

國立交通大學
環境工程研究所
碩士論文

以月芽藻類毒性試驗方法評估 α , β -不飽和酮類之毒性
與結構-活性關係之研究

Toxicity Assessment and The Quantitative Structure -Activity
Relationships of α , β -unsaturated Ketones based on the
Effects on *Pseudokirchneriella subcapitata*



研究生：黃聖然
指導教授：陳重元 教授

中華民國 九十九 年 十一 月

以月芽藻類毒性試驗方法評估 α , β -不飽和酮類之毒性

與結構-活性關係之研究

Toxicity Assessment and The Quantitative Structure -Activity
Relationships of α,β -unsaturated Ketones based on the
Effects on *Pseudokirchneriella subcapitata*

研究生：黃聖然

Student : Sheng-Ran Huang

指導教授：陳重元

Advisor : Dr. Chung-Yuan Chen

國立交通大學



A Thesis

Submitted to Institute of Environmental Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

In partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master Science

In

Environmental Engineering

November 2010

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國 九十九 年 十一 月

以月芽藻類毒性試驗方法評估 α , β -不飽和酮類之毒性

與結構-活性關係之研究

學生：黃聖然

指導教授：陳重元

國立交通大學環境工程研究所碩士班

摘要

本篇研究以月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 針對 18 種酮類，其中 16 種為 α, β -不飽和酮，2 種為飽和酮，所進行之 48 小時密閉式毒性試驗。實驗所得之結果，將利用 ΔDo 、Final yield 及 Growth rate 做為觀測終點，藉由 Probit 模式求出半致死濃度 (50% Effect concentration, EC_{50})，將其毒性試驗後所得到的 $\log(1/EC_{50})$ 與其物化參數 (Log P)、電性參數 (ΔE 、 Q_3 、 Q_4 、 E_{lumo} 、 E_{homo}) 及反應性參數 ($\log(1/RC_{50})$) 進行迴歸分析，找出定量-結構活性關係模式。

毒性由強至弱依序為不飽和酮 > 鹵素取代酮 > 飽和酮，炔酮類 > 烯酮類，無取代基不飽和酮 > 甲基取代酮，造成此趨勢之主因為酮類含 $C=O$ ，屬於拉電子基，造成本身電子雲密度不均，使得酮類本體不穩定；不飽和酮含 π 鍵，使酮類結構活躍，導致電子易發生轉移，與生物體內所含之巯基 ($-SH$) 產生交互作用，進而影響毒性；而甲基取代造成立體障蔽 (steric hindrance) 效應，使酮類不易與電子反應，毒性減弱。另外，由反應性試驗數據呈現亦與上述結果相同。

敏感度分析方面，藻類毒性試驗反應終點以最終細胞變化量最為敏感；與其他物種進行比較，藻類敏感性比纖毛蟲高。

QSAR 分析發現，本試驗毒物屬親電性物質，與麻醉性作用機制常選用之參數—辛醇-水係數迴歸結果不佳，故其不為反應性毒性作用機制；而利用反應性參數迴歸效果佳，毒性與反應性呈現正相關；由逐步迴歸分析法，挑選出與試驗毒物相關性佳之電性參數，也找到一些相關性高之方程式 ($R^2=0.821\sim 0.907$)，未來可藉此預測迴歸式預測具相關結構、相同毒性作用機制之毒化物，以減少在生物毒性試驗上人力、時間、設備上之成本。

Toxicity Assessment and The Quantitative Structure -Activity
Relationships of α,β -unsaturated Ketones based on the
Effects on *Pseudokirchneriella subcapitata*

Student : Sheng-Ran Huang

Advisor : Dr.Chung-Yuan Chen

Institute of Environmental Engineering
National Chiao Tung University

Abstract

The objective of this study is to understand the toxic effect of ketones (that contains sixteen α,β -unsaturated ketones and two saturated ketones) on *Pseudokirchneriella subcapitata* using a closed system test. The effects of ketones are evaluated by three kinds of response endpoints, i.e., final yield, growth rate, and the dissolved oxygen production. Median effective concentrations (EC_{50}) are estimated using the Probit model with a test duration of 48hrs. Then, $\log (1/EC_{50})$ is utilized to make a regression with physical chemistry descriptors, electronic descriptors and reactive descriptors. Finally, we establish the QSAR models.

The results show that unsaturated ketones are the toxicest of these ketones. Alkynones are more toxic than alkenones, and no substitution ketones are more toxic than Methyl substitution ketones. Ketones become unstable owing to electron-withdrawing effect caused by the existence of carboxyl of ketones. In addition, unsaturated ketones contain π -bond that make electron easily transfer and interact with sulfhydryl group which is in organisms. Methyl group substitution cause steric hindrance, hence toxicity decrease a lot. The same results of toxicity are also discovered in Reactivity.

The order of the relative sensitivity is as follows : algae(Final yield) > algae(DO production) > algae(Growth rate) > *Tetrahymena pyriformis*.

The toxicant of this study is electrophile which results in poor relationship with 1-octanol/water partition coefficient. Toxicity is positive correlation with reactivity. The QSAR models are established well ($R^2=0.821\sim 0.907$) that based on electronic descriptors by stepwise analysis. The results of this study can help us to decrease the cost of toxicity test.

誌謝

首先誠摯的感謝指導教授 陳重元教授悉心的教導使我得以一窺毒物學領域的深奧，不時的討論並指點我正確的方向，使我在這些年中獲益匪淺。老師對學問的嚴謹更是我輩學習的典範。

本論文的完成另外亦得感謝交大生科所 楊進木教授以及中山醫大職安系 趙木榮教授兩位口試委員在論文中提出許多寶貴的意見與更正一些觀念，使得本論文能夠更完整而嚴謹。

兩年半裡的日子，實驗室裡共同的生活點滴，學術上的討論、言不及義的閒扯、讓人又愛又怕的宵夜、趕計畫實驗的革命情感、因為睡太晚而遮遮掩掩閃進實驗室...，感謝眾位學長姐、同學、學弟妹的共同砥礪(墮落?)，有你們的陪伴讓兩年半的研究生活變得絢麗多彩。感謝楊詔芬學姐不厭其煩的指出我研究中的缺失，也感謝心渝、庭宇同學的幫忙，恭喜我們畢業了。實驗室的思宏、家祥、哲賢學弟、萱芳、筱涵、慈君學妹們當然也不能忘記，你們的幫忙及搞笑我銘感在心，也感謝思宏的哥哥替我修改一些英文上的措詞文法，感恩！

另外還要感謝的是我的摯友庚轅、信元、信佑，在我最需要發洩時，充當我的沙包；當我需要流淚時，化作我的衛生紙，是你們給我撐完這兩年半的力量，因為你們讓我的碩士生活不寂寞。

家人背後的默默支持更是我前進的動力，妹妹的鼓勵、爸爸的體諒、媽媽的支持及銀彈補給，給了聖然一針強心劑，家人的溫暖一直是我待在這風大的新竹最好的暖暖包。最後，謹以此文獻給我摯愛的雙親

目 錄

表次	頁次
中文摘要	I
英文摘要	II
誌謝	III
目 錄	IV
表目錄	VII
圖目錄	VIII
第一章、緒論.....	1
1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究目的.....	2
1.3 研究方法及架構.....	2
第二章、文獻回顧.....	4
2.1 毒性物質-酮類之介紹	4
2.1.1 酮的定義.....	4
2.1.2 酮類之物化特性.....	5
2.1.3 常見酮類在環境中的流佈.....	5
2.1.4 常見酮類之應用.....	5
2.2 藻類毒性試驗.....	6
2.2.1 試驗物種簡介.....	6
2.2.2 藻類毒性試驗優點.....	7
2.2.3 藻類反應終點之量測.....	7
2.2.4 批次式藻類毒性試驗 (Batch of toxicity tests with microalgae).....	8
2.2.5 密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗.....	8
2.2.6 試驗之重要參數.....	8
2.2.7 揮發性有機物實驗.....	11
2.3 定量-結構反應關係 (Quantitative Structure-Activity Relationship ; QSAR)	12
2.3.1 QSAR 之簡介.....	12
2.3.2 常用之 QSAR 參數.....	13
2.3.3 QSAR 在環境毒物學上的應用	14
2.3.4 QSAR 的分類.....	15
2.4 α,β -不飽和酮類之 QSAR 研究.....	17
2.4.1 結構及性質.....	17

2.4.2 官能基的相互作用 (Interaction of functional groups)	17
2.4.3 親電子性加成反應 (Electrophilic addition)	18
2.4.4 親核性加成反應 (Nucleophilic addition)	18
2.4.5 親核性及親電子性加成反應的比較 (Comparison of nucleophilic and electrophilic addition)	19
2.4.6 Michael 加成反應 (The Michael addition)	20
2.4.7 α,β -不飽和羰化物之毒性機制	20
2.5 挑選最適迴歸參數方法 — 逐步迴歸分析法(Stepwise analysis) ^[46]	21
第三章、基本理論.....	23
3.1 基本生長動力學.....	23
3.2 毒性物質劑量反應模式.....	24
第四章、實驗設備與方法.....	28
4.1 實驗設備及材料.....	28
4.2 毒性試驗藻種.....	38
4.3 實驗前的準備.....	38
4.3.1 培養基配製.....	38
4.3.2 玻璃器皿清洗與滅菌.....	40
4.3.3 盤面光度之調整.....	40
4.3.4 藻類之培養步驟及裝置.....	40
4.3.5 ISOTON II 之配製.....	42
4.3.6 電子顆粒計數器操作方式與原理.....	42
4.4 儀器操作原理、步驟與設定條件.....	44
4.4.1 TOC (總有機碳分析法).....	44
4.4.2 總有機碳分析之標準液配製流程.....	46
4.5 密閉式藻類毒性試驗方法及步驟.....	46
4.5.1 實驗方法.....	46
4.5.2 實驗步驟.....	46
4.6 RC_{50} 反應性參數值實驗.....	50
4.7 實驗之品保及品管 (QA/QC)	52
第五章、結果與討論.....	53
5.1 藻類毒性試驗數據.....	53
5.2 NOEC、 EC_{10} 之比較	54
5.3 急慢性比 (Acute-Chronic Toxicity Ratio ; ACR).....	57
5.4 α,β -不飽和酮類與基線毒性之比較	59
5.5 密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗與其他物種試驗之比較	62
5.6 QSAR 分析	65
5.6.1 毒性數據與傳統物化參數 Log P (辛醇-水係數) 迴歸分析	65
5.6.2 藻類與纖毛蟲物種間關係.....	65

5.6.3 毒性數據與電性參數迴歸分析.....	66
5.6.4 毒性數據與反應性分析.....	72
第六章、結論與建議.....	74
6.1 結論.....	74
6.2 建議.....	75
第七章、參考文獻.....	76
附錄一、原始數據.....	82
附錄二、統計方法.....	110
附錄三、參數計算軟體使用方法.....	115



表目錄

Table 2.3.1 Classification of reactive mechanism	16
Table 3.2.1 The types of Weibull 、Probit and Logit models	27
Table 4.1.1 Physical and chemical characteristic of α,β -unsaturated ketones	32
Table 4.1.2 Reference toxicity data and descriptors of α,β -unsaturated ketones	37
Table 4.3.1 The consist of micro-algae medium	39
Table 4.3.2 The consist of micro-algae medium (EDTA component)	39
Table 4.3.3 The conditions of Coulter Counter	43
Table 5.1.1 algal toxicity test results of three endpoints	55
Table 5.1.2 Substance classification	56
Table 5.3.1 The ACR values in three test end-points	58
Table 5.4.1 Used baseline toxicity predicted toxicity and residual between observed	60
Table 5.5.1 Comparison of algal toxicity test results with other species	64
Table 5.6.3.1 Utilized the descriptors of this study	70
Table 5.6.3.1 Utilized the descriptors of this study (continue).....	71
Table 5.6.3.2 The correlation matrix of descriptors between each other.....	71



圖目錄

Fig 1.3.1 The flow chart of this study	3
Fig 2.1.1 The structure of ketone ^[2]	4
Fig 2.1.2 The structure of α,β -unsaturated ketones ^[3]	5
Fig 2.2.1 The picturebook of <i>Raphidocelis subcapitata</i>	6
Fig 2.2.2 Carbonate system and photosynthesis method for pH balance	9
Fig 2.4.1 The chart of Electrophilic addition ^[41]	17
Fig 2.4.2 The formation of carbocation ^[41]	18
Fig 2.4.3 The chart of nucleophilic addition (1) ^[42]	19
Fig 2.4.4 The chart of nucleophilic addition (2) ^[41]	19
Fig 2.4.5 The difference between nucleophilic and electrophilic ^[41]	20
Fig 2.4.6 The chart of Michael addition ^[42]	20
Fig 3.2.1 Dose-response relationships of common toxicity tests	25
Fig 4.3.1 The culture steps of algae.....	41
Fig 4.4.1 The graph of TOC analyzer	44
Fig 4.4.2 Introduction of TOC analyzer structure	45
Fig 4.5.1 The flow chart in close-system algae toxicity test	47
Fig 4.5.2 The diffuser system of deion-water.....	48
Fig 4.6.1 The flow chart of RC ₅₀ experiment	51
Fig 5.4.1 Correlation between $\log(1/EC_{50})$ and $\log P$	61
Fig 5.5.1 Comparison of relation of <i>P.subcapitata</i> and <i>T.pyriformis</i>	63
Fig 5.6.3.1 Utilize Eq(11~13) predicted toxicity v.s. observed toxicity.....	69
Fig 5.6.4.1 Utilize Eq(23~25) predicted toxicity v.s. observed toxicity.....	73

第一章、緒論

1.1 研究緣起

隨著工業的發展與科技突飛猛進的快速提升，每年工廠將合成、生產數以萬計之新化學物質，因而造成所產生的汙染物質之排放總量越來越多，而這些新化學物質，毒性性質也相對複雜，使得造成環境之衝擊更勝於以往。為此歐盟近年來提出一項草案（安全化學管制法），此項草案業於2006年12月13日由經歐盟議會通過，這項法規名為 REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals；化學品註冊、評估、授權法案)，未來將取代歐盟現行管理化學物的 40 條法律規範。對於每年生產量或進口量等於或大於1噸的物質，除法規規定不適用或可豁免外，每家製造商或進口商都有義務向歐盟化學總署 (ECHA) 進行註冊 (Registration)。並提出足夠資訊以確定其安全使用。如未依相關規定完成註冊，則無法繼續在歐盟市場流通。

針對一些廠商所需提出化學品資訊，在環境毒性風險評估部份，可利用一些生物急毒性試驗，讓我們可在短時間內瞭解到化合物對於生物所造成的毒性，以便建立化學物對於造成環境生物之影響資訊及數據資料。

藻類為食物鏈的底層之生產者，當水中之毒性物質對藻類造成毒性傷害時，會由食物鏈導致其他消費者，如微生物、甲殼類動物、無脊椎動物、魚類…等產生生理變化，再經由生物累積及傳輸作用，進而影響到更大型的生物種，間接破壞整個水體生態系統。由此可知藻類在水體環境中扮演角色之重要性。

本研究實驗係採用浮游植物-月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)，其具有實驗方法簡單、快速、便宜、敏感均高於其他試驗物種等優點，且藻類繁衍迅速、生命週期較短暫、試驗期間內幼年期或老年期對毒性物質忍耐力之差異影響亦較小，適合選用當作毒性評估之試驗物種。

對於許多複雜及不同結構之化學物質，由於種類繁多且數量龐大之因素，因此無法針對所有化學物質一一進行完整之毒性分析。環境毒物學引用醫學、製藥工業經常使用之定量-結構反應關係 (Quantitative Structure-Activity Relationships；QSARs) 預測單一有機化學物質之毒性大小及可能造成毒性之原因。此外，由於 QSARs 可以簡單而迅速的推估出同類有機物質之毒性，不僅可節省龐大經費，亦可省下許多的時間及人力。

本研究係利用藻類毒性試驗方法，藉實驗結果及相關參數所建構之 QSARs 進行 α,β -不飽和酮類之毒性分析，探討不同結構及作用機制下所可

能發生之毒性效應。

1.2 研究目的

1. 藉由密閉式藻類毒性試驗，研究在不同結構之取代基（烯基、炔基、甲基）、不同碳數、取代基位置之 α,β -不飽和酮類，以溶氧變化量、最終細胞變化量和生長率為反應終點，求得各毒性化學物質 EC_{50} 值，可做為毒性資料庫之數據以利建構更完善之毒性評估。
2. 由於 α,β -不飽和酮類為不飽和羰基化合物，因此毒性反應機制與不飽和羰基化合物相同均為生物親電性^[1]，其毒性均較基線毒性 (baseline toxicity) 高，此外，藉由各種物理化學及親電性參數所建構之 QSAR 與藻類毒性實驗所得之 $\log (1/EC_{50})$ 進行迴歸分析，以得知不同參數與毒性迴歸結果，進而可預測在不同毒性機制下，受測有機物之毒性。
3. 過去實驗室的資料庫多探討麻醉性極性與非極性化物之 QSAR 的研究，因此想要針對反應性有機物建立更完整的數據及資訊，所以選擇 α,β -不飽和酮類作為本研究之毒物，另外結構改變對於親電性反應物與毒性及反應性之關係亦想作進一步探討。

1.3 研究方法及架構

首先由參考文獻中蒐集相關資料及數據，之後決定欲擬實驗毒性化學物質後，再將所選定之毒性物質之物化資料及研究文獻做進行更進一步之整理，其後建構實驗目的、實驗方法及實驗結果分析以完成毒性實驗流程。

本研究乃以密閉式藻類毒性實驗，採批次實驗之方式進行，再將實驗結果之數據以 Probit 模式分析，進而求得 EC_{50} 值及劑量反應曲線 (dose-response curve)。最終再將實驗所得之結果進行更進一步之討論並提出本研究之結論。詳細之流程如圖 1.3.1。

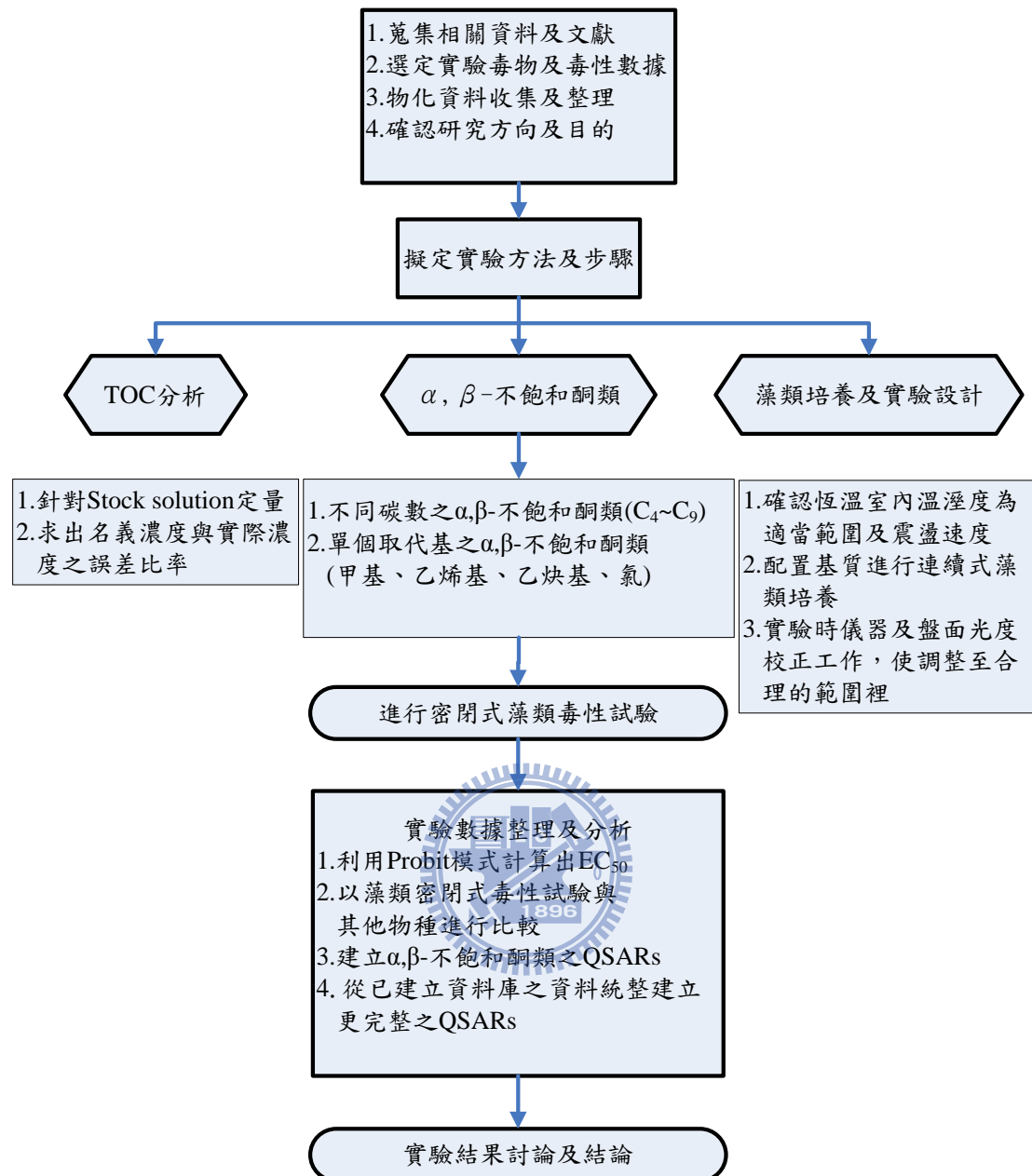


Fig 1.3.1 The flow chart of this study

第二章、文獻回顧

2.1 毒性物質-酮類之介紹

2.1.1 酮的定義

酮 (ketone)：有機化合物的一類，是羰基[-C(O)-]的兩個單鍵分別和兩個烴基連接而成的化合物。

通式： $R^1-C(O)-R^2$ ，酮分子裡的羰基[-C(O)-]常被稱為酮基。

結構：其分子結構如圖 2.1.1 所示。

命名：簡單的酮常用普通命名法。芳香酮中芳基作為取代基來命名。多元酮命名時，應選取含羰基儘可能多的碳鏈作主鏈，並標明羰基的位置和羰基的數目。不飽和酮的命名除羰基的編號應儘可能小以外，還要表示出不飽和鍵所在的位置。脂環酮命名時，編號從羰基碳原子開始，僅在名稱前多加一個「環」字。許多天然酮都有俗名，例如，天然麝香的主要成分麝香酮 (muscone) 為十五元環酮等。

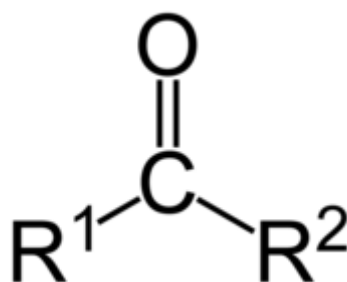


Fig 2.1.1 The structure of ketone^[2]

α,β -不飽和酮類：

α,β -不飽和酮類是同時接有碳-氧雙鍵及碳-碳雙鍵的酮類，其化學結構如下圖2.1.2所示：

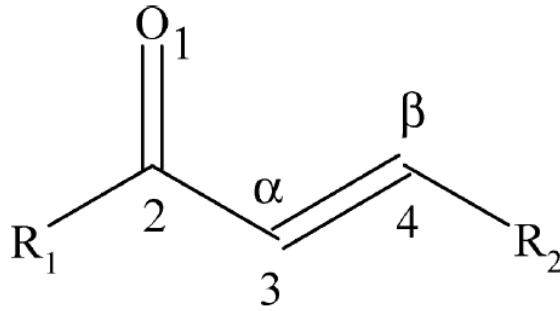


Fig 2.1.2 The structure of α,β -unsaturated ketones^[3]

α -C 為接酮基上碳之鄰近相接的 C=C 之第一個碳， β -C 為接酮基上碳之鄰近相接的 C=C 之第二個碳， R_1 、 R_2 為分別不同的取代基；本研究係針對具此結構之酮類及其衍生物或同分異構物做探討。

2.1.2 酮類之物化特性

羰基帶有極性，因此酮分子亦帶有極性。羰基與水分子之間有氫鍵，因此酮能溶於水中。但是，酮分子之間沒有氫鍵，因此酮的揮發性較分子重量相近的醇及羧酸為高。常見的酮類為丙酮、丁酮及丁二酮等等。以丙酮為例，丙酮在常溫下為無色透明液體，易揮發、易燃，有芳香氣味；與水、甲醇、乙醇、乙醚、氯仿和吡啶等均能互溶，能溶解油、脂肪、樹脂和橡膠等，亦能溶解醋酸纖維和硝酸纖維，是一種重要的溶劑。

2.1.3 常見酮類在環境中的流佈

酮類由於它很穩定所以常常被應用於工業製程及生產日常生活用品上然而它也是揮發性有機溶劑的一種，在放流水中也常常存在著。酮類與同碳數的醛類相比毒性也較低，但雙酮類例外^[4]。另外，酮類在自來水消毒程序中也常常被當作臭氧的副產物，或是在不完全氧化與燃燒下的產物，還有被當作代謝產物等^[4]。

2.1.4 常見酮類之應用

酮類在日常生活中廣泛被應用，較常見的有下列幾項：

1. 用作卸除指甲油的去光水，以及油漆的稀釋劑。
2. 可作為有機溶劑，應用於醫藥、油漆、塑料、火藥、樹脂、橡膠、照相軟片等行業。
3. 在工業上應用於製造雙酚 A、甲基丙烯酸甲酯 (MMA)、丙酮氰醇、甲基異丁基酮等產品，以及塑膠、纖維、藥物及其他化學物質。
4. 冷劑：丙酮與乾冰的混合物可當冷劑 (-50°C)。
5. 丁酮用作溶劑、變性劑、催化劑，也用於製取過氧化甲乙酮。
6. 在食品中可作為調味添加劑。例如，丁二酮與 3-羥基-2-丁酮一樣，是使黃油帶上其獨特口感的化合物。正因如此，食品生產商在人造黃油或類似油類食品終產品中添加丁二酮與 3-羥基-2-丁酮（同時添加 β -胡蘿蔔素以增加黃色），雖然這些添加劑是無味的^[5]。

2.2 藻類毒性試驗

2.2.1 試驗物種簡介

本實驗所採用的試驗藻種為月芽藻 (*Raphidocelis subcapitata*, *Selenastrum capricornutum* or *Pseudokirchneriella subcapitata*) Strains UTEX 1648, 為 2008 年 8 月份向 The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austi (<http://web.biosci.utexas.edu/utex/>) 所購得。*Raphidocelis subcapitata* 是屬於綠藻綱 (Chlorophyceae) 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 $40\text{-}60\mu\text{m}^3$ 。典型的 *Raphidocelis subcapitata* 體積約為 $45\mu\text{m}^3$ 且重量介於 10 至 20 pg/cell 之間^[6]，因為體型呈半月型，所以稱為月芽藻，具備有取得容易、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，並較其它微生物試驗來的敏感^[7]，圖 2.2.1 為典型月芽藻。

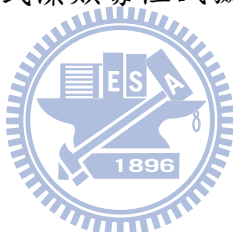


Fig 2.2.1 The picturebook of *Raphidocelis subcapitata*

2.2.2 藻類毒性試驗優點

藻類由於下列優點而被廣泛用於進行毒性之研究：

1. 藻類為生態系統中最低階的生產者之一，在食物鏈的過程中由於生物濃縮作用 (Bioconcentration) 而造成其他高階消費者體內含有高濃度之毒性物質。
2. 在毒性試驗過程中，藻類生長過程可分成四個階段：遲滯期 (Lag phase)、對數生長期 (Exponential phase)、穩定期 (Stationary phase) 及死亡期 (Death phase)。在良好的培養環境下，可以迅速讓藻類到達對數生長期和穩定期，並且持續一段較長的時間，如此便有利於實驗之進行。其他某些生物實驗則必須受到長期的幼年時期或生命週期之限制。
3. 藻類毒性試驗與其他物種之毒性實驗進行比較後，可發現藻類具有較高之再現性。尤其於密閉式之藻類毒性試驗中^[8]，當反應終點為 ΔDO 及 Growth rate 時，兩者之變異係數 (coefficients of variation; CV) 約為 10%，而傳統之藻類毒性試驗其 CV 為 20~32% 左右，由此即可發現密閉式藻類毒性試驗法具更高之再現性。



