，將試驗時間縮短至二十四小時，且在月芽藻的試驗之中發現，當營養鹽呈限制性狀態時，藻類的淨光合反應量會與限制性營養鹽呈現線性關係。

2.4.4 試驗中的重要參數控制

藻類毒性試驗若是在實驗中採用不同的物化參數，將會影響藻類的生長情形與對化合物的敏感性，因此容易造成實驗結果不一，也導

致不同的藻類毒性試驗資料存在許多差異，故評估文獻中之藻類毒性試驗資料時，通常必須參考其試驗方法一起評估。有許多的控制因子都會影響藻類毒性試驗的結果，本研究實驗中所考慮的重要參數分成環境條件、營養鹽濃度、毒性試驗植種量與時間三部份彙整如下：

1. 環境條件：

環境條件包括各種可影響藻類生長的參數，以下針對 pH 值、光照強度與溫度分別說明如下。

(1) pH 值

藻類因行光合作用，故導致 pH 值會產生變化，因此有些學者主張 pH 值可以不需要控制，讓藻類在合理的 pH 值範圍內暴露於毒性物質下進行試驗。Lin *et al.* 在密閉式藻類毒性試驗中，並未刻意對整個系統的 pH 加以限制，發現在水中溶解性金屬對於藻類的抑制率若高於 20% 時，系統中 pH 的濃度變化大部份皆在 1.5 個單位以下，因此認為在藻類毒性試驗中，不需限制系統中 pH 的變化 [33]。

不過如此將使重複試驗不易進行，而且用來預測在某特定的 pH 值狀況下之物種濃度影響也有困難。因此標準藻類毒性試驗皆傾向將 pH 值維持在固定範圍內。

以毒理學的觀念而言，pH 值若變化一個單位，可能導致毒性改變 10 倍以上；pH 控制值隨著不同的標準方法而有差異，U.S. EPA 規定最終 pH 值需在 8.5 之下 [35]，OECD 則要求 pH 值之最大變動不要超過一個單位 [36]；ISO 則是要求 pH 值之變動在 1.5 個單位之內 [37]。若決定試驗在一固定 pH 值下進行時，就必須小心的確保 pH 值變化量為最少。減少 pH 值改變的方法大致有下列幾種：使用較低之生物接種量、縮短整個試驗之時間、以空氣或是添加二氧

化碳之空氣加以曝氣。本研究為減少 pH 值所產生的誤差，仍在毒性試驗前將 pH 值控制在 7.5 ± 0.1 之間，

(2) 光照強度

光照的強度會影響藻類行光合作用之速率，因而造成其產氧率之不同 [41]。藻類毒性試驗之中，光照的強度依照不同的試驗標準及不同藻種而有些許的差異。在實驗室培養藻類時必須要考慮「自身遮蔽」效應 (self-shading)，此效應會造成距光源較遠處之光照與較近處之光照強度之差異，良好的混合可以減低自身的遮蔽效應並使光照有更好的利用效率。光照強度在良好的培養條件之下，應為一常數並能使藻類呈現指數生長、縮小培養體積及維持充分的混合有助於達到理想狀態。

(3) 溫度

當溫度逐漸增加時，藻類會呈現指數生長，而當達到其最適生長溫度後即迅速下降。本研究採用 U.S. EPA 建議的 24°C 環境下來培養藻類及進行實驗，整個培養及試驗過程中，溫度之變化不可大於 2°C ，因此本研究所有藻類培養與毒性實驗皆在 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 之恆溫室下進行。

2. 植種數量與時間

對批次式實驗而言，若實驗開始時的植種數量過高，將會造成實驗後期由於藻類細胞大量增加造成代謝物累積及水中碳源耗盡，而導致 pH 值升高等問題，進而影響毒性試驗結果之精確度。Lin 針對不同試驗時間和不同初始植種密度進行敏感度和變異性的分析，發現生物毒性試驗隨著時間增加，其敏感度提高而 C.V. 值減少；而隨著初始植種密度減少，其敏感度提高但 C.V. 值亦提高 [42]。而根據 Vasseur

and Pandard [43] 改變初始生物量進行批次試毒性試驗，結果也證實當提高實驗初始生物量時，EC₅₀ 值也顯著提升。在兼顧兩者的考量下，本研究選定之最佳化藻類初始植種密度為 1.5×10^4 cells/ml。

而試驗時間的長短會關係到毒性試驗的敏感性和數據結果。過長的試驗時間，會使得存在於 BOD 瓶內的營養鹽不足，使藻類死亡現象增加，此外過長的試驗期間，也會使得毒性的反應消失。本實驗選定的時間為四十八小時。

5. 試驗基質

一般為使試驗之狀態符合自然環境狀況及讓藻類能有效利用微量元素，在未受污染的水體中螯合物的 (EDTA) 的濃度不超過 30 $\mu\text{g/L}$ [44]，於試驗時會在培養基中加入固定量之螯合劑，如 ISO 於培養基中加入 78 $\mu\text{g/L}$ 的 EDTA 融合劑可助於藻類與水中必要元素的螯合，如此可確保毒性試驗期間藻類維持於對數生長期。但是，從文獻上顯示若毒性試驗過程中添加螯合劑會與常見二價金屬 (Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 等) 形成親水性錯合物，此錯合物對微生物的毒性相較於游離態金屬來得低，進而影響毒性試驗結果，因此本研究於試驗時不加 EDTA [45]。

Lin *et al.* [33] 在密閉式藻類毒性試驗中，若將營養基質成份之一的 NaHCO_3 由 15 mg/L 增為 300 mg/L，對於酚的毒性試驗結果而言，敏感度將降低。為了解 HCO_3^- 對於毒性試驗之影響，Lin, (2001) [42] 進行兩組試驗：一組初始細胞密度為 10^5 cells/mL，毒性試驗時間為十二小時，毒性物質為重金屬鋅及鎘的條件下，分別進行營養基質採用原 U.S. EPA 營養基質 (HCO_3^- 濃度為 10 mg/L) 及加入兩倍 HCO_3^- 之營養基質進行藻類毒性試驗，試驗終點為溶氧變化量；另一組初始細胞密度為 1.5×10^4 cells/mL，毒性試驗時間為四十八小時，毒性物質

為重金屬鋅及有機物質酚。試驗結果發現， HCO_3^- 加倍後對毒性試驗敏感度之影響並沒有一定之趨勢，而且並不會對其毒性反應造成太大之影響。因此本研究在最初藻類活化培養時，加入 100% 之 EDTA，於連續式培養中加入 10% EDTA，毒性試驗開始時則不添加 EDTA。



第三章 基本理論

3.1 藻類生長動力學

在批次式藻類培養中，單細胞藻類的生長通常依循簡單的一階動力學：

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

其中，X 為生物質量（一般以乾重或是細胞數表示之）； μ 為比生長率；t 為時間。影響生長率之因子有光照、溫度、營養鹽及碳源之供應等，在光照、營養鹽或碳源受到限制時，藻類之基本生長模式會由指數型態轉變為直線型態。

在連續式藻類培養中，當系統達到平衡（Steady State）時：

一、由反應槽中生物質量之平衡可得下列式子：

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX = (\mu - D) X$$

其中，D 為稀釋率 (day^{-1}) 即入流量與反應槽體積之比值，當系統達到平衡穩定狀態時，

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

則 $\mu = D$ ，代表當反應槽達到平衡穩定狀態時，反應槽內生物之生長率即為該系統之稀釋率。因此可藉由調整稀釋率來控制反應槽內藻類之生長率。

二、由反應槽內之基質平衡可得下式：

$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - DS - \mu \left(\frac{X}{Y} \right)$$

其中， S_0 為入流基質濃度 (mg/l)； S 為系統達平衡穩定狀態時，限制性基質之濃度 (mg/l)； X 為系統達平衡穩定狀態時，生物質量之密度 (cells/ml)； Y 為無因次之生長係數。

當系統達平衡時，

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

則 $D(S_0 - S) = \mu \left(\frac{X}{Y} \right)$

又 $\mu = D$

所以 $X = Y(S_0 - S)$

再由 Mood's equation， $\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(Ks + S)}$

及 $\mu = D$

所以 $S = \frac{KsD}{(\mu_{\max} - D)}$



其中， μ 為比生長率； μ_{\max} 為最大比生長率； Ks 為飽和常數（比生長率達最大比生長率之一半時的基質濃度）。

最後可得下式：

$$X = Y \left[\frac{S_0 - KsD}{(\mu_{\max} - D)} \right]$$

由此式可知，當反應槽達平衡穩定狀態時，槽內生物量可由稀釋率及進流基質濃度來控制。

3.2 劑量反應模式與選擇

毒理學上，劑量與反應關係 (dose-response relationship) 是探討

化學物質對生物體所造成影響之基礎。美國國家科學院將劑量—反應關係定義為：一種物質給予或接受的劑量與在暴露族群中某種健康效應之發生率的關係之特性描述，並且以人類暴露到此物質來估計此效應的發生率之過程。

所有的物質皆可能有毒，化學物質是否為毒性物質最主要的差別在於所暴露之劑量。毒性研究主要可以分成模式推估及實驗驗證兩大部分。若從數據分析的部分來看：在毒性試驗過程中，實驗物種受毒性物質作用時，所造成生物體 50% 受抑制（或死亡）時所表現出的毒性物質濃度，即稱做 EC_{50} ；而由受影響或死亡的百分率所迴歸出的 S 曲線關係，稱為劑量-反應曲線圖（Dose-response curve）；這些在於毒性評估方面皆為相當重要。

欲從 S 型曲線求得 EC_{50} 或 EC_{10} 並不容易，因此必須藉由數學關係式將 S 型轉為直線型以便求取，此種數學轉換模式便稱為劑量反應關係模式，不同的模式根據的理論基礎互有出入，因此同一組數據，經由各種不同模式的分析，其結果可能有所差異；以生物試驗來講，不同生物甚至不同觀測參數 (Endpoint) 對毒性物質容忍度不盡相同，若以不適當之反應模式計算，實驗點與理論點間變異過大，則所得結果則相當可疑，尤其在所求為外插情況下，變異波動更加明顯，因此數據處理程序中往往需要作適合度分析，以判斷最適合之使用模式。

一般常見的毒性物質劑量-反應模式為有三種，包括了：Probit、Weibull 及 Logit 模式，皆是依據不同的假設發展而成；Probit 模式為假設毒性物質對於受體生物的容忍度為一常態分布，因此以常態分佈函數來表示毒物對生物抑制率 P 對毒物濃度 (劑量) Z 的濃度 (劑量) 反應曲線。Weibull 模式則是符合毒性物質與受體生物間產生化學鍵

結的假設，為機率-反應機制基礎（Mechanistic-Probability basis）模式，發展根據毒性物質分子與受測試生物之受體分子間化學鍵關係所推演而來。至於 Logit 模式則與 Monod Equation 相似，由人口成長研究所發展而出的另一種模式，描述毒性反應中的某種酵素反應（Enzyme Reaction），適用於自催化（autocatalysis）之化學反應。表 3.2.1 為三種劑量反應曲線之數學轉換關係式。

其中，Probit 模式，為毒性試驗報告中最常見的劑量-反應模式，主要是由實驗經驗加上理論基礎所得的一個模式，其係假設生物對毒性物質的容忍度分布為常態分布（Log-normal distribution），其主要以毒性物質濃度之 log 值與反應率之 NED（Normal equivalent deviation）具有線性關係為基礎，其中反應率即測試生物對毒性物質之反應比率（如死亡率等）。此模式將劑量-反應模式之 S 型曲線，轉換成 NED 尺度上的一直線，原來劑量-反應曲線在抑制率於 50% 之處對應到 NED scale 上為 0，84.1% 反應率之處對應為 1，而 NED scale 之座標值加 5 即為 Probit 的座標，Probit 單位與反應率與毒性物質劑量間之轉換關係如下：

$$Y = A + B \log Z$$

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

其中 Y 為 Probit 單位，A、B 為劑量-反應曲線之截距與斜率，Z 為毒性物質劑量濃度（單位：mg/L）；P 為測試物種對毒性物質之反應率（如死亡率等，單位：%），erf 為 error function。

表 3.2.1 Weibull、Probit 與 Logit 容忍度分布模式

Type	Transformation	Probability density	Probiblity of response P
Weibull	$u = \ln(k) + \eta \ln(z)$	$\exp(t - e^t)$	$1 - \exp(-kz^\eta) = 1 - \exp(-e^u)$
Probit	$Y = \alpha + \beta \log(z)$	$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{t^2}{2}\right)$	$\int_{-\infty}^{Y-5} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{t^2}{2}\right) dt = \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf}\left(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}\right)\right)$
Logit	$1 = \theta + \phi \ln(z)$	$\frac{1}{4} \frac{1}{\cosh^2\left(\frac{t}{2}\right)}$	$\frac{1}{1 + e^{-\theta} z^{-\phi}} = \frac{1}{1 + e^{-t}}$

Type	Probility of no-response Q	Transform vs P	Transform vs Q
Weibull	$\exp(-kz^\eta) = \exp(-e^u)$	$u = \ln(-\ln(1 - P))$	$u = \ln(-\ln Q)$
Probit	$\int_{Y-5}^{\infty} \exp\left(-\frac{t^2}{2}\right) dt = \frac{1}{2} \left(1 - \operatorname{erf}\left(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}\right)\right)$	$Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(2p - 1)$	$Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(1 - 2Q)$
Logit	$\frac{1}{1 + e^\theta z^\phi} = \frac{1}{1 + e^t}$	$1 = \ln\left(\frac{P}{1 - P}\right)$	$1 = \ln\left(\frac{1 - Q}{Q}\right)$

3.3 NOEC 與 Cut-Off value

3.3.1 判定 NOEC 和 LOEC

「未造成明顯毒性反應的最高濃度」(no observed effect concentration, NOEC) 與「達到顯著毒性反應的最低濃度」(lowest observed effect concentration, LOEC) 即代表毒性物質對受測物的無影響濃度與最小影響濃度。NOEC 及 LOEC 求法為將各濃度區間下的毒性反應（處理組）與控制組的毒性反應比較，比較在統計上是否達到顯著水準來判斷。舉例來說，假設在某實驗中處理組 A（統計）分析發現和控制組沒有差異，而比處理組 A 更高濃度的處理組 B 分析後發現和控制組有統計上差異，則處理組 A 的濃度定義為 NOEC，而處理組 B 的濃度稱為 LOEC。本研究利用統計方法 Dunnett's test，藉以判別出各濃度區間下的毒性反應與控制組的毒性反應，在機率上是否達到顯著水準。

3.3.2 平均中斷值 (Cut-Off value)

為了了解毒物在低濃度下分析方式結果（模式迴歸分析及統計分析）的差異及找出較適的水體保護指標，本研究中分別比較兩種指標 NOEC 及 EC₁₀ 值，並利用平均中斷值 (cut-off value) 作為選擇 NOEC 或 EC₁₀ 的客觀參考點。平均中斷值其值本身與一組試驗的組內變異之平方根成正比，因此組內變異較小的精確試驗有較小的平均中斷值，此中斷值亦指出 NOEC 所能達到之保護程度的極限，使 NOEC 之定位更加明顯，其計算公式如下：

$$\text{平均中斷值} (\% \text{ reduction}) = \frac{T}{Xc} \times Sw \sqrt{\frac{1}{nc} + \frac{1}{ni}} \times 100$$