2.2.3 藻類反應終點之量測

一般藻類毒性試驗之標準方法 (U.S. EPA^[9]、OECD^[10]、ISO^[11]、APHA^[12]、ASTM^[13]) 皆是於試驗終點時，測量藻類的生物質量。而量測生物質量最直接的方法就是量測生物之乾重，但是直接稱重的方法，需要花費較久的時間，所以利用電子顆粒計數器、光學顆粒計數器等之間接量測生物質量的方法逐漸將直接稱重法取代，因為這些方法簡單、快速，所需藻液量亦少，且與生物乾重之間有良好的相關性^[14]。另外，生長率 (growth rate) 也是一項經常被測量的反應參數，學者^[15, 16]曾經分析 ISO's ring tests 實驗數據，發現以生物質量及生長率為反應終點時，生長率的 EC₅₀ 值高了一倍。

另外一個觀測終點是量測試驗水的溶氧，直接量測水中溶氧之變化，再依此計算出藻類生長之情形，優點是成本低、量測時間短。Hostetter 發展出一套量測水中溶氧之藻類試驗方法，試驗時間僅需二十四小時，且在以 *Raphidocelis subcapitata* (月牙藻) 為試驗物種的實驗中發現，當一種或多種之營養鹽呈限制性狀態時，藻類之淨光合反應量會與限制性營養鹽呈現線性關係^[17]。

綜合以上的觀點，本研究採用以細胞密度為基礎計算出的生物最終產量 (final yield)、生長率 (growth rate) 以及溶氧產生量 (ΔDO) 當作整個

試驗的反應終點，並比較這三種反應終點對 α,β -不飽合酮類的敏感度。

2.2.4 批次式藻類毒性試驗 (Batch of toxicity tests with microalgae)

批次式毒性試驗為起初提供藻類足量的生長基質，但是在後續的實驗過程中則不再添加任何基質，亦無藻類之代謝物質流出。在此條件之下，基質的消耗及代謝物的累積皆會降低藻類毒性試驗之敏感性，同時也難反應出真實水體中的情況。但由於此方法的優點為操作容易、成本低廉且可同時處理大量之樣本，因而到目前為止仍被廣為使用。

2.2.5 密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗

想發展出成功的密閉式藻類毒性試驗系統，需要克服兩個問題：1. 要提供足夠的碳源 CO_2 ，以避免藻類因為碳源不足生長受到抑制。2. 能確保毒性物質在試驗期間內能維持穩定的濃度。

本研究使用了具有完全密閉系統優點之 BOD 瓶進行毒性試驗。過去實驗室人員 Huang^[18]，Lin^[19] 等發展出連續式培養加上 BOD 瓶密閉式試驗系統，利用連續式的培養方法結合了 BOD 瓶 (BOD bottle) 發展出試驗方法為「48 小時的批次式 BOD 瓶藻類毒性試驗」其主要為使用體積 300ml 的 BOD 瓶，將藻類、營養鹽和試驗毒物加入其內，再用蓋子密封，讓藻類暴露於毒性物質一段時間，由觀測終點量測實驗組與無暴露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，在其優點操作簡單，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。

2.2.6 試驗之重要參數

在進行任何的毒性試驗之中，其結果皆可能不盡相同，而不同的操作參數亦皆可能是導致實驗結果差異的主要因素之一，因此對於各參數必須進行嚴格的控制並了解各參數對於藻類生長與毒性之間是否有其相關性。下列為本研究所考慮之參數：

(一) pH 控制及碳源供給

由於藻類因進行光合作用而導致 pH 產生明顯的變化，因此於實驗系統中若不對 pH 加以控制的話，則重複性的試驗將難以進行。此外，

在碳源方面，由於藻類生長時首先會消耗水中之溶解性二氧化碳(本實驗設備之曝氣幫浦和氣體鋼瓶所提供)，次者為培養基 (medium) 中的碳酸氫鈉 (NaHCO_3)，當碳源不足時則會造成藻類死亡。在 pH 控制方面，由於預測某特定 pH 值情況之物種濃度較有其困難性，且 pH 亦會改變毒性物質於水中的型態及濃度，進而影響毒性的大小。如 HCN 於 pH 7.8 降至 7.5 時，毒性會提高 10 倍左右。因此標準藻類毒性試驗皆傾向於固定 pH 值。Nyholm^[20]提出固定藻類 pH 的方式，如圖 2.2.2 所示：

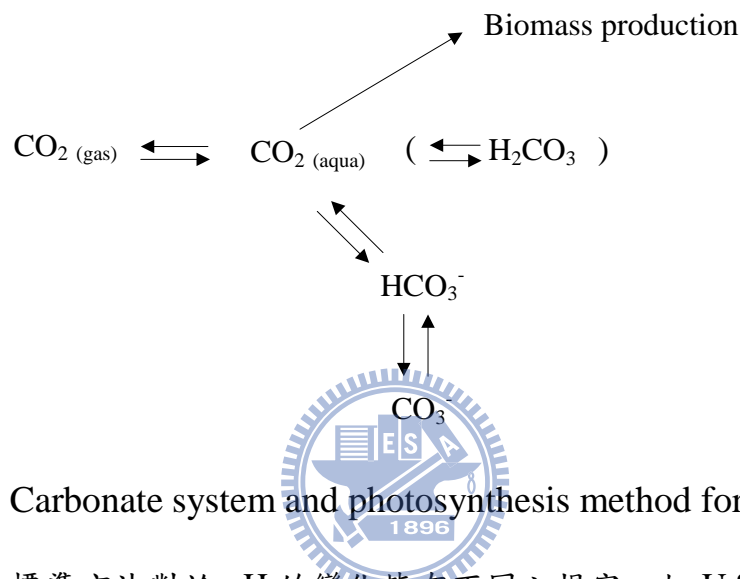


Fig 2.2.2 Carbonate system and photosynthesis method for pH balance

不同的標準方法對於 pH 的變化皆有不同之規定，如 U.S.EPA 要求最終之 pH 需再 8.5 之下，OECD 則規定 pH 的變化不可超過一個單位；ISO 則要求 pH 的變化不可超過 1.5 的單位。因此控制 pH 變化的方法大致上有下列幾種：

1. 減少接種生物量
2. 系統加入二氧化碳加以曝氣
3. 維持均勻振盪
4. 保持空氣流通
5. 縮短整體的實驗時間

Arensberg et al.^[21]利用月芽藻為試驗物種進行藻類毒性試驗，為防止 pH 值的變化而將試驗時間由三天縮短為二天。而 Lin et al.^[19]於密閉式藻類毒性試驗中並未控制整體系統之 pH，發現當水中溶解性金屬對於藻類的抑制率高於 20% 時，系統中的 pH 變化大多皆在 1.5 個單位以下，因此認為藻類毒性試驗是不需要針對 pH 變化而加以控制。本研究依據早期之藻類毒性研究方法^[22]於進行毒性試驗前，將 pH 控制於 7.5 左右，使其減少 pH 變化所造成之可能誤差性。

(二) 光照強度

Nyholm and Kälqvist^[23]提到光照強度會影響藻類行光合作用，因此在

其藻類毒性試驗的設計中如要使藻類維持在 exponential phase，則光照需設為常數，要維持在該條件下的方法有兩種：(1) 保持較低的生物質量 (biomass)、縮小培養體積及提供充分之混合，此一方法的主要目的是為可減少「自身遮蔽 (self-shading)」所產生之影響，即排除因光源的遠近距離使得光照強度之差異。(2) 為提供飽和的光照強度，使得藻類能吸收到一定量的光度而不會影響到生長。因此，如光照強度為一常數時，能使藻類呈現對數生長，縮小培養體積等優點以利藻類處於理想的環境中。

本研究依照 U.S. EPA^[9] 標準方法針對 *Raphidocelis subcapitata* 的規定，於連續式培養和批次試驗中所選擇的光照的強度為 $4300 \pm 10\%$ lux，與其它標準方法 ISO、OECD、EEC 的 8000 lux 不同，採用連續式的光照來排除光暗交替循環式的光照所導致的藻類生物質量變異的缺點。

(三) 溫度

採用 U.S. EPA^[9] 建議的 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，在恆溫室下培養藻類及進行實驗，整個培養及試驗過程中需注意恆溫室中溫度的變化，讓溫度維持在平均溫度變化量 1°C ，以確定實驗進行溫度分布的均勻度。

(四) 植種之藻液初始密度和試驗時間

在批次式實驗中，當植入 BOD bottle 的藻液初始密度過低時，即藻類細胞數目過少，會導致些微的細胞數量變動便可讓生長率產生大幅度的變化，將這樣的數據輸入 probit 等模式計算出的 EC_{50} 也會有較大的變異性 (C.V. 值)，反之若植入的藻液初始密度過高時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 值升高和 EC_{50} 會隨之顯著升高等問題，進而影響毒性試驗結果之精確度，因此決定較適當的植種數量是影響試驗結果中很重要的因子。

試驗時間的長短會關係到毒性試驗的敏感性和數據結果，如過長的試驗時間，會使得存在於 BOD bottle 內的營養鹽不足，使得無加毒物的藻類也會與有加毒物的藻類發生出死亡的現象，受處理組與控制組在最終產量的差距會逐漸縮短，此外過長的試驗期間，也會使得毒性的反應消失，在 Lin^[19] 試驗結果發現隨著時間增加，毒性試驗的敏感度提高而 C.V. 值減少，隨著初始植種密度減少，則敏感度提高但 C.V. 值亦提高。在兼顧兩者的考量下，本試驗選定最佳化條件為控制 BOD bottle 內藻類初始植種密度在 1.5×10^4 cells/ml，試驗時間為 48 小時。

(五) 實驗培養基

實驗培養基的成份是影響微生物毒性試驗結果的重要因子之一^[24]，而主要之影響培養基因子有 pH、硬度、螯合劑、氮、磷及一些主要陽離子。一般為了使試驗之環境符合自然環境之情況及讓藻類能有效的利用微量元素，於試驗中會額外加入一定量之螯合劑 (EDTA)。此外，氮、磷元素對於藻類生長與毒性試驗結果影響最大。因此即針對上述之培養基質進行分別探討：

1. 氮、磷的影響

在一般的自然水體中，存在這各種不同的生長元素，其中以氮、磷兩種元素為藻類生長的主要限制因子。Lin^[19] 針對重金屬鋅及有機

物質酚進行毒性試驗，由試驗結果發現，當 U.S. EPA 營養基質的 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，而最直接影響藻類生長最主要的因素則為氮或磷的濃度，此即為藻類生長的限制性因子。

在水中只有 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 形態能夠直接被藻類吸收，故於各種藻類試驗方法中，磷皆是以正磷酸鹽之型態存在（如 ISO 和 OECD 是 KH_2PO_4 ，U.S.EPA 是 K_2HPO_4 ），至於氮的形態，由於 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 及 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 皆能被藻類吸收，在 ISO 和 OECD 用的是 $\text{NH}_4^+ (\text{NH}_4\text{Cl})$ 形態，U.S.EPA 用的則為 $\text{NO}_3^- (\text{NaNO}_3)$ 形態。Millington et al.^[25] 提到自營菌無法像異營菌能快速利用 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 而快速生長，且 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 不似 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 那麼容易為異營菌所使用，所以一般自然環境中藻類的氮源應是硝酸態。

2. 螯合劑 (EDTA) 的影響

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於試驗時會在培養基中加入固定量之螯合劑，但根據文獻指出一些螯合物如 EDTA、NTA 等與常見之二價金屬 (Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+}) 所形成的親水性複合物，較之前未螯合時呈現的游離態時的毒性還低，因此倘若進行重金屬實驗時勢必會影響毒性試驗之結果^[26, 27]。因此，1996 年 U.S. EPA^[9] 建議在培養藻類時可加入固定量之螯合劑於培養基中，但在進行藻類毒性試驗時，培養基中則不添加任何螯合劑。



2.2.7 揮發性有機物實驗

早期的標準生物試驗方法皆以評估「水溶性」及「非揮發性」的化學物質，尚無方法可偵測揮發性有機物的毒性^[28]。其主要因素為傳統的批次式毒性試驗方法皆為開放式系統 (Open-system)，此一系統會提供激烈的振盪以利藻類進行氣體交換並得到無機碳源 (CO_2)。但揮發性化學物質濃度會伴隨著試驗期間拉長及震盪試驗瓶之過程中逐漸消失因而低估其毒性，相對地亦造成各個實驗室測試的毒性結果會有所差異。

一般藻類毒性試驗之密閉式系統，需考慮下列兩項重要的因素：(一) 為提供足夠的碳源，以避免藻類會因為碳源不足而生長受到抑制，(二) 為確保試驗毒性物質於試驗期間因揮發作用而改變毒物濃度。

本試驗方法為密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗，為了改善上述的缺點不讓揮發性物質的濃度會因為試驗容器的上方留有未裝滿液體的空間(head space)而有揮發、濃度減少的情形，因此在本試驗的容器 BOD 瓶會將液體(毒物+基質)加滿至不留空間，讓 Head Space 減至最低；在提供足夠的碳源的部分，事先將去離子水以 $\text{CO}_2\text{-N}_2$ 混合氣體曝氣，一方面除去水中溶氧，另一方面便是增加碳源，讓營養液能有足夠的碳源使藻類生長不受抑制。

2.3 定量-結構反應關係 (Quantitative Structure-Activity

Relationship ; QSAR)

2.3.1 QSAR 之簡介

雖然傳統的生物分析法可得知有機化合物對生態環境所造成之衝擊，但其缺點為所需的時間較長，且由於大量新的化合物不斷的推陳出新，因此即必須建構出一套可快速預測化合物毒性的方法，以減少時間及金錢上的浪費。

早在西元 1930~1960 年期間，就有幾位學者專家為了研究物質的化學結構與其活性的關係，提出了 formal structure-activity relationship 的理論，之後並陸續地應用在藥物以及殺蟲劑的研究方面，一直到了西元 1970 年，才有學者提出了 Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR)，並且開始廣泛地應用在環境毒理學上的研究。簡單來說，它就是以一種物質的化學或物理性參數，來建立一個模式，描述並預測此物種與這些參數之間的毒性關係。

環境毒理學中，QSAR 的建立即是為了預測每日所不斷產生的新化學物質的毒性，因此為了能建構有效的 QSAR 模式則必須注意下列因素：

1. 應用於 QSAR 模式之參數，必須在極小的偏差範圍之內，所建立之模式才能有效並準確的預測毒性大小及毒性反應機制。
2. 目前為止，QSAR 模式的發展僅應用於預測單一毒性物質之毒性，對於混合毒性之分析尚未有完整之研究。
3. QSAR 模式並非以一種模式就可以包含各種形式的化學物質。簡單而言，針對某一種毒性物質之研究，最好能配合該毒性物質之衍生物同時進行分析，其所建立之模式才有最佳之效果。
4. QSAR 模式所應用之毒性數據及參數，需有容易取得之便利性。此外，需針對實驗毒物之特性篩選所使用之參數；例如，該毒物為低水溶解性，則不應將溶解度當為建立 QSAR 模式之參數。

McFarland^[29]認為化學物質的毒性主要有下列兩種因素所造成：

- (1) 毒物進入生物相的穿透力。
- (2) 毒物和反應位置的相互作用。

以數學模式表示法如下：

$$\text{Log (toxicity)}^{-1} = A[\text{log (penetration)}] + B[\text{log (interaction)}] + C$$

2.3.2 常用之 QSAR 參數

參數含喻一些結構上的特性及性質，因此在定量方法上可利用生物活性進行迴歸；一些特定物理化學性質參數值，可代表毒性物質與受測物種之間的作用力。一般使用的 QSAR 參數大致可分為下列幾種類型：

(一) 親脂性參數 (hydrophobic or lipophilicity parameter)

建立 QSAR 模式最常使用的參數即為親脂性參數，這方面的參數包括溶解度、辛醇-水分配係數 ($\log P$ or $\log K_{ow}$) 等。因為此參數與毒性的水溶性、薄膜的滲透性及提供配位基 (ligand) 與接受器 (receptor) 的鍵結有直接的關係。簡單而言，各類化學物質和不同生物系統的作用未必相同，但是當化學物質要進入細胞體內時，親油性的作用機制將優先考慮於化學物質和反應位置的作用，因為疏水性物質對細胞的作用機制被認為與被動擴散 (Passive diffusion) 有關，所以穿透細胞膜的動力是與化學物質的疏水性有直接關係。

親脂性參數定義為一個化合物在水溶液相和非水溶液相分佈的情況；早期對於分佈係數 (partition coefficient; P) 的定義為與「輕」和「重」相關。現今對於 P 的定義為物質濃度在有機相和水溶液相平衡時分佈的比例。

$$P = C_{org} / C_{aq}$$

在較早時期的 QSAR 模式中會使用不同的有機相和水相系統所得到的分佈係數，但自從 Hansch 使用有取代基的苯甲酸正辛醇和水的分佈係數後，正辛醇即變成分佈係數中所使用的有機相。Russom et al.^[1] 指出擁有越高 $\log P$ 的物質會增加物質在水中與生物相 (Biophases) 的平衡時間，因而增加其 LC_{50} ratio ($24h LC_{50} / 96h LC_{50}$)。現今已有很多方法可以利用電腦軟體幫助我們預測化合物的 $\log P$ ，但由於彼此之間的預測起始點不同，因此導致有不同的結果，由其是對於一些溶解度低的化學物質，預測的結果常會與實驗所得的結果有偏差^[29]。

(二) 電子參數 (Electronic parameter)

分子的電子性質可以用許多不同類型的參數來描述。一般這類型的參數包括有原子電荷數 (Atomic charge)、分子軌域能量 (E_{homo} 和 E_{lumo})、未定域化 (Delocalizability)、偶極矩 (Dipole moment)、Hammett 取代基常數 (Hammett sigma substituent constant; σ) 和還原位能 (Reduction potential) 等。上述之所有參數都是描述一些基團 (group) 或取代基對電子分佈的影響，因此在 QSAR 的建立上都有應用過這些參數。相對於描述整個分子性質的參數 (親脂性參數和莫耳折射率)，電子參數主要著重於一些原子或基團 (除了偶極矩)。例如，選擇 σ_p 來描述對位 (p -) 取代基對於 phenolic 酸性的影響，此模式可以表示 phenolic 基團在與鍵結位置作用時當作一個氫鍵的提供者或接受者。

根據 (Atkins, 1994)^[30] 第五版的物化課本中指出，highest occupied molecular orbital (HOMO) 和lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) 這兩個軌域會共同形成分子的「Frontier orbitals」，這個軌域對於一個分子的化學及光學性質具有高度的關聯性。當分子之間以形成電荷轉移方式相互作用時，HOMO 可作為分子給予電子能力的量度；而LUMO 則可做為分子接受電子能力的量度，亦即電子是從HOMO 轉移至LUMO，因此透過HOMO 和LUMO 來了解分子的電離能力和電子親合力。

(三) 立體 (空間) 參數 (Steric parameter)

立體效應很難去描述，因為在鍵結位置時的 3D 結構通常很難取得。立體效應常數 E_s 是在QSAR的研究中第一個被使用來描述立體效應的參數，而其他相關參數包括總表面積 (Total surface area)、總分子體積 (Total molecular volume) 及莫耳折射率 (molar refractivity) 等。Di Marizo and Saenz^[31] 發現化學物質之分子體積與其毒性成正比，因為在相同濃度的溶液當中，分子體積較大的化學物質佔有較大的體積分率。

(四) 分子連結參數 (molecule connectivity indices; MCIs)

最早是由Randic^[32] 所提出，所代表的是化學結構上的鍵結與分支，可將其量化的結果做為化合物的參數，此一參數並非物理或化學性質，所以很容易利用演算法從結構式中取得。

(五) 極性參數 (polarizability)

莫耳體積 (MV)、莫耳折射率 (MR) 及等張比容 (parachor; PA) 都為相關性之參數。

$$MV = MW/\rho$$

$$MR = MV \times [n^2 - 1/n^2 + 2]$$

$$PA = MV \times \gamma^{1/4}$$



MW: 分子量, ρ : 密度

n: 折射係數

γ : 表面張力

其中MR 被廣泛應用於QSAR，且與凡得瓦體積 (van der waals volume)、等張比容有很好的相關性 ($R=0.92$ and 0.97)。MR的計算是經由極化性 (polarizability) 和一些基團的極性而來的，分子中極性的部分愈大者，MR值就愈大。早期Kubinyi^[33] 認為在QSAR的迴歸方程式中如果MR之係數為正，則表示取代基鍵結在極性表面；反之，如為負值或是非線性關係則表示此鍵結的位置受到立體障礙或是一個限制區域 (limit area)。

2.3.3 QSAR 在環境毒物學上的應用

QSAR是用來評估有機化合物毒性的工具之一，早期在QSAR的發展是先將化合物進行分類的基礎上而建立的，亦即一個QSAR的模型只能預測同類或具類似結構化合物的毒性。Schultz et al.^[34] 認為，在毒性分析上要建立有意義的QSAR模式，必須將不同毒性機制的化合物加以分類。由於QSAR無法在不同毒性機制下討論，因此在建立QSAR模式前需先將毒物進行分類。Verharra et al.^[35] 首先根據毒性反應的模式來分類，其依據之標準

為毒性比例(Toxic Ratio; TR)。毒性比例TR 的定義為:

$$TR = EC_{x, \text{baseline}} / EC_{x, \text{experimental}}$$

其中 $EC_{x, \text{baseline}}$ 為預測之基線毒性 (baseline toxicity), $EC_{x, \text{experimental}}$ 為測量之實驗值。

基線毒性可藉由QSAR來預測，而且通常以單一物化參數 $-\log K_{ow}$ 來描述，但是 $\log K_{ow}$ 無法完整模擬生物薄膜的情況，所以在基線毒性中又分成非極性 (non-polar) 和極性 (polar) 麻醉作用 (narcosis)。當某種化合物之毒性大於從QSAR預測非極性麻醉作用的5-10 倍時，也就是 $5 \leq TR \leq 10$ ，則此化合物即被歸類為極性麻醉作用。反之，如某種化合物之 $TR \geq 10$ ，則此化合物即被歸類為反應性 (reactive) 或是特別反應 (specifically acting)，且當此化合物之 $pK_a \leq 6.5$ 時，則該物質即屬於非耦合 (uncoupler) 之化合物^[36]。

2.3.4 QSAR 的分類

Russom et al.^[1] 則將有機物分成圖2.3.1的毒性機制，可分為一般的 (General) 和特異的 (Specific) 兩大類型。一般性毒物是指麻醉作用在細胞膜非特定的位置上；而特異性毒物有又可稱為反應性毒物，它會作用在細胞的特定位置上或抑制特定的反應。

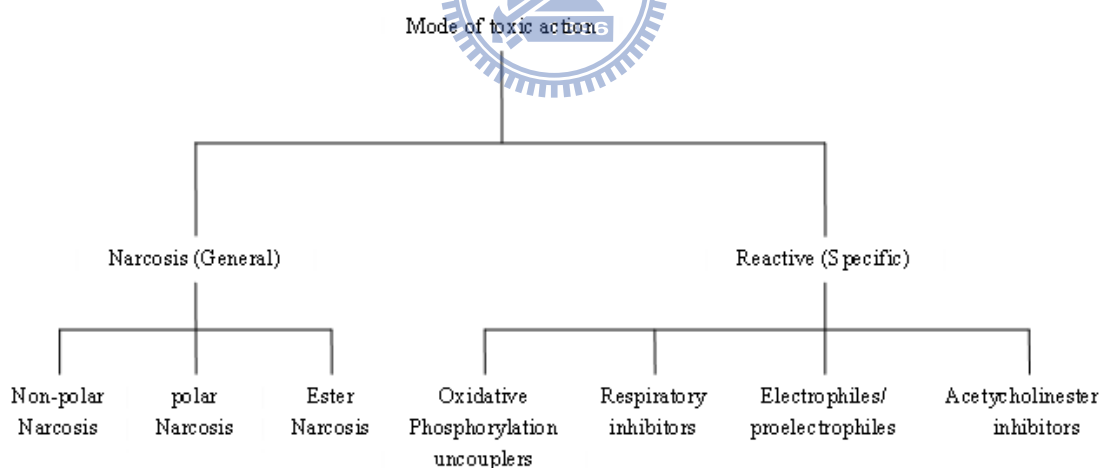


Fig 2.3.1 Classification of toxicity mechanism in aquatic toxicity tests^[1]

一般性也就是麻醉性，主要可分為兩類：非極性、極性。非極性麻醉性通常是較遲鈍的化合物，也可被稱作第一類化合物 (class I compound)，在QSAR分析上，與辛醇與水係數 ($\log P$) 成良好線性關係，也可定義為基線毒性 (baseline toxicity)。極性麻醉性之化合物通常比第一類化合物活潑，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。

化合物的作用包括了極性麻醉效應 (polar narcosis)、非極性麻醉效應

(nonpolar narcosis)、磷酸呼吸的非耦合 (phosphoric acid respiratory uncouplers) 與親電性 (electrophilic) 或親核性 (nucleophilic) 物質等。所有的有機化合物皆有能力產生麻醉效應，但此效應於低濃度中會被許多特异性機制的存在而抵銷^[37]。因此常被用於描述難分解化合物與細胞膜間非共價性的交互作用 (interaction)，其原因在於擾動了膜層(磷脂雙層)間脂質與蛋白質的比例^[38]，改變細胞膜脂質成份，進而產生毒性效應。

Hermen^[39]將化學物質廣義分成四大類：Class I inert chemicals、Class II less inert chemicals、Class III reactive chemicals、Class IV specifically acting chemicals。

Lipnick^[40]將反應性有機物分為四類 (表2.3.1)，分別為反應性親電型毒性(Electrophilic toxicity)、反應性前親電型毒性(Pro-electrophilic toxicity)、反應性具氰基型毒性 (Cyanogenic toxicity) 和反應性多機制型毒性 (Multiple toxicity)。

Table 2.3.1 Classification of reactive mechanism

1. Excess toxicity of electrophile nonelectrolytes
Nucleophilic substitution: allylic and propargylic activation Nucleophilic substitution: benzylic activated Nucleophilic substitution: α -halo-(C=X, C \equiv X) Acid anhydrides Strained three-membered heterocyclic ring Michael-type addition Schiff base formation
2. Proelectrophile nonelectrolytes and excess toxicity
Alcohol dehydrogenase activation Monooxygenase activation Glutathione transferase activation
3. Cyanogenic nonelectrolytes and excess toxicity
Cyanide release via cyanohydrin-like toxicant Cyanide release via monooxygenase activation
4. Excess toxicity from multistep or multiple mechanisms

2.4 α,β -不飽和酮類之 QSAR 研究

2.4.1 結構及性質

一般，含有C=C雙鍵和C=O雙鍵的化合物具有二種官能基特徵的性質。一種不飽和酮在C=C雙鍵上能進行酸類或鹵素的親電子性加成反應、氫化反應、羥化反應以及裂解；在羥基上能進行酮典型的親核性加成反應。在 α,β -不飽和羰基化合物中，有C=C雙鍵與C=O雙鍵僅隔一C-C單鍵； $-C=C-C=O$ 即雙鍵共軛。因此種共軛之故，此種化合物不但具有各別官能基的性質，亦具有某種其他性質^[41]。

2.4.2 官能基的相互作用 (Interaction of functional groups)

C=C雙鍵被送電子基活化，被拉電子基去活化。C=C雙鍵的作用如親電子性試劑的電子源；其電子的可用度取決於與之連結的基。具體一點就是送電子性取代基使初期鎂離子分散其正在成長的陽電荷而穩定過渡狀態；拉電子性取代基因加強陽電荷故使過渡狀態不穩定 (圖2.4.1)。

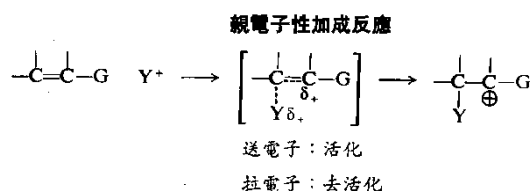
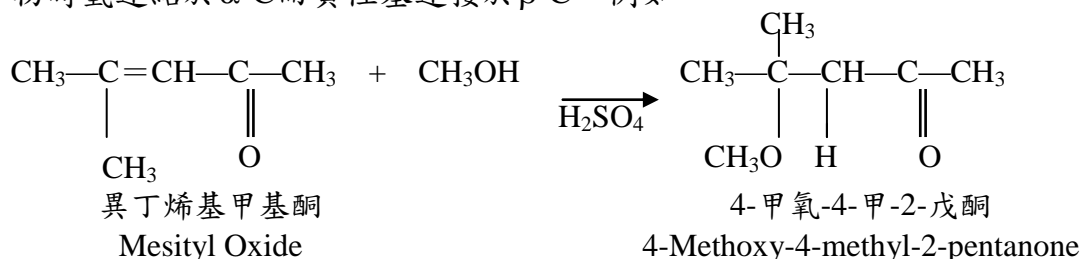


Fig 2.4.1 The chart of Electrophilic addition^[41]

C=O， $-\text{COOH}-$ ， $-\text{COOR}$ 等基為有力的拉電子基，故可望去活化C=C雙鍵的親電子性加成反應。但此種強力的拉電子性，對於尋找電子的試劑有去活化C=C雙鍵的作用，同時富電子試劑會活化C=C雙鍵。結果， α,β -不飽和酮的C=C雙鍵可接受親核性攻擊，而進行親核性加成反應 (nucleophilic addition)^[41]。

2.4.3 親電子性加成反應 (Electrophilic addition)

羰基的存在不但降低C=C雙鍵對於親電子性加成反應的反應性，而且控制加成反應的位向。一般言之，不對稱試劑加成於 α,β -不飽和羰基化合物時氫連結於 α -C而負性基連結於 β -C。例如：



單純烯類的親電子性加成反應以生成最穩定的中間體鎂離子^鎂的方式進行， α,β -不飽和羰基化合物的加成亦與此原理一致。 β -C上的加成產生穩定生成物(III)，此物僅為不飽和羰基化合物的烯醇體(enol form)。該烯醇體然後進行互變異構化反應成酮體(keto form)，得生成物(IV)^[41](圖2.4.2)。

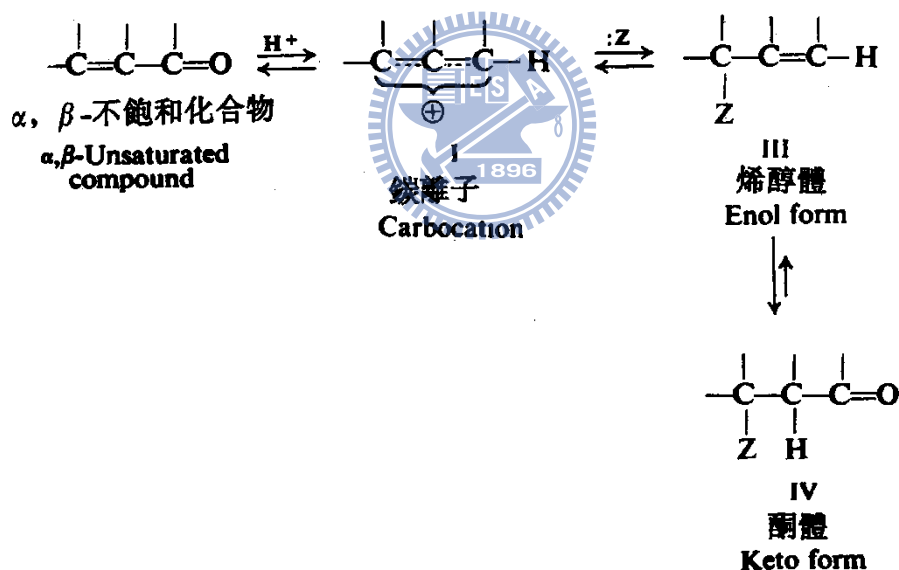


Fig 2.4.2 The formation of carbocation^[41]

2.4.4 親核性加成反應 (Nucleophilic addition)

有很多例子，都說明了明顯過量的毒性是由於包含鹵素或其他適合的離基(leaving group)發生親核性反應(S_N reaction)所造成^[42,43]。藉由此機制作用的化合物被認為在生物高分子內之化合物共價鍵與其硫氫基、氮

基及其他親核基鍵結。明顯過量的毒性在這些親電性物質其離基在 α -位置為雙鍵 (allylic activation) 或參鍵 (propargylic activation) 亦或芳香環 (benzylic activation) 上被展現出來^[42] (圖2.4.3)。然而，和鹵碳化物 (halo-carbon) 類似的官能基，例如苯甲醯甲基 (phenacyl)、羧基 (carboxyl) 及氨基化物 (amide) 也會同時產生 π 活化 (π -activation) 作用^[42, 43]。

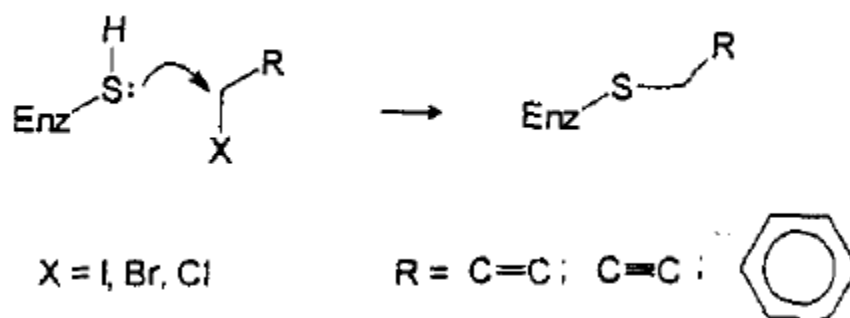


Fig 2.4.3 The chart of nucleophilic addition (1)^[42]

由於 S_N 活化的部份 (activating moieties)，基本結構 (substructural screen) 是以 sp^3 碳位與一個鹵素及碳氫原子共價鍵結結合，用 $X-CY_3$ 表示，其中 $X = \text{I, Br, Cl}$ ， $Y = \text{C, H}$ ，只有 I, Br, Cl 作為離基，而先前的研究指出 $\text{F, C}\equiv\text{N}$ 不適合在親核性取代 (S_N displacement) 當做離基。

2.4.5 親核性及親電子性加成反應的比較 (Comparison of nucleophilic and electrophilic addition)

親核性及親電子性加成反應間的差異當然在其所生成中間體離子具有相反電荷：在親核性加成反應中成負性，在親電性加成反應成正性。結果取代基的效應完全相反。拉電子基去活化 $\text{C}=\text{C}$ 雙鍵的親電性加成反應，活化親核性加成反應。拉電子基在親核性加成反應中因幫助分散生長中的負電荷以穩定化導致生成中間體陰離子的過渡狀態(圖 2.4.4)^[41]：

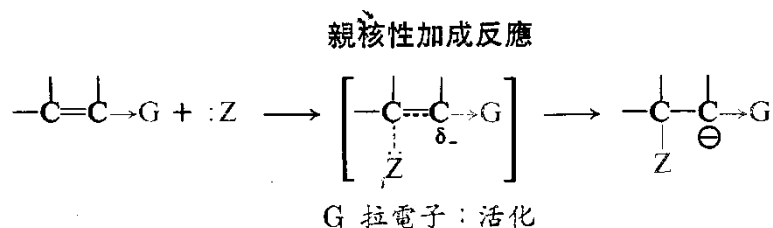


Fig 2.4.4 The chart of nucleophilic addition (2)^[41]

α,β -不飽和羰基化合物的加成反應以對整個全共軛系的攻擊論之最易瞭解。欲得最穩定的中間體離子，此攻擊必須發生在該共軛系的一端。親核性試劑攻擊 β -C 生成負電荷部份被電負性原子氧所容納的陰離子；親電子性試劑攻擊氧生成正電荷被碳所容納的鎂離子 (圖 2.4.5)^[41]。

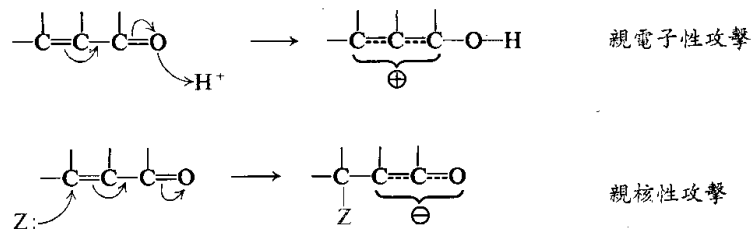


Fig 2.4.5 The difference between nucleophilic and electrophilic ^[41]

2.4.6 Michael 加成反應 (The Michael addition)

含極性官能基之 α,β -不飽和羰基化合物具明顯的毒性由於 Michael 加成 (Michael-type addition) 至親核性高分子位置作用所致^[42]。圖 2.4.6 為 Michael 加成反應之示意圖^[42]，Enz 為強鹼性陰離子，SH 為硫氫基。

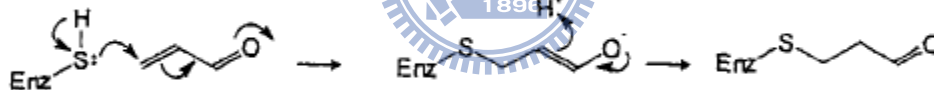


Fig 2.4.6 The chart of Michael addition^[42]

Michael 加成 (Michael-type addition) 主要由兩個步驟形成^[44]：

- (1) 藉由所形成之共價鍵向內轉至親電性中心
- (2) 最後在分子上不留下離基 (leaving group)

此分子機制常常發生在 C=C 雙鍵之外層碳原子上，藉由硫醇基在外層碳原子上之親核性加成反應^[44]。

2.4.7 α,β -不飽和羰化物之毒性機制

Papirmeister et al. ^[45]重新探討 Michael 加成親電性物質的毒性，簡單來說，毒性是由於一開始的 GSH 烷基化而之後依序遞減，使得其他含硫氫基物質尤其是鈣離子轉運酶 (Ca²⁺ translocases) 較容易受到攻擊，干擾鈣

離子體內平衡與細胞骨架，破壞並使細胞質膜喪失完整性。GSH 是一種由 L- γ -glutamyl-L-cystemylglycine 所構成之三肽類，它的半胱氨酸 (cystemyl) 提供了關鍵的硫氫基部分 (SH moiety)，它亦是便利性傳輸之重要的功用物質，會經由接合作用 (conjugation) 消除許多反應性化合物質。自發性接合作用 (Spontaneous conjugation) 會將所選之軟親電性物質與 GSH 內之硫醇基交互作用以保護含硫醇基的酵素與結構蛋白^[45]。

2.4.8 毒化物與穀胱甘肽(glutathione)之反應性

Michael 加成親電性物質的毒性易受到 GSH 烷基化所影響，隨著 GSH 被消耗會使硫氫基 (-SH) 容易受到攻擊，由於所選的親電性毒化物會與 GSH 自發性的結合以保護細胞內所含之硫氫基遭受攻擊。於是了解分子結構與 GSH 之間反應性關係成為解釋 α,β -不飽和毒化物結構-毒性關係一個重要的關鍵^[3]

2.5 挑選最適迴歸參數方法 — 逐步迴歸分析法(Stepwise analysis)^[46]

逐步迴歸法(stepwise analysis)大多與迴歸模式結合，其為迴歸模式之一，可將主要分析參數選出，避免不必要之預估參數，並可將影響模式之變數影響力排序。在此所選用之統計軟體為Minitab 15。

一般在建立迴歸模式時，希望盡可能包含主要之自變數以減少誤差項，並求得較精確之結果。但變數過多常導致模式冗大而分析困難，故常使用較少卻足以達到解釋模式變異程度之變數數目。逐步迴歸分析可以藉由向前選擇法(forward)、向後消去法(backward)、及逐步選擇法(stepwise)，選擇較少數目卻足以反應迴歸模式之變數，降低預估參數量而簡化模式。逐步迴歸程序乃利用選取一組新集合的自變數以產生一較佳的迴歸模式，將一連串的變數簡化，藉由逐步迴歸將與因變數較有顯著關係之自變數選出，刪除對此迴歸模式較無顯著相關之變數，經由逐步迴歸之程序減少不必要之自變數，減低模式預估參數。變數之選取或消去通常使用F檢定之顯著水準來決定變數去留，自變數partial R squared 值則為對模式之影響效果，其亦作為模式選入之參考標準。^[46]

向前選擇法在開始時並無變數進入迴歸模式中，在每次選擇程序中，選出一個對模式影響最大之變數進入迴歸方程式中，並對迴歸程式選擇外的變數以是否顯著 (F 檢定，Minitab 內定 $p < 0.25$)，以決定某一個預測變數是否有資格被選入迴歸模式中。向前選擇法一步步選取變數，直至無變數可進入模式。向後消去法和前進選擇法類似，不同的是向後消去法在剛開始時所有變數皆在模式之中，在每一次的選擇步驟去除對模式貢獻最

小者，並對留在迴歸模式中的變數作F 檢定（Minitab 內定 $p < 0.1$ ），最不顯著之變數則刪除，直到沒有變數可消去。逐步選擇法為向前選擇法和後退消去法之結合，剛開始時模式中並無變數存在，先採用向前選擇法選取對模式貢獻最大者之變數進入迴歸模式中，下一步驟使用向後選擇法考驗此變數是否留下或去除，一步步考慮選取進入模式之變數，反覆選取刪除後，直到當模式中所有變數之水準被測定為可進入且無任何變數可再進入時，逐步選擇停止。逐步迴歸的F 統計檢定Minitab 內定標準為 $p < 0.15$ ，為選取進入與消去之基礎，檢驗已在模式中之變數，刪除具有較少區別力之變數，反之則加入，當沒有適合的變數落在模式外則結束逐步程序，可設定較小的顯著水準提高選取變數數目，但可能所選取的變數並無法顯著影響模式。不論是使用顯著水準還是partial R squared 之值為標準，變數的選取個數也許不同，但選取順序依然相同。^[46]



第三章、基本理論

3.1 基本生長動力學

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，如果光照、營養鹽或碳源受到限制，則藻類之基本生長模式將由指數型態變成直線型態。

在連續式藻類培養中，當系統達到一平衡（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 $\mu = D$

此表示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。

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，

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

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

$$\text{又 } \mu = D$$

$$\text{所以 } X = Y(S_0 - S)$$

$$\text{再由 Monod's equation, } \mu = \frac{\mu_{\max} S}{(K_s + S)}$$

$$\text{及 } \mu = D$$

$$\text{所以 } S = \frac{K_s D}{(\mu_{\max} - D)}$$

其中， μ 為比生長率； μ_{\max} 為最大比生長率； K_s 為飽和常數（比生長率為最大比生長率一半時之基質濃度）。

最後可得

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

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

3.2 毒性物質劑量反應模式



以毒理學的角度而言，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，是否為毒性物質最主要差別在所暴露之劑量。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，實驗物種受測試物質作用時，所造成生物體 50% 受抑制（或死亡）時所表現出的測試物質濃度，即稱做 EC_{50} (Effect Concentration 50%) 或 LC_{50} (Lethal Concentration 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。生物體受毒性物質影響的劑量反應關係如圖 3.2.1 所示。虛線與實線分別代表受測生物體 A 與 B 的劑量反應曲線，可以看出虛線的斜率大於實線的斜率，表示生物體 A 對毒性物質的容忍範圍較小，亦說明了生物體 A 對毒物濃度的變化較敏感：微量的濃度變化即可導致抑制率的明顯改變。而在抑制率為 0.5 處，延伸至兩曲線所對應的毒性物質濃度，即為毒性物對生物體所造成的半致死濃度 (EC_{50})。

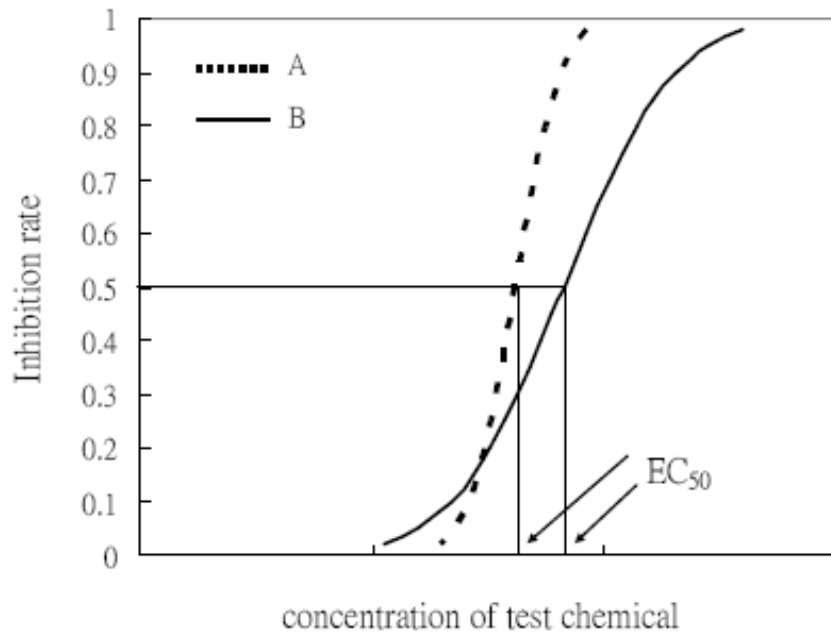


Fig 3.2.1 Dose-response relationships of common toxicity tests

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議，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，再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。



Table 3.2.1 The types of Weibull, Probit and Logit models

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

第四章、實驗設備與方法

4.1 實驗設備及材料

密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗之設備材料：

1. 恆溫無塵室

恆溫無塵室大小約為五坪，其溫度控制在 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，保持恆溫，藻類培養、試驗皆在此溫控室內進行。

2. 水質

實驗中清洗容器、器具之二次清洗水及藥品配製用水皆為自來水依次經過四道濾心過濾、離子交換、蒸餾然後再經超過濾 (Milli-Q plus) 處理之去離子水。使用時需確定水質之電阻值 ≥ 18.2 Mega-ohm ($\text{M}\Omega\text{-cm}$) 才可開始使用。

3. 培養裝置與迴轉式振盪儀

培養裝置為自行裝配之培養箱，台面可依所需而更改、拆換，以角鋼為架構主體，長 \times 寬 \times 高為 $135\times 110\times 135\text{cm}$ ，頂面履以 120cm 長之白色螢光燈管 8 支。並設有迴轉式振盪儀 (EIRSTEK公司，型號S103)，搖動速度可大於 100rpm ，其台面共有 66 個位置。培養設備置於恆溫室內，控制溫度在 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。作為藻類批次式培養與毒性試驗之用。

4. 批次式培養器皿

以批次方式培養液態藻類時所使用之容器為 125ml ，Erlmeyer之三角錐瓶。每次使用前皆經過滅菌斧殺菌。

5. 紗布

藻類於批次培養時，使用消毒紗布覆蓋至三角錐瓶瓶口，除了可防止異物進入，且可利於空氣中之 CO_2 流通來提供藻類生長所需之碳源。

6. 連續式培養母槽

連續式培養之母槽使用體積 5 公升，直徑為 18cm 之玻璃容器。於體積 4 公升處開口做為溢流口，並且於體積 2 公升處開一口做為取樣之用。母槽上方亦有兩開口，一作為營養基質流入口、

另一作為空氣進流用。

7. 電磁攪拌器

用於連續式培養母槽，當放置於連續式培養母槽的下方，其作用為使藻液與進流之營養基質、空氣混合均勻，避免藻類之沉澱。

8. 蠕動幫浦

蠕動幫浦使用日本EYELA公司，型號 MP-1000 之定量幫浦，作為輸送營養基質到連續式培養母槽之動力，並可控制其流量。

9. 幫浦管

幫浦管使用Materflex公司，型號 H-96400-14。輸送管為矽膠材質，不具毒性，可避免影響母槽之培養及毒性試驗之結果。

10. 曝氣幫浦

使用之曝氣幫浦為一般水族使用之曝氣幫浦。

11. 浮子流量計

其功用在量測曝氣氣體之流量，本實驗母槽之曝器量控制在400ml/min。

12. 空氣洗滌器

洗滌器的功用在去除曝氣氣體中的雜質，並可以藉此濕潤氣體，增加氣體之溶解。

13. 庫德式電子顆粒計數器二代

功用為計數藻類細胞數。使用 Coulter Electronics 公司之 Coulter Counter，型號為 MULTISIZER II，並以 5.06 μm 標準顆粒乳液來校正。配有 50 及 100 μm 孔徑之玻璃管。本實驗使用 100 μm 孔徑之玻璃管，量測之顆粒直徑範圍為 2 μm ~ 60 μm 。

14. BOD 瓶

為毒性試驗時使用之玻璃器皿。使用體積 300ml，直徑 8cm 之 BOD 玻璃瓶。上頭開口處有玻璃瓶塞，使其可以利用水封之形式，避免外界氣體、物質等進入，而減少干擾。整個系統為一個封閉式系統。

15. 光度測定計

使用 TOPCON 產牌，型號 IM-2D，單位為 lux。

16. 酸鹼度 (pH) 測定儀

使用 Suntex 公司，Model SP-2200 之 pH 測定儀。其精確度為

± 0.01%。

17. 溶氧測定儀

美國 YSI 公司出品之微電腦溶氧測定儀，Model YSI 5100，附有 Model 5010 溶氧測定探頭 (BOD Probe)，其探頭部分裝有電動攪拌器，可以對樣品進行攪拌。溶氧量測定範圍為 0.0 ~ 60.0 mg/L，精準度為 ±0.1%。

18. 曝氣用氣體鋼瓶

使用含 0.5% CO₂ 之高壓氣體鋼瓶，氮氣之純度達 99.9%，總氣體體積為 6 m³。用於降低營養基質中之溶氧值，並確保能提供足夠之碳源。

19. 純水曝氣設備

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

20. 無菌操作台

使用造鑫公司製造的 Laminar Flow 操作台，內設有紫外光殺菌，以防止植種過程及配製營養鹽時受到污染。

21. 抽器幫浦

使用 SINKU KIKO 公司，型號 ULVACG-5 及 G-50 之幫浦。用於過濾營養基質及 ISOTON II 之用。

22. 冰箱

使用 Whirlpool 之冰箱，其功用為維持藻種、藥品及營養鹽於 4°C 之下，以保存之。

23. 滅菌釜

使用 HIRAYAMA 公司，型號 HA-300M 之滅菌釜，最大壓力可達 1.9 kg/cm²，容積為 0.0521 m³。使用時條件設定為高溫 (121 °C) 高壓 (1.1 kg/cm²) 來進行滅菌，每次對實驗器皿進行滅菌的時間設定為 15 分鐘。

24. 烘箱

使用 Memmet 公司之烘箱，做為烘乾玻璃器皿用。使用時溫度設為 52 ± 1°C。

25. 分析天秤

量測藥品用，產牌 Precisa 205A，精確度至0.01mg。

26. 定量吸管

使用SOCOREX 公司，可調式移液器，容量為 100~1000 μ l 及 0.1~10 ml 兩種。

27. 濾膜

使用之濾膜分成兩種，過濾營養基質時使用 ADVANTEC[®] 型號 80414200 之0.45 μ m 濾膜，過濾 Isoton II 時使用型號 70802200 之0.2 μ m 濾膜。

28. QSAR 中物化參數計算程式

- 辛醇-水係數 ($\log K_{ow}$) 由美國環保署提供的 EPIWEB 4.0 計算求得
- E_{LUMO} 、 E_{HOMO} 、 α -C部分電荷值(Q_3)、 β -C部分電荷值(Q_4)以 ChemOffice 軟體建立所需要的輸出檔，再將其輸入 MOPAC 計算而得。建立方式請詳見附錄三

29. QSAR 中物化參數分析統計軟體

- Minitab 15版統計軟體，統計方法請詳見附錄二

30. 總有機碳 (TOC) 分析儀器

廠牌為 jena (台灣耶拿)，型號為 analytikjena 的 multi N/C 3100 TOC Analyzer。

31. 藥品

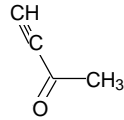
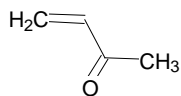
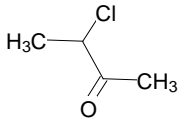
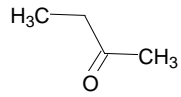
實驗所使用之藥品均向友和貿易股份公司購買，純度均 \geq 95%。

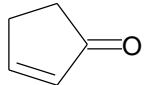
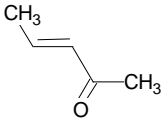
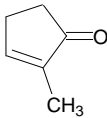
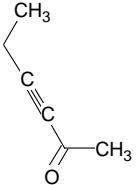
試驗步驟：

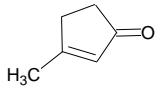
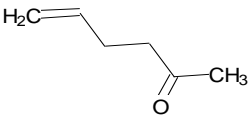
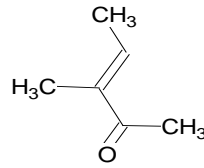
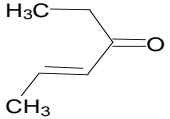
本研究主要是利用BOD瓶進行18種 α , β -不飽和酮類的藻類毒性試驗，試驗共進行 2 run 以上，每一 run 為三重複，每一重複為7組不同濃度及1組控制組，濃度的換算係在實驗前先將配置好的stock solution 以 TOC定量，再依濃度比例將名義濃度(nominal concentration) 換算為實際濃度進行實驗;實驗結果也分別以溶氧變化量 (ΔDO)、最終生物數量 (Final Yield) 和細胞生長率 (Growth Rate) 為試驗終點進行單一毒物之毒性試驗。實驗毒物之物化特性如表4.1.1。

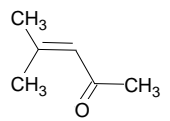
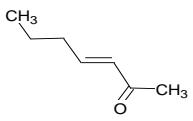
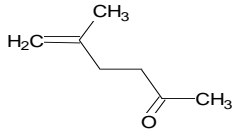
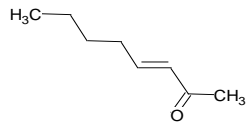
毒性數據分析的部份，選定物化參數及參考文獻中親電性與反應性參數並利用minitab統計分析軟體，建立一單一線性迴歸式與多重線性迴歸式，並觀察其預測能力好壞，建立QSAR之毒性結構關係，與觀察其反應性與毒性之關聯性，實驗毒物之電性參數、反應性參數與文獻毒性數據如表4.1.2。

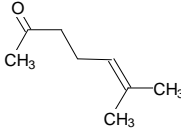
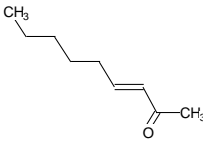
Table 4.1.1 Physical and chemical characteristic of α,β -unsaturated ketones

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Log P	Solubility (mg/L)
3-butyn-2-one	1423-60-5	C ₄ H ₄ O	68.08		-0.52	178550
3-buten-2-one	78-94-4	C ₄ H ₆ O	70.09		0.41	10977
3-chloro-2-butanone *	4091-39-8	C ₄ H ₇ ClO	106.55		0.44	75022
Methyl ethyl ketone *	78-93-3	C ₄ H ₈ O	72.11		0.26	96451

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Log P	Solubility (mg/L)
2-cyclopenten-1-one	930-30-3	C ₅ H ₆ O	82.10		0.71	7639.2
3-pentene-2-one	625-33-2	C ₅ H ₈ O	84.12		0.52	8179.2
2-methyl-2-cyclopenten-1-one	1120-73-6	C ₆ H ₈ O	96.13		1.26	4268.5
3-hexyn-2-one	1679-36-3	C ₆ H ₈ O	96.13		0.17	ND

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Log P	Solubility (mg/L)
3-methyl-2-cyclopenten-1-one	2758-18-1	C ₆ H ₈ O	96.13		1.26	4268.5
5-hexen-2-one	109-49-9	C ₆ H ₁₀ O	98.14		1.10	11454
3-methyl-3-penten-2-one	565-62-8	C ₆ H ₁₀ O	98.14		1.37	4554.3
4-hexene-3-one	2497-21-4	C ₆ H ₁₀ O	98.14		1.31	2771.2