T：查表所得（以 one-tail Dunnett's test 在顯著程度為 5% 之表格）

X_c 為控制組之平均值

S_w ：組內變異之平方根

n_c 與 n_i ：控制組與處理組重複試驗次數

3.4 NEC

毒性反應的判斷指標，除了前面提到的 NOEC 及 EC_{10} 外，還有無影響濃度(No Effect Concentrations，NEC)。NEC 主要和 NOEC 不同的地方是在於計算的方法不同，之前已提到 NOEC 是利用變數分析(ANOVA)的方法求得的，而 NEC 則是利用回歸分析(Regression analysis)之方法所求得的。

計算 NEC 主要為一非線性模式的假設，其主要是假設所觀測到的反應終點參數和濃度呈現一個簡單的線性遞減關係或者是為一指數遞減的關係，但在接近濃度為零(及控制組)時，會呈現一定值接著即開始遞減。而這些模式在統計學上的文獻中已存在很久並且有相當多的命名，例如：segmented regression, multiphase regression, regression with changepoint 以及 regression with breakpoint 等等。而使用這樣的方式求的 NEC，計算方法複雜且須有良好的統計背景基礎才會運用。因此，本研究求得方法是參考 Karsten and Narindwr 所提出的方法，利用將濃度及反應終點的參數取對數轉換後，相互作圖比較取其線性關係式後，將反應終點參數控制組的值代入，推出 NEC 的值。而此線性關係的判斷則是參考 Paulsson *et al.*,其根據兩項參考值

(1) 回歸斜率的顯著值($P < 0.05$)。

(2) 最大的 r^2 。

即可判定此迴歸為一線性關係。

第四章 材料與方法

4.1 儀器設備與使用藥劑

4.1.1 儀器設備

1. 恒溫室：

五坪大的空調控溫室，溫度保持在 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

2. 蠕動幫浦：

培養母槽使用 EYELA 公司，型號 MP-1000 之定量幫浦兩台，用以控制供應母槽之流量。

3. 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。

4. 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

5. 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。

6. 基質儲存瓶

容量約為 5 公升，直徑為 25 公分大小的血清瓶。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。

7. 連續式培養母槽：

使用體積 5 公升，直徑 18 公分之掀蓋式玻璃槽。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。

8. 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；另外再加上氣體流量計，用於控制檢測氣體流量之用，連續培養之母槽的曝氣量大約為：400 mL/min。

9. 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。

10. 曝氣桶：

曝氣設備使用體積 10 公升之純水桶。開口處嵌入一矽膠塞，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。

11. pH meter：

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

12. DO meter：

美國 YSI 公司數字型溶氧測定器 Model 5100；BOD 探頭為 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 $\pm 0.01 \text{ mg/L}$ 。

13. 毒性試驗瓶：

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

14. 震盪培養箱：

自行裝配之培養箱二組，台面可拆換，以角鋼為架構主體，長 \times 寬 \times 高為 135 \times 107 \times 90 公分，頂面履以 120 公分超高色溫燈管 (40°C, 20W) 10 支，頂面可依據光面強弱上下調整，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，機座台面分別可裝 300 mL BOD 瓶 66 座及 105 座。培養箱置於溫控室內，控制溫度在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。作為藻類批次式培養與 BOD 瓶密閉式藻類毒性試驗之用。

15. 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。

16. 電腦：

使用中央處理器為 P-3 之桌上性電腦，視窗 XP (Windows XP) 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。

17. 光度計：

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

18. 氣體鋼瓶：

購於洽隆，含 0.5% CO₂ 的高壓氮氣鋼瓶，純粹 N₂ 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。

19. 定量吸量管：

使用 SOCOREX 可調式移液器，大小為 100~1000 μL 及 1~5 mL 兩種。以及 NICHIRO, Nichipet EX, 20~200 μL、10~100 μL 以及 2~20 μL 等 3 種。

20. 分析天平：

產牌 Precisa 205A。



21. 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。

22. 烘箱：

廠牌 Memmet，做為烘乾玻璃器皿用，溫度約在 50°C 左右。

23. 無菌操作台：

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。

24. 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。

25. 分析儀器

高效能液相層析儀 (HPLC)，Waters 2996。

26. 濾紙與濾膜

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

4.1.2 使用藥劑

本研究所使用的藥劑包括分析化合物濃度用藥品、培養用營養鹽與實驗用毒性化學物質三部份。

- 
1. HPLC 用藥：Acetonitrile, 99.97% HPLC grade。用以作為移動相。
 2. 培養用營養鹽，種類詳見 4.2.1 節，純度皆高於 95%。
 3. 毒性化學物質與溶劑：七種苯醣類加上三個萘醣與九個蒽醣類共 17 個，純度皆高於 97%，購自友和，溶劑為 DMSO 二甲亞楓。

詳細化合物名稱、縮寫如下表 4.1.1

表 4.1.1 實驗用毒化物

Toxicants	縮寫	中文
9,10-anthraquinone	ATQ	9,10-蒽醌
1-hydroxyanthraquinone	1-hATQ	1-羥基-9,10-蒽醌
2-hydroxyanthraquinone	2-hATQ	2-羥基-9,10-蒽醌
1,4-dihydroxyanthraquinone	1,2-dhATQ	1,4-二羥基-9,10-蒽醌
1,2-dihydroxyanthraquinone	1,4-dhATQ	1,2-二羥基-9,10-蒽醌
1,8-dihydroxyanthraquinone	1,8-dhATQ	1,8-二羥基-9,10-蒽醌
1,2,4,-trihydroxyanthraquinone	1,2,4-triATQ	1,2,4,-三羥基-9,10-蒽醌
1,4-naphthoquinone	1,4-NAP	1,4-萘醌
2-hydroxy-naphthoquinone	2-OH-1,4-NAP	2-羥基-1,4-萘醌
Mnadione	M	甲基萘醌
1,4-benzoquinone	BQ	對苯醌
2-chloro-1,4-benzoquinone	2-Cl-BQ	2-氯對苯醌
2,5-dichloro-1,4-benzoquinone	2,5-diCl-BQ	2,5-二氯對苯醌
Tetrachloro-1,4-benzoquinone	tetraCl-BQ	四氯對苯醌
methyl-1,4-benzoquinone	CH3-BQ	甲基對苯醌
2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone	2,5-diCH3-BQ	2,5-二甲基對苯醌
Tetramethyl-1,4-benzoquinone	tetraCH3-BQ	四甲基對苯醌

4.2 實驗方法



本研究之實驗流程詳見圖 4.2.1，在實驗開始前需先培養藻類，直至藻類生長狀況達到穩定態之後，配製毒性化學物質同時進行定量分析，並取母槽中之藻類進行為期 48 小時之密閉式毒性試驗，詳細步驟分節敘述如下：

4.2.1 藻類培養

1. 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, 2006 年 8 月初。開始活化培養時，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)。通常此固態培養基可保存六個月（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），四個星期後繼續移植以保存菌種。

2. 培養基：

本研究採用 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 L。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 ± 0.10 並立即以 0.45 μm 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 NaNO₃ 於 500 mL 去離子水。
- (b) 氯化鎂貯備液：溶解 6.082 g MgCl₂ · 6H₂O 於 500 mL 去離子水。
- (c) 氯化鈣貯備液：溶解 2.205 g CaCl₂ · 2H₂O 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 H₃BO₃

0.714 mg CoCl₂ · 6H₂O

207.690 mg MnCl₂ · 4 H₂O

3.630 mg Na₂MoO₄ · 2 H₂O

1.635 mg ZnCl ₂	0.006 mg CuCl ₂ · 2H ₂ O
79.880 mg FeCl ₃ · 6H ₂ O	150 mg Na ₂ EDTA · 2H ₂ O

- (e) 硫酸鎂貯備液：溶解 7.350 g MgSO₄ · 7H₂O 於 500 mL 去離子水中。
- (f) 磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522 g K₂HPO₄ 於 500 mL 去離子水中。
- (g) 碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g NaHCO₃ 於 500 ml 去離子水中。

其中微量營養鹽貯備液中，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表 4.2.1 及表 4.2.2。最後濃度欄則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。

3. 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：母槽之曝氣管空氣流率為 480 mL/min。
- 溢流率：母槽溢流率控制在 950-1050 mL/day。

每天量測上述參數，以確保母槽中藻類的穩定度。

4. 藻類培養程序

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 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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 CO_2 之作用，另外經由曝氣裝置之進流氣體則供應 CO_2 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 $4300 \pm 10\% \text{ lux}$ 之間。

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 $0.25/\text{d}$ ），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 ($1.9 \times 10^6 \sim 2.2 \times 10^6 \text{ cells/mL}$) 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) 即可作為後續藻類毒性試驗之植種。

表 4.2.1 基質中之巨量營養鹽濃度

Chemical	Concentration (mg/l)	Element	Final conc. (mg/l)
NaNO ₃	25.5	N	4.20
		C	2.14
		Na	11.0
K ₂ HPO ₄	1.04	P	0.186
		K	0.649
MgSO ₄ -7H ₂ O	14.7	S	1.91
MgCl ₂	5.70	Mg	2.90
CaCl ₂ -2H ₂ O	4.41	Ca	1.20

表 4.2.2 基質中之微量營養鹽濃度

Chemical	concentration ($\mu\text{g/L}$)	Element	Final conc. ($\mu\text{g/L}$)
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	0.040
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	7.26	Mo	2.88
FeCl ₃	96.0	Fe	30.0
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	300		

4.2.2 藻類毒性實驗

1. 實驗前之準備：

- 玻璃器皿：

使用無磷清潔劑清洗後，以自來水沖洗數次，而後泡至 10% HCl 溶液至少 1 小時，取出後以 Na_2CO_3 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 ）。使用前面通口處封上鋁箔，然後置於設定為 1.1 kg/cm^2 ， 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。

2. 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 $0.2 \mu\text{m}$ 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。

3. 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，形成某特定量的電阻。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 $60 \mu\text{m}$ 。量測時，取 1 mL 的藻液置入 50 mL 之定量瓶內，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。

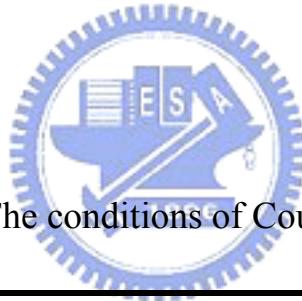


表 4.2.3 The conditions of Coulter counter

Conditions	Values
Full scale	10Ma
Polarity	+
Currents , I	100
Diameter Lower Threshold , Tl	$2.622\mu\text{m}$
Diameter Upper Threshold , Tu	$30\mu\text{m}$
Attenuation , A	1
Preset Gain	1
Alarm Threshold	OFF
Analysis amount	500ML

*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) × 50

4. 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。

5. 藻類毒性實驗步驟：

當以上準備完畢即可進行藻類毒性實驗，詳細步驟如下：

(1) 稀釋水配置

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% CO₂ 的 N₂ 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 CO₂ 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。

(2) 毒物添加

從培養母槽 (steady state 狀態) 中取出所需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，且另外再量測初始溶氧值 (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)。

每種毒物之第一次試驗需先進行 range finding 的測試，得到毒性作用的主要範圍濃度，當範圍確定後，取適當倍數配製七個濃度，再進行確定試驗。

(3) 實驗終點

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到淨溶氧值 (ΔDO)，同時利用顆粒計數器測量瓶中細胞密度扣除初始細胞密度 15000 cells/ml，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。



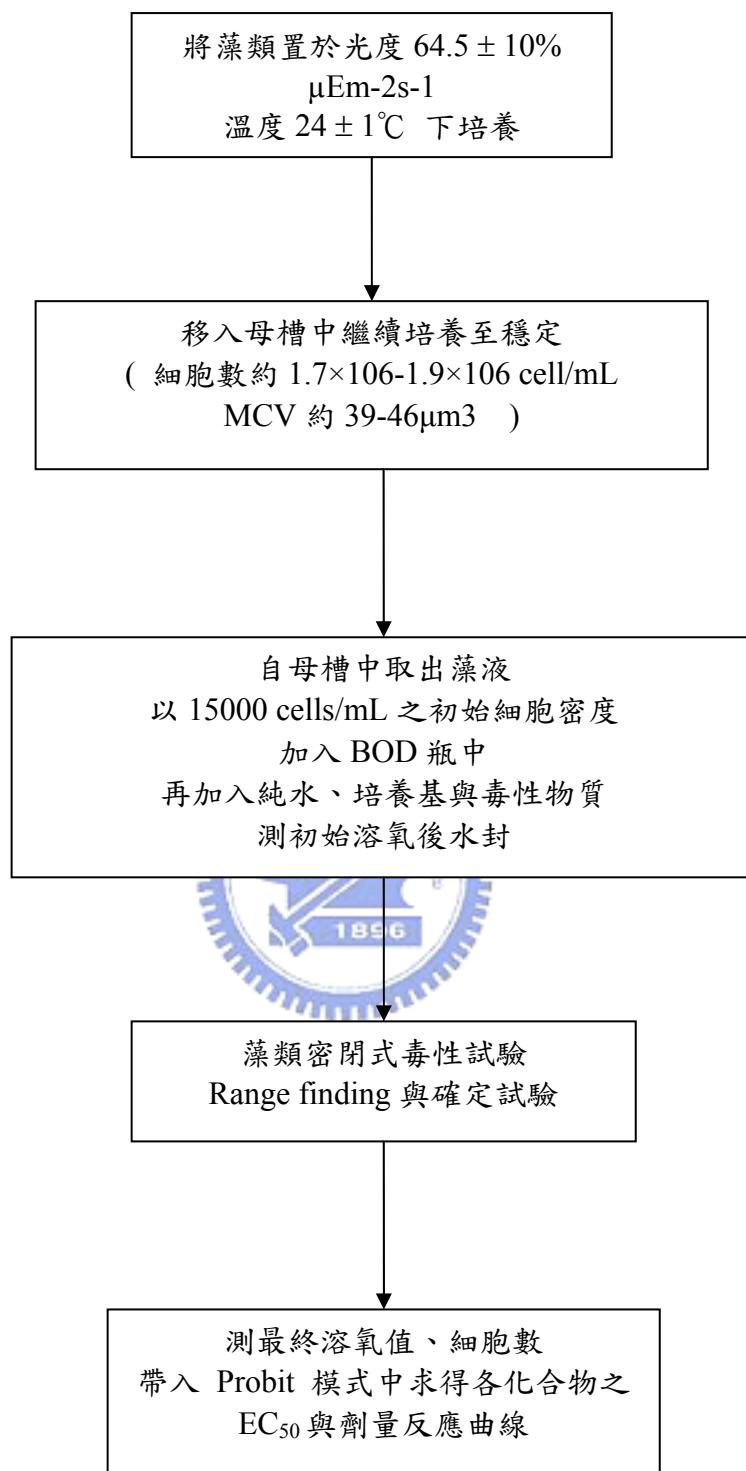


圖 4.2.1 藻類毒性實驗流程圖

4.2.3 化學物質之配製與定量

(1) 標準品之配製

以 DMSO (dimethylsulfoxide) 作為溶劑，分別對各個化合物配置五個濃度之標準品，以作為 HPLC 定量之檢量線。

(2) 儲備液 (stock solution) 之配製

實驗前取適量化合物，以 DMSO 作為溶劑，定量至 10 ml 後，倒入試管中，迅速蓋上瓶蓋封緊；為確保混合均勻，在配製完儲備液後，利用超音波震盪器使其溶解並混合均勻。

為確認 stock solution 之濃度，需將樣品進行定量分析，以 HPLC 確認此樣品之濃度 (nominal concentration)，確保實驗的準確度。

(3) 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 1 mL/min 流洗 30 分鐘直到背景訊號穩定。穩定後將紫外光偵測器打開，儀器歸零。設定操作條件：波長、量測時間 (Run time) 為 5~10 分鐘 (隨不同的分析化合物而不同)，樣品注射量為 10 μ L，mobile phase 流速為 1 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，並利用先前所建立之檢量線進一步求得樣本中所含物質之濃度。