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Log P	Solubility (mg/L)
4-methyl-3-pentene-2-one	141-79-7	C ₆ H ₁₀ O	98.14		1.37	4554.3
3-heptene-2-one	1119-44-4	C ₇ H ₁₂ O	112.17		1.8	919.74
5-methyl-5-hexen-2-one	3240-09-3	C ₇ H ₁₂ O	112.17		1.65	6247.6
3-octene-2-one	1669-44-9	C ₈ H ₁₄ O	126.20		2.29	300.48

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Log P	Solubility (mg/L)
6-methyl-5-hepten-2-one	110-93-0	C ₈ H ₁₄ O	126.20		2.06	4364.1
3-nonene-2-one	14309-57-0	C ₉ H ₁₆ O	140.23		2.79	96.955

ND : No Data

Log P data from EPIWEB version 4.0 software

* : saturated ketone

Table 4.1.2 Reference toxicity data and descriptors of α,β -unsaturated ketones

Chemical	CAS No.	Formula	IGC ₅₀ (mM)	RC ₅₀ (mM)	Q ₃ +Q ₄ (au)
3-butyn-2-one	1423-60-5	C ₄ H ₄ O	0.011 ^a	0.057 ^c	-0.3560 ^b
3-buten-2-one	78-94-4	C ₄ H ₆ O	0.032 ^a	0.090 ^c	-0.3775 ^b
3-chloro-2-butanone *	4091-39-8	C ₄ H ₇ ClO	ND	ND	ND
Methyl ethyl ketone *	78-93-3	C ₄ H ₈ O	0.012 ^a	ND	ND
2-cyclopenten-1-one	930-30-3	C ₅ H ₆ O	0.230 ^b	ND	-0.3454 ^b
3-pentene-2-one	625-33-2	C ₅ H ₈ O	0.290 ^a	0.11 ^c	-0.3321 ^b
3-hexyn-2-one	1679-36-3	C ₆ H ₈ O	0.055 ^a	0.12 ^c	-0.3083 ^b
2-cyclopenten-1-one, 2-methyl-	1120-73-6	C ₆ H ₈ O	6.699 ^b	ND	-0.2949 ^b
2-cyclopenten-1-one, 3-methyl-	2758-18-1	C ₆ H ₈ O	21.038 ^b	ND	-0.2927 ^b
4-hexene-3-one	2497-21-4	C ₆ H ₁₀ O	0.118 ^a	0.34 ^c	-0.3333 ^b
5-hexen-2-one	109-49-9	C ₆ H ₁₀ O	13.821 ^a	ND	ND
3-penten-2-one, 3-methyl-	565-62-8	C ₆ H ₁₀ O	2.213 ^b	10 ^c	-0.2794 ^b
4-methyl-3-pentene-2-one	141-79-7	C ₆ H ₁₀ O	4.403 ^a	28 ^c	-0.2771 ^b
5-methyl-5-hexen-2-one	3240-09-3	C ₇ H ₁₂ O	8.669 ^a	ND	ND
3-heptene-2-one	1119-44-4	C ₇ H ₁₂ O	0.201 ^a	ND	-0.3301 ^b
3-octene-2-one	1669-44-9	C ₈ H ₁₄ O	0.182 ^a	0.46 ^c	-0.3298 ^b
6-methyl-5-hepten-2-one	110-93-0	C ₈ H ₁₄ O	2.833 ^a	ND	ND
3-nonene-2-one	14309-57-0	C ₉ H ₁₆ O	0.104 ^a	ND	-0.3302 ^b

^a : data from Reference by T. W. Schultz et al. 1995. ^[47]

^c : data from Reference by T. W. Schultz et al. 2007. ^[45]

RC₅₀ : 50% Reactive Concentrations with GSH

ND : No Data

^b : data from Reference by T. W. Schultz et al. 2005. ^[3]

IGC₅₀ : 50% Inhibit Growth Concentrations with *Tetrahymena pyriformis*

Q₃+Q₄ : sum of the partial charges of C₄ and C₃

* : saturated ketone

4.2 毒性試驗藻種

本研究中，採用植物性浮游生物，在分類上屬於綠藻綱 (*Chlorophyceae*) 的月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)，Strains UTEX 1648，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 $40-60 \mu\text{m}^3$ ，體型呈半月型。U.S. EPA、ISO、OECD 及 APHA 等單位之藻類毒性試驗，皆使用此藻種做為標準試驗物種之一。本實驗之藻種購自於University of Texas, Austin。

4.3 實驗前的準備

4.3.1 培養基配製

本研究所使用之培養基質為參考 U.S. EPA 使用之營養基質組成，配製方法如下：

將下列 1~7 的貯備液 (Stock Solution) 各加 1 ml 至含 900 ml 去離子水中，再稀釋至 1 公升。接著以 0.1N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養基質之 pH 值調至 7.50 ± 0.10 ，用錫箔紙包覆後置於 4°C 冰箱中保存。

1. 硝酸鈉貯備液：溶解 12.750g NaNO_3 於 500 ml 去離子水。
2. 氯化鎂貯備液：溶解 6.082g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水。
3. 氯化鈣貯備液：溶解 2.205g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水。
4. 硫酸鎂貯備液：溶解 7.350g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水中。
5. 磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522g K_2HPO_4 於 500 ml 去離子水中。
6. 碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5g NaHCO_3 於 500 ml 去離子水中。
7. 微營養鹽貯備液：共配製 stock1 (100% EDTA)、stock2 (10% EDTA) 和 stock3 (0% EDTA) 三瓶不同編號的貯備溶液，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。每瓶的配法為先秤取下列七種藥品加入 500 ml 去離子水中。

92.760 mg H_3BO_3	0.714 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
207.690 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.630 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.635 mg ZnCl_2	0.006 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
79.880 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	150 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

其中微營養鹽貯備液中，EDTA分別有 100%、10% 及 0%三種。100% 是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時使用10%，進行實驗

時則使用不含EDTA之貯備液。最後配成的營養鹽其巨量及微量營養素濃度列於表4.3.1及表4.3.2。營養基質的滅菌是以 0.45 μ m 的濾膜過濾，過濾滅菌後的營養基質須保存在 4 °C 且置於陰暗無光線照射處，以免產生光化學反應。

Table 4.3.1 The consist of micro-algae medium

Chemical	concentration (mg/L)	element	Final conc. (mg/L)
NaNO ₃	25.5	N	4.20
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5.7	Mg	2.90
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4.41	Ca	1.20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	14.7	S	1.91
K ₂ HPO ₄	1.04	P	0.186
		K	0.649
NaHCO ₃	15.0	C	2.14
		Na	11.0

Table 4.3.2 The consist of micro-algae medium (EDTA component)

Chemical	concentration (μ g/L)	element	Final conc. (μ g/L)
H ₃ BO ₃	186	B	32.5
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	264	Mn	115
ZnCl ₂	3.27	Zn	1.57
FeCl ₃ · 6H ₂ O	96.0	Fe	30.0
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.78	Co	0.354
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	7.26	Mo	2.88
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.00900	Cu	0.0400
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	300		

4.3.2 玻璃器皿清洗與滅菌

玻璃器皿使用前需先用不含磷之清潔劑浸泡、清洗，然後以自來水沖洗 5 至 6 次，接下來則用 10% 之鹽酸 (HCl) 浸泡最少一個小時，之後再以碳酸鈉 (Na_2CO_3) 溶液清洗中和，並用自來水沖洗 5 至 6 次後再以去離子水沖洗 3 至 4 次，置入烘箱中以 52°C 之溫度烘乾。使用前需在其開口處封上鋁箔，置入滅菌釜中，以 $1.1\text{Kg}/\text{cm}^2$ 、 121°C 的條件滅菌 15 分，而定量容器則不可加熱烘乾或放入滅菌釜中，以避免容器因加熱而改變容量，只要於泡酸液清洗完後，置於架上陰乾即可。

4.3.3 盤面光度之調整

使用單面為白色亮面具反射光線效果之木板，組裝於震盪器四周，光度不足處調整木板大小及形狀，並以具反射作用之鋁箔紙覆蓋於木板之上反覆進行微調，使整個震盪器盤面之光度落在 $4300 \pm 10\%$ Lux 之範圍內，以減少實驗之誤差。



4.3.4 藻類之培養步驟及裝置

實驗物種 *Pseudokirchneriella subcapitata* 在進行實驗前必須經過 2-7 天預培養 (pre-culture) 使之平均細胞體積 (mean cell volume) 達到 $39\text{-}46\mu\text{m}^3$ ，而藻類細胞數量達到 $1.9\text{-}2.0 \times 10^6$ cells/mL，在此條件下才取藻類進行實驗。在培養藻類最需注意的步驟為微營養鹽貯備液的加入方法，一開始活化藻類加的是 stock1 (100% EDTA)，而在連續式母槽中培養藻類時使用的是 stock2 (10% EDTA)。此外液態營養基質中之藻類可在 4°C 下保存四個星期，於四個星期之後做移植以繼續培養保存菌種。圖 4.3.1 為培養步驟且本實驗條件依據 Lin^[19] 所決定之適當的條件下進行，條件如下：

1. 溫度：藻類之培養及毒性試驗皆在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 下進行。
2. 光度：藻類之培養及毒性試驗皆在光度為 $4300 \pm 10\%$ Lux 下進行，所使用之光源為連續白冷光。
3. 氮、磷濃度：培養藻類時使用一半之濃度，毒性試驗時則不變。
4. HCO_3 濃度：15 mg/L。
5. pH：初始 pH 為 7.50 ± 0.01 。
6. EDTA 含量：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。

7. 試驗時間：48 hr。
8. 藻類初始植種密度： 1.5×10^4 cells / ml。
9. 振盪頻率：100 rpm。

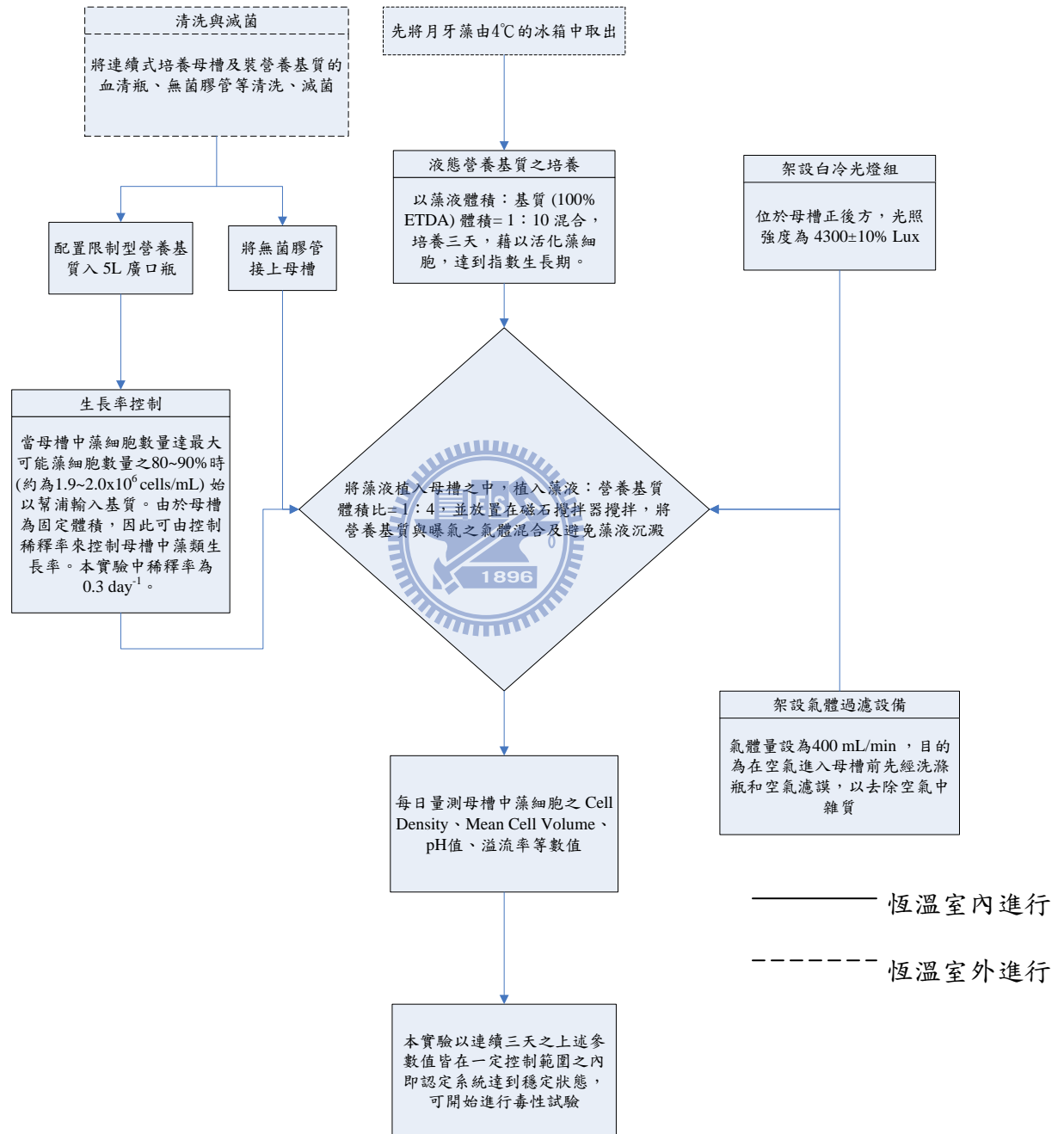


Fig 4.3.1 The culture steps of algae

4.3.5 ISOTON II 之配製

ISOTON II 之作用主要是作為電子顆粒計數器之導電溶液，使用電子顆粒計數器量測藻類細胞數時，所使用之溶液皆為 ISOTON II。ISOTON II 的配製是於 20 公升的超純水中加入 200g 氯化鈉 (NaCl)，攪拌使其混合均勻，然後以電導計測量其導電度，所需要之導電度為 17mmho。若是導電度低於 17mmho，則再慢慢加入氯化鈉，攪拌均勻，直到導電度為 17mmho；相反的，如果導電度超過了 17mmho，則慢慢加入超純水，攪拌均勻，直到導電度降至 17mmho。待導電度達 17mmho 後再以 0.2 μ m 之濾膜過濾此溶液，其濾液即是進行計數時所需之 ISOTON II 溶液。

4.3.6 電子顆粒計數器操作方式與原理

在電子顆粒計數器中有一根玻璃管及一攪拌器，將待測之顆粒樣品先與 ISOTON II 稀釋樣品（氯化鈉溶液）混合製成稀釋懸浮液。此懸浮液自玻璃管近底端的側面的一口徑已定之小孔抽引入測試管 (Aperture) 內，小孔兩側各有一內外電極，當顆粒通過小孔入管內時，每一顆粒均會取代與其相等體積之電解液，導致兩電極之電阻呈現暫時性之改變，由於系統是恆電流設計，故電位差亦暫時性之改變，行程某特定量的電阻。而電阻量化透過示波器的脈衝顯示，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，然後再將資料輸送至電腦中，以軟體程式 (Multisizer Accucomp V. 2.01) 進行進一步的分析。電子顆粒計數器主要條件設定如下表 4.3.3。本實驗採用 100 μ m 孔徑之毛細玻璃管。計數時，取 1ml 的藻液置入 50ml 之量瓶內，再加入 ISOTON I 至 50ml，然後倒入燒杯中，置入顆粒計數器內計數。以顯示之讀數值扣除空白顆粒數之數值，即純 ISOTON II 之背景值，所取之值為連續三次值相差在 2% 者之平均值。

Table 4.3.3 The conditions of Coulter Counter

項 目	數 值
滿刻度電流量 (Full scale)	10mA
極性 (Polarity)	+
電流 (Currents , I)	100
粒度下限 (Diameter Lower Threshold , Tl)	2.177 μ m
粒度上限 (Diameter Lower Threshold , Tu)	6.975 μ m
脈衝衰減倍率 (Attenuation , A)	1
脈衝放大倍率 (Preset Gain)	1
警戒粒徑限度 (Alarm Threshold)	OFF
孔徑 (Orifice Diameter)	100
孔長 (Orifice Length)	75.00
分析量	500 μ L
Setup	Manual
Kd	924
Size	5.00 E
Size unit	μ m

4.4 儀器操作原理、步驟與設定條件

試驗需先進行有機物定量，其中試驗毒物中以TOC (總有機碳分析儀) 定量，以下分別就儀器的原理及實驗步驟分別描述。

4.4.1 TOC (總有機碳分析法)

總有機碳(TOC)定義為Total Organic Carbon，而TIC為Total Inorganic Carbon，TC則為Total Carbon；而其簡單的原理為 $TOC=TC-TIC$ ；所使用的機型為analytikjena的 multi N/C 3100 TOC Analyzer (如圖4.4.1)；所利用的分析方式有兩種：第一種為直接分析模式 (NPOC Method)： $NPOC = TOC$ ，此方法的優點為分析時間快速，適合高濃度的樣品分析，但缺點為樣品需為不具揮發性，由於如此較不適用於本研究；而本研究所使用的為相減法 (Differential Method)： $TOC = TC-IC$ ，此方法可針對於具揮發性之有機化合物的偵測，為確保於燃燒管中完全氧化，故將溫度設定於 $800-1000^{\circ}\text{C}$ ，在建立背景校正曲線及分析樣品時採用注入不同濃度及相同體積樣品進行，從分析結果也發現其誤差範圍較小(0.2%~5.4%)。



Fig 4.4.1 The graph of TOC analyzer

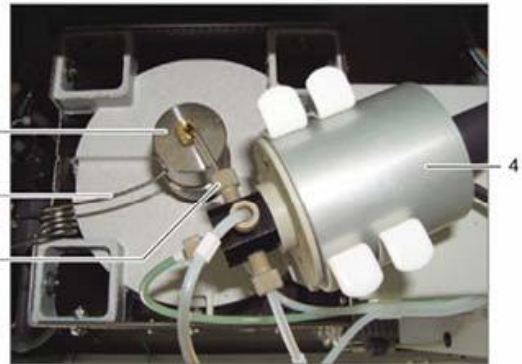
主體基本介紹：主體結構如圖4.4.2



- | | |
|------------|------------|
| 1. TIC 反應器 | 6. LED 指示燈 |
| 2. 冷凝器 | 7. 液體注射針 |
| 3. 鹵素吸附U型管 | 8. 幫浦 |
| 4. 過濾器 | 9. 磷酸瓶 |
| 5. 幫浦 (磷酸) | 10. 托盤 |



1 氣體供應系統 2 燃燒系統 3 環狀冷凝管



1 燃燒氣體接頭 2 帶動氣體接頭
3 燃燒頭 4 氣體切換閥

Fig 4.4.2 Introduction of TOC analyzer structure

4.4.2 總有機碳分析之標準液配製流程

- A. 總碳 (TC) 標準儲存液以 1000mg/L 為例：稱取 2.1254g KHP 鄰苯二甲酸氫鉀 (Potassium Hydrogenphthalate) →以超純水 (電導度 > 18Ω) 溶解並定量至1000mL。
- B. 總無機碳 (TIC) 標準儲存液以 1000mg/L 為例：
稱取 4.41625g 碳酸鈉 (Sodium Carbonate, Na_2CO_3) 以及 3.5g 碳酸氫鈉 (Sodium Hydrogen Carbonate, NaHCO_3) 混合後→以超純水 (電導度 > 18Ω) 溶解並定量至1000mL。
- C. TC/TIC混合儲存液，分別取上述已配製好的TC及TIC標準儲液各500mL 混合即可。

本實驗進行前，為了確保所配製的化合物Stock solution濃度的準確性，會先建立一條校正曲線，濃度分別為 20mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L；在進行毒性試驗前後分別測定其濃度，而為了避免高濃度的stock solution造成儀器測定的準確性，會採用稀釋的方式再進行樣品的分析，此方法也從分析結果中看到相當準確的結果。

4.5 密閉式藻類毒性試驗方法及步驟



4.5.1 實驗方法

在進行藻類毒性實驗前，先查尋過去是否有學者亦是以藻類進行毒性試驗，並參考其實驗結果，接著以文獻中所記載之濃度，於實驗前進行配製。若查無以藻類進行毒性試驗的資料時，則以文獻中的實驗數據與本實驗室過去實驗數據之間的關連性，進行實驗毒物濃度的預測。每次所進行之藻類毒行試驗均包括無添加毒物的控制組，以及添加七種不同濃度的處理組，進行三重覆的分析。最終分別以溶氧、藻類顆粒數、以及生長率，做為觀測終點 (End point)，並利用Probit模式計算出各種毒物對藻類所造成 50% 抑制時的濃度 (EC_{50})。

4.5.2 實驗步驟

本藻類試驗為屬於四十八小時的急毒性試驗，其圖4.5.1為密閉式藻類毒性試驗流程暨裝置示意圖。以下針對實驗進行的第一天及第三天需準備器具和進行順序介紹如下：

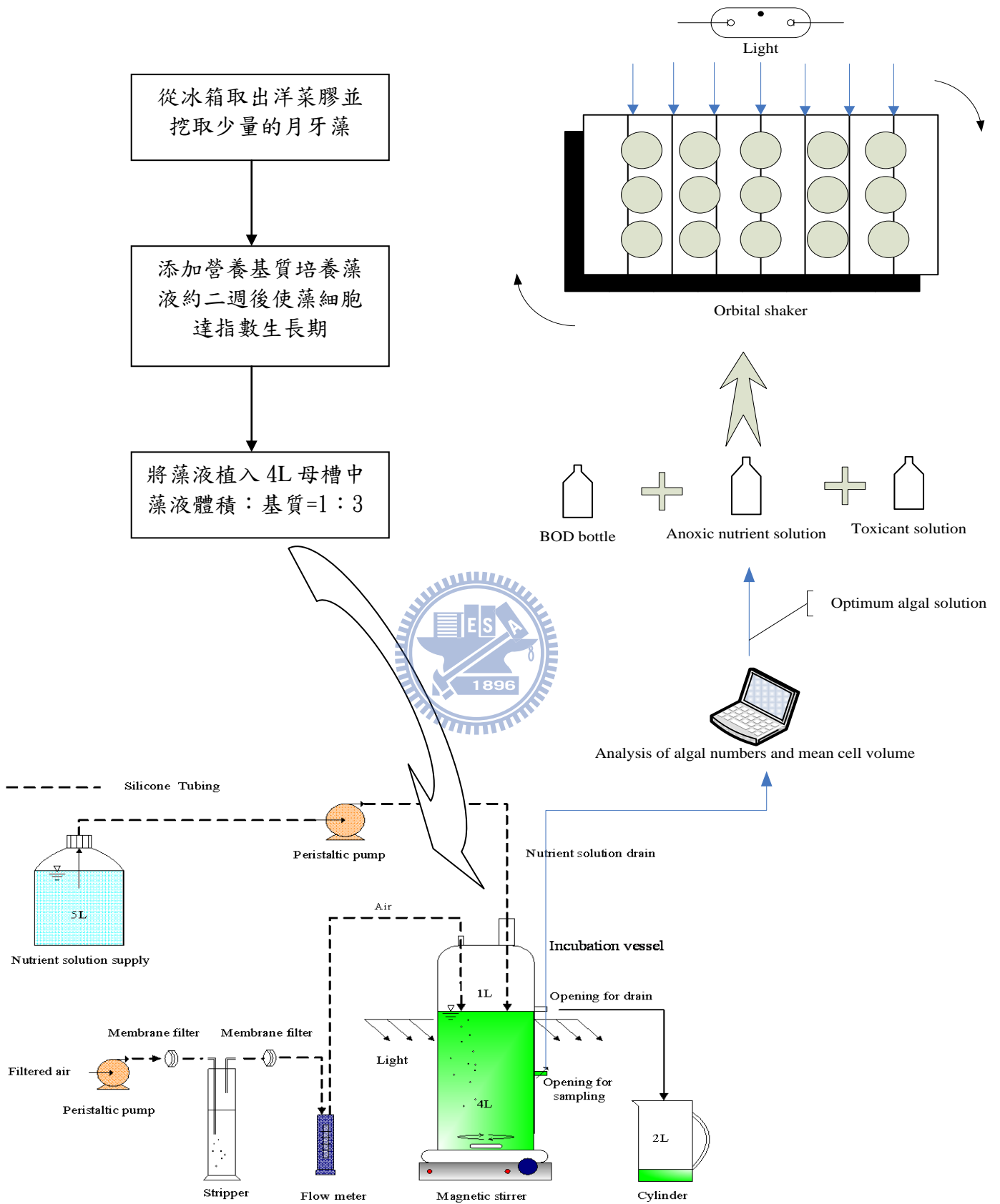


Fig 4.5.1 The flow chart in close-system algae toxicity test

第一天

1. 去離子水曝氣：當確定連續式培養母槽穩定之後，即可以開始藻類毒性試驗。

(1) 器具

- 18.2 Megaohm 的去離子水 (DI water)
- pH meter
- 0.1N 氫氧化鈉 (NaOH)、1N 氫氧化鈉 (NaOH)
- 去離子水曝氣設備 (包含德製下口瓶、0.5% CO₂ + 99.5% N₂之高壓氣體鋼瓶、氣體流量計、幫浦管和曝氣小球)

(2) 進行順序

將自行設計之去離子水曝氣設備裝滿的去離子水，裝完後用 NaOH 調整 pH 值至 7.50 ± 0.01 ，氣體鋼瓶進行曝氣 15 分鐘 (如圖 4.5.2)。曝氣的目的是為了降低營養基質中之溶氧值並增加其 CO₂ 濃度。經過 5~6 分鐘的曝氣後，溶氧值可接近 1.0 mg/L。迅速將下口瓶之蓋子蓋上。

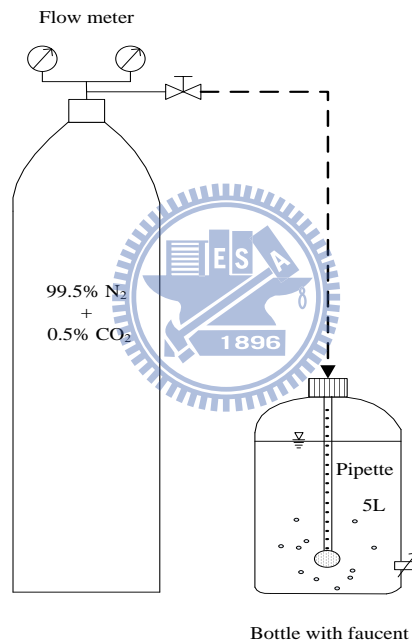


Fig 4.5.2 The diffuser system of deion-water

2. 營養鹽準備：本步驟只針對一組21 瓶的BOD 瓶實驗進行描述。

(1) 器具

- 經美國環保署 (U.S. EPA) 標準方法修正過後的七瓶的貯備
- 100mL 燒杯
- 電磁攪拌器+磁石

(2) 進行順序

取一空燒杯各加入的貯備液 6.3mL，其中需注意含有 EDTA 微量營養鹽儲備液是取 0% EDTA，取完後再加入磁石覆上鋁箔紙進行攪拌器混和。

3. 藻類選取：目的為判定連續式培養母槽是否已達穩定狀態（steady state），是否可用於用於毒性實驗。

(1) 器具

- 庫德式電子顆粒計數器（內附有特置鐘型圓口瓶和攪拌器）
- 50mL 定量瓶
- 50mL 燒杯
- ISOTON II
- 1mL 的定量吸管

(2) 進行順序

先將計數器暖機 30 分鐘後，用 ISOTON II 流洗計數器並設定吸取分析量為 500 μ L，流洗完畢時，用燒杯從母槽取出藻液，再用定量吸管定量 1mL 從燒杯取出藻液加入定量瓶中並加入 ISOTON II 直至 50mL，再倒入鐘型圓口瓶進行攪拌量測。先量測三次的 ISOTON II 讀值 (N_{ISOTON})，此讀值即為背景值需小於300，再測量三次的藻類的數目 (N_{alga})，最後得淨藻類數目 (N)，當平均細胞體積（mean cell volume, MCV）達到 39-46 μ m³，而 N 達到 1.9~2.0 $\times 10^6$ cells/mL，在此條件下才取藻類進行實驗。

$$N\left(\frac{cells}{mL}\right) = \left[\frac{(N_{alga} - N_{ISOTON})}{0.5mL} \right] \times 50$$

4. BOD 瓶試驗：添加藻類、去離子水、營養鹽和毒物加入BOD 瓶中。

(1) 器具

- BOD 瓶
- DO meter
- 已曝氣的去離子水曝氣、營養鹽和達steady state的藻類
- 培養裝置與迴轉式振盪儀
- 毒物

(2) 進行順序

分別加入BOD 瓶中使試驗時藻類之初始細胞密度為 1.5 $\times 10^4$ cells/mL，之後再迅速加入曝氣好之純水，然後逐瓶加入所需之營養基質和不同體積的毒性物質以達到所需的濃度。當藻液、營養基質及毒性物質皆分別加入BOD 瓶中後，測量各瓶之溶氧值，視為初始溶氧值(Initial DO, DO_i)，並由各瓶中取出少量之溶液（約1mL），以計數初始藻液細胞密度是否為 1.5 $\times 10^4$ cells/mL。為了避免實驗誤差，本實驗將BOD瓶之 pH 值再用 0.1N 及 1N 之NaOH進行調整，將其調整至 7.50 \pm 0.01，之後將BOD 瓶置於培養箱內迴轉式震盪儀上震盪。實驗條件控制在溫度 24 \pm 1 $^{\circ}$ C，光照來自於上方平行照射，強度為 4300 \pm 10% Lux 之白冷光燈，震盪頻率為 100rpm。

第三天

以下三步驟為毒性試驗四十八小時後的成果驗收

5. 溶氧值和 pH 測定：為量測 48 個小時後各個 BOD 瓶中之溶氧值，視為最終溶氧值 (Final DO, DO_f)。此步驟可得到本實驗第一個試驗終點 (end point) 溶氧抑制率的 raw data。

(1) 器具

- DO meter
- 18.2 Megaohm 的去離子水 (DI water)
- 拭鏡紙
- pH meter

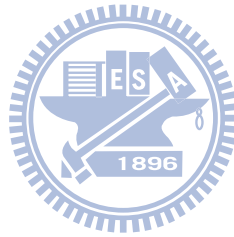
(2) 進行順序

將 DO meter probe 用去離子水淋洗再用拭鏡紙吸乾水份置入 BOD 瓶中量測 Final DO (DO_f)，由 Final DO 減掉 Initial DO 可得到一溶氧差 (ΔDO)，即 $DO_f - DO_i = \Delta DO$ 。

6. 藻數測定：用顆粒計數器量測每個 BOD 瓶的藻類細胞密度，此步驟可得到本實驗第二個和第三個 end point 即 Final yield 和 Growth rate 兩抑制率的 raw data。

(1) 器具

- 庫德式電子顆粒計數器
- 50mL 定量瓶
- 1L 燒杯
- ISOTON II
- 1mL 的定量吸管



(2) 進行順序

將 BOD 瓶中的藻液先倒入約一半於燒杯中，再將 BOD 瓶中剩餘的藻液搖晃均勻倒入燒杯中，再用定量吸管定量 1mL 從燒杯取出藻液加入定量瓶中並加入 ISOTON II 量測最終細胞密度。減掉初始植入的的細胞密度 1.5×10^4 cells/mL 可得細胞密度的變化量。

7. 計算 EC_{50} ：使 Probit 模式來計算藻類之抑制率與 EC_{50} 值。

4.6 RC_{50} 反應性參數值實驗

其流程圖如圖 4.6.1

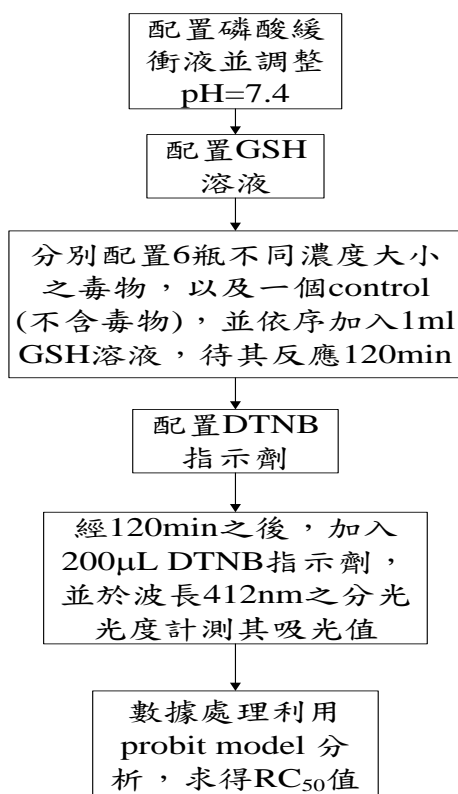


Fig 4.6.1 The flow chart of RC_{50} experiment

步驟 (參考 Schultz 於 2005 年發表 paper)^[3] :

1. 配製磷酸緩衝溶液(buffer)：將 9.38 g KH_2PO_4 與 9.38 g Na_2HPO_4 加入超純水定量至 1 L，並調整 pH 值至 7.4。
2. 配製該毒物(Chemical)之 stock solution，並利用 TOC 定量其誤差值，以便計算實際濃度，配製毒物皆使用磷酸緩衝溶液配製。
3. 1.375 mM GSH 溶液當次現配，配製方法將還原態 GSH 取 0.042g 溶於 pH=7.4, 100 ml 磷酸緩衝溶液。
4. range finding 實驗，試驗濃度範圍為五個濃度分別作 2~4 倍等倍稀釋，以便抓取 RC_{50} 落入範圍。實驗有兩個 control，一為加入 GSH，另一為只有磷酸緩衝溶液(不含 GSH)做空白用。
5. 確定試驗，試驗濃度範圍為分別將 range finding 所找到的範圍值細分成 6 個濃度，其中間隔以兩倍等倍稀釋，實驗至少兩重複，兩個 control，一為加入 GSH，另一為只有磷酸緩衝溶液(不含 GSH)做空白用。
6. 分別依照其六個濃度範圍隨後從所配製毒化物之 Stock solutions 由濃度低到高依序加入磷酸緩衝溶液，再者由高濃度到低濃度依序加入 1 ml 的 GSH 溶液定量至小玻璃瓶 (10 ml) 使 SH 最終濃度為 0.1375 mM。
7. 配製 DTNB 顯色劑，取 1.98 g 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 並溶於磷酸緩衝溶液中定量至 100 ml，調整 pH 至 7.4。
8. 定量完之後的小玻璃瓶輕搖並靜置 2 小時，2 小時之後各別加入 DTNB 顯色劑 200 μ l，並於波長 412 nm 下利用分光光度計測其吸收值，將其記錄與 control 組作比較，利用 probit model 分析。

4.7 實驗之品保及品管 (QA/QC)

在每次的實驗過程中，可能會因為儀器保養疏失，而導致實驗數據的重覆性不高甚至誤判的情況；因此對於每次實驗過程中，所需要使用的儀器或是藻類的生長狀況，均需要定期檢驗，才可以維持實驗的品質及可信度。以下為本實驗對於藻類及儀器方面所做的檢驗程序介紹：

1. 母槽生長情況紀錄表：

為確保實驗時所使用的藻類在最佳狀態，每天取 1 mL 藻液，量測細胞密度及平均細胞體積 MCV 等參數變動情形並填寫於母槽生長情況紀錄表，並控制母槽的溢流率為 1.2 L/day ($D=0.3$)。

2. 儀器定期檢查

實驗儀器誤差會影響實驗結果的好壞，為降低誤差的發生必順定期檢查儀器，下列分別介紹：

- 光度：光度強弱影響藻類之生長狀況，為減少光度所帶來之誤差，所以要將實驗進行之震盪器上之盤面光度調整至一致方可，本次實驗所使用之光度為 4300Lux，其誤差皆控制於 10% 以內
- 顆粒計數器：計數器在量測高濃度處理組（低藻類密度）時也會受到 ISOTON II 背景值、因此本實驗要求 ISOTON II 背景值需小於300以下，且實驗前後皆 ISOTON II 用進行取樣管的流洗，清洗取樣管壁結晶。
- DO meter：如果薄膜或電解液受到污染，也會影響到以溶氧指標的敏感度，因此本實驗會每個月定期更換 CLARK-TYPE 薄膜與3M 氯化鉀電解質和進行校正。
- pH meter: 如電極棒有微粒附著於表面時，因為導致二點校正 (pH = 4 and 7) 其誤差比率低於 90% 時，則應立即將電極棒泡於 0.1N 之鹽酸之中，以達到去除表面微粒之效果。

第五章、結果與討論

5.1 藻類毒性試驗數據

本研究係利用連續式培養，於 BOD 瓶進行 48 小時之藻類批次試毒性試驗，反應終點分別為：溶氧變化量(ΔDo)、最終細胞變化量(Final Yield)及生長率(Growth Rate)；實驗結果計算 EC_{50} 值並繪製劑量-反應曲線並針對 18 種酮類，其中 16 種為 α,β -不飽和酮，2 種為飽和酮，與其中不同結構及不同取代基所造成毒性做進一步討論。

由表 4.1.1 結構圖及表 5.1.1 可知結構與毒性間之關係，毒性大小 3-butyn-2-one > 3-buten-2-one，以結構來看分別為三鍵 > 雙鍵，由於三鍵拉電子的能力比雙鍵強，所造成電子雲密度上差異較大，進而間接影響對生物體內交互作用機制(ex: 親核性加成)，造成毒性之差異^[45]；不飽和酮 > 鹵素取代酮 > 飽和酮，含 π 鍵之不飽和酮較活潑、不穩定，也容易發生電子轉移作用，與生物體內部發生反應，而飽和酮結構較穩定，毒性作用機制屬於麻醉性，故毒性較低^[47]，另外鹵素取代酮會被羰基(carbonyl group)活化而利用 S_N 取代反應與親核劑進行加成作用造成較具活性、不穩定，導致毒性大於飽和酮^[48]；接甲基之後毒性減弱，如 3-pentene-2-one < 3-buten-2-one、4-hexene-3-one < 3-pentene-2-one、3-methyl-3-penten-2-one < 4-methyl-3-pentene-2-one < 3-pentene-2-one、6-methyl-5-hepten-2-one < 3-heptene-2-one、5-methyl-5-hexen-2-one < 5-hexen-2-one、2-methyl-2-cyclopenten-1-one < 3-methyl-2-cyclopenten-1-one < 2-cyclopenten-1-one，其中甲基取代位置不同亦造成毒性差異，甲基在尾端比在中間被取代毒性減弱較多，如 3-methyl-3-penten-2-one < 4-methyl-3-pentene-2-one，甲基取代在 C=C 旁會造成立體空間障礙(steric hindrance)效應，導致電子轉移困難，使得毒性減弱^[47]；而 π 鍵取代位置在尾端比在中間毒性較弱，如 5-hexene-2-one < 4-hexen-3-one；最後直碳鏈越長毒性愈低，3-nonene-2-one < 3-octene-2-one < 3-buten-2-one。

從表 5.1.2 之中可得知，具甲基取代之不飽和酮類在歐洲國家物質分類^[49]被歸類為對水體生物有害或為對水體環境可能造成不利影響，相較於其他不飽和酮毒性為弱，而毒性最強的為三鍵炔酮類，被歸類為對水體生物劇毒。另外，依分類結果對水體生物有毒之酮類分別為烯酮類、環烯酮以及鹵素取代酮，毒性排名次之。

5.2 NOEC、EC₁₀之比較

本研究分別利用三種不同的反應終點(ΔDo 、Final Yield and Growth rate)來討論密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗之 EC₁₀ 值和 NOEC 值(No Observed Effect Concentration)。

NOEC 值的判定通常與實驗濃度的取決、重複組的數量和選定之參數有所關聯。一般 NOEC 值是由統計方法中的 Dunnett's test 方法來進行分析，若空白組之重複組間的差異不大時，則與處理組的差距便較為明顯，所求得之 NOEC 值也較為準確，通常較不嚴謹的實驗出現較高之 NOEC 值。

表 5.1.1 列出了利用 Dunnett's test 所得到之 NOEC 值，而 EC₁₀ 則是根據 Probit model 所計算求得，並列出了三種不同參數之 EC₁₀/NOEC。在 NOEC 值的比較方面，三種不同參數有著相同 NOEC 值的毒性物質有十種(3-buten-2-one、3-chloro-2-butanone、Methyl ethyl ketone、3-pentene-2-one、3-hexyn-2-one、3-methyl-2-cyclopenten-1-one、5-hexen-2-one、3-heptene-2-one、5-methyl-5-hexen-2-one、6-methyl-5-hepten-2-one)，其他數據以 Final Yield 為最為敏感的佔三個， ΔDo 佔四個，Growth Rate 則佔三個。

與 EC₁₀ 的比較之下，以 ΔDo 為反應終點時，EC₁₀/NOEC 之比值在 0.284~2.924 之間，其中 >1 的組數有 9 組，佔了 50%；以 Final Yield 來討論時可以發現到，也是有 11 的物質 EC₁₀/NOEC 之比值 >1，約由 0.377~3.188 之間，佔了 61%；若以 Growth rate 觀察，有 8 組數據的比值 >1，佔 44%，值約在 0.150~4.913 之間。當其比值 >1 時則是顯示出 NOEC 會比 EC₁₀ 敏感，而造成比值大於 1 的原因可能與毒物濃度設定有關，即較佳的實驗濃度設定可降低分析結果之差異。由此即可看出大部分的反應終點表現出 NOEC 值較 EC₁₀ 來得敏感能在毒性評估中提供較好的保護。

Table 5.1.1 algal toxicity test results of three endpoints

Chemical	EC ₅₀ (mg/L)			EC ₁₀ (mg/L)			NOEC (mg/L)			EC ₁₀ /NOEC		
	(ΔDo)	(F. Y.)	(G. R.)	(ΔDo)	(F. Y.)	(G. R.)	(ΔDo)	(F. Y.)	(G. R.)	(ΔDo)	(F. Y.)	(G. R.)
3-butyn-2-one ^a	0.013	0.008	0.014	0.001	0.003	0.003	<0.001	0.003	0.003	>2.000	1.154	1.000
3-hexyn-2-one ^a	0.206	0.137	0.300	0.030	0.030	0.030	0.050	0.050	0.050	0.600	0.600	0.800
3-chloro-2-butanone *	2.329	1.647	2.098	0.200	0.200	0.030	0.200	0.200	0.200	1.000	1.000	0.150
Methyl ethyl ketone *	1060	1001.3	2272.4	75.150	257.300	396.570	80.720	80.720	80.720	0.931	3.188	4.913
2-cyclopenten-1-one ^b	9.351	5.015	8.719	4.035	1.548	1.743	1.380	1.380	2.760	2.924	1.122	0.631
2-methyl-2-cyclopenten-1-one ^c	153.72	129.8	196	78.962	64.954	87.158	76.430	38.220	38.220	1.033	1.699	2.280
3-methyl-2-cyclopenten-1-one ^c	406.93	334.56	466.26	223.130	162.960	203.330	124.240	124.240	124.240	1.796	1.312	1.637
3-penten-2-one ^b	5.175	2.726	3.999	1.344	0.839	0.844	1.270	1.270	1.270	1.058	0.661	0.665
3-methyl-3-penten-2-one ^c	58.449	58.155	72.112	16.290	35.730	46.870	14.025	28.050	28.050	1.161	1.274	1.671
4-methyl-3-penten-2-one ^c	180.68	144.02	213.47	50.413	64.894	98.389	50.520	25.260	101.040	0.998	2.569	0.974
4-hexene-3-one ^b	3.397	2.758	4.208	1.028	1.164	1.491	0.385	0.769	1.538	2.672	1.513	0.970
5-hexen-2-one ^b	129.41	74.055	180.21	44.262	13.483	9.871	23.290	23.290	23.290	1.900	0.579	0.424
5-methyl-5-hexen-2-one ^c	268.98	202.12	384.92	41.761	60.874	73.411	99.710	99.710	99.710	0.419	0.611	0.736
3-heptene-2-one ^b	3.736	2.549	3.311	0.794	1.046	1.591	0.980	0.980	0.980	0.810	1.067	1.623
6-methyl-5-hepten-2-one ^c	71.846	69.785	126.26	12.501	16.569	15.492	44.000	44.000	44.000	0.284	0.377	0.352
3-buten-2-one ^b	0.101	0.066	0.091	0.025	0.039	0.052	0.035	0.035	0.035	0.714	1.114	1.486
3-octene-2-one ^b	4.116	1.882	4.093	0.740	0.472	0.868	1.360	0.680	0.680	0.544	0.694	1.277
3-nonene-2-one ^b	9.995	6.026	15.878	1.520	1.177	1.779	3.910	1.960	1.960	0.389	0.601	0.908

* : saturated ketones ΔDo : endpoint of Delta Do F. Y. : endpoint of Final Yield G.R. : endpoint of Growth Rate

NOEC is conducted by Dunnett's test EC₁₀、EC₅₀ is conducted by Probit

^a : alkynone ^b : alkenone ^c : methyl-substituted ketones

Table 5.1.2 Substance classification

EC ₅₀ ^a (mg/L) ^[49]	Risk phrase ^b ^[49]	Ketones	Methyl-substituted Ketones
		(According to sequence of toxicity)	
≤1	R50	butyn> buten	
>1, ≤10	R51	butyn>hexyn chloro-butan- * octene- heptene- pentene- 4-hexene-3- cyclopenten- nonene-	
>10, ≤100	R52/R53	5-hexen-2	3-methyl-3-penten- 6-methyl-5-hepten-
>100	R53	methyl ethyl*	2-methyl-cyclopenten- >3-methyl-2-cyclopenten- 4-methyl-3-pentene- 5-methyl-5-hexen-

^a : The toxicity of algae is based on endpoint of Final yield

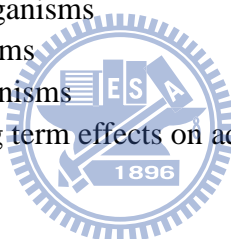
^b : R50 : very toxic to aquatic organisms

R51 : toxic to aquatic organisms

R52 : harmful to aquatic organisms

R53 : may cause adverse long term effects on aquatic environment

* : saturated ketones



5.3 急慢毒性比 (Acute-Chronic Toxicity Ratio ; ACR)

在毒性試驗中，由於慢毒性試驗比急毒性試驗需要更多的時間、物資及人力。因此，現今大多利用外插法(extrapolation)得知毒物之毒性影響並更進一步得知達到環境品質之標準。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即有負面之影響。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等級。而急慢毒性比值(Acute - chronic toxicity ratio)即是經由此而發展出來的。因為使用一固定的因子有時可能會低估或高估了毒性化學物質在環境中的慢毒性影響。

ACR=Acute toxicity/Chronic toxicity 之比值，由表 5.3.1 可知，利用 NOEC 所計算出來的 ACR 值，大部分是介於 1~9 之間，其中 3-chloro-2-butanone、Methyl ethyl ketone 值較為偏高，；若以 EC₁₀ 計算出之結果，ACR 值大約都介於 1~9 之間，以 ΔDo 為反應終點時，主要以 3-chloro-2-butanone、Methyl ethyl ketone 值較為偏高，以 Final yield 為反應終點時，主要以 3-chloro-2-butanone 值較為偏高，以 Growth rate 為反應終點時，主要以 3-chloro-2-butanone、5-hexen-2-one 值較為偏高，3-chloro-2-butanone、Methyl ethyl ketone 由於兩個化合物屬於飽和酮，毒性較弱，劑量-反應曲線之斜率偏低，造成 ACR 值較大之可能，而 5-hexen-2-one 則可能為實驗過程不夠嚴謹所致。

綜上所述，在本研究利用不同低濃度抑制值所得到三種反應終點下的 ACR 平均值約 3.465~8.765，屬於較低比值，由於本研究毒化物不飽和酮類屬於反應性毒性作用機制，毒性較容易顯現，劑量-反應曲線斜率偏高，造成 ACR 值偏低。

Table 5.3.1 The ACR values in three test end-points

Chemical	ΔD_o (ACR)		Final yield(ACR)		Growth rate(ACR)	
	EC ₅₀ /NOEC	EC ₅₀ / EC ₁₀	EC ₅₀ /NOEC	EC ₅₀ / EC ₁₀	EC ₅₀ /NOEC	EC ₅₀ / EC ₁₀
3-butyne-2-one	>13.000	6.500	3.077	2.667	4.667	4.667
3-buten-2-one	2.886	4.040	1.886	1.692	2.600	1.750
3-chloro-2-butanone *	11.645	11.645	8.235	8.235	10.490	69.933
Methyl ethyl ketone *	13.132	14.105	12.405	3.892	28.152	5.730
2-cyclopenten-1-one	6.776	2.317	3.634	3.239	3.159	5.004
3-pentene-2-one	4.075	3.850	2.146	3.249	3.149	4.738
2-methyl-2-cyclopenten-1-one	2.011	1.947	3.396	1.998	5.128	2.249
3-hexyne-2-one	4.120	6.867	2.740	4.567	6.000	7.500
3-methyl-2-cyclopenten-1-one	3.275	1.824	2.693	2.053	3.753	2.293
5-hexen-2-one	5.556	2.924	3.180	5.492	7.738	18.257
3-methyl-3-penten-2-one	4.167	3.588	2.073	1.628	2.571	1.539
4-hexene-3-one	8.834	3.306	3.586	2.370	2.736	2.822
4-methyl-3-pentene-2-one	3.576	3.584	5.702	2.219	2.113	2.170
3-heptene-2-one	3.812	4.705	2.601	2.437	3.379	2.081
5-methyl-5-hexen-2-one	2.698	6.441	2.027	3.320	3.860	5.243
3-octene-2-one	3.027	5.563	2.768	3.988	6.019	4.715
6-methyl-5-hepten-2-one	1.633	5.747	1.586	4.212	2.870	8.150
3-nonene-2-one	2.556	6.576	3.074	5.120	8.101	8.925
mean	>4.928	5.307	3.712	3.465	5.916	8.765

ACR=EC₅₀/(NOEC or EC₁₀)

* : saturated ketones

5.4 α,β -不飽和酮類與基線毒性之比較

本研究室曾做一系列有關非極性麻醉毒性化合物之研究，並與 $\log P$ 值迴歸同樣依三個不同的反應終點 ΔDO ，Final Yield，Growth rate 建立有關月芽藻之基線毒性(baseline toxicity)關係，分別以 Eq(1)^[50]、Eq(2)^[51]、Eq(3)^[50] 表示：

$$\begin{aligned} \log (1/ EC_{50, \Delta DO}) &= 0.978 \log P - 1.83 & (1) \\ n &= 26, R^2 = 0.94, Q^2 = 0.932, S = 0.332, F = 380.2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log (1/ EC_{50, \text{Final Yield}}) &= 0.9 \log P - 1.4 & (2) \\ n &= 48, R^2 = 0.87, Q^2 = 0.866, S = 0.49, F = 303.7 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log (1/EC_{50, \text{Growth rate}}) &= 0.974 \log P - 1.95 & (3) \\ n &= 26, R^2 = 0.943, Q^2 = 0.933, S = 0.325, F = 393.5 \end{aligned}$$

本節期利用上述基線毒性預測 α,β -不飽和酮類之毒性，進而判斷毒性作用機制。表 5.4.1 為利用上述基線毒性預測結果與實際毒性之殘差，一般而言，基線毒性代表的就是最低的毒性，以 F.Y.反應終點判斷 3-methyl-2-cyclopenten-1-one、5-methyl-5-hexen-2-one、6-methyl-5-hepten-2-one 毒性均較預測毒性低，可能因其接上甲基取代基而造成毒性減低，導致毒性機制改變；而飽合酮的部分大致上接近基線毒性，除了 3-chloro-2-butanone，接上一個鹵素(氯原子)取代，進行親核性取代反應，造成電子雲密度分布不均，使結構不穩，毒性增加。除此之外，其他反應終點大部分毒物毒性均較基線毒性高，因其不飽和酮類屬於反應性毒物之毒性作用機制，所以毒性理論上應比基線毒性高，其結果與預期相符亦與文獻一致^[47]，也可從圖 5.4.1 看出。

Table 5.4.1 Used baseline toxicity predicted toxicity and residual between observed

Chemical	logP	ΔDo log(1/EC ₅₀)			F.Y. log(1/EC ₅₀)			G.R. log(1/EC ₅₀)		
		Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual
3-butyn-2-one	-0.52	3.72	-2.34	6.06	3.93	-1.87	5.80	3.69	-2.46	6.15
3-buten-2-one	0.41	2.84	-1.43	4.27	3.03	-1.03	4.06	2.89	-1.55	4.44
2-cyclopenten-1-one	0.71	0.94	-1.14	2.08	1.21	-0.76	1.97	0.97	-1.26	2.23
3-pentene-2-one	0.52	1.21	-1.32	2.53	1.49	-0.93	2.42	1.32	-1.44	2.76
2-methyl-2-cyclopenten-1-one	1.26	-0.20	-0.60	0.40	-0.13	-0.27	0.14	-0.31	-0.72	0.41
3-hexyn-2-one	0.17	2.67	-1.66	4.33	2.85	-1.25	4.10	2.51	-1.78	4.29
3-methyl-2-cyclopenten-1-one	1.26	-0.60	-0.63	-0.03	-0.54	-0.27	-0.27	-0.69	-0.72	0.03
5-hexen-2-one	1.1	-0.12	-0.75	0.63	0.12	-0.41	0.53	-0.26	-0.88	0.62
3-methyl-3-penten-2-one	1.37	0.23	-0.49	0.72	0.23	-0.17	0.40	0.13	-0.62	0.75
4-hexene-3-one	1.31	1.46	-0.55	2.01	1.55	-0.22	1.77	1.37	-0.67	2.04
4-methyl-3-pentene-2-one	1.37	-0.27	-0.49	0.22	-0.17	-0.17	0.00	-0.34	-0.62	0.28
3-heptene-2-one	1.8	1.48	-0.07	1.55	1.64	0.22	1.42	1.53	-0.20	1.73
5-methyl-5-hexen-2-one	1.65	-0.38	-0.22	-0.16	-0.26	0.08	-0.34	-0.54	-0.34	-0.19
3-octene-2-one	2.29	1.49	0.41	1.08	1.83	0.66	1.17	1.49	0.28	1.21
6-methyl-5-hepten-2-one	2.06	0.24	0.18	0.06	0.26	0.45	-0.21	0.00	0.06	-0.06
3-nonene-2-one	2.79	1.15	0.90	0.25	1.37	1.11	0.26	0.95	0.77	0.18
3-chloro-2-butanone *	0.44	1.66	-1.40	3.06	1.81	-1.00	2.81	1.71	-1.52	3.23
Methyl ethyl ketone *	0.26	-1.17	-1.58	0.41	-1.14	-1.17	0.03	-1.50	-1.70	0.20

Obse. : log(1/EC₅₀)_{observed} Pred. : log(1/EC₅₀)_{predicted} Residual = log(1/EC₅₀)_{Observed} - log(1/EC₅₀)_{Predicted} EC₅₀ unit : mmol/L
logP : log(n-Octonal/Water Partition Coefficient) * : saturated ketones