結束測量，儀器關閉前，需用乙腈以 1 mL/min 之流速流洗 30 分鐘，觀察背景值穩定後始可關閉。待流洗完畢，關掉儀器及電腦。整個操作流程圖如圖 4.2.2。

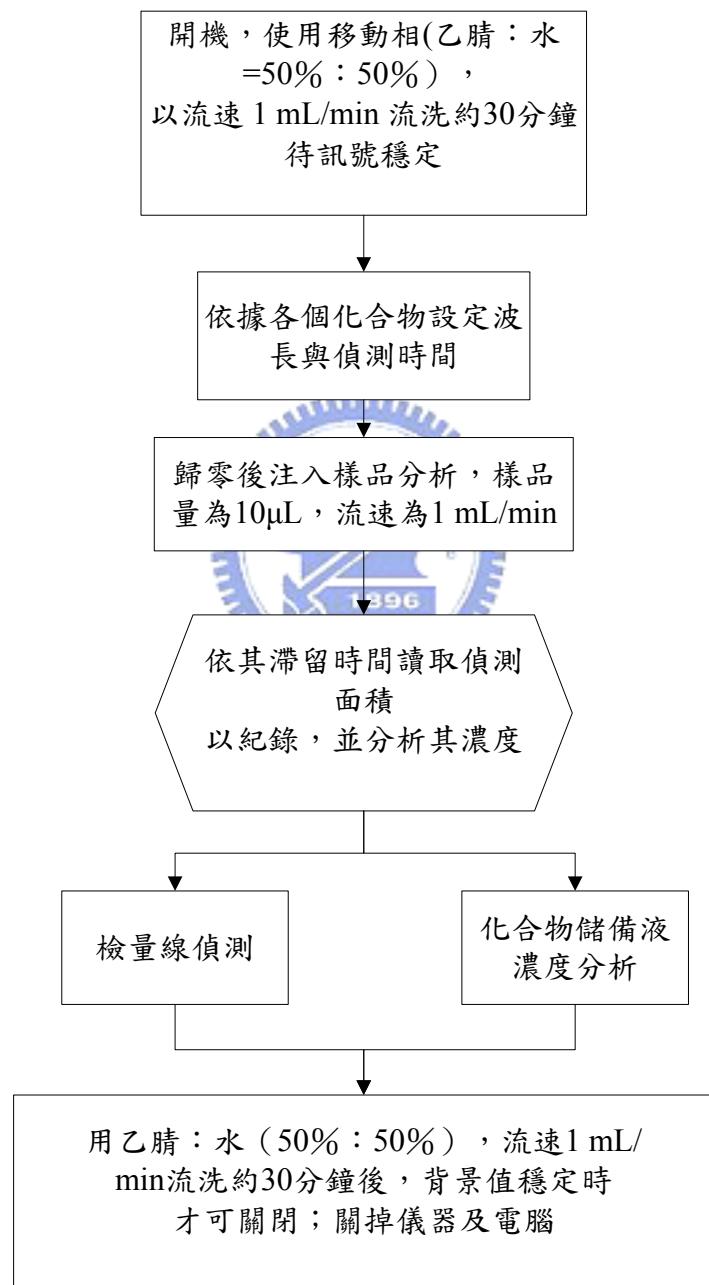


圖 4.2.2 HPLC 操作流程

4.3 實驗數據之處理

將實驗所測出之各參數值（如生長細胞數變化量及溶氧產生量）與對應之有機物濃度帶入模式中計算，得到各模式的劑量-反應曲線之斜率與截距及 EC_{50} 值；並且由圖中求得生長曲線斜率，作為日後討論。

其餘數據分析方法與原理詳見 3.2~3.4 節。



第五章 結果與討論

5.1 密閉式藻類毒性試驗結果

本研究使用批次密閉式 BOD 瓶進行 17 種醣類化合物對月芽藻之 48 小時毒性實驗，包含七種單環對苯醣，三種二環的萘醣與七種三環的蒽醣，揮發性介於半揮發性~不揮發之間，並使用三種不同的反應終點來探討對藻類的毒性，包括溶氧變化量 ($\triangle DO$)，最終細胞產率 (Final Yield ; FY) 與生長率 (Growth Rate) 三種終點，求得毒性物質的劑量反應曲線與 EC_{50} 值。每種毒物於第一次進行實驗時，需先作 range finding 進行兩重複測試，找出適當之實驗範圍後，再進行三重複之確定試驗，每次配製之化合物 stock solution 需使用高效能液相層析儀 (HPLC) 進行濃度定量。

表 5.1.1 為 1,4-對苯醣之原始毒性數據，選擇三重複之平均值呈現數據，initial DO 與 final DO 值使用溶氧測定儀分析測得，而藻細胞之顆粒數則使用顆粒計數器測得，利用數學公式求得三種終點之 μ specific、 μ relative 與抑制率，其他本研究所使用之化合物詳細毒性數據結果見附錄 1，再將抑制率與濃度帶入模式中，即可求得劑量反應曲線之截距 (A) 與斜率 (B)，依此畫出劑量反應曲線，並求出 EC_{50} 值 (本節使用 Probit 模式)，由此表可看出，隨著對苯醣濃度增加，其抑制效應越明顯，當對苯醣濃度由 0.014 mg/L 上升至 0.84 mg/L，濃度提高 60 倍時，溶氧抑制率由 5% 上升至 77%；藻細胞數抑制率則由 3% 上升至 99%；生長率的抑制由 1% 上升至 97%。

表 5.1.2 分別為三種不同反應終點利用 Probit 模式所求得之 17 種化合物的 EC_{50} 值、95% 信賴區間，有星號的代表三種測試終點中

最敏感的參數，所有 17 種醌類化合物，生長率皆為最不敏感的測試終點，以溶氧為最敏感的化合物有八種，其餘九種則以藻細胞產量為最敏感之試驗終點。圖 5.1.1~5.1.17 為 17 種醌類在三個試驗終點下之毒性試驗結果，以 probit 模式所繪出之劑量反應關係圖。

在三種不同的測試終點下毒性最強的化合物為皆為對苯醌，選擇兩個較具敏感度的測試終點溶氧與最終藻顆粒數討論如下，若以溶氧作為測試終點時，毒性順序大致如下，對苯醌毒性最強，接下來是三環的蒽醌類化合物，二環的萘醌較三環蒽醌毒性弱，其後為含有取代基的單環對苯醌類，其毒性最弱。使用 FY 作為試驗終點所得到的結果大致相去不遠，毒性順序如下： $BQ, 1,8\text{-dh-ATQ} > 1,2,4\text{-trihATQ}$, $1,4\text{-dhATQ}, 1,4\text{-NAP}, 2\text{-OH-1,4-NAP} > \text{ATQ}, 1\text{-hATQ} > 2\text{-hATQ}$, $2,5\text{-diCl-BQ} > 2\text{-Cl-BQ}, M > 1,2\text{-dhATQ} > \text{tetraCH}_3\text{-BQ} > \text{CH}_3\text{-BQ} > 2,5\text{-diCH}_3\text{-BQ} > \text{tetraCl-BQ}$ 。

5.1.1 七種單苯環醌類（對苯醌）之毒性結果討論

以最終藻細胞數目 (FY) 為試驗終點單獨討論一個苯環的七種對苯醌與其衍生物之毒性，可發現當對苯醌接上取代基後，毒性皆會降低，此特點與文獻中其他物種的毒性試驗結果相符 [16]，文獻中也提及，在化合物之酮的鄰近位置沒有取代基時較可能有烷基化作用，因此若不含取代基之對苯醌較毒，代表其毒性機制最主要為親電性機制造成的烷基化 [1, 16]。本研究所得之毒性大小順序如下： $BQ > 2,5\text{-diCl-BQ} > 2\text{-Cl-BQ} > \text{tetraCH}_3\text{-BQ} > \text{CH}_3\text{-BQ} > 2,5\text{-diCH}_3\text{-BQ} > \text{tetraCl-BQ}$ ，許多毒性試驗中，接上鹵素取代基會使毒性上升，但在本研究中對苯醌卻無此趨勢，當四個位置完全由鹵素取代基 Cl 取代時，毒性反而大幅降低，文獻中 [1] 也提到類似的情形，不過在小鼠肝細胞的毒性試驗中 [6]，含取代基之對苯醌類化合物，反而以 tetraCl-BQ 最毒，應該是四氯對苯醌對肝細胞的毒性機制不同所致。

當取代基為甲基時，結果與氯取代基相反，含四個甲基的對苯醣，其毒性最強，此結果與文獻中纖毛蟲毒性試驗 [1] 及小鼠肝細胞的毒性試驗 [6] 結果不符，在纖毛蟲的毒性試驗中，甲基越多，對纖毛蟲所造成的毒性越弱。由此可見，含甲基取代基的對苯醣，對月芽藻與對纖毛蟲所造成毒性之機制可能不同。

比較含甲基取代基與含氯取代基之對苯醣可發現，除了四個位置全取代的對苯醣以外，大致上含氯取代基之對苯醣較含甲基取代基之對苯醣毒性強，此點也與纖毛蟲毒性試驗結果相符，由於取代基氯傾向接受電子，而甲基則傾向提供電子，與氯相比，含甲基的對苯醣其親電性較低 [1]，因此所造成的毒性也較低。

5.1.2 萍醣類之毒性結果討論

三種試驗終點對三種萍醣之毒性趨勢都相同，無取代基的萍醣與含有一個氫氧取代基的萍醣毒性相差不多，而含有一個甲基的萍醣毒性稍稍減弱，這也與文獻中，甲基會降低親電性的特性相符，在酵母菌的毒性實驗中，也可發現甲萍醣與萍醣相比，對酵母菌較不毒 [3]，也就是酵母菌對其敏感度較低。

5.1.3 葵醣類之毒性討論

葵醣類化合物對月芽藻之毒性頗高，以 DO 為試驗終點時其敏感度順序為： $1,8\text{-dhATQ} > 1,4\text{-dhATQ}, 1,2,4\text{-trihATQ}, 1\text{-hATQ}, \text{ATQ} > 1,2\text{-dhATQ}, 2\text{-hATQ}$ ；而以 FY 為試驗終點時其敏感度順序為： $1,8\text{-dhATQ} > 1,4\text{-dhATQ}, 1,2,4\text{-trihATQ}, > 1\text{-hATQ}, \text{ATQ} > 2\text{-hATQ} > 1,2\text{-dhATQ}$ 。以 DO 與 FY 兩者為試驗終點時敏感度差異性小，藻類對 1,8-dhATQ 最敏感，而 2-hATQ 及 1,2-dhATQ 則敏感度較低。

毒性實驗文獻中，較少見針對葵醣類化合物及其衍生物的毒性實驗，由於此類葵醣為 PAHs 中葵之光變化產物，因此此類葵醣類化

合物較常出現於研究多環芳香族碳氫化合物之光變產物毒性的文獻中，文獻中也指出，蔥醣類化合物會影響植物之光合作用電子傳遞鏈。

討論取代基的影響，可發現，-OH 取代基對蔥醣毒性影響無法一概而論，氫氧取代基之數目及取代位置皆會影響其毒性，其 EC₅₀ 值其實相差並不大，三種測試終點下最具毒性與最不具毒性之蔥醣其 EC₅₀ 值相差都不超過 1 mg/L。

5.1.4 芬環數對毒性的影響

討論醣類芬環數對月芽藻毒性影響，可發現毒性順序為 BQ > 1,4-NAP, ATQ，毒性稍稍隨著芬環數目增多而下降，對纖毛蟲而言，毒性趨勢類似，BQ > 1,4-NAP，且 ATQ 在溶解度範圍內沒有觀測到抑制纖毛蟲的情形。大致上芬環的增加會稍稍減弱毒性。



表 5.1.1 對苯醣之毒性試驗結果原始數據

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	2.250	6.607	265367	4.357	1.436	1.000	0.000	0.000	0.000
0.860	2.470	3.453	16267	0.983	0.041	0.028	0.972	0.995	0.774
0.430	2.293	3.567	37533	1.273	0.458	0.319	0.681	0.910	0.708
0.210	2.273	3.793	64500	1.520	0.728	0.507	0.492	0.802	0.651
0.108	2.190	4.543	153533	2.353	1.162	0.809	0.190	0.447	0.460
0.054	2.277	5.413	222233	3.137	1.347	0.938	0.062	0.172	0.280
0.027	2.270	5.813	248967	3.543	1.405	0.978	0.022	0.066	0.187
0.014	2.277	6.417	256100	4.140	1.419	0.987	0.012	0.037	0.050



表 5.1.2 17 種醌類化合物之毒性試驗數據

Toxicants	DO			Final yield			Growth rate		
	EC ₅₀ (mg/L)	95% C.I.		EC ₅₀ (mg/L)	95% C.I.		EC ₅₀ (mg/L)	95% C.I.	
BQ	0.14	0.11	~	0.19	0.12*	0.10	~	0.13	0.24
2-Cl-BQ	0.31*	0.19	~	0.67	0.60	0.37	~	1.68	1.01
2,5-diCl-BQ	0.71	0.42	~	1.57	0.45*	0.26	~	0.74	1.82
tetraCl-BQ	19.45	13.89	~	29.54	3.11*	1.91	~	5.39	9.15
CH3-BQ	5.17	1.86	~	96.92	2.32*	1.25	~	5.44	10.74
2,5-diCH3-BQ	2.35*	1.46	~	5.00	2.47	2.00	~	3.10	5.02
tetraCH3-BQ	0.49*	0.42	~	0.57	1.15	0.93	~	1.43	2.40
1,4-NAP	0.36	0.24	~	0.55	0.24*	0.18	~	0.42	0.52
2-OH-1,4-NAP	0.29	0.28	~	0.35	0.20*	0.17	~	0.22	0.45
M	0.31*	0.19	~	0.67	0.60	0.37	~	1.68	1.01
ATQ	0.33*	0.17	~	0.40	0.40	0.27	~	0.47	1.29
1-hATQ	0.30*	0.27	~	0.34	0.35	0.32	~	0.39	0.63
2-hATQ	0.54	0.50	~	0.58	0.50*	0.46	~	0.55	0.89
1,2-dhATQ	0.53*	0.47	~	0.60	0.95	0.85	~	1.23	1.16
1,4-dhATQ	0.26	0.09	~	0.42	0.22*	0.14	~	0.31	0.47
1,8-dhATQ	0.16	0.12	~	0.20	0.12*	0.10	~	0.15	0.29
1,2,4-triATQ	0.27*	0.25	~	0.28	0.28	0.25	~	0.30	0.37