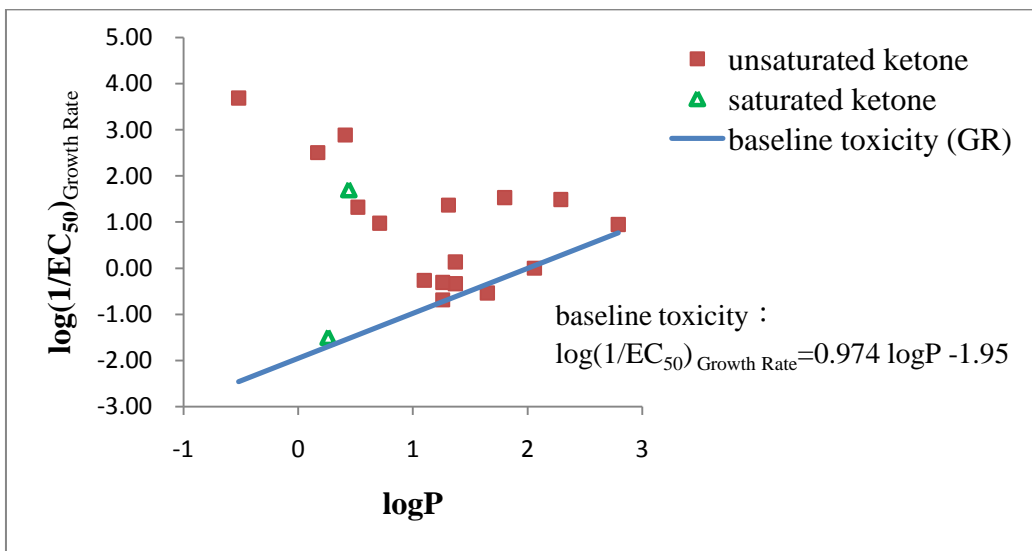
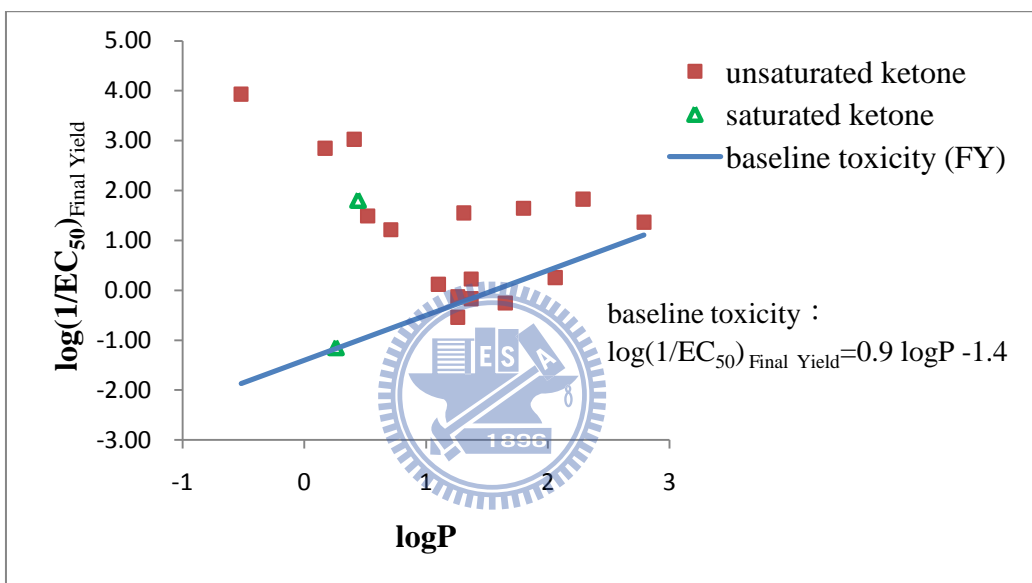
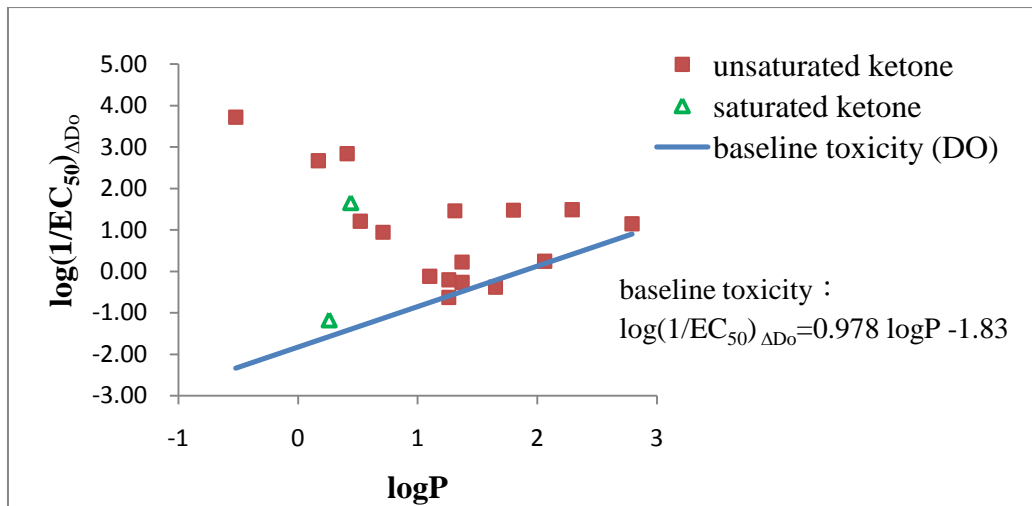


Fig 5.4.1 Correlation between $\log(1/EC_{50})$ and $\log P$

5.5 密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗與其他物種試驗之比較

Cronin et al.^[52]認為當毒物屬於相同之毒性機制可利用物種間迴歸結果來了解彼此之相關性，並可藉由迴歸的結果推估其他物種之敏感度，也因此基於以上論點本節將討論本密閉式藻類試驗法與其他方法之相關性。

表 5.5.1 為以密閉式藻類毒性試驗(ΔDo 、Final yield 及 Growth rate)與纖毛蟲(*Tetrahymena pyriformis*)所得之實驗結果。針對密閉式藻類毒性試驗而言，可發現三種反應終點當中對於 α, β -不飽和酮類之敏感性最高者為最終細胞變化量(F.Y)，其次為溶氧產生量(ΔDo)，而敏感性最差之反應終點為生長率(G.R.)。進一步探討藻類與其他生物物種之敏感性比較可發現藻類之敏感性較纖毛蟲高，順序為藻類最終細胞變化量(F.Y) $>$ 藻類溶氧產生量(ΔDo) $>$ 藻類生長率(G.R.) $>$ 纖毛蟲。另外，藻類相較於纖毛蟲具有較高之敏感度，因其毒性試驗為密閉式，利用 BOD 瓶水封阻止揮發性之不飽和酮類逸散，如此一來更能反映毒性的影響，而纖毛蟲試驗為開放式，不飽和酮類有揮發的可能以致在毒性數據呈現上，藻類較為敏感，且藻類在水體環境中為主要之生產者，受到危害後會直接或間接影響到其他更高階之生物物種，對於水體環境的保護具有一定之重要性。

圖 5.5.1 為藻類在不同反應終點與纖毛蟲之相關性比較，由圖上相關係數(R^2)，以 ΔDo 、F.Y、G.R.順序排列，分別為 0.912、0.916、0.913，可知其藻類跟纖毛蟲物種相關性很高，此結果有助於 QSAR 研究可利用其中一種物種預測另一物種之相關毒性。

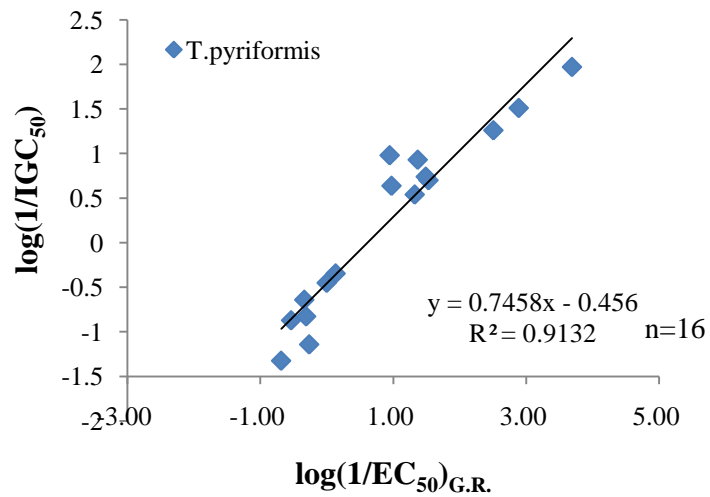
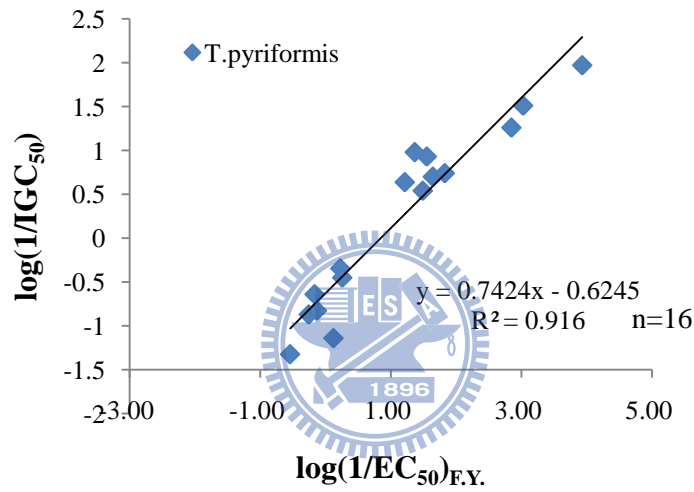
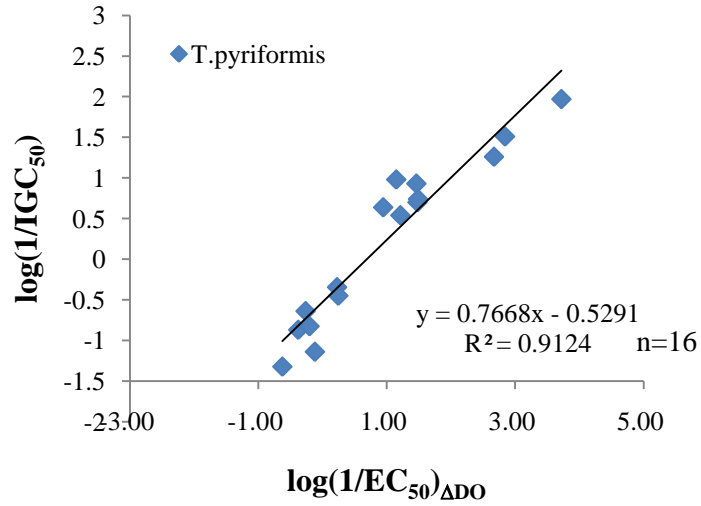


Fig 5.5.1 Comparison of relation of *P.subcapitata* and *T.pyriformis*

Table 5.5.1 Comparison of algal toxicity test results with other species

Chemical	Algae (BOD bottle)(48hr)			T.pyriformis
	Δ DO	F.Y.	G.R.	40hr
	$\log(1/EC_{50})$	$\log(1/EC_{50})$	$\log(1/EC_{50})$	$\log(1/IGC_{50})$
3-butyn-2-one	3.72	3.93	3.69	1.97 ^a
3-buten-2-one	2.84	3.03	2.89	1.51 ^b
2-cyclopenten-1-one	0.94	1.21	0.97	0.64 ^b
3-pentene-2-one	1.21	1.49	1.32	0.54 ^b
2-methyl-2-cyclopenten-1-one	-0.20	-0.13	-0.31	-0.83 ^b
3-hexyn-2-one	2.67	2.85	2.51	1.26 ^a
3-methyl-2-cyclopenten-1-one	-0.63	-0.54	-0.69	-1.32 ^b
5-hexen-2-one	-0.12	0.12	-0.26	-1.14 ^a
3-methyl-3-penten-2-one	0.23	0.23	0.13	-0.35 ^b
4-hexene-3-one	1.46	1.55	1.37	0.93 ^b
4-methyl-3-pentene-2-one	-0.27	-0.17	-0.34	-0.64 ^b
3-heptene-2-one	1.48	1.64	1.53	0.70 ^a
5-methyl-5-hexen-2-one	-0.38	-0.26	-0.54	-0.87 ^a
3-octene-2-one	1.49	1.83	1.49	0.74 ^a
6-methyl-5-hepten-2-one	0.24	0.26	0.00	-0.45 ^a
3-nonene-2-one	1.15	1.37	0.95	0.98 ^a

F.Y. : Final Yield G.R. : Growth Rate T.pyriformis : Tetrahymena pyriformis

^a : Data from TW.Schlitz et al., 1995^[47] ^b : Data from TW.Schlitz et al., 2005^[3]

EC₅₀ unit : mmol/L IGC₅₀ unit : mmol/L

5.6 QSAR 分析

5.6.1 毒性數據與傳統物化參數 Log P (辛醇-水係數) 迴歸分析

本研究試驗毒物 α,β -不飽和酮類為親電性物質之反應性有機物，此種有機物之毒性一般而言較非反應性物質(麻醉性物質)毒，而麻醉性物質的毒性與辛醇-水係數 (n-Octanol/Water Partition Coefficient, Log P) 有良好之關係，因此本研究毒性試驗數據係以 Log P 觀察其相關性，若相關性不佳，就進一步證實本研究試驗毒物為反應性有機物的毒性作用機制，由 Eq(4)、Eq(5)、Eq(6)可看出其相關係數(R_{adj}^2)為 0.23~0.25 顯示與 Log P 相關性不佳，期結果亦與文獻相符^[47]。

$$\begin{aligned} \log (1/EC_{50, \Delta DO}) &= -0.817 \log P + 1.99 & (4) \\ n = 16, R_{adj}^2 &= 0.24, R_{pred}^2 = 0.00, S = 1.113, F = 5.63 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log (1/EC_{50, \text{Final Yield}}) &= -0.834 \log P + 2.17 & (5) \\ n = 16, R_{adj}^2 &= 0.23, R_{pred}^2 = 0.00, S = 1.159, F = 5.4 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log (1/EC_{50, \text{Growth rate}}) &= -0.863 \log P + 1.97 & (6) \\ n = 16, R_{adj}^2 &= 0.25, R_{pred}^2 = 0.11, S = 1.133, F = 6.06 \end{aligned}$$

n 為樣品數，針對模式之適合度而言，在統計迴歸分析中，模式通常採用迴歸係數之平方(R^2 ，代表模式所解釋之相關性)或自由度校正的 R_{adj}^2 ，標準偏差(S)及檢驗值(F)等來評判。而模式之穩健性(準確性)一般採用交叉驗證法(Cross Validation)來進行檢驗。而此方法通常包含兩種方式：一種逐一剔除法(Leave-one-out)，即一般說的 Jackknife 檢驗，其做法是從訓練集中每次刪除一個化合物，用其餘的化合物建立模式並用來預測刪除化合物的性質活性；另一種方式為分組剔除法(Leave-more-out)，即每次剔除 N 個化合物，用其餘的化合物集來建立模式並預測 N 個化合物的性質。本研究係使用逐一剔除法，而 R_{pred}^2 即為經由交叉驗證法之後的迴歸係數平方值。

5.6.2 藻類與纖毛蟲物種間關係

可以由藻類與文獻纖毛蟲毒性數據迴歸式，看彼此物種之間相關性，若相關性佳，當缺少其中某一物種的毒化物毒性數據時，就可以利用已建好的物種間 QSAR 預測式去推估另一物種的毒化物的毒性資料，一方面可以減少許多實驗的時間、物力、人力成本，增加研究效率。

$$\begin{aligned} \log (1/EC_{50, \Delta DO}) &= 1.19 \log(1/IGC_{50}) + 0.716 & (7) \\ n = 16, R_{adj}^2 &= 0.906, R_{pred}^2 = 0.877, S = 0.390, F = 145.84 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log(1/EC_{50, \text{Final Yield}}) &= 1.23 \log(1/IGC_{50}) + 0.867 & (8) \\ n = 16, R_{\text{adj}}^2 &= 0.910, R_{\text{pred}}^2 = 0.882, S = 0.396, F = 152.64 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log(1/EC_{50, \text{Growth rate}}) &= 1.22 \log(1/IGC_{50}) + 0.638 & (9) \\ n = 16, R_{\text{adj}}^2 &= 0.907, R_{\text{pred}}^2 = 0.879, S = 0.400, F = 147.32 \end{aligned}$$

由 Eq(7)、Eq(8)、Eq(9) 可得相關係數(R_{adj}^2) 為 0.906~0.910、預測能力相關係數(R_{pred}^2) 為 0.877~0.882，顯示其物種間的相關性極高，所以可以利用其中之一種物種，去預測另一種物種的毒性，這也對於在建立生物毒性資料庫(Database) 的研究上提供很好的一項參考資訊。

5.6.3 毒性數據與電性參數迴歸分析

本研究試驗毒物 α, β -不飽和酮類屬於親電性物質為反應性有機物，以傳統之物化參數 Log P 迴歸結果並無良好相關性，於是利用試驗毒物其有機化學原理，以 α, β -不飽和酮類在不同結構上，其電子轉移的能力不同，所造成電子雲密度有差異，導致毒性改變，故利用一些電性參數與毒性數據迴歸分析，討論其結果。

從表 5.6.3.1 參考文獻^[3]中所選之部分電荷之總和(Q_3+Q_4 ， α -C 與 β -C 上部分電荷之總和)、最低空價軌域能(E_{lumo})等參數值與纖毛蟲毒性數據迴歸所得 Eq(10)，利用本研究室計算參數軟體分析的部分電荷之總和(Q_3+Q_4 ， α -C 與 β -C 上部分電荷之總和)、最低空價軌域能(E_{lumo})等參數值與藻類毒性數據迴歸結果如 Eq(11)、Eq(12)、Eq(13)，及圖 5.6.3.1 與文獻^[3]一致，相關性很高。 $n=11$ ，其中 3-butyn-2-one、3-hexyn-2-one、5-hexen-2-one、5-methyl-5-hexen-2-one、6-methyl-5-hepten-2-one，由於缺乏完整資料，因此將其挑出迴歸式外，故樣本數剩 11 個不飽和酮。

$$\begin{aligned} \log(1/IGC_{50}) &= -24.6(Q_3+Q_4) (\text{文獻}) + 8.14 E_{\text{lumo}} (\text{文獻}) - 7.92 & (10) \\ n = 11, R_{\text{adj}}^2 &= 0.945, R_{\text{pred}}^2 = 0.873, S = 0.210, F = 86.92 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log(1/EC_{50, \Delta\text{DO}}) &= -15.3(Q_3+Q_4) + 1.2 E_{\text{lumo}} - 6.45 & (11) \\ n = 11, R_{\text{adj}}^2 &= 0.915, R_{\text{pred}}^2 = 0.893, S = 0.295, F = 54.97 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log(1/EC_{50, \text{Final Yield}}) &= -16.3(Q_3+Q_4) + 0.61 E_{\text{lumo}} - 6.66 & (12) \\ n = 11, R_{\text{adj}}^2 &= 0.930, R_{\text{pred}}^2 = 0.907, S = 0.283, F = 67.68 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log(1/EC_{50, \text{Growth rate}}) &= -16.0(Q_3+Q_4) + 0.69 E_{\text{lumo}} - 6.71 & (13) \\ n = 11, R_{\text{adj}}^2 &= 0.916, R_{\text{pred}}^2 = 0.893, S = 0.306, F = 55.55 \end{aligned}$$

由迴歸方程式之係數可知參數對於毒性數據之貢獻度，以 Eq(10) 觀察，

對於毒性的貢獻度 Q_3+Q_4 微大於 E_{lumo} ，但不大於一個等級(order)，故兩參數皆對纖毛蟲毒性數據具一定程度的影響，若以 Eq(11~13)， Q_3+Q_4 對毒性的貢獻度遠大於 E_{lumo} 一個等級(order)，顯示 Q_3+Q_4 對於藻類毒性數據在三種不同反應終點下均影響很大， Q_3+Q_4 愈小，毒性愈大。

此外，利用 Minitab 統計軟體中逐步迴歸分析法(Stepwise anlysis)挑出與藻類毒性數據較相關的電性參數，總表整理於表 5.6.3.1 中。而在迴歸分析法，所選擇之參數與毒性數據值迴歸時，需注意參數與參數間本身之相關性不可過高，亦不可具有高度共線性關係(collinearity)^[53]，而可由表 5.6.3.2 看出參數間彼此之相關程度，給予在選擇建立 QSAR 預測式時一個參考。

$$\log(1/EC_{50, \Delta DO}) = -4.36 - 0.5 \Delta E + 0.936 \log(1/RC_{50}) \quad (14)$$

$$n = 13, R_{adj}^2 = 0.888, R_{pred}^2 = 0.850, S = 0.342, F = 48.40$$

$$\log(1/EC_{50, Final Yield}) = -5.80 - 0.654 \Delta E + 0.979 \log(1/RC_{50}) \quad (15)$$

$$n = 13, R_{adj}^2 = 0.906, R_{pred}^2 = 0.873, S = 0.328, F = 58.6$$

$$\log(1/EC_{50, Growth rate}) = -4.07 - 0.469 \Delta E + 0.989 \log(1/RC_{50}) \quad (16)$$

$$n = 13, R_{adj}^2 = 0.888, R_{pred}^2 = 0.852, S = 0.360, F = 48.37$$

Eq(14~16)為利用最高佔有分子軌域能-最低未佔有分子軌域能(Delta E)也稱之為能量間隙(Energy gap)、反應性參數(Log(1/RC₅₀))，與其藻類在三種不同反應終點之毒性數據所建立之迴歸式，由迴歸式係數觀察，Log(1/RC₅₀)與毒性之關係最為明顯，其次為 Delta E；反應性參數越高，毒性亦越強；而 Delta E 值越大，毒性則越低，顯示能量間隙越大，其化合物的結構傾向於越穩定，毒性因而較弱^[47]。n=13，其中 3-butyn-2-one、3-hexyn-2-one、6-methyl-5-hepten-2-one，由於缺乏完整資料，因此將其挑出迴歸式外，故樣本數剩 13 個不飽和酮。

$$\log(1/EC_{50, \Delta DO}) = 1.82 + 1.10 \log(1/RC_{50}) + 3.11 Q_3 \quad (17)$$

$$n = 14, R_{adj}^2 = 0.873, R_{pred}^2 = 0.826, S = 0.395, F = 45.83$$

$$\log(1/EC_{50, Final Yield}) = 1.90 + 1.13 \log(1/RC_{50}) + 2.78 Q_3 \quad (18)$$

$$n = 14, R_{adj}^2 = 0.875, R_{pred}^2 = 0.829, S = 0.408, F = 46.45$$

$$\log(1/EC_{50, Growth rate}) = 1.57 + 1.12 \log(1/RC_{50}) + 2.43 Q_3 \quad (19)$$

$$n = 14, R_{adj}^2 = 0.881, R_{pred}^2 = 0.842, S = 0.394, F = 49.31$$

Eq(17~19)為利用 α -C 上部分電荷值(Q_3)、反應性參數(Log(1/RC₅₀))，與其藻類在三種不同反應終點之毒性數據所建立之迴歸式，由迴歸式係數觀察， Q_3 對毒性之影響程度最為明顯，其次為 Log(1/RC₅₀)； α -C 上部分電荷值越高，毒性相對亦越高；反應性參數越高，毒性亦越強。n=14，其中 3-butyn-2-one、6-methyl-5-hepten-2-one，由於缺乏完整資料，因此將其挑

出迴歸式外，故樣本數剩 14 個不飽和酮。

$$\log (1 / \text{EC}_{50, \Delta \text{DO}}) = 0.551 + 1.02 \text{Log}(1 / \text{RC}_{50}) - 2.10 Q_4 \quad (20)$$
$$n = 14, R_{\text{adj}}^2 = 0.877, R_{\text{pred}}^2 = 0.821, S = 0.390, F = 47.40$$

$$\log (1 / \text{EC}_{50, \text{Final Yield}}) = 0.650 + 1.07 \text{Log}(1 / \text{RC}_{50}) - 2.48 Q_4 \quad (21)$$
$$n = 14, R_{\text{adj}}^2 = 0.890, R_{\text{pred}}^2 = 0.836, S = 0.382, F = 53.64$$

$$\log (1 / \text{EC}_{50, \text{Growth rate}}) = 0.505 + 1.06 \text{Log}(1 / \text{RC}_{50}) - 2.05 Q_4 \quad (22)$$
$$n = 14, R_{\text{adj}}^2 = 0.891, R_{\text{pred}}^2 = 0.836, S = 0.378, F = 54.04$$

Eq(20~22)為利用 β -C 上部分電荷值(Q_4)、反應性參數($\text{Log}(1/\text{RC}_{50})$)，與其藻類在三種不同反應終點之毒性數據所建立之迴歸式，由迴歸式係數觀察， Q_4 對毒性之影響程度最為明顯，其次為 $\text{Log}(1/\text{RC}_{50})$ ； β -C 上部分電荷值越高，毒性相對亦越低；反應性參數越高，毒性亦越強。 $n=14$ ，其中 3-butyn-2-one、6-methyl-5-hepten-2-one，由於缺乏完整資料，因此將其挑出迴歸式外，故樣本數剩 14 個不飽和酮。

Eq(17~22)造成 α -C 上部分電荷值(Q_3)與 β -C 上部分電荷值(Q_4)對於藻類毒性影響有相反之結果其原因為 Q_3 與 Q_4 間彼此會互相影響電子雲的分佈，當 Q_3 值越大，代表越缺電子，此時 Q_4 值較小、所帶負電荷較多且受到羰基(carbonyl)拉電子基影響導致往 Q_3 分佈移動造成 β -C 較容易與親核試劑(ex：硫氫基)進行親核性取代反應，進而增加毒性。

綜上所述，Eq(14~22)為利用逐步迴歸分析法所分析的結果，其大部分自由度校正之相關係數 R_{adj}^2 皆大於 0.85，而經由交叉驗證法之後相關係數 R_{pred}^2 均大於 0.80，顯示利用以上迴歸式預測 α, β -不飽和酮類藻類毒性數據的預測能力佳， α, β -不飽和酮類足資為親電性物質，而此物質與電性參數及反應性參數具某種程度上的關係，亦與文獻相呼應^[44, 45, 47]。

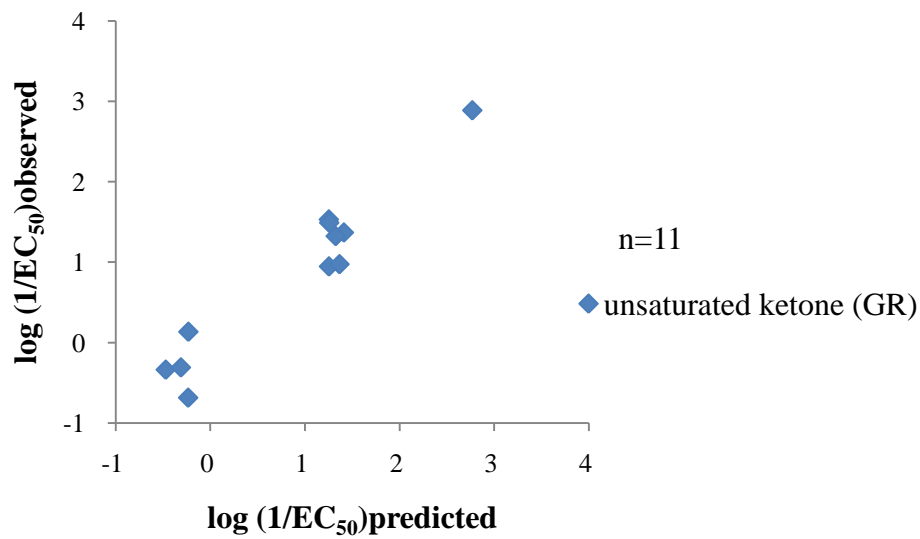
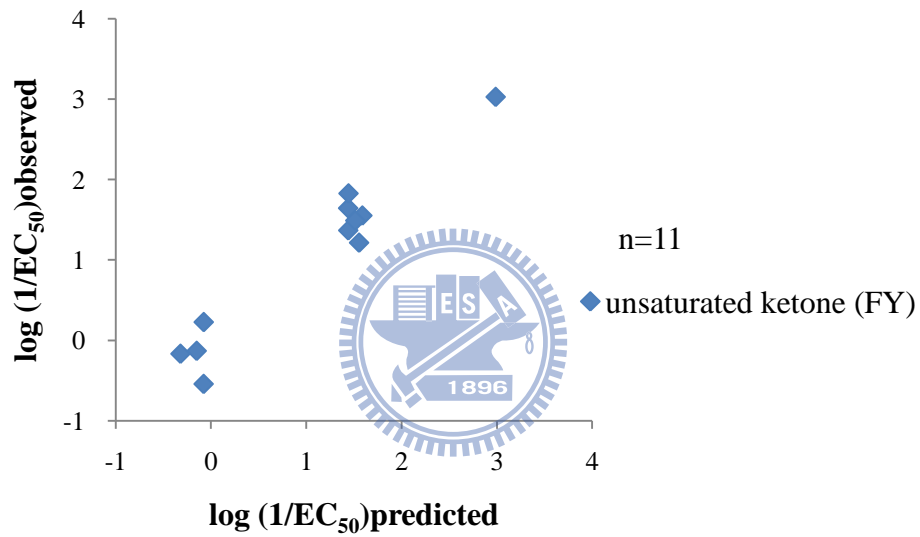
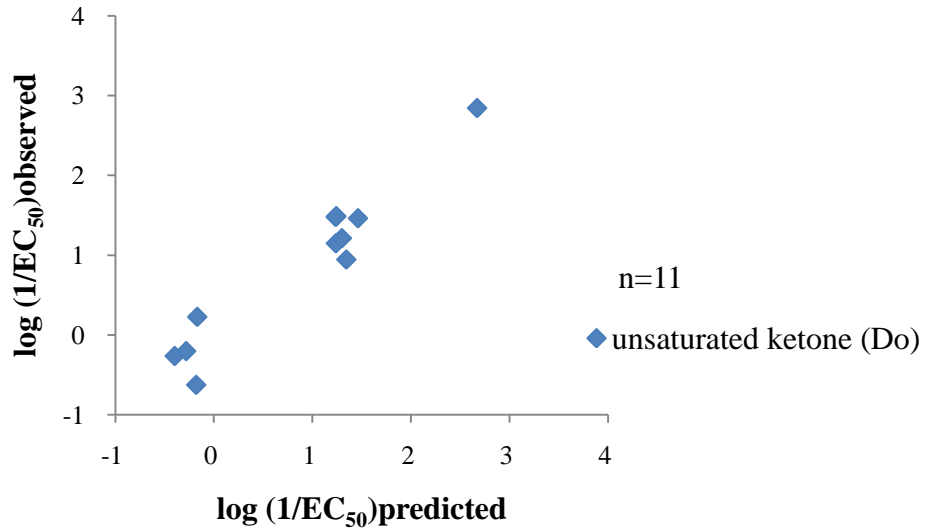