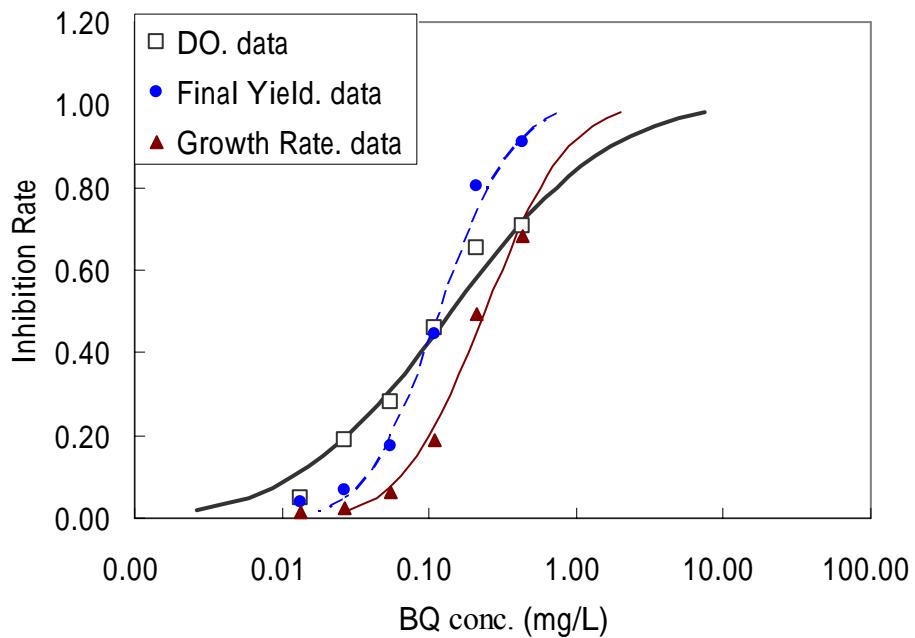


圖 5.1.1 三種試驗終點下 BQ 之劑量反應曲線

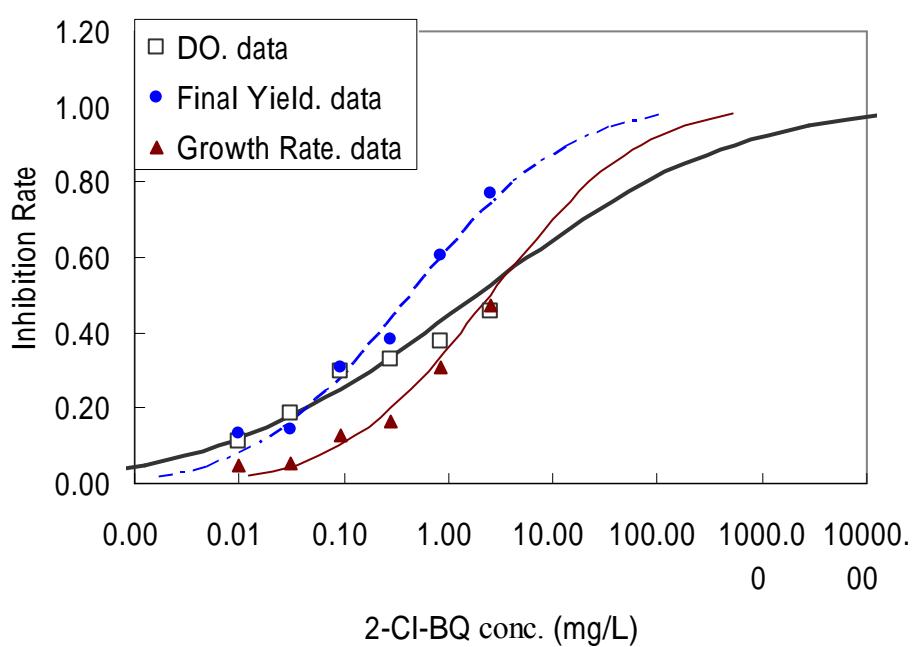


圖 5.1.2 三種試驗終點下 2-Cl-BQ 之劑量反應曲線

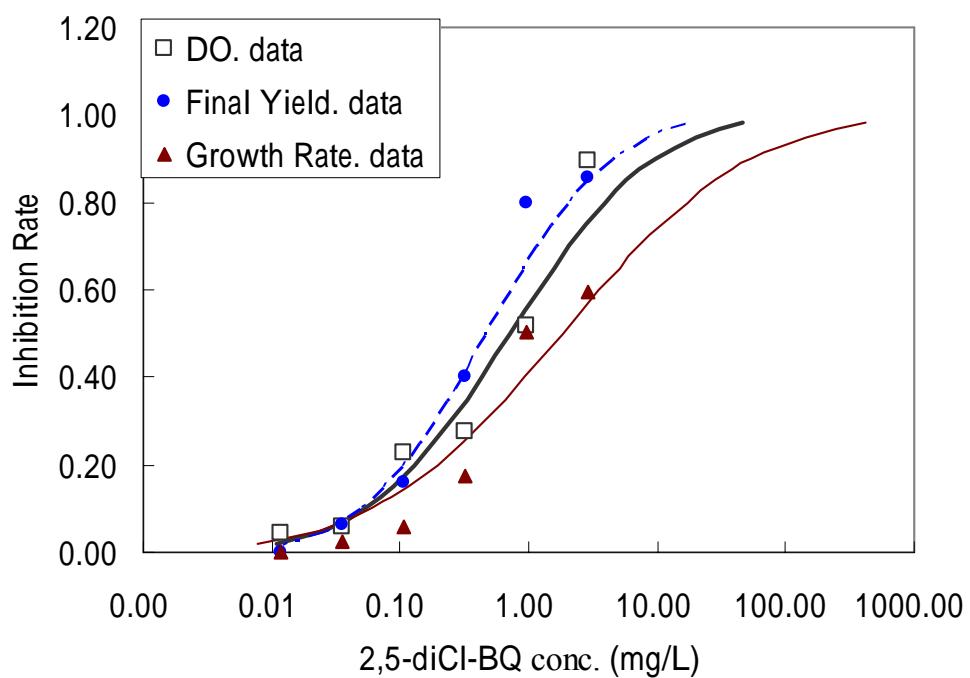


圖 5.1.3 三種試驗終點下 2,5-diCl-BQ 之劑量反應曲線

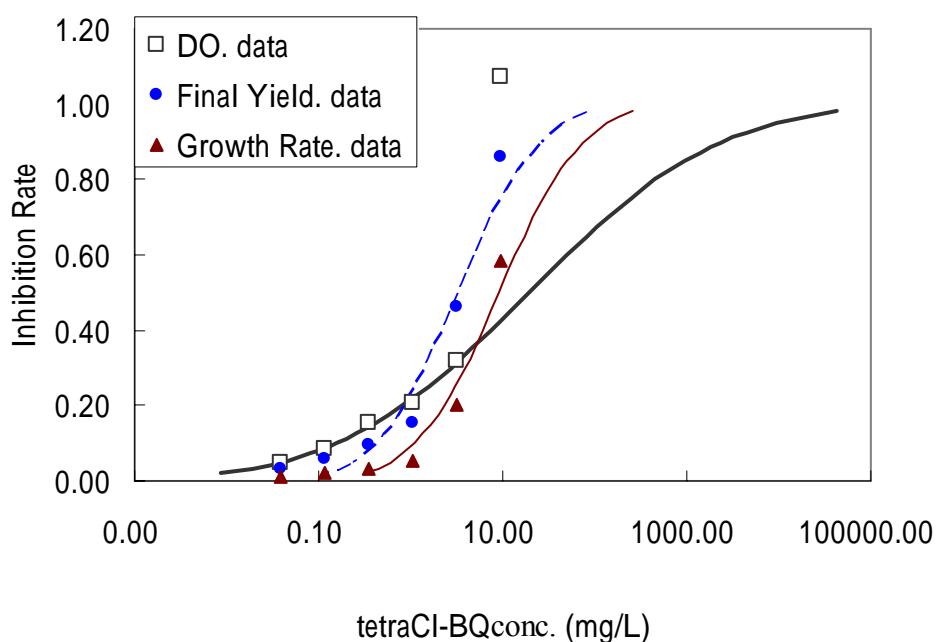


圖 5.1.4 三種試驗終點下 tetraCl-BQ 之劑量反應曲線

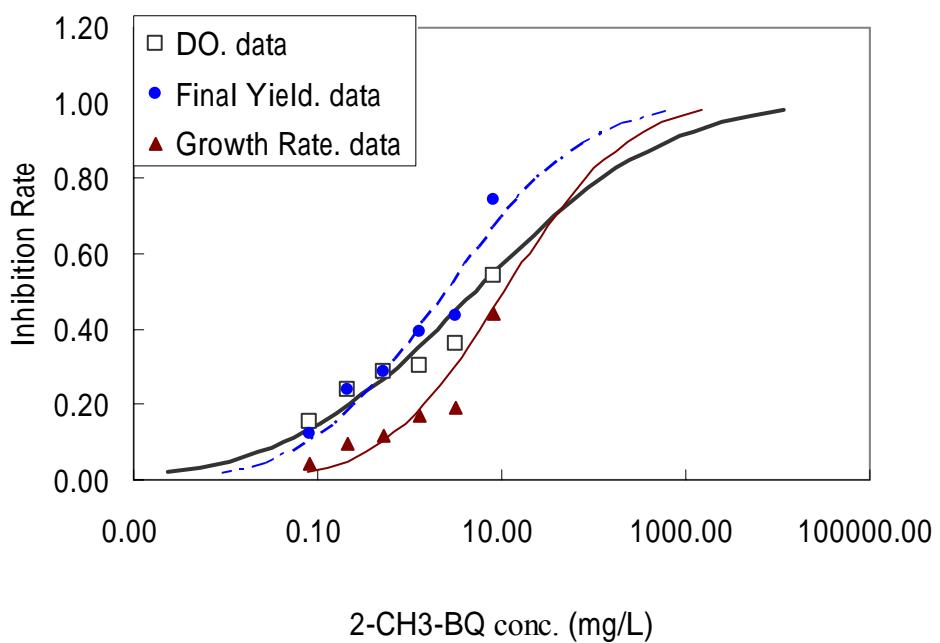


圖 5.1.5 三種試驗終點 2-CH3-BQ 之劑量反應曲線

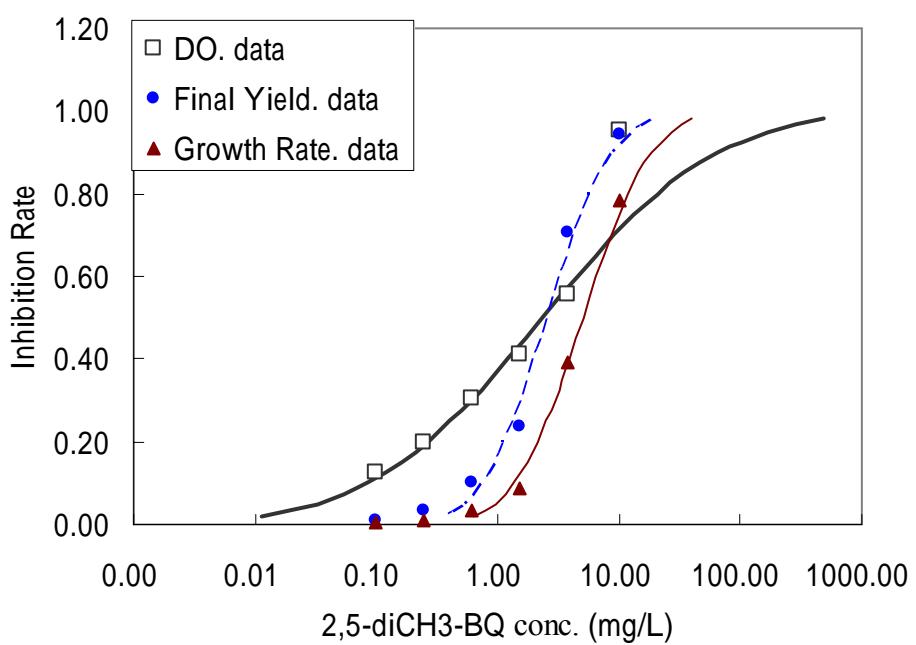


圖 5.1.6 三種試驗終點下 2,5-diCH3-BQ 之劑量反應曲線

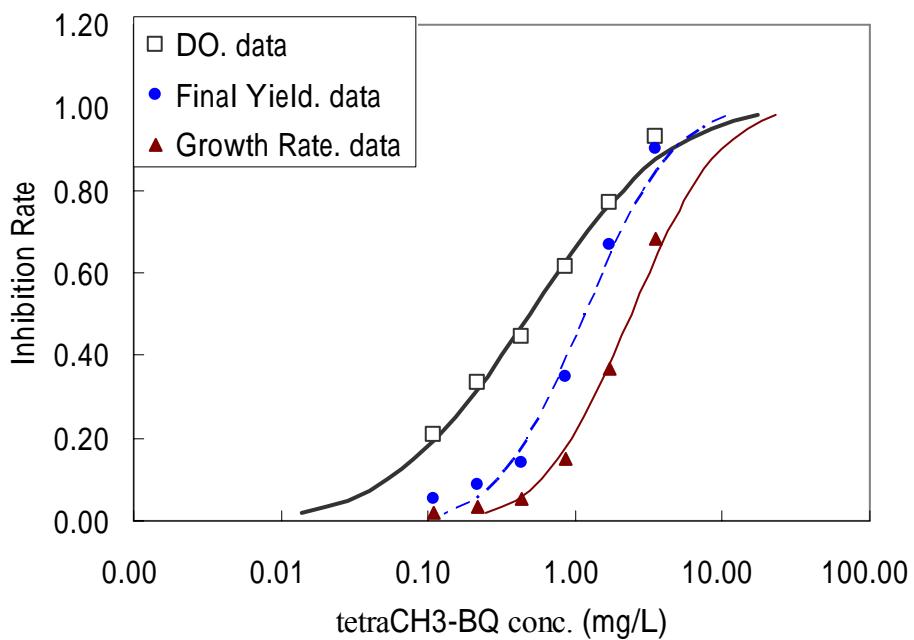


圖 5.1.7 三種試驗終點下 tetraCH3-BQ 之劑量反應曲線

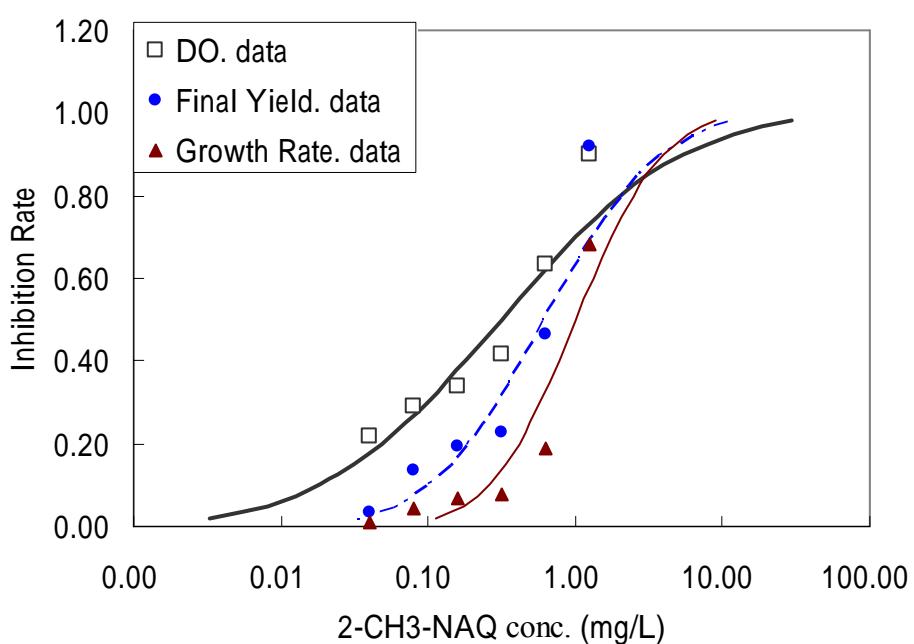


圖 5.1.8 三種試驗終點下甲萘醌之劑量反應曲線

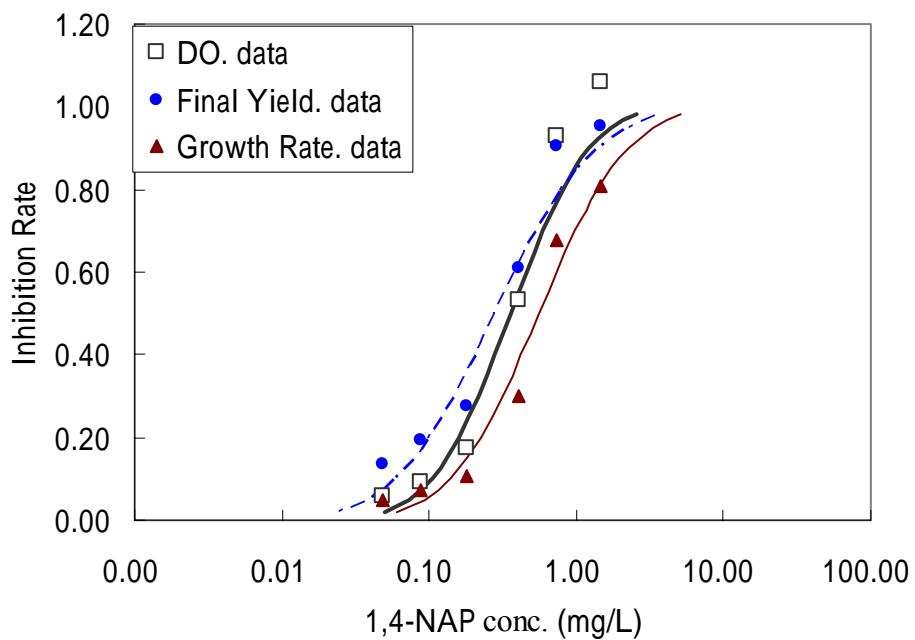


圖 5.1.9 三種試驗終點下 1,4-NAP 之劑量反應曲線

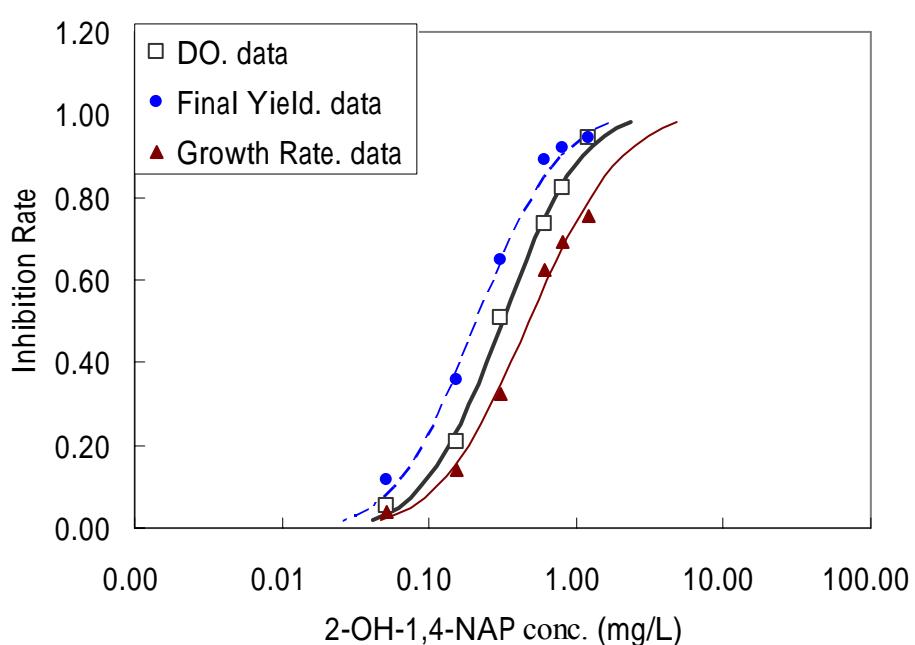


圖 5.1.10 三種試驗終點下 2-OH-1,4-Nap 之劑量反應曲線

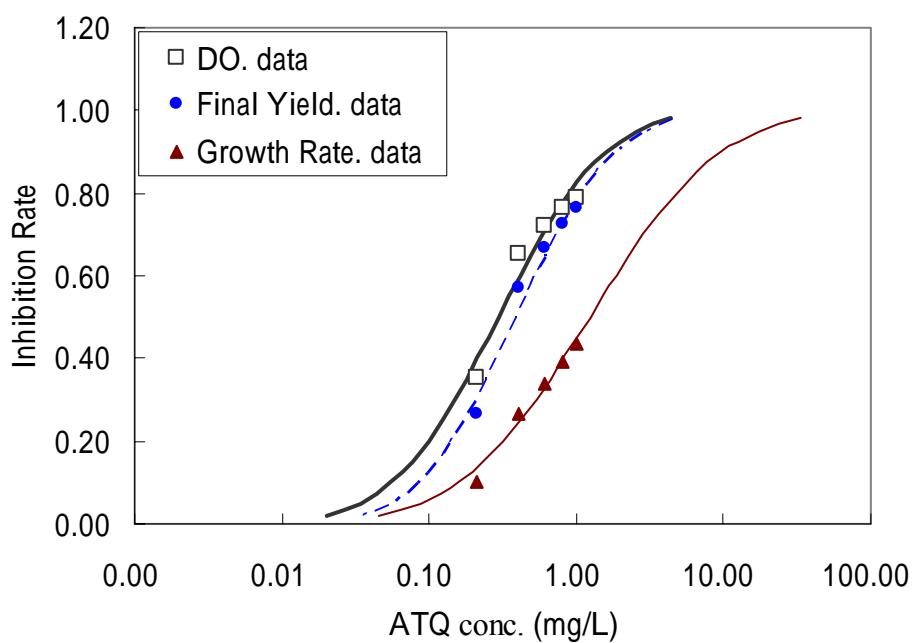


圖 5.1.11 三種試驗終點下 ATQ 之劑量反應曲線

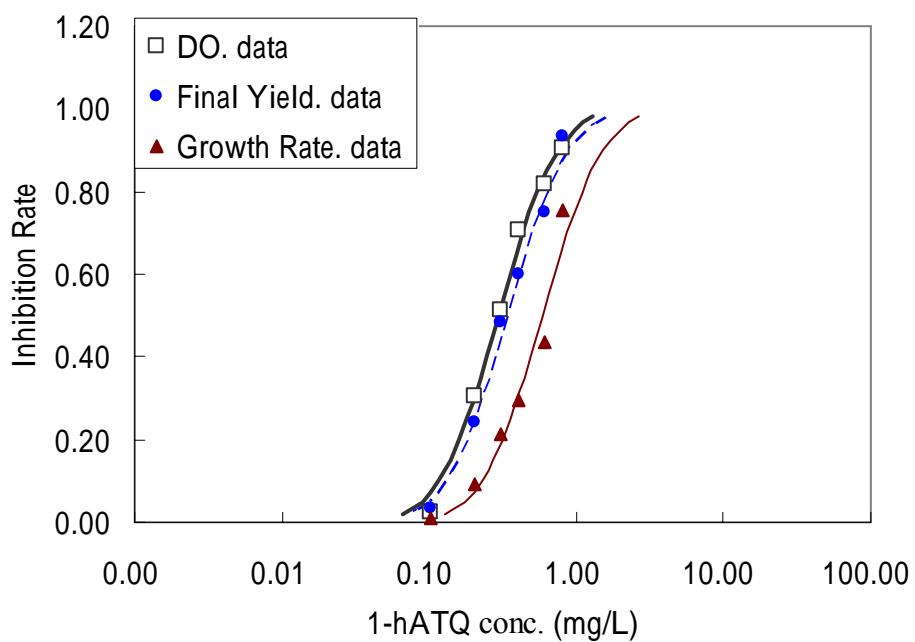


圖 5.1.12 三種試驗終點下 1-hATQ 之劑量反應曲線

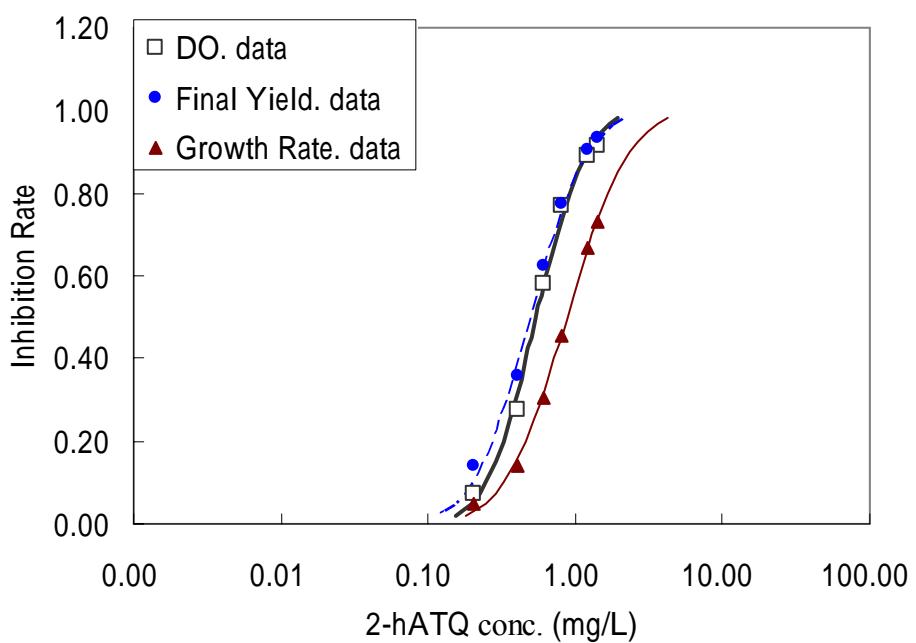


圖 5.1.13 三種試驗終點下 2-hATQ 之劑量反應曲線

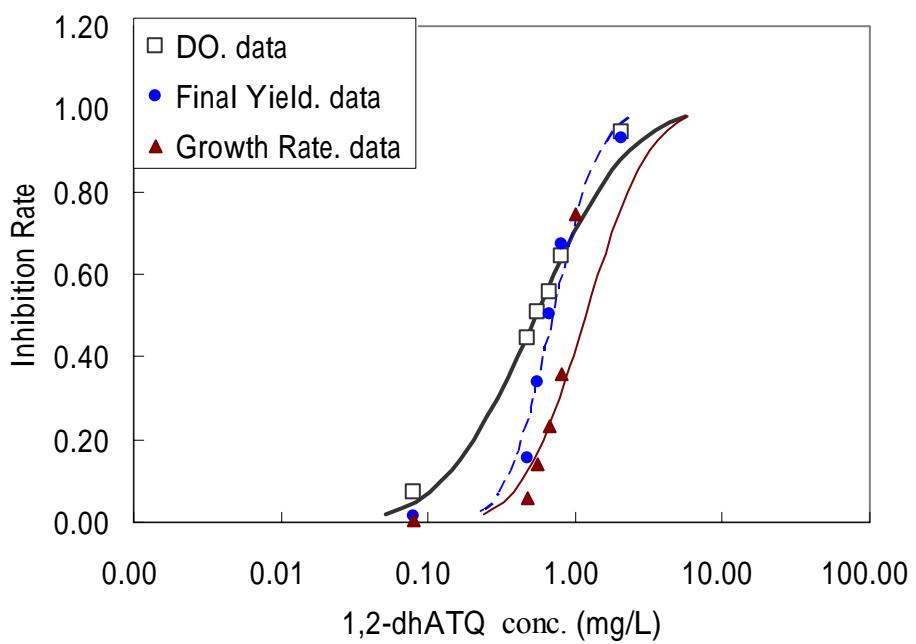


圖 5.1.14 三種試驗終點下 1,2-dhATQ 之劑量反應曲線

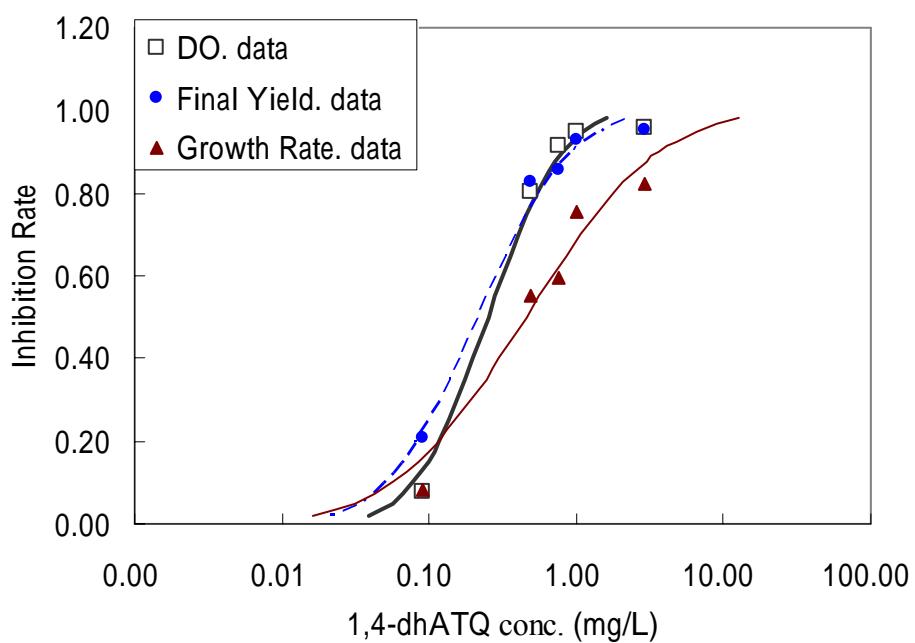


圖 5.1.15 三種試驗終點下 1,4-dhATQ 之劑量反應曲線

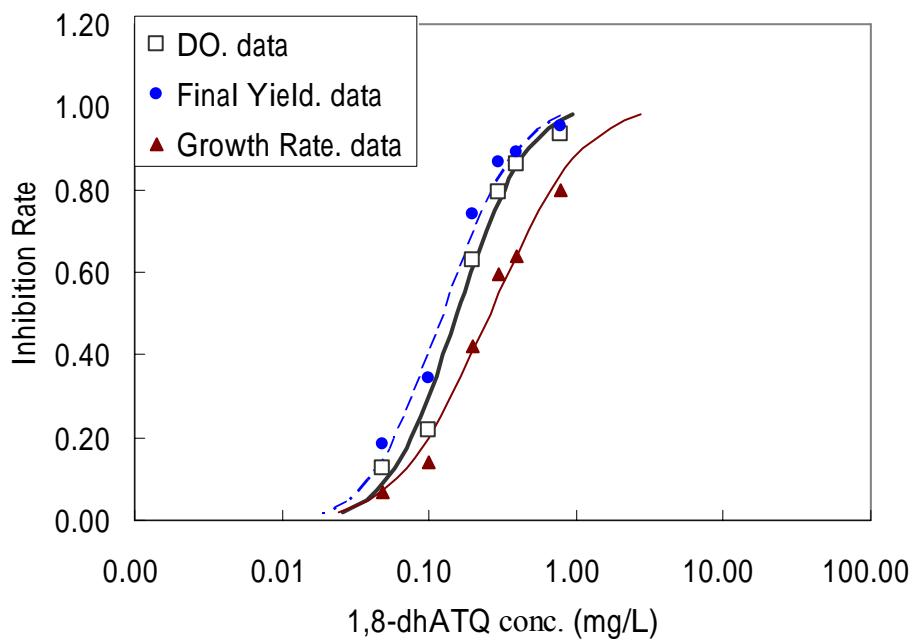


圖 5.1.16 三種試驗終點下 1,8-dhATQ 之劑量反應曲線

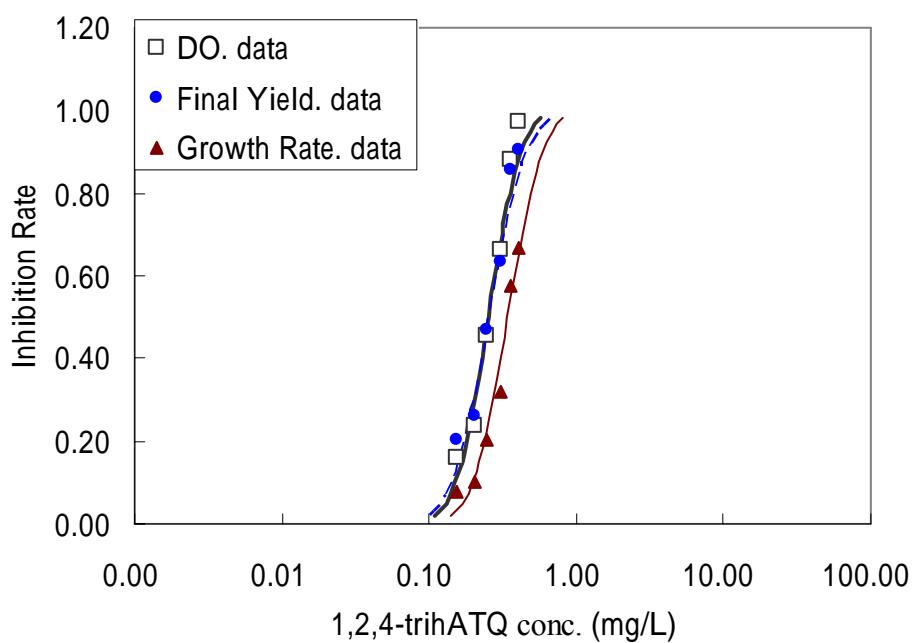


圖 5.1.17 三種試驗終點下 1,2,4-trihATQ 之劑量反應曲線



5.2 最佳化模式比較

毒性試驗所求得之 EC 或是 LC 值，皆是使用不同的數學模式轉換而得，以便了解受測物種對毒性化學物質之敏感度，而一般常用於毒理學的數學模式有三種，分別為 Probit、Logit 與 Weibull 三種，主要原因是因為此三種模式所求出之 EC_{50} 較穩定的關係，分析所得之值差異較小，故較具代表性。