Fig 5.6.3.1 Utilize Eq(11~13) predicted toxicity v.s. observed toxicity

Table 5.6.3.1 Utilized the descriptors of this study

Chemical	Descriptors							
	Log P	E_{lumo}^a	E_{lumo}^b (文献)	E_{homo}^a	Q_3^a	Q_4^a	$Q_3+Q_4^a$	$Q_3+Q_4^b$ (文献)
3-butyne-2-one	-0.52	ND	0.049	ND	ND	ND	ND	-0.356
3-buten-2-one	0.41	0.103	0.051	-10.568	-0.304	-0.284	-0.588	-0.377
2-cyclopenten-1-one	0.71	0.132	-0.037	-10.424	-0.305	-0.194	-0.499	-0.345
3-pentene-2-one	0.52	0.120	0.053	-10.408	-0.306	-0.191	-0.497	-0.332
2-methyl-2-cyclopenten-1-one	1.26	0.091	-0.006	-9.871	-0.205	-0.191	-0.396	-0.295
3-hexyn-2-one	0.17	ND	0.118	ND	-0.246	-0.144	-0.390	-0.308
3-methyl-2-cyclopenten-1-one	1.26	0.144	-0.047	-10.117	-0.300	-0.099	-0.399	-0.293
5-hexen-2-one	1.10	0.920	ND	-10.227	-0.243	-0.323	-0.566	ND
3-methyl-3-penten-2-one	1.37	0.159	0.075	-9.972	-0.209	-0.189	-0.398	-0.279
4-hexene-3-one	1.31	0.269	0.075	-10.311	-0.330	-0.166	-0.496	-0.333
4-methyl-3-pentene-2-one	1.37	0.160	0.059	-10.044	-0.314	-0.069	-0.383	-0.277
3-heptene-2-one	1.80	0.131	0.069	-10.399	-0.305	-0.187	-0.492	-0.330
5-methyl-5-hexen-2-one	1.65	0.988	ND	-9.919	-0.149	-0.323	-0.472	ND
3-octene-2-one	2.29	0.137	0.068	-10.388	-0.305	-0.187	-0.492	-0.329
6-methyl-5-hepten-2-one	2.06	0.917	ND	-9.590	-0.235	-0.139	-0.374	ND
3-nonene-2-one	2.79	0.133	0.068	-10.383	-0.305	-0.187	-0.492	-0.330

Log P : n-Octanol/Water Partition Coefficient

E_{homo} : highest occupied molecular orbital energy

Q_4 : partial charge of C_4 (partial charge of β -C)

^a : Calculate by Chemoffice version 5.0 software(MOPAC 97)

ND : No Data

Descriptors : Calculate by Chemoffice version 5.0 software

E_{lumo} : lowest unoccupied molecular orbital energy

Q_3 : partial charge of C_3 (partial charge of α -C)

Q_3+Q_4 : sum of the partial charges of C_3 and C_4

^b : Data from TW.Schltz et al., 2005^[3]

Log P : data from EPIWEB version 4.0 software

Table 5.6.3.1 Utilized the descriptors of this study (continue)

Chemical	Descriptors		
	Delta E ^a	Log(1/RC ₅₀)	Log(1/RC ₅₀) ^c (文獻)
3-butyn-2-one	ND	1.23	1.24
3-buten-2-one	-10.671	1.12	1.05
2-cyclopenten-1-one	-10.556	0.26	ND
3-pentene-2-one	-10.528	0.82	0.96
2-methyl-2-cyclopenten-1-one	-9.962	-0.94	ND
3-hexyn-2-one	ND	1.05	0.92
3-methyl-2-cyclopenten-1-one	-10.261	-1.28	ND
5-hexen-2-one	-11.147	-1.46	ND
3-methyl-3-penten-2-one	-10.131	-0.68	-1.00
4-hexene-3-one	-10.580	0.80	0.47
4-methyl-3-pentene-2-one	-10.204	-1.32	-1.45
3-heptene-2-one	-10.530	0.53	ND
5-methyl-5-hexen-2-one	-10.907	-1.56	ND
3-octene-2-one	-10.525	0.59	0.34
6-methyl-5-hepten-2-one	-10.507	NA	ND
3-nonene-2-one	-10.516	0.54	ND

Delta E : E_{homo} - E_{lumo}

RC₅₀ : 50% Reactive Concentrations with GSH (unit : mmol/L)

^c : data from Reference by T. W. Schultz et al. 2007. [45]

NA : No active (No reactive)

ND : No Data

Table 5.6.3.2 The correlation matrix of descriptors between each other

相關係數 (R)	E _{homo}	Log(1/RC ₅₀)	Q ₃	Delta E	E _{lumo}	Q ₄
E _{homo}	1					
Log(1/RC ₅₀)	-0.844	1				
Q ₃	0.696	-0.553	1			
Delta E	0.303	-0.056	-0.063	1		
E _{lumo}	0.537	-0.559	0.617	-0.641	1	
Q ₄	0.212	0.084	-0.437	0.730	-0.475	1

5.6.4 毒性數據與反應性分析

McFarland^[29]認為化學物質的毒性主要有下列兩種因素所造成：

- (1) 毒物進入生物相的穿透力。
- (2) 毒物和反應位置的相互作用。

以數學模式表示法如下：

$$\text{Log (toxicity)}^{-1} = A[\text{log (penetration) }] + B[\text{log (interaction) }] + C$$

本研究試驗毒物屬於反應性毒性作用機制(參考 Russom et al. 分類^[1])，其中試驗毒物與細胞間之交互作用關係的代表參數為 RC_{50} ，因親電性物質之毒性易受到 GSH 烷基化影響，隨著 GSH 被消耗會使硫氫基 (-SH) 容易受到攻擊，又親電性毒化物會與 GSH 自發性的結合加以保護細胞內所含之硫氫基遭受攻擊。 RC_{50} 的大小就代表反應的程度，其值愈低，反應性越高。

利用表 5.6.3.1 中 Log P 、 $\text{Log}(1/RC_{50})$ 與藻類毒性數據迴歸分析得 Eq(23)、Eq(24)、Eq(25)，顯示相關性均佳，三種不同反應終點其 $\text{Log}(1/RC_{50})$ 的斜率均大於 Log P 之斜率，顯示其影響毒性較大，由此足見反應性越高，毒性亦越高，結果與文獻相似^[45]。n=15，其中 6-methyl-5-hepten-2-one，由於其反應性太低以致參數值無法得之，故將其挑出於迴歸式外，樣品數剩 15 個不飽和酮。

$$\begin{aligned} \log (1/ EC_{50, \Delta DO}) &= -0.395 \text{ Log P} + 1.03 \text{ Log}(1/RC_{50}) + 1.52 & (23) \\ n = 15, R_{\text{adj}}^2 &= 0.876, R_{\text{pred}}^2 = 0.823, S = 0.459, F = 50.36 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log (1/ EC_{50, \text{Final Yield} }) &= -0.382 \text{ Log P} + 1.08 \text{ Log}(1/RC_{50}) + 1.68 & (24) \\ n = 15, R_{\text{adj}}^2 &= 0.877, R_{\text{pred}}^2 = 0.823, S = 0.470, F = 51.11 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log (1/EC_{50, \text{Growth rate} }) &= -0.416 \text{ Log P} + 1.06 \text{ Log}(1/RC_{50}) + 1.49 & (25) \\ n = 15, R_{\text{adj}}^2 &= 0.896, R_{\text{pred}}^2 = 0.853, S = 0.429, F = 61.41 \end{aligned}$$

模式迴歸分析法亦為判定準確性方法之一，亦即將模式之預測值與實際值進行迴歸分析，當迴歸公式之斜率越接近於 1 且截距越接近 0 時，其模式之準確性亦相對越高。由圖 5.6.4.1 可知在本研究中，以兩種參數迴歸之模式其斜率皆接近於 1，且截距接近 0，由此足見以此所建立之模式有極高之準確性。

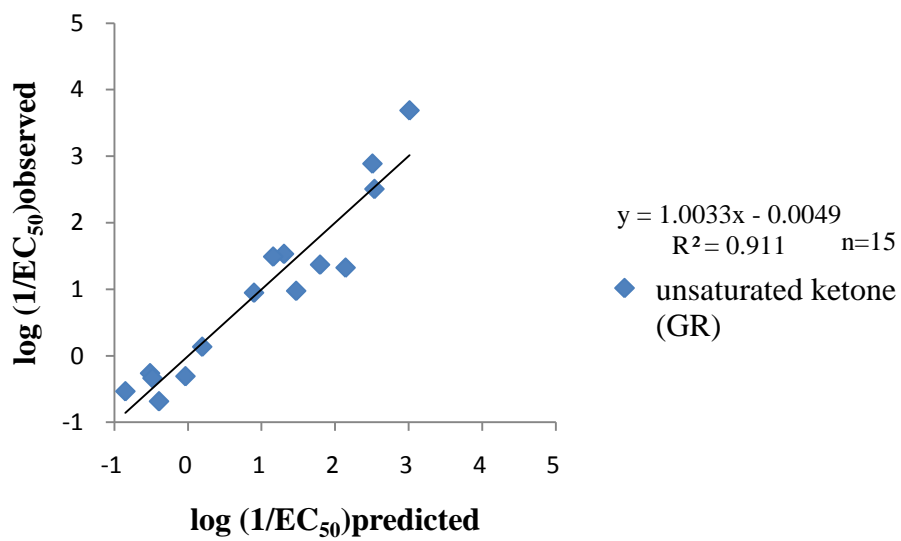
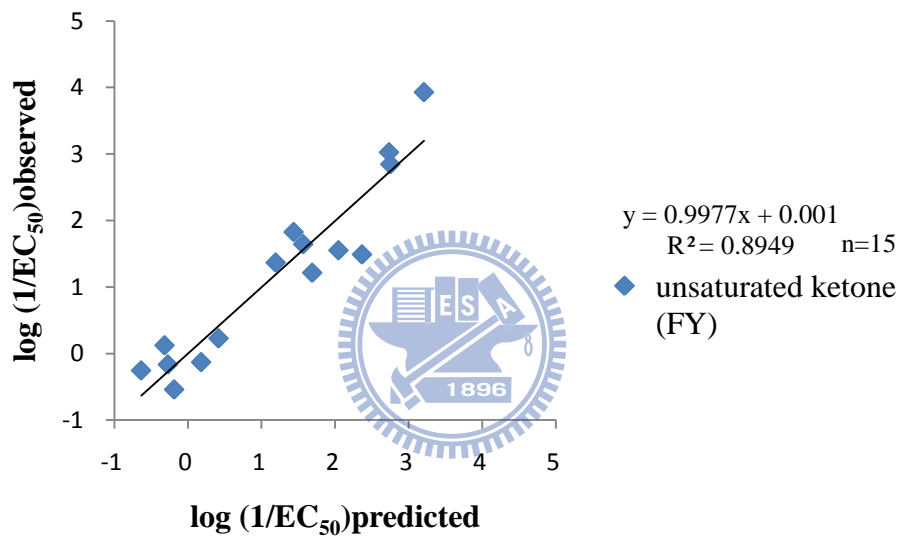
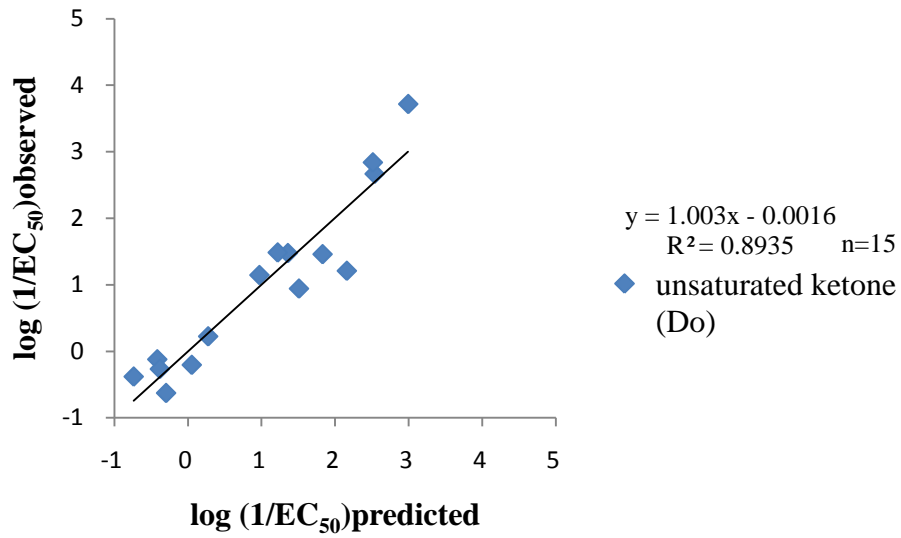


Fig 5.6.4.1 Utilize Eq(23~25) predicted toxicity v.s. observed toxicity

第六章、結論與建議

6.1 結論

本研究係針對 18 種酮類，其中 16 種為 α,β -不飽和酮，2 種為飽和酮進行密閉式之藻類毒性試驗，其所得之結果如下：

1. 藻類毒性試驗三個反應終點的敏感度比較，Final yield(佔 100%)最為敏感；而 ΔDo 與 Growth Rate 相較下， ΔDo 較 Growth Rate 來的敏感(佔 67%)。
2. 毒性由強至弱依序為不飽和酮 > 鹵素取代酮 > 飽和酮，含 π 鍵之不飽和酮較活潑、不穩定，亦容易發生電子轉移作用，與生物體內部發生反應，而飽和酮結構較穩定，毒性作用機制屬於麻醉性，故毒性較低，鹵素取代酮會被羰基(carbonyl group)活化而利用 S_N 取代反應與親核劑進行加成作用造成較具活性、不穩定，導致毒性大於飽和酮。
3. 毒性炔酮類 > 烯酮類(三鍵 > 雙鍵)，由於三鍵拉電子的能力比雙鍵強，所造成電子雲密度上差異較大，進而影響對生物體內交互作用機制，造成毒性之差異。
4. 接甲基之後毒性減弱，甲基取代在 $C=C$ 旁會造成立體空間障礙(steric hindrance)效應，導致電子轉移困難，使得毒性減弱。
5. 16 種 α,β -不飽和酮中大部分(81%)除 3-methyl-2-cyclopenten-1-one、5-methyl-5-hexen-2-one、6-methyl-5-hepten-2-one 之外，其他毒性皆大於基線毒性(baseline toxicity)，故 α,β -不飽和酮屬於反應性有機化合物，而例外之三種不飽和酮類因為甲基取代之後，造成毒性劇降。
6. 藻類與纖毛蟲物種比較部分，藻類比纖毛蟲敏感，而密閉式方式亦較開放性試驗更能減少有機物揮發且使誤差下降，毒性數據更為準確。
7. QSAR 分析方面，以傳統物化參數 Log P(辛醇-水係數)迴歸效果不佳，顯示 α,β -不飽和酮不屬於麻醉性毒性作用機制；再者，利用逐步迴歸分析法，挑出與藻類毒性數據有相關之電性參數(Delta E、 Q_3 、 Q_4)及反應性參數(Log(1/ RC_{50}))，加以迴歸分析；自由度校正之相關係數 R_{adj}^2 皆大於 0.85，而經由交叉驗證法之後相關係數 R_{pred}^2 均大於 0.80，結果說明以此方法所建立之迴歸式預測 α,β -不飽和酮類藻類毒性數據的預測能力佳，且皆無 outlier。另外，藻類與纖毛蟲物種的相關性比較，相關係數(R_{adj}^2)為 0.906~0.910、預測能力相關係數(R_{pred}^2)為 0.877~0.882，顯示其物種間的相關性極高，所以可以利用其中之一種物種，去預測另一種物種的毒性，這也對於在建立生物毒性資料庫

(Database)的研究上提供很好的一項參考資訊。

8. 藻類毒性數據與反應性分析結果，顯示毒性與反應性成正相關，毒性越高，反應性越高。

6.2 建議

1. 所選用其飽和酮及鹵素取代酮較少，可以另外再多選取一些飽和酮類與鹵素取代酮，如此一來在討論與不飽和酮類之間的毒性與結構關係可以更加完善。
2. 由於現今對於 α,β -不飽和酮類與其他生物物種(水蚤、魚、海洋發光菌等)之毒性數據並不充足，因此在未來的研究當中應收集更多生物物種之毒性數據，以便更進一步研究替代實驗物種之可行性。



第七章、參考文獻

- [1] **Russom CL, Bradbury SP, Broderius SJ, Hammermeister DE, Drummond RA.** 1997. Predicting modes of toxic action from chemical structure: Acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Article.
- [2] <http://zh.wikipedia.org/zh-tw/File:Ketone-displayed.png>.
- [3] **Schultz TW, Netzeva TI, Roberts DW, Cronin MTD.** 2005. Structure-toxicity relationships for the effects to tetrahymena pyriformis of aliphatic, carbonyl-containing, alpha,beta-unsaturated chemicals. *Chem Res Toxicol* 18:330-341.
- [4] **Chen HF, Hee SSQ.** 1995. Ketone EC(50) value in the microtox test. *Ecotox Environ Safe* 30:120-123.
- [5] **Pavia DL .** Introduction to organic laboratory techniques, 4th ed.
- [6] **Mayer P, Nyholm N, Verbruggen EMJ, Hermens JLM, Tolls J.** 2000. Algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials. *Environ Toxicol Chem* 19:2551-2556.
- [7] **Padrtova RR, Marsalek B, Holoubek I.** 1998. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery. *Chemosphere* 37:495-507.
- [8] **Lin JH, Kao WC, Tsai KP, Chen CY.** 2005. A novel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. *Water Research* 39:1869-1877.
- [9] **United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA).** 1996. Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. Algal Toxicity, Tiers I and II.

- [10] **Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)**. 1984. Guideline for testing chemicals. No. 201. Alga growth inhibition test. Paris, France.
- [11] **International Organization for Standardization (ISO)**. 1987. Water quality- Algal growth inhibition test. Draft International Standard ISO/DIS 8692. Geneva, Switzerland.
- [12] **American Public Health Association (APHA), American Water Works Association and Water Pollution Control Federation**. 1995. Toxicity testing with phytoplankton, in *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 19th edn, APHA, Washington, DC.
- [13] **American Society for Testing and Materials (ASTM)**. 1994. Standard Guide for Conducting Static 96h Toxicity Tests with Microalgae. Annual Book of ASTM Standards. ASTM E1218-90. Philadelphia, PA.
- [14] **Chao MR, Chen CY**. 2000. No-observed-effect concentrations in batch and continuous algal toxicity tests *Environ Toxicol Chem* 19:1589-1596.
- [15] **Hanstveit AO**. 1982. Evaluation of the result of the third ISO-interlaboratory study with an algal toxicity test. ISO/TC147/SC5/WG5. Netherlands Normalisatie Institute, Delft, Netherlands.
- [16] **Hanstveit AO**. 1981. Evaluation of the result of the second ISO-interlaboratory study with an algal toxicity test. ISO/TC147/SC5/WG5. Netherlands Normalisatie Institute, Delft, Netherlands.
- [17] **Newman MC**. 1991. Metal Ecotoxicology, p. 1-26. Lewis, Michigan.
- [18] **黃祥瑞**. 2000. 以光合作用為反應參數之藻類毒性實驗設計. 國立交通大學環境工程研究所, 碩士論文.

- [19]林瑞合. 2001. BOD 瓶之藻類毒性實驗設計. 國立交通大學環境工程研究所, 碩士論文.
- [20]HallingSorensen B, Nyholm N, Baun A. 1996. Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with CO₂ enriched headspace. *Chemosphere* 32:1513-1526.
- [21]Arensberg P, Hemmingsen VH, Nyholm N. 1995. A miniscale algal toxicity test *Chemosphere* 30:2103-2115.
- [22]林國清. 1997. 連續式藻類毒性試驗之實驗設計及效能評估. 國立交通大學土木工程研究所, 博士論文.
- [23]Nyholm N, Kallqvist T. 1989. Methods for growth-inhibition toxicity tests with fresh-water algae. *Environ Toxicol Chem* 8:689-703.
- [24]Chen CY. 1994. Theoretical evaluation of the inhibitory effects of mercury on algal growth at various orthophosphate levels *Water Research* 28:931-937.
- [25]Millington LA, Goulding KH, Adams N. 1988. The influence of growth-medium composition on the toxicity of chemicals to algae. *Water Research* 22:1593-1597.
- [26]Mazidji CN, Koopman B, Bitton G, Neita D. 1992. Distinction between heavy-metal and organic toxicity using EDTA chelation and microbial assays *Environ Toxicol Water Quality* 7:339-353.
- [27]Sorvari J, Sillanpaa M. 1996. Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and DTPA acute toxicity determined by *Daphnia magna*. *Chemosphere* 33:1119-1127.
- [28]Nalecz-Jawecki G, Sawicki J. 1999. Spirotox - A new tool for testing the toxicity of volatile compounds. *Chemosphere* 38:3211-3218.
- [29]Nirmalakhandan N, Egemen E, Trevizo C, Xu S. 1998. Structure-

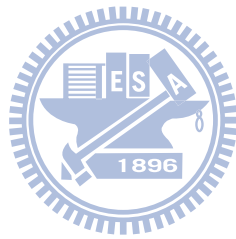
and property-activity relationship models for prediction of microbial toxicity of organic chemicals to activated sludge. *Ecotox Environ Safe* 39:112-119.

- [30] **Atkins PW.** 1994. Physical chemistry. *Oxford University Press* 497. Oxford University Press. 497.
- [31] **Marzio WD, Saenz ME.** 2004. Quantitative structure-activity relationship for aromatic hydrocarbons on freshwater fish. *Ecotox Environ Safe* 59:256-262.
- [32] **Randic M.** 2002. Characterization of molecular branching. *Journal of the American Chemical Society* 97:6609-6615.
- [33] **Kubinyi H.** 1993. QSAR: Hansch analysis and related approaches. VCH Publishers, New York. NY(USA), pp 4-49.
- [34] **Schultz TW.** 1998. QSAR in aquatic toxicology : A mechanism of action approach comparing toxic potency to *Pimephales promelas*, *Tetrahymena pyriformis*, and *Vibrio fischeri*. In J D, ed. Taylor & Francis, New York, pp 51-109.
- [35] **Verhaar HJM, Vanleeuwen CJ, Hermens JLM.** 1992. Classifying environmental-pollutants.1. Structure-activity-relationships for prediction of aquatic toxicity *Chemosphere* 25:471-491.
- [36] **Schultz TW.** 1987. The use of ionization constant(pKa) in selecting models of toxicity in phenols. *Ecotox Environ Safe* 14:178-183.
- [37] **Seward JR, Hamblen E, Wayne Schultz T.** 2002. Regression comparisons of *tetrahymena pyriformis* and *poecilia reticulata* toxicity. *Chemosphere* 47:93-101.
- [38] **Zhao YH, Cronin MTD, Dearden JC.** 1998. Quantitative structure-activity relationships of chemicals acting by non-polar narcosis - Theoretical considerations. *Quant Struct-Act Relat* 17:131-138.

- [39] **Herman DC, Inniss WE, Mayfield CI.** 1990. Impact of volatile aromatic-hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the fresh-water alga *selenastrum-capricornutum*. *Aquat Toxicol* 18:87-100.
- [40] **Lipnick RL.** 1990. Outliers-their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity. 4th International Workshop on Quantitative Structure-Activity Relationships in Environmental Toxicology, Veldhoven, Netherlands, Sep 16-20, pp 131-153.
- [41] **Morrison RT, Boyd RN.** 1995. Organic chemistry, sixth ed. 台灣東華書局股份有限公司.
- [42] **Karabunarliev S, Mekenyan OG, Karcher W, Russom CL, Bradbury SP.** 1996. Quantum-chemical descriptors for estimating the acute toxicity of electrophiles to the fathead minnow (*Pimephales promelas*): An analysis based on molecular mechanisms. *Quant Struct-Act Relat* 15:302-310.
- [43] **Hermens JLM.** 1990. Electrophiles and Acute Toxicity to Fish. *Environ Health Perspect* 87:219-225.
- [44] **Schultz TW, Yarbrough JW, Johnson EL.** 2005. Structure-activity relationships for reactivity of carbonyl-containing compounds with glutathione. *SAR QSAR Environ Res* 16:313-322.
- [45] **Yarbrough JW, Schultz TW.** 2007. Abiotic sulfhydryl reactivity: a predictor of aquatic toxicity for carbonyl-containing alpha,beta-unsaturated compounds. *Chem Res Toxicol* 20:558-562.
- [46] **莊涵婷.** 2004. 通勤旅程中非工作活動產生模式之研究. 中原大學土木工程研究所, 碩士論文.
- [47] **Schultz TW, Sinks GD, Hunter RS.** 1995. Structure-toxicity relationships for alkanones and alkenones. *SAR QSAR Environ Res* 3:27-26.

- [48] **Schultz TW, Ralston KE, Roberts DW, Veith GD, Aptula AO.** 2007. Structure-activity relationships for abiotic thiol reactivity and aquatic toxicity of halo-substituted carbonyl compounds. 12th International Workshop on Quantitative Structure - Activity Relationships in Environmental Toxicology (QSAR 2006), Lyon, FRANCE, May 08-12, pp 21-29.
- [49] **Faucon JC, Bureau R, Faisant J, Briens F, Rault S.** 1999. Ecotoxicological endpoints in European notification procedure impact on the classification for the aquatic environment. *Chemosphere* 38:2849-2863.
- [50] **Hsieh SH, Tsai KP, Chen CY.** 2006. The combined toxic effects of nonpolar narcotic chemicals to *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water Research* 40:1957-1964.
- [51] **Tsai KP, Chen CY.** 2007. An algal toxicity database of organic toxicants derived by a closed-system technique. *Environ Toxicol Chem* 26:1931-1939.
- [52] **Dearden JC, Cronin MTD, Schultz TW.** 1995. QSAR study of the toxicity of nitrobenzenes of *Tetrahymena pyriformis*. *Quant Struct-Act Relat* 14:427-432.
- [53] **Schultz TW, Cronin MTD.** 2003. Essential and desirable characteristics of ecotoxicity quantitative structure-activity relationships. *Environ Toxicol Chem* 22:599-607.