根據分析模式的不同，計算求得之結果也會不同，雖然上述三種模式所求得之 EC_{50} 差異小，但在計算毒物之低影響濃度時，由於模式之間的差異性與信賴區間變大，求得的低影響濃度值差距也會變大，因此需要做最佳化模式的分析，經由三種模式所分析求得之 EC_{50} 進行 G-test，(Goodness of fit)，來做最佳化選擇，求出最佳計算模式後，利用此最佳化模式求出低影響濃度值 (EC_{10})。G-test 是將重複試驗之每一處理組與期望值之誤差比較，所求得絕對值最小的 G 值，即為最適合的模式。

表 5.2.1~5.2.3 為三種反應終點之 G-test 分析結果，三種參數中， ΔDO 與 growth rate 皆以 Weibull 最適用的佔了較多數，比率佔了 17 種化合物中的 47.36% 與 36.84%。而 Final Yield 則以 Logit 為最適合的模式，佔了 52.63%。以溶氧為終點之數據中有幾筆 Logit 模式之 G 值無法計算，這是由於某些醣類化合物在高濃度時可能會與水中溶氧作用，消耗溶氧，導致 ΔDO 在高濃度時呈現負值，此時無法求得 Logit 模式之 G 值。

表 5.2.1 以溶氧為終點的三種模式之 G 值

Toxicants	G of probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
ATQ	2.887	1.836	-4.044	L
1-hATQ	-16.281	-17.457	-33.762	P
2-hATQ	2.201	-0.639	-32.590	L
1,2-dhATQ	50.861	50.668	2.844	W
1,4-dhATQ	1.019	-3.575	695.275	P
1,8-dhATQ	1.591	-0.07	-31.212	L
1,2,4-trihATQ	109.741	107.486	45.916	W
1,4-NAP	18.898	16.350	-22.739	L
2-OH-1,4-NAP	1102.175	1043.337	908.157	W
BQ	57.45	43.87	-17.53	W
2-Cl-BQ	350.35	178.58	77.68	W
2,5-diCl-BQ	284.86	-	158.33	W
tetraCl-BQ	1025.27	-	1065.89	P
CH3-BQ	155.35	170.61	84.12	W
2,5-diCH3-BQ	565.53	513.67	405.64	W
tetraCH3-BQ	82.73	-	31.85	W
M	910	-	934	P

Best fit: Weibull , 47.36%

表 5.2.2 以 final yield 為終點的三種模式之 G 值

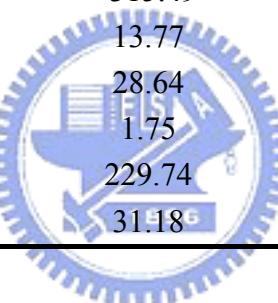
Toxicants	G of probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
ATQ	-95.302	-97.040	-102.702	P
1-hATQ	-89.955	-88.246	-119.989	L
2-hATQ	-102.310	-97.31	-131.164	L
1,2-dhATQ	-75.03	-100.249	-142.98	P
1,4-dhATQ	-147.587	-149.667	-153.584	P
1,8-dhATQ	-127.651	-125.944	-144.399	L
1,2,4-trihATQ	-56.874	-46.064	-93.034	L
1,4-NAP	-21.349	-8.290	-82.648	L
2-OH-1,4-NAP	-94.586	-90.421	-127.089	L
BQ	-63.04	-68.38	-125.26	P
2-Cl-BQ	-100.98	-92.78	-113.80	L
2,5-diCl-BQ	-59.49	255.66	-139.77	P
tetraCl-BQ	22.39	6.56	-58.22	L
CH3-BQ	-49.29	-40.51	-97.48	L
2,5-diCH3-BQ	-89.19	-82.10	-117.70	L
tetraCH3-BQ	46.45	-169.83	-159.53	P
M	123.20	141.78	-4.34	W

Best fit: Logit , 52.63%

表 5.2.3 以 growth rate 為終點的三種模式之 G 值

Toxicants	G of probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
ATQ	-4.801	-8.015	-10.576	P
1-hATQ	33.861	30.321	6.817	W
2-hATQ	12.234	4.950	9.823	L
1,2-dhATQ	-13.737	-29.911	-43.95	P
1,4-dhATQ	-12.063	-16.392	46.266	P
1,8-dhATQ	-14.854	-23.271	-49.574	P
1,2,4-trihATQ	26.246	21.529	6.260	W
1,4-NAP	42.263	32.233	-12.841	W
2-OH-1,4-NAP	11.015	2.454	-19.445	L
BQ	57.45	43.87	-17.53	W
2-Cl-BQ	7.24	14.14	8.21	P
2,5-diCl-BQ	-301.38	-315.49	-336.67	P
tetraCl-BQ	39.98	13.77	-24	L
CH3-BQ	35.84	28.64	13.39	W
2,5-diCH3-BQ	9.16	1.75	-28.84	L
tetraCH3-BQ	235.04	229.74	-41.22	W
M	53.40	31.18	-30.55	W

Best fit: Weibull , 36.84%



5.3 低濃度影響之比較

5.3.1 NOEC、EC₁₀ 與 NEC

在低濃度影響之毒性比較，使用幾種不同的參數來探討化合物之低濃度抑制值，分別為 NEC (No Effect Concentration)、NOEC (No Observed Effect Concentration) 、 LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) 與 EC₁₀ (Effect Concentration)。NEC 是使用回歸分析法求得；而其中 NOEC 與 LOEC 是使用 Dunnett's test，找出處理組與控制組的實驗結果是否存在統計上之顯著差異，與實驗濃度之取決、重複組數量有關係，當重複組間差異小時，與處理組間之差距會較顯著；EC₁₀ 則是選擇上一節中最佳之模式所求得的值來討論。

表 5.3.1 為三種試驗終點之 NEC 值，代表在自然環境中，生物體對化學物質可容忍或是可抵抗毒性物質的最高限度。由迴歸分析所得之 NEC 值，其 P 值須 < 0.05 才具有統計上的可靠度。以溶氧為測試終點時，有四種毒物在高濃度時，會消耗溶氧，導致 ΔDO 值出現負值，因此影響 NEC 值的計算，得不到 NEC 值，因此 ΔDO 可能較不適用於此 NEC 的分析。而其餘所有化合物的毒性數據計算所得之 NEC 結果，其 P 值皆 < 0.05 ，因此都具有統計上的可信度。

表 5.3.2 為三個試驗終點下之不同的低濃度抑制值，包含 NOEC、LOEC、EC₁₀、NEC，NOEC 值與化合物實驗濃度取決有很大的關係，三種終點中， ΔDO 與 Final Yield 皆有八種毒物是求不出 NOEC 值，只能以 " $<$ " 來表示，這些佔了 17 種醣類之 47% 左右，而 Growth Rate 則有六種無法求出 NOEC，約佔了 35.29%，可見 DO 與 FY 是比較敏感的參數，以 NOEC 為依據比較 DO 與 FY 低濃度之敏感性時，可發現有三種醣類 ΔDO 較 Final Yield 敏感，另外兩種則以 FY 較敏感，將其餘 12 種使用 EC₁₀ 為依據來比較，

發現有六種以 DO 最敏感，五種以 FY 較敏感，其餘化合物再就 NEC 值討論找出敏感度較佳之參數。由此排出敏感度較高的反應終點作為後續低濃度抑制參數的比較討論用。

表 5.3.3 選用較具敏感性之反應終點，討論各種低濃度抑制參數 NEC、EC₁₀ 與 NOEC 之間的相互關係，空白欄位為求不出 NEC，EC₁₀/NOEC 值 >1 的組數有十組，平均值為 1.345，NEC/EC₁₀ >1 的為十組，平均值為 2.448，NEC/NOEC 則有九組大於一，平均值為 3.182，由此可見，低抑制濃度之三種參數敏感度排名為 NOEC > EC₁₀ > NEC。



表 5.3.1 三種試驗終點之 NEC 值

Toxicants	DO		FY		GR	
	NEC	P	NEC	P	NEC	P
ATQ	0.113	0.001	0.130	0.0002	0.152	0.000007
1-hATQ	0.185	0.002	0.200	0.008	0.183	0.036
2-hATQ	0.346	0.002	0.315	0.001	0.389	0.006
1,2-dhATQ	0.372	0.039	0.405	0.044	0.473	0.077
1,4-dhATQ	0.077	0.007	0.053	0.006	0.085	0.004
1,8-dhATQ	0.085	0.00086	0.057	0.00035	0.086	0.001
1,2,4-trihATQ	0.257	0.022	0.196	0.0064	0.219	0.015
1,4-NAP	-	-	0.131	0.005	0.172	0.013
2-OH-1,4-NAP	0.143	0.012	0.094	0.001	0.127	0.004
BQ	0.019	0.00003	0.0370	0.001	0.0522	0.026
2-Cl-BQ	0.030	0.042	0.035	0.002	0.056	0.002
2,5-diCl-BQ	0.360	0.00007	0.323	0.00007	0.378	0.001
tetraCl-BQ	-	-	0.230	0.008	0.286	0.013
CH3-BQ	0.253	0.039	0.120	0.005	0.299	0.014
2,5-diCH3-BQ	-	-	0.454	0.003	0.565	0.011
tetraCH3-BQ	-	-	0.299	0.008	0.364	0.013
M	-	-	0.118	0.008	0.140	0.015

Unit:mg/L

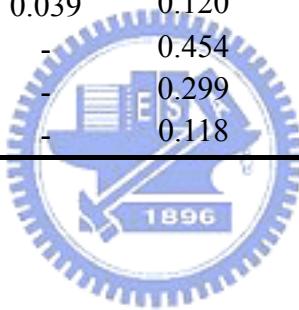


表 5.3.2 三個不同參數下之低濃度抑制值

Toxicants	DO				FY				GR			
	NOEC	LOEC	EC ₁₀	NEC	NOEC	LOEC	EC ₁₀	NEC	NOEC	LOEC	EC ₁₀	NEC
ATQ	<0.229	0.229	0.055	0.113	<0.229	0.229	0.084	0.130	<0.229	0.229	0.165	0.152
1-hATQ	0.110	0.220	0.125	0.185	0.110	0.220	0.121	0.200	0.110	0.220	0.228	0.183
2-hATQ	<0.206	0.206	0.248	0.346	<0.206	0.206	0.188	0.315	<0.206	0.206	0.318	0.389
1,2-dhATQ	<0.079	0.079	0.099	0.372	0.079	0.475	0.326	0.405	0.079	0.475	0.427	0.473
1,4-dhATQ	<0.094	0.094	0.082	0.077	<0.094	0.094	0.051	0.053	<0.094	0.094	0.058	0.085
1,8-dhATQ	<0.050	0.050	0.052	0.085	<0.050	0.050	0.031	0.057	<0.050	0.050	0.060	0.086
1,2,4-trihATQ	<0.164	0.164	0.151	0.257	<0.164	0.164	0.146	0.196	<0.164	0.164	0.209	0.219
1,4-NAP	0.046	0.084	0.169	-	<0.046	0.046	0.075	0.131	0.046	0.084	0.137	0.172
2-OH-1,4-NAP	0.048	0.145	0.081	0.143	0.048	0.145	0.065	0.094	0.048	0.145	0.073	0.127
BQ	0.014	0.027	0.005	0.019	0.014	0.027	0.036	0.0370	0.027	0.054	0.049	0.0522
2-Cl-BQ	0.01	0.031	0.005	0.030	<0.01	0.01	0.012	0.035	0.031	0.093	0.090	0.056
2,5-diCl-BQ	0.035	0.106	0.048	0.360	0.035	0.106	0.048	0.323	0.106	0.318	0.061	0.378
tetraCl-BQ	0.117	0.35	0.158	-	0.117	0.35	0.446	0.230	1.05	3.149	1.163	0.286
CH3-BQ	<0.083	0.083	0.036	0.253	<0.083	0.083	0.061	0.120	<0.083	0.083	0.499	0.299
2,5-diCH3-BQ	0.098	0.246	0.085	-	0.246	0.614	0.757	0.454	0.614	1.535	1.385	0.565
tetraCH3-BQ	<0.109	0.109	0.030	-	0.109	0.217	0.288	0.299	0.434	0.868	0.347	0.364
M	0.040	0.079	0.018	-	0.040	0.079	0.095	0.118	0.079	0.158	0.217	0.140

Unit: mg/L

表 5.3.3 NEC、EC₁₀ 與 NOEC

Most sensitivity endpoint		NOEC	LOEC	EC ₁₀	NEC	EC ₁₀ /NOEC	NEC/NOEC	NEC/EC ₁₀
ATQ	DO	<0.229	0.229	0.055 ^L	0.113	>0.240	>0.493	2.054
1-hATQ	DO	0.110	0.220	0.125 ^P	0.185	1.136	1.681	1.48
2-hATQ	FY	<0.206	0.206	0.188 ^L	0.315	>0.913	>1.529	1.676
1,2-dhATQ	DO	<0.079	0.079	0.099 ^W	0.372	>1.253	>4.709	3.758
1,4-dhATQ	FY	<0.094	0.094	0.051 ^P	0.053	>0.542	>0.564	1.039
1,8-dhATQ	DO	<0.050	0.050	0.057 ^L	0.031	>1.140	>0.62	0.544
1,2,4-trihATQ	DO	<0.164	0.164	0.196 ^L	0.146	>1.195	>0.890	0.745
1,4-NAP	DO	<0.046	0.046	0.131 ^L	0.075	>2.848	>1.630	0.573
2-OH-1,4-NAP	DO	0.048	0.145	0.094 ^L	0.065	1.958	1.354	0.691
BQ	DO	0.014	0.027	0.005 ^W	0.0190	0.357	0.703	3.8
2-Cl-BQ	FY	<0.01	0.01	0.012 ^L	0.035	>1.2	>3.5	2.917
2,5-diCl-BQ	FY	0.035	0.106	0.048 ^P	0.323	1.371	9.22	6.729
tetraCl-BQ	DO	0.117	0.35	0.158 ^P	-	1.350	-	-
CH3-BQ	DO	<0.083	0.083	0.036 ^W	0.253	>0.434	>3.048	7.027
2,5-diCH3-BQ	DO	0.098	0.246	0.085 ^W	-	0.867	-	-
tetraCH3-BQ	DO	<0.109	0.109	0.030 ^W	-	>0.275	-	-
M	FY	0.040	0.079	0.095 ^W	0.118	2.375	2.950	1.242

Unit:mg/L

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

5.3.2 中斷值 (Cut-off value)

為了深入比較 EC_{10} 與 NOEC，本章節使用中斷值 cut-off value，來了解 EC_{10} 與 NOEC 的嚴謹度，利用三種重要的統計參數， Sw 、 F ratio 與 cut-off value 來討論。

表 5.3.4 為三種試驗終點下的 Sw 、 F ratio 與 cut-off value 值，三種統計參數之意義如下： Sw 代表實驗的組內變異的平方根，在此指重複組間的變異情形； F ratio 代表組間變異與組內變異的比值，在此表示重複組組內差異性與不同處理組之間差異性的比；而 cut-off value 則是一個用來方便判斷的中斷值，此值與 Sw 成比例關係，且介於 NOEC 與 LOEC 之間，但大於 NOEC。由於三種測試終點的單位皆不同，導致無法直接使用 F ratio 與 Sw 來判斷，為了方便比較在不同試驗終點下的情形，因而使用 cut-off value 來討論，較小的中斷值代表重複組內的變異較小，此實驗的精確度也較高，當中斷值小於 10% 時，選擇 NOEC 會比選擇 EC_{10} 來的好，因為 NOEC 所造成的抑制率會比 EC_{10} 所造成的 10% 抑制率還低，因此能提供的保護較佳。

表 5.3.4 得到以 ΔDO 、Final Yield 與 Growth rate 為試驗終點的中斷值平均為 7.14、6.96 與 5.37。本研究中，以 ΔDO 與 Final Yield 為終點所得到中斷值小於 10% 的佔了 88.2%，兩個終點各自都只有兩個化合物之中斷值大於 10%，以 Growth rate 為試驗終點時，所有的化合物中斷值皆小於 10%。由此可知，本研究中，使用 NOEC 值比使用 EC_{10} 所能提供的保護標準較佳。

表 5.3.4 三種試驗終點之統計參數

Toxicant	DO			FY			GR		
	Sw	F ration	Cut-off value	Sw	F ration	Cut-off value	Sw	F ration	Cut-off value
ATQ	0.21	106.92	6.22	15738.65	202.87	10.22	0.06	229.95	7.67
1-hATQ	0.15	637.52	4.33	4180.38	1054.55	3.49	0.02	1254.23	3.45
2-hATQ	0.09	2407.88	2.56	3306.73	1858.65	2.73	0.03	236.12	4.00
1,2-dhATQ	0.13	468.44	4.78	4944.19	675.93	4.44	0.02	892.48	3.31
1,4-dhATQ	0.22	646.36	5.36	21408.51	39.35	20.5	0.03	746.51	4.41
1,8-dhATQ	0.08	2980.06	2.29	3277.51	1684.73	2.68	0.03	647.92	4.17
1,2,4-trihATQ	0.24	270.14	7.29	4135.01	887.4	3.39	0.02	835.27	3.14
1,4-NAP	0.13	1658.53	3.97	3845.63	1450.03	3.27	0.04	483.4	5.48
2-OH-1,4-NAP	0.12	1354.13	3.58	11989.12	185.91	8.7	0.05	250.93	7
BQ	0.17	161.84	8.03	7185.47	617.42	5.73	0.03	1439.2	3.73
2-Cl-BQ	0.33	496.61	7.42	8832.87	145.63	8.65	0.05	383.48	7.10
2,5-diCl-BQ	0.5	34.27	25.18	10003.31	197.19	9.5	0.05	175.93	7.94
tetraCl-BQ	0.23	221.31	11.68	9622.02	268.41	7.92	0.04	278.80	6.03
CH3-BQ	0.13	220.89	6.17	6581.72	219.34	6.42	0.02	437.19	3.93
2,5-diCH3-BQ	0.21	211.35	9.84	9563.08	321.67	8.31	0.05	379.36	7.22
tetraCH3-BQ	12.51	4.38	6.57	4418.90	984.12	4.38	0.04	411.98	6.57
M	15.4	7.94	6.14	11906.56	276.24	7.94	0.04	377.71	6.14
AVE	1.81	699.33	7.14	8290.57	651.14	6.96	0.036	556.50	5.37

Sw : Variation between columns

F ration: The ration of variation within columns to variation between columns

5.4 急慢毒性比

由於慢毒性試驗所需要的時間長、耗費的成本於人力也較急毒性試驗多出許多，因此，在環境毒物學上經常使用及慢毒性比，ACR (Acute and Chronic Ratio)，使用急毒性實驗結果來推估化合物慢毒性的影响。ACR 的計算可使用生物的急毒性結果除以慢毒性結果而得，計算公式如下：

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

慢毒性結果可以使用 NOEC 或是 LOEC 值來帶入，由於本研究中有些醣類之 NOEC 值並沒有求出來，因此改用 LOEC 來代替 NOEC，同時也使用 EC₁₀、NEC 來當作慢毒性指標，比較 ACR 值，詳見表 5.4.1。

使用 LOEC 所求出之 ACR 值，17 種化合物在三種測試終點下之 ACR 平均值分別為 10.809、8.427 與 11.96，平均值之間差異不大，大部分都介於 1~12 之間，不過有幾組 ACR 特別高，tetraCl-BQ、2-Cl-BQ 與 CH3-BQ，使用 EC₁₀ 時，tetraCl-BQ、CH3-BQ 求出之 ACR 值也是偏高的，可能由於實驗不嚴謹導致。

觀測終點為 DO 時，使用以 EC₁₀ 為慢毒性指標所得之 ACR 值相較於其他參數來的高，但因為其中有五種醣類在高濃度時會出現消耗氧氣的情形，因此會影響使用溶氧產量為觀測終點的敏感度，DO 可能較不適用作為會與氧氣反應之化合物的毒性試驗終點。不考慮這組 ACR 的話，可以發現其餘的 ACR 平均值都接近 10，因此可以考慮使用 15 來作為慢毒性比值。

表 5.4.1 各種慢毒性參數之 ACR

Toxicants	DO			FY			GR		
	EC50/LOEC	EC50/EC10	EC50/NEC	EC50/LOEC	EC50/EC10	EC50/NEC	EC50/LOEC	EC50/EC10	EC50/NEC
ATQ	1.441	6.000	2.920	1.747	4.762	3.077	5.633	7.818	8.487
1-hATQ	1.364	2.400	1.622	1.591	2.892	1.750	2.864	2.763	3.443
2-hATQ	2.621	2.177	1.561	2.427	2.660	1.587	4.320	2.799	2.288
1,2-dhATQ	6.709	5.354	1.425	2.000	2.914	2.346	2.442	2.717	2.452
1,4-dhATQ	2.766	3.171	3.377	2.340	4.314	4.151	5.000	8.103	5.529
1,8-dhATQ	3.200	3.077	1.882	2.400	3.871	2.105	5.800	4.833	3.372
1,2,4-trihATQ	1.646	1.789	1.051	1.707	1.918	1.429	2.256	1.771	1.689
1,4-NAP	4.286	2.130	-	5.217	3.200	1.832	6.190	3.796	3.023
2-OH-1,4-NAP	2.000	3.580	2.028	1.379	3.077	2.128	3.103	6.164	3.543
BQ	5.185	28.00	7.368	4.444	3.333	3.243	4.444	4.898	4.598
2-Cl-BQ	10	62.00	10.33	60.00	50.00	17.14	10.86	11.22	18.04
2,5-diCl-BQ	6.698	14.79	1.972	4.245	9.375	1.393	5.723	29.84	4.815
tetraCl-BQ	55.57	123.1	-	8.886	6.973	13.52	2.906	7.868	31.99
CH3-BQ	62.29	143.6	20.43	27.95	38.03	19.33	129.4	21.52	35.92
2,5-diCH3-BQ	9.553	27.64	-	4.023	3.263	5.441	3.270	3.625	8.885
tetraCH3-BQ	4.495	16.33	-	5.300	3.993	3.846	2.765	6.916	6.593
M	3.924	17.22	-	7.594	6.316	5.085	6.392	4.654	7.214
AVE.	10.81	27.20	4.664	8.427	8.876	5.259	11.96	7.724	8.934

5.5 QSAR 分析結果

本研究參考選取文獻上常用之物化參數，進行醣類化合物對月芽藻之結構-毒性關係分析，嘗試使用親電性物化參數 E_{LUMO} 、分子疏水性參數 $\log P$ 將 17 種醣類一起進行 QSAR 分析，皆無法得到較高的 R^2 平方值，無法得到成功的 QSAR。

此外，也嘗試依據苯環數的不同分開探討 QSAR，但也得不到較佳的結果，只有三個苯環的蒽醣類，使用辛醇與水分配係數 $\log P$ 來當作參數時，與以 DO 為終點所得之 EC_{50} 值回歸所得之 R^2 值可達 0.86，其他兩個試驗終點，Final Yield and Growth Rate，和 $\log P$ 作回歸之結果，效果沒有 DO 的結果好，但也可以看出具有一定程度之相關性。圖 5.5.1 為三種試驗終點與 $\log P$ 之 QSAR 結果。代表此類含氫氧取代基之蒽醣對月芽藻的毒性機制應與分子疏水性有相當程度的關係。

$$DO : \log 1/EC50 = 0.5168 \log P + 1.0717, R^2 = 0.8659$$

$$FY : \log 1/EC50 = 0.6728 \log P + 0.4991, R^2 = 0.7063$$

$$GR : \log 1/EC50 = 0.528 \log P + 0.7012, R^2 = 0.6069$$

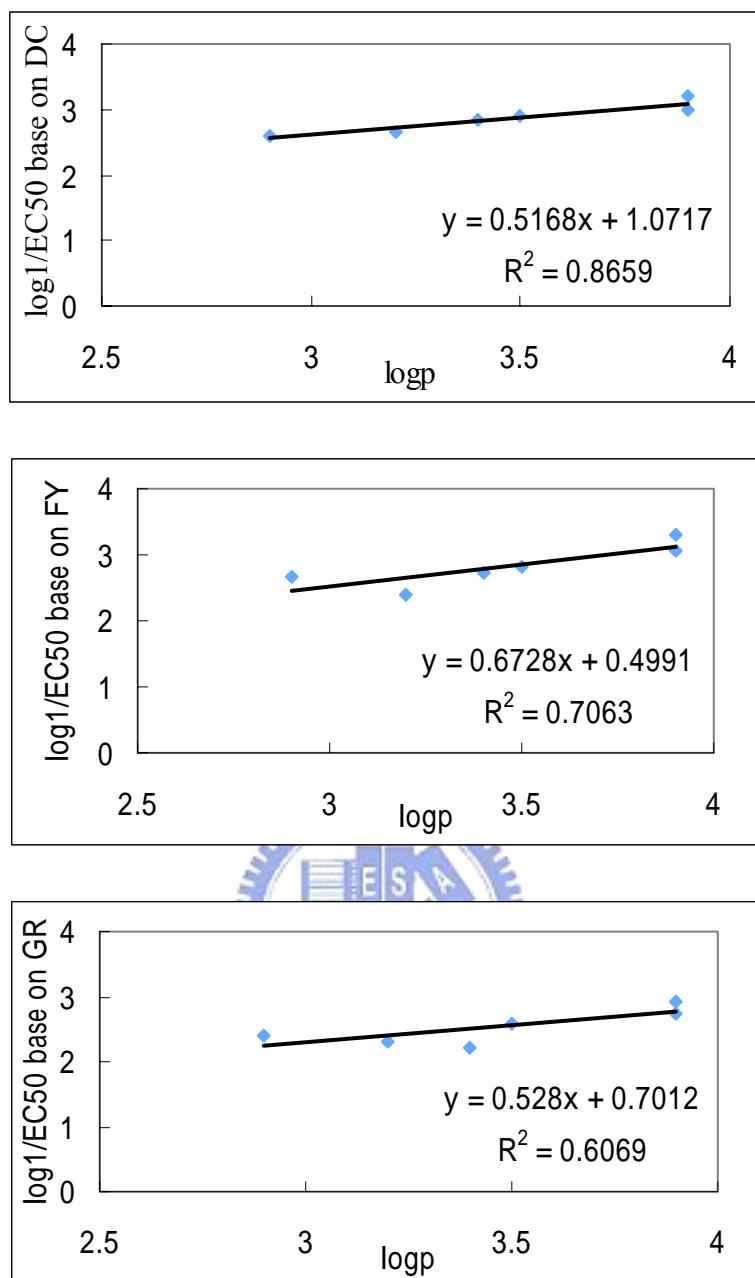


圖 5.5.1 三種終點之 EC50 與 Log P 值之 QSAR

5.6 試驗物種比較

本研究所收集之物種比較表詳見表 5.6.1，文獻中醣類衍生物毒性數據較少。因此無法比較不同物種之低影響濃度值。圖 5.6.1 為不同物種間毒性數據比較圖。

比較現有數據可發現，本密閉式藻類毒性試驗所得到的數據，擁有一般的敏感性，與纖毛蟲、酵母菌、浮萍、綠球藻、鯉魚相比，敏感度大致算高，但一般而言，藻類的敏感性應較纖毛蟲高出許多，由本篇研究結果卻發現，對於大部分醣類其敏感度雖高於纖毛蟲，但相差不大，而且纖毛蟲對於 2-methyl-1,4-BQ 與 2,5-dimethyl-1,4-BQ 擁有較高的敏感度。與綠球藻相比，敏感度高於綠球藻，也幾乎都高於浮萍，但浮萍對 2-hATQ 特別敏感，值得一提的是鯉魚對於 1,4-NAP 特別的敏感， EC_{50} 值非常低，為 0.003 mg/L。由圖 5.6.1 可簡單的看出敏感度關係，分別就三個不同的試驗終點對不同物種毒性試驗結果作圖，橫座標為此研究之 BOD 瓶毒性試驗結果，在斜率為 1 的斜線之上的代表較本研究來的敏感，可以發現大部分都在斜線之下，只有幾個特定的化合物對一些特殊物種較為敏感。

DEVILLERS 等人單獨針對對苯醣 (BQ)，使用不同生物進行毒性試驗 [46]，結果也類似上述趨勢，酵母菌最不敏感，而綠球藻、大腸桿菌也較不敏感，魚類 *Brachydanio rerw* 之 24 小時 LC_{50} 為 0.27 mg/L，相近於本研究所得之月芽藻 EC_{50} 值，其中唯一較本研究之月芽藻敏感的為一種發光菌 *Photobacterium phosphoreum*，其測試時間為 5~20 分鐘， EC_{50} 值為 0.02 mg/L。

由這些結果也可發現，某些物種對於某類醣具有高度的敏感性，這也代表了醣類化合物之毒性機制複雜，可能對於某些物種有其特殊的反應機制而導致此結果。

表 5.6.1 不同物種之 EC₅₀ 值

Toxicant	BOD bottle test microalga <i>P.subcapitata</i>			Infusorian ^[1] <i>T.pyriformis</i>	Yeast ^[3] <i>S.cerevisiae</i>	Duckweed ^[47] <i>L.gibba</i>	Microtox ^[48] <i>V.fischeri</i>	Chlorella ^[21] <i>C.vulgaris</i>	Carp ^[21] <i>C. carpio</i>
	DO EC ₅₀	FY EC ₅₀	GR EC ₅₀	IGC ₅₀	EC ₅₀	EC ₅₀	EC ₅₀		
1,4-BQ	0.14	0.12*	0.24	0.72	7.5				
2-chloro-1,4-BQ	0.31*	0.60	1.01	0.37					
2,5-dichloro-1,4-BQ	0.71	0.45*	1.82	0.44*					
Tetrachloro-1,4-BQ	19.45	3.11*	9.15	15.5					
2-methyl-1,4-BQ	5.17	2.32*	10.74	0.47*					
2,5-dimethyl-1,4-BQ	2.35*	2.47	5.02	0.93*					
tetramethyl-1,4-BQ	0.49*	1.15	2.40	9.2					
1,4-NAP	0.36	0.24*	0.52	1.582 ^[22]			-	99.85	0.695
2-OH-1,4-NAP	0.29	0.20*	0.45	27.61 ^[22]			1		0.003*
Mnadione	0.31*	0.60	1.01	4.96 ^[22]	5.92				
ATQ	0.33*	0.40	1.29		2.18		1.5	95.85	
1-hATQ	0.30*	0.35	0.63				2.5	-	
2-hATQ	0.54	0.50*	0.89				0.2*	-	
1,2-dhATQ	0.53*	0.95	1.16				5.5	1.81	
1,4-dhATQ	0.26	0.22*	0.47				>10	-	0.805
1,8-dhATQ	0.16	0.12*	0.29				3	-	0.664
1,2,4-trihATQ	0.27*	0.28	0.37				>10	-	10

Unit:mg/L

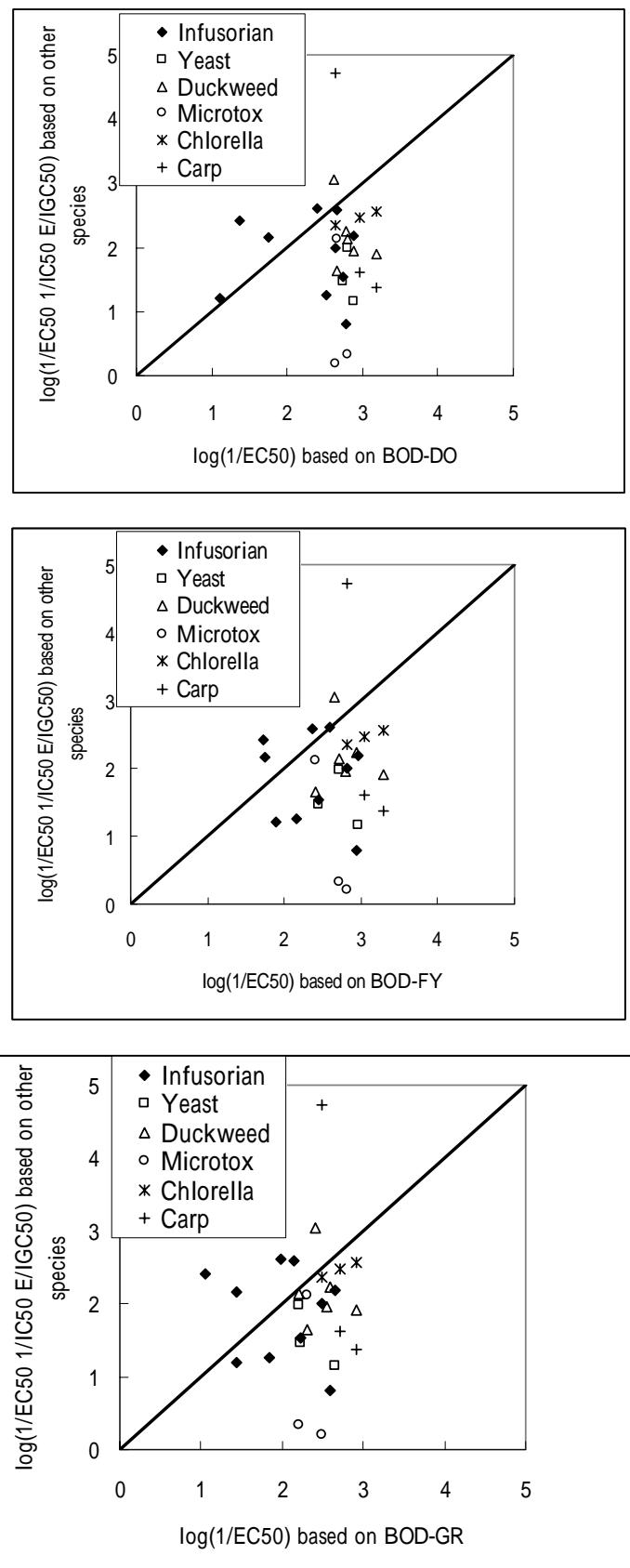


圖 5.6.1 與文獻中其他物種比較毒性試驗結果 單位: mmole/L

第六章 結論與建議

6.1 結論

1. 醛類毒性試驗結果，最具敏感性的測試終點為溶氧產量與最終細胞數各佔約一半，但考慮到有些醛類會消耗溶氧，因此若要兼顧敏感度與模式的穩定，最終細胞數 (Final Yield) 為較佳的參數。
2. 17 種醛類化合物對月芽藻的毒性都不低，以對苯醛所顯示對月芽藻的毒性最高，其中毒性最弱的為四氯對苯醛與甲基苯醛，以 Final Yield 為終點時，毒性最大與最小的化合物其 EC_{50} 相差約有 26 倍，就苯環數討論，大致而言毒性數據差異並不是非常大，對苯醛 $>$ 萍醛 $>$ 蔥醛。
3. 模式的最佳化分析，可發現多半以 Weibull 與 Logit 較佳，但由於對低濃度的影響較為顯著， EC_{50} 相距不遠，因此 EC_{50} 值仍使用 Probit 模式來分析。
4. QSAR 分析結果只有蔥醛類可以以 Log P 回歸得到較佳模式，但使用親電性參數來回歸卻得不到比較好的結果。其餘醛類化合物皆無法成功的求出 QSAR。
5. 在低影響濃度的討論中，使用中斷值來探討低抑制濃度，得到以 ΔDO 、Final Yield 與 Growth rate 為試驗終點的中斷值平均為 7.14、6.96 與 5.37，表示以 NOEC 來當作保護標準是可行的。
6. 物種比較方面，本實驗方法下之月芽藻對 17 種醛類的敏感性頗高，除了少數幾個特殊的化合物外，大致上敏感度都比纖毛蟲、浮萍、綠球藻來的高。會出現某一個化合物對某一物種特別敏感的情形，這也說明了醛之毒性機制的複雜度與選擇性。

6.2 建議

1. 在研究的過程中發現，醣類可能會與水中之溶氧反應，導致最終溶氧低於初始溶氧的情形發生，因此在進行毒性實驗時必須考慮溶氧是否適合作為此類化合物毒性實驗終點。
2. 本研究嘗試建立醣類化合物之 QSAR，發現不易得到較佳的預測模式，在文獻中也可發現這一點，可能由於衍生物的種類不夠多，也有可能是毒性機制複雜所導致，日後可以增加實驗之化合物種類，並配合多選幾個結構上或是電子性參數，以期建立成功的 QSAR 並進一步討論與毒性機制的關聯。



第七章 參考文獻

1. Schultz, T.W., G.D. Sinks, and M.T.D. Cronin, Quinone-induced toxicity to *Tetrahymena* :structure-activity relationships. *Aquatic Toxicology* 1997. **39**: p. 267-278.
2. Bolton, J.L., et al., Role of Quinones in Toxicology. *American Chemical Society*, 2000. **13**: p. 135-160.
3. Rodriguez, C.E., et al., An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicology*, 2004. **201**: p. 185-196.
4. 莊麗津，王正隆，蔡百豐，汪文忠，黃武章，王姿文譯，有機化學. 第五版 學銘圖書 p.263-264.
5. Monks, T.J., et al., Quinone chemistry and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1992. **112**: p. 2-16.
6. Siraki, A.G., T.S. Chan, and P.J. O'Brien, Application of Quantitative Structure-Toxicity Relationships for the Comparison of the Cytotoxicity of 14 p-Benzoquinone Congeners in Primary Cultured Rat Hepatocytes Versus PC12 Cells. *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 2004. **81**: p. 148-159.
7. Cho, A.K., et al., Determination of Four Quinones in Diesel Exhaust Particles, SRM 1649a, and Atmospheric PM2.5. *Aerosol Science and technology*, 2004. **38(S1)**: p. 68-81.
8. 林伯雄，陳秀卿，望熙榮，曾昭桓，盧至人譯，環境化學, 2002, 合記圖書. P.358-364
9. BJ, M., et al., Natural sunlight induced photooxidation of naphthalene in aqueous solution. . *Water,Air, and Soil Pollution.*, 2002. **136**: p. 347-359.

10. Mallakin, A., D.G. Dixon, and B.M. Greenberg, Pathway of anthracene modification under simulated solar radiation. *Chemosphere.*, 2000. **40**: p. 1435-1441.
11. A, S. and G. D, A primary study of the toxic effect of irradiated vs non-irradiated water soluble fraction of NO.2 fuel oil *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1976. **16**: p. 595-603.
12. Samokyszyn, V.M., et al., Peroxidase-catalyzed oxidation of pentachlorophenol. *Chem. Res. Toxicol.*, 1995. **8**: p. 349–355.
13. O'Brien, P.J., H.K. Kaul, and A.M. Rauth, Differential cytotoxicity of diaziquone toward Chinese hamster ovary cells under hypoxic and aerobic exposure conditions. *Cancer Res.*, 1990. **50**: p. 1516-1520.
14. Monks, T.J. and D.C. Jones, The metabolism and toxicity of quinones, quinoneimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Curr. Drug Metab.*, 2002. **3**: p. 425-438.
15. 王秋森、洪雪芬，周界大氣懸浮微粒中之反應性含氧化物種，國科會生命科學簡訊
http://biometrics.sinica.edu.tw/nsc/article/v16_12/article1.php3.
16. O'Brien. and P.J., Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem.-Biol. Interactions*, 1991. **80**: p. 1-41.
17. Robertson, M.L., D.A. Eastmond, and M.T. Smith, Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes *Mutat. Res.*, 1991. **249**: p. 201-209.
18. Monks, T.J. and S.S. Lau, Biological reactivity of polyphenolic glutathione conjugates. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997. **10**: p. 1296-1313.
19. Auer, C.M., J.V. Nabholz, and K.P. Baetcke, Mode of action and

- the assessment of chemical hazards in the presence of limited data: use of structure activity relationships (SAR) under TSCA Section 5. Environ. Health Perspect., 1990. **87**: p. 183-187.
20. **Russom, C.L., Bradbury, S.P., Broderius, S.J., Hammermeister, D.E., Drummond, R A.**, Predicting modes of toxic action from chemical structure : acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) Environ. Toxicol. Chem., 1997. **16** (5), 948-967.
21. Jui-Hung Yen, Kuo-Hsiung Lin, and Yei-Shung Wang, Acute Lethal Toxicity of Environmental Pollutants to Aquatic Organisms, Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002. **52**: p.113-116
22. Schultz, T.W. and A.P. Bearden, Structure-Toxicity Relationahips for Selected Naphthoquinones to *Tetrahymena pyriformis*.Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1998. **61**: p. 405-410
23. Mayer, P., et al., Algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials. Environ. Toxicol. Chem., 2000. **19**: p. 2551-2556.
24. Padrtova, R.R., B. Marsalek, and I. Holoubek, Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery. Chemosphere, 1998. **37**: p. 495-507.
25. Chen, C.Y., The effects of limiting nutrient to algal toxicity assessment: A theoretical approach. Toxicity Assessment, 1989. **4**: p. 35-42.
26. Chen, C.Y. and C.K. Lin, Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. Environmental Toxicology Chemistry, 1997. **16**: p. 1337-1344.
27. Brack, W. and H. Rottlern, Toxicity testing of highly volatile chemicals with green algae. ESPR, 1994. **4**: p. 223-228.
28. Kühn, R., et al., Results of the Harmful Effects of Selected Water

- Pollutants(Anilines, Phenols, Aliphatic Compounds) to Daphnia magna. Water. Res. , 1989. **23**: p. 495-499.
29. Kühn, R. and M. Pattard, Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. Wat. Res. , 1990. **24**: p. 31-38.
30. Galassi, S. and M. Vighi, Testing toxicity of volatile substances with algae. Chemosphere, 1981. **10**: p. 1123-1126.
31. Herman, D.C., W.E. Inniss, and C.I. Mayfield, Impact of volatile aromatic hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the freshwater alga *Selenastrum Capricornutum*. Aquatic. Toxicology, 1990. **18**: p. 87-100.
32. Mayer, P., et al., Algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials. Environ. Toxicol. Chem., 2000. **19**: p. 2551-2556.
33. Lin, J.H., et al., A novel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. Water Res., 2005. **39**: p. 1869-1877.
34. Chen, C.Y. and M.R. Chao, No-observed-effect concentrations in batch and continuous algal toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. , 2000. **19**: p. 1589-1596.
35. United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA), Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. Algal Toxicity, Tiers I and II. , 1996
36. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guideline for testing chemicals. No. 201. Alga growth inhibition test. Paris, France. ,1984.
37. International Organization for Standardization (ISO), Water quality- Algal growth inhibition test. Draft International Standard ISO/DIS 8692. Geneva, Switzerland. 1987.

38. American Society for Testing and Materials (ASTM), Standard Guide for Conducting Static 96h Toxicity Tests with Microalgae. Annual Book of ASTM Standards. ASTM E1218-90. Philadelphia, PA. 1994.
39. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Toxicity testing with phytoplankton, in Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19th edn, APHA, Washington, DC. 1995.
40. Hostetter, H.P. J. Phycol. , A rapid bioassay for algal nutrients and toxins. 1976. **12**: p. 10.
41. Nyholm, N. and T. Källqvist, Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. Environ. Toxicol. Chem., 1989. **8**: p. 689-703.
42. Lin, J.H., Experimental design of the algal toxicity test based on BOD bottle, in Institute of Environmental Engineering 2001, National Chiao Tung University.
43. Vassur, P. and P. Pandard, Influence of some experimental factors on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum*. Toxicity Assessment, 1988. **3**: p. 331-343.
44. Bergers, P.J.M. and A.C. Degroot, The analysis of EDTA in water by HPLC. 1994. **28**: p. 639—642.
45. Mazidji, C.N., et al., Distinction between heavy metal and organic toxicity using EDTA chelation and microbial assays. Environmental Toxicology and Water Quality, 1992. **7**: p. 339-353.
46. Devillers, J., et al., Combination of single-species laboratory tests for the assessment of the ecotoxicity of p-Benzoquinone. Toxicity Assessment:an international Journal ,1990. **5**: p. 405-416.
47. **Mallakin A, McConkey BJ, Miao G, McKibben B, Snieckus V, Dixon**

- DG, Greenberg BM.** Impacts of structural photomodification on the toxicity of environmental contaminants: Anthracene photooxidation, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1999. **43**: 204–212.
48. **El-Alawi YS, Dixon DG, Greenberg BM.**, Effects of a preincubated period on the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the luminescent bacterium., *Vibrio. fischeri. Environ. Toxicol.*, 2001. **16**:277–286.