附錄一、原始數據



實驗毒物： 3-butyn-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000

MCV (µm³)： 45.86 Initial pH： 7.52 EDTA(%)： 0

T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	µspecific	µrelative	IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	2.05	7.42	225500	5.37	1.355	1.000	0.000	0.000	0.000
0.084	2.31	2.23	23000	-0.08	0.214	0.158	0.842	0.962	1.015
0.042	2.12	2.09	20500	-0.03	0.156	0.115	0.885	0.974	1.006
0.021	2.00	2.22	21800	0.22	0.187	0.138	0.862	0.968	0.959
0.010	1.99	5.23	82900	3.24	0.855	0.631	0.369	0.677	0.397
0.005	2.11	6.43	183900	4.32	1.253	0.925	0.075	0.198	0.196
0.003	2.06	6.74	222500	4.68	1.348	0.995	0.005	0.014	0.128
0.001	2.03	7.12	221100	5.09	1.345	0.993	0.007	0.021	0.052
Control	1.90	7.26	227000	5.36	1.358	1.000	0.000	0.000	0.000
0.084	2.47	2.50	18900	0.03	0.116	0.085	0.915	0.982	0.994
0.042	2.00	2.00	24100	0.00	0.237	0.175	0.825	0.957	1.000
0.021	1.95	2.21	24400	0.26	0.243	0.179	0.821	0.956	0.951
0.010	2.01	5.11	70300	3.10	0.772	0.569	0.431	0.739	0.422
0.005	2.02	6.39	192200	4.37	1.275	0.939	0.061	0.164	0.185
0.003	2.09	6.46	211500	4.37	1.323	0.974	0.026	0.073	0.185
0.001	2.10	6.60	207600	4.50	1.314	0.967	0.033	0.092	0.160
Control	1.91	7.58	219800	5.67	1.342	1.000	0.000	0.000	0.000
0.084	2.92	2.97	24900	0.05	0.253	0.189	0.811	0.952	0.991
0.042	2.35	2.22	22300	-0.13	0.198	0.148	0.852	0.964	1.023
0.021	2.06	2.46	22500	0.40	0.203	0.151	0.849	0.963	0.929
0.010	2.06	5.54	83100	3.48	0.856	0.638	0.362	0.667	0.386
0.005	2.04	5.74	154800	3.70	1.167	0.869	0.131	0.317	0.347
0.003	2.24	6.43	184000	4.19	1.253	0.934	0.066	0.175	0.261
0.001	2.07	7.12	229400	5.05	1.364	1.016	-0.016	-0.047	0.109
Control	1.95	7.42	224100	5.47	1.352	1.000	0.000	0.000	0.000
0.084	2.57	2.57	22267	0.00	0.194	0.144	0.854	0.965	1.000
0.042	2.16	2.10	22300	-0.05	0.197	0.146	0.853	0.965	1.010
0.021	2.00	2.30	22900	0.29	0.211	0.156	0.844	0.962	0.946
0.010	2.02	5.29	78767	3.27	0.828	0.612	0.387	0.695	0.401
0.005	2.06	6.19	176967	4.13	1.232	0.911	0.087	0.225	0.245
0.003	2.13	6.54	206000	4.41	1.308	0.968	0.031	0.087	0.193
0.001	2.07	6.95	219367	4.88	1.341	0.992	0.008	0.023	0.107

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 3-buten-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm3)： 45.06 Initial pH： 7.44 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
				mg/L	µspecific	µrelative			
Control	2.3	6.4	213400	4.1	1.328	1.000	0.000	0.000	0.000
2.23	2.33	2.94	13300	0.61	-0.060	-0.045	1.045	1.009	0.851
1.12	2.09	2.19	15700	0.1	0.023	0.017	0.983	0.996	0.976
0.56	2.09	2.49	14200	0.4	-0.027	-0.021	1.021	1.004	0.902
0.28	2.27	2.79	14900	0.52	-0.003	-0.003	1.003	1.001	0.873
0.14	2.27	2.87	17600	0.6	0.080	0.060	0.940	0.987	0.854
0.07	2.24	5.32	79800	3.08	0.836	0.630	0.370	0.673	0.249
0.04	2.21	6.81	209100	4.6	1.317	0.992	0.008	0.022	-0.122
Control	2.29	7.18	220600	4.89	1.344	1.000	0.000	0.000	0.000
2.23	2.64	3.29	12100	0.65	-0.107	-0.080	1.080	1.014	0.867
1.12	2.19	2.27	12500	0.08	-0.091	-0.068	1.068	1.012	0.984
0.56	2.1	2.74	13900	0.64	-0.038	-0.028	1.028	1.005	0.869
0.28	2.29	2.93	12400	0.64	-0.095	-0.071	1.071	1.013	0.869
0.14	2.27	3.27	22100	1.0	0.194	0.144	0.856	0.965	0.796
0.07	2.23	5.29	120600	3.06	1.042	0.775	0.225	0.486	0.374
0.04	2.3	6.01	191900	3.71	1.274	0.948	0.052	0.140	0.241
Control	2.28	7.69	228600	5.41	1.362	1.000	0.000	0.000	0.000
2.23	2.69	3.08	11600	0.39	-0.129	-0.094	1.094	1.016	0.928
1.12	2.13	2.71	17400	0.58	0.074	0.054	0.946	0.989	0.893
0.56	2.09	3	13100	0.91	-0.068	-0.050	1.050	1.009	0.832
0.28	2.12	2.8	13300	0.68	-0.060	-0.044	1.044	1.008	0.874
0.14	2.27	3.05	30300	0.78	0.352	0.258	0.742	0.928	0.856
0.07	2.23	5.93	118900	3.7	1.035	0.760	0.240	0.514	0.316
0.04	2.15	6.66	225500	4.51	1.355	0.995	0.005	0.015	0.166
Control	2.29	7.09	220867	4.80	1.345	1.000	0.000	0.000	0.000
2.23	2.55	3.10	12333	0.55	-0.099	-0.073	1.073	1.013	0.885
1.12	2.14	2.39	15200	0.25	0.002	0.001	0.995	0.999	0.947
0.56	2.09	2.74	13733	0.65	-0.044	-0.033	1.033	1.006	0.865
0.28	2.23	2.84	13533	0.61	-0.053	-0.039	1.038	1.007	0.872
0.14	2.27	3.06	23333	0.79	0.208	0.154	0.836	0.960	0.835
0.07	2.23	5.51	106433	3.28	0.971	0.722	0.271	0.556	0.317
0.04	2.22	6.49	208833	4.27	1.316	0.978	0.021	0.058	0.110

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 3-chloro-2-butanone 初始細胞密度(cells/mL)： 15000

MCV (μm³)： 46 Initial pH： 7.59 EDTA(%)： 0

T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	μspecific	μrelative	IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	2.11	4.12	133300	2.01	1.092	1.000	0.000	0.000	0.000
206.70	3.23	3.20	20000	-0.03	0.144	0.132	0.868	0.958	1.015
51.70	2.48	2.40	18700	-0.08	0.110	0.101	0.899	0.969	1.040
12.90	2.19	2.56	33000	0.37	0.394	0.361	0.639	0.848	0.816
3.20	2.16	3.11	38700	0.95	0.474	0.434	0.566	0.800	0.527
0.80	2.22	3.83	144700	1.61	1.133	1.038	-0.038	-0.096	0.199
0.20	2.05	4.26	173600	2.21	1.224	1.121	-0.121	-0.341	-0.100
0.05	2.11	4.76	172800	2.65	1.222	1.119	-0.119	-0.334	-0.318
Control	1.87	4.23	156100	2.36	1.171	1.000	0.000	0.000	0.000
206.70	3.39	3.50	18500	0.11	0.105	0.090	0.910	0.975	0.953
51.70	2.54	2.42	17800	-0.12	0.086	0.073	0.927	0.980	1.051
12.90	2.14	2.81	31500	0.67	0.371	0.317	0.683	0.883	0.716
3.20	2.10	3.01	34400	0.91	0.415	0.354	0.646	0.863	0.614
0.80	2.06	3.78	137200	1.72	1.107	0.945	0.055	0.134	0.271
0.20	2.11	4.29	181700	2.18	1.247	1.065	-0.065	-0.181	0.076
0.05	2.06	4.14	149400	2.08	1.149	0.981	0.019	0.047	0.119
Control	2.01	4.51	157600	2.50	1.176	1.000	0.000	0.000	0.000
206.70	3.66	3.35	21400	-0.31	0.178	0.151	0.849	0.955	1.124
51.70	2.55	2.65	17900	0.10	0.088	0.075	0.925	0.980	0.960
12.90	2.11	2.53	27700	0.42	0.307	0.261	0.739	0.911	0.832
3.20	2.15	3.04	42800	0.89	0.524	0.446	0.554	0.805	0.644
0.80	1.94	3.51	126200	1.57	1.065	0.906	0.094	0.220	0.372
0.20	2.36	4.45	162700	2.09	1.192	1.014	-0.014	-0.036	0.164
0.05	2.12	4.16	151000	2.04	1.155	0.982	0.018	0.046	0.184
Control	2.00	4.29	149000	2.29	1.147	1.000	0.000	0.000	0.000
206.70	3.43	3.35	199667	-0.08	0.142	0.124	0.875	0.963	1.033
51.70	2.52	2.49	18133	-0.03	0.095	0.083	0.917	0.977	1.015
12.90	2.15	2.63	30733	0.49	0.357	0.313	0.688	0.883	0.787
3.20	2.14	3.05	38633	0.92	0.471	0.411	0.588	0.824	0.600
0.80	2.07	3.71	136033	1.63	1.102	0.963	0.040	0.097	0.287
0.20	2.17	4.33	172667	2.16	1.221	1.066	-0.064	-0.177	0.057
0.05	2.10	4.35	157733	2.26	1.175	1.027	-0.025	-0.065	0.015

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： Methyl ethyl ketone 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm³)： 43.04 Initial pH： 7.44 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	µspecific	µrelative (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	2.30	6.46	266900	4.16	1.439	1.000	0.000	0.000
7882.40	4.07	3.17	24600	-0.90	0.247	0.172	0.828	1.216
3152.96	2.97	3.83	35500	0.86	0.431	0.299	0.701	0.793
1261.18	2.42	4.96	91300	2.54	0.903	0.627	0.373	0.697
504.47	2.40	5.17	176000	2.77	1.231	0.855	0.145	0.361
201.79	2.36	5.48	209200	3.12	1.318	0.915	0.085	0.229
80.72	2.25	6.37	238300	4.12	1.383	0.961	0.039	0.114
32.29	2.40	6.53	239900	4.13	1.386	0.963	0.037	0.107
Control	2.23	6.57	203400	4.34	1.304	1.000	0.000	0.000
7882.40	4.09	3.56	30300	-0.53	0.352	0.270	0.730	1.122
3152.96	3.19	4.12	39800	0.93	0.488	0.374	0.626	0.868
1261.18	2.48	4.95	85900	2.47	0.873	0.669	0.331	0.624
504.47	2.32	5.12	233000	2.80	1.371	1.052	-0.052	-0.157
201.79	2.26	5.69	251700	3.43	1.410	1.082	-0.082	-0.256
80.72	2.57	6.71	241300	4.14	1.389	1.066	-0.066	-0.201
32.29	2.26	6.42	252900	4.16	1.412	1.084	-0.084	-0.263
Control	2.18	6.90	213900	4.72	1.329	1.000	0.000	0.000
7882.40	3.88	3.19	23200	-0.69	0.218	0.164	0.836	1.146
3152.96	3.24	4.27	41100	1.03	0.504	0.379	0.621	0.869
1261.18	2.59	4.97	96700	2.38	0.932	0.701	0.299	0.589
504.47	2.36	5.13	198800	2.77	1.292	0.972	0.028	0.076
201.79	2.33	5.60	240600	3.27	1.388	1.044	-0.044	-0.134
80.72	2.39	6.69	242200	4.30	1.391	1.047	-0.047	-0.142
32.29	2.26	6.64	259400	4.38	1.425	1.073	-0.073	-0.229
Control	2.24	6.64	228067	4.41	1.357	1.000	0.000	0.000
7882.40	4.01	3.31	26033	-0.71	0.272	0.202	0.797	1.160
3152.96	3.13	4.07	38800	0.94	0.474	0.351	0.651	0.888
1261.18	2.50	4.96	91300	2.46	0.902	0.666	0.336	0.642
504.47	2.36	5.14	202600	2.78	1.298	0.960	0.044	0.120
201.79	2.32	5.59	233833	3.27	1.372	1.014	-0.009	-0.027
80.72	2.40	6.59	240600	4.19	1.388	1.024	-0.020	-0.059
32.29	2.31	6.53	250733	4.22	1.408	1.040	-0.035	-0.106

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 2-cyclopenten-1-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (μm³)： 41.58 Initial pH： 7.55 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR	IR	IR
				mg/L	μspecific	μrelative	(growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	2.02	4.69	161900	2.67	1.189	1.000	0.000	0.000	0.000
88.41	2.51	2.54	22300	0.03	0.198	0.167	0.833	0.950	0.989
44.20	1.85	1.75	11300	-0.10	-0.142	-0.119	1.119	1.025	1.037
22.10	1.85	2.39	13600	0.54	-0.049	-0.041	1.041	1.010	0.798
11.05	1.85	2.77	21100	0.92	0.171	0.143	0.857	0.958	0.655
5.53	1.94	4.16	87100	2.22	0.880	0.739	0.261	0.509	0.169
2.76	1.82	4.07	111500	2.25	1.003	0.843	0.157	0.343	0.157
1.38	1.92	4.38	147100	2.46	1.142	0.960	0.040	0.101	0.079
Control	2.02	4.54	155600	2.52	1.170	1.000	0.000	0.000	0.000
88.41	1.99	2.04	17100	0.05	0.066	0.056	0.944	0.985	0.980
44.20	1.83	1.72	11400	-0.11	-0.137	-0.117	1.117	1.026	1.044
22.10	1.84	2.01	15500	0.17	0.016	0.014	0.986	0.996	0.933
11.05	1.80	2.74	24600	0.94	0.247	0.211	0.789	0.932	0.627
5.53	1.91	4.02	74400	2.11	0.801	0.685	0.315	0.578	0.163
2.76	1.97	4.33	119100	2.36	1.036	0.886	0.114	0.260	0.063
1.38	2.01	5.12	160200	3.11	1.184	1.012	-0.012	-0.033	-0.234
Control	2.02	4.67	161400	2.65	1.188	1.000	0.000	0.000	0.000
88.41	2.50	2.48	17400	-0.02	0.074	0.062	0.938	0.984	1.008
44.20	2.04	1.90	17600	-0.14	0.080	0.067	0.933	0.982	1.053
22.10	1.90	2.08	15500	0.18	0.016	0.014	0.986	0.997	0.932
11.05	1.85	2.92	27500	1.07	0.303	0.255	0.745	0.915	0.596
5.53	1.75	3.77	77500	2.02	0.821	0.691	0.309	0.573	0.238
2.76	1.85	4.81	154100	2.96	1.165	0.981	0.019	0.050	-0.117
1.38	1.99	4.36	133300	2.37	1.092	0.919	0.081	0.192	0.106
Control	2.02	4.63	159633	2.61	1.182	1.000	0.000	0.000	0.000
88.41	2.33	2.35	18933	0.02	0.113	0.095	0.902	0.973	0.992
44.20	1.91	1.79	13433	-0.12	-0.066	-0.056	1.047	1.011	1.045
22.10	1.86	2.16	14867	0.30	-0.005	-0.004	1.004	1.001	0.886
11.05	1.83	2.81	24400	0.98	0.240	0.203	0.794	0.935	0.626
5.53	1.87	3.98	79667	2.12	0.834	0.705	0.294	0.553	0.190
2.76	1.88	4.40	128233	2.52	1.068	0.903	0.093	0.217	0.034
1.38	1.97	4.62	146867	2.65	1.139	0.964	0.035	0.088	-0.013

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 3-pentene-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (μm3)： 44.32 Initial pH： 7.46 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR	IR	IR
				mg/L	μspecific	μrelative	(growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	2.60	4.91	130900	2.31	1.083	1.000	0.000	0.000	0.000
20.39	2.82	3.16	18400	0.34	0.102	0.094	0.906	0.971	0.853
10.20	2.48	2.65	18700	0.17	0.110	0.102	0.898	0.968	0.926
5.10	2.44	3.48	21600	1.04	0.182	0.168	0.832	0.943	0.550
2.55	2.38	4.10	71600	1.72	0.782	0.721	0.279	0.512	0.255
1.27	2.32	4.40	114900	2.08	1.018	0.940	0.060	0.138	0.100
0.64	2.36	4.47	120900	2.11	1.043	0.963	0.037	0.086	0.087
0.32	2.35	5.03	152800	2.68	1.161	1.071	-0.071	-0.189	-0.160
Control	2.37	4.54	126200	2.17	1.065	1.000	0.000	0.000	0.000
20.39	3.07	3.43	21300	0.36	0.175	0.165	0.835	0.943	0.834
10.20	2.56	2.89	20500	0.33	0.156	0.147	0.853	0.951	0.848
5.10	2.58	3.62	19300	1.04	0.126	0.118	0.882	0.961	0.521
2.55	2.35	4.11	71600	1.76	0.782	0.734	0.266	0.491	0.189
1.27	2.34	4.39	101500	2.05	0.956	0.898	0.102	0.222	0.055
0.64	2.36	4.74	148900	2.38	1.148	1.078	-0.078	-0.204	-0.097
0.32	2.34	4.81	139400	2.47	1.115	1.047	-0.047	-0.119	-0.138
Control	2.43	4.60	122600	2.17	1.050	1.000	0.000	0.000	0.000
20.39	3.12	3.47	26100	0.35	0.277	0.264	0.736	0.897	0.839
10.20	2.61	2.74	18600	0.13	0.108	0.102	0.898	0.967	0.940
5.10	2.40	3.44	21400	1.04	0.178	0.169	0.831	0.941	0.521
2.55	2.34	4.28	69800	1.94	0.769	0.732	0.268	0.491	0.106
1.27	2.30	4.86	125700	2.56	1.063	1.012	-0.012	-0.029	-0.180
0.64	2.30	4.49	146400	2.19	1.139	1.084	-0.084	-0.221	-0.009
0.32	2.34	4.40	133200	2.06	1.092	1.039	-0.039	-0.099	0.051
Control	2.47	4.68	126567	2.22	1.066	1.000	0.000	0.000	0.000
20.39	3.00	3.35	21933	0.35	0.185	0.174	0.822	0.938	0.842
10.20	2.55	2.76	19267	0.21	0.125	0.117	0.883	0.962	0.905
5.10	2.47	3.51	20767	1.04	0.162	0.152	0.847	0.948	0.531
2.55	2.36	4.16	71000	1.81	0.777	0.729	0.271	0.498	0.185
1.27	2.32	4.55	114033	2.23	1.012	0.950	0.049	0.112	-0.006
0.64	2.34	4.57	138733	2.23	1.110	1.042	-0.043	-0.109	-0.005
0.32	2.34	4.75	141800	2.40	1.122	1.053	-0.053	-0.137	-0.084

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 2-methyl-2-cyclopenten-1-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm³)： 45 Initial pH： 7.6 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	µspecific	µrelative (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	2.12	5.97	187800	3.85	1.264	1.000	0.000	0.000
305.73	2.68	2.56	25700	-0.12	0.269	0.213	0.787	0.938
152.87	2.28	4.24	78200	1.96	0.826	0.653	0.347	0.634
76.43	2.05	5.45	186100	3.40	1.259	0.996	0.004	0.010
38.22	1.95	5.99	196200	4.04	1.286	1.017	-0.017	-0.049
19.11	1.92	5.90	190600	3.98	1.271	1.006	-0.006	-0.016
Control	2.07	5.35	175800	3.28	1.231	1.000	0.000	0.000
305.73	2.78	2.72	28200	-0.06	0.316	0.256	0.744	0.918
152.87	2.26	4.04	82900	1.78	0.855	0.695	0.305	0.578
76.43	1.96	4.85	170100	2.89	1.214	0.987	0.013	0.035
38.22	2.01	5.47	194500	3.46	1.281	1.041	-0.041	-0.116
19.11	1.96	6.04	198600	4.08	1.292	1.050	-0.050	-0.142
Control	2.01	5.39	181900	3.38	1.248	1.000	0.000	0.000
305.73	3.06	2.71	28500	-0.35	0.321	0.257	0.743	0.919
152.87	2.32	3.88	66900	1.56	0.748	0.599	0.401	0.689
76.43	2.04	5.32	178200	3.28	1.237	0.992	0.008	0.022
38.22	1.90	5.28	175500	3.38	1.230	0.986	0.014	0.038
19.11	1.97	4.97	179800	3.00	1.242	0.995	0.005	0.013
Control	2.07	5.57	181833	3.50	1.247	1.000	0.000	0.000
305.73	2.84	2.66	27467	-0.18	0.302	0.242	0.758	0.925
152.87	2.29	4.05	76000	1.77	0.809	0.649	0.350	0.634
76.43	2.02	5.21	178133	3.19	1.237	0.992	0.008	0.022
38.22	1.95	5.58	188733	3.63	1.266	1.015	-0.015	-0.041
19.11	1.95	5.64	189667	3.69	1.268	1.017	-0.017	-0.047

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 3-hexyn-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (μm³)： 44.24 Initial pH： 7.58 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
				mg/L	μspecific	μrelative			
Control	2.03	8.88	227000	6.85	1.358	1.000	0.000	0.000	0.000
3.21	2.26	2.88	20300	0.62	0.151	0.111	0.889	0.975	0.909
1.60	2.05	2.68	21100	0.63	0.171	0.126	0.874	0.971	0.908
0.80	2.07	3.68	28900	1.61	0.328	0.241	0.759	0.934	0.765
0.40	2.03	3.94	33700	1.91	0.405	0.298	0.702	0.912	0.721
0.20	1.90	4.73	75500	2.83	0.808	0.595	0.405	0.715	0.587
0.10	1.97	7.05	146400	5.08	1.139	0.839	0.161	0.380	0.258
0.05	2.05	8.32	215000	6.27	1.331	0.980	0.020	0.057	0.085
Control	2.03	8.89	223100	6.86	1.350	1.000	0.000	0.000	0.000
3.21	2.18	2.69	19200	0.51	0.123	0.091	0.909	0.980	0.926
1.60	2.04	2.80	22500	0.76	0.203	0.150	0.850	0.964	0.889
0.80	1.93	3.36	29800	1.43	0.343	0.254	0.746	0.929	0.792
0.40	1.96	4.19	33000	2.23	0.394	0.292	0.708	0.914	0.675
0.20	1.94	4.53	74200	2.59	0.799	0.592	0.408	0.716	0.622
0.10	1.98	7.15	163200	5.17	1.193	0.884	0.116	0.288	0.246
0.05	1.96	8.78	241100	6.82	1.389	1.029	-0.029	-0.086	0.006
Control	2.12	8.74	216300	6.62	1.334	1.000	0.000	0.000	0.000
3.21	2.44	2.52	18600	0.08	0.108	0.081	0.919	0.982	0.988
1.60	2.11	3.12	27900	1.01	0.310	0.233	0.767	0.936	0.847
0.80	2.01	3.60	28500	1.59	0.321	0.241	0.759	0.933	0.760
0.40	2.04	4.13	39800	2.09	0.488	0.366	0.634	0.877	0.684
0.20	1.97	4.65	87300	2.68	0.881	0.660	0.340	0.641	0.595
0.10	1.98	7.05	146000	5.07	1.138	0.853	0.147	0.349	0.234
0.05	1.95	8.02	203600	6.07	1.304	0.977	0.023	0.063	0.083
Control	2.06	8.84	222133	6.78	1.348	1.000	0.000	0.000	0.000
3.21	2.29	2.70	19367	0.40	0.127	0.094	0.905	0.979	0.940
1.60	2.07	2.87	23833	0.80	0.228	0.169	0.828	0.957	0.882
0.80	2.00	3.55	29067	1.54	0.331	0.245	0.755	0.932	0.772
0.40	2.01	4.09	35500	2.08	0.429	0.319	0.680	0.901	0.694
0.20	1.94	4.64	79000	2.70	0.829	0.616	0.384	0.691	0.602
0.10	1.98	7.08	151867	5.11	1.157	0.858	0.141	0.339	0.246
0.05	1.99	8.37	219900	6.39	1.341	0.995	0.004	0.011	0.058

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 3-methyl-2-cyclopenten-1-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000

MCV (μm³)： 42.68 Initial pH： 7.47 EDTA(%)： 0

T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR	IR	IR
				mg/L	μspecific	μrelative	(growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.90	3.52	110700	1.62	0.999	1.000	0.000	0.000	0.000
754.34	3.05	3.00	24500	-0.05	0.245	0.245	0.755	0.901	1.031
469.96	2.39	3.04	39400	0.65	0.483	0.483	0.517	0.745	0.599
248.48	2.02	3.35	78600	1.33	0.828	0.829	0.171	0.335	0.179
124.24	1.85	3.60	126000	1.75	1.064	1.065	-0.065	-0.160	-0.080
62.12	1.85	3.46	122600	1.61	1.050	1.051	-0.051	-0.124	0.006
Control	1.85	3.43	111000	1.58	1.001	1.000	0.000	0.000	0.000
754.34	3.07	3.11	22500	0.04	0.203	0.203	0.797	0.922	0.975
469.96	2.30	2.86	35800	0.56	0.435	0.435	0.565	0.783	0.646
248.48	2.06	3.49	80700	1.43	0.841	0.841	0.159	0.316	0.095
124.24	1.96	3.65	129900	1.69	1.079	1.079	-0.079	-0.197	-0.070
62.12	1.86	3.52	124000	1.66	1.056	1.055	-0.055	-0.135	-0.051
Control	1.77	3.42	110400	1.65	0.998	1.000	0.000	0.000	0.000
754.34	3.43	3.33	27100	-0.10	0.296	0.296	0.704	0.873	1.061
469.96	2.42	3.05	38900	0.63	0.476	0.477	0.523	0.749	0.618
248.48	2.03	3.41	90700	1.38	0.900	0.902	0.098	0.206	0.164
124.24	1.96	3.57	123100	1.61	1.052	1.055	-0.055	-0.133	0.024
62.12	1.80	3.60	137100	1.80	1.106	1.109	-0.109	-0.280	-0.091
Control	1.84	3.46	110700	1.62	0.999	1.000	0.000	0.000	0.000
754.34	3.18	3.15	24700	-0.04	0.248	0.248	0.750	0.899	1.023
469.96	2.37	2.98	38033	0.61	0.465	0.465	0.535	0.759	0.621
248.48	2.04	3.42	83333	1.38	0.856	0.857	0.142	0.286	0.146
124.24	1.92	3.61	126333	1.68	1.065	1.066	-0.066	-0.163	-0.041
62.12	1.84	3.53	127900	1.69	1.071	1.072	-0.072	-0.180	-0.045

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 5-hexen-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm³)： 44.6 Initial pH： 7.53 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR	IR	IR
				mg/L	µspecific	µrelative	(growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.93	7.15	233200	5.22	1.372	1.000	0.000	0.000	0.000
1490.72	3.32	3.42	29800	0.10	0.343	0.250	0.750	0.932	0.981
745.36	2.42	2.56	34400	0.14	0.415	0.302	0.698	0.911	0.973
372.68	2.08	2.20	37700	0.12	0.461	0.336	0.664	0.896	0.977
186.34	2.03	3.59	53000	1.56	0.631	0.460	0.540	0.826	0.701
93.17	1.90	5.70	88700	3.80	0.889	0.648	0.352	0.662	0.272
46.59	1.99	6.24	186500	4.25	1.260	0.919	0.081	0.214	0.186
23.29	1.92	6.66	244800	4.74	1.396	1.018	-0.018	-0.053	0.092
Control	1.85	6.87	223400	5.02	1.350	1.000	0.000	0.000	0.000
1490.72	3.17	3.24	27000	0.07	0.294	0.218	0.782	0.942	0.986
745.36	2.46	2.56	28600	0.10	0.323	0.239	0.761	0.935	0.980
372.68	2.11	2.22	31900	0.11	0.377	0.279	0.721	0.919	0.978
186.34	2.10	3.74	47700	1.64	0.578	0.428	0.572	0.843	0.673
93.17	1.92	5.00	85300	3.08	0.869	0.644	0.356	0.663	0.386
46.59	1.90	6.21	187700	4.31	1.263	0.936	0.064	0.171	0.141
23.29	1.96	7.51	257800	5.55	1.422	1.053	-0.053	-0.165	-0.106
Control	1.82	6.67	229700	4.85	1.364	1.000	0.000	0.000	0.000
1490.72	3.35	3.41	27200	0.06	0.298	0.218	0.782	0.943	0.988
745.36	2.59	2.71	31500	0.12	0.371	0.272	0.728	0.923	0.975
372.68	2.13	2.22	35600	0.09	0.432	0.317	0.683	0.904	0.981
186.34	2.13	3.68	48400	1.55	0.586	0.429	0.571	0.844	0.680
93.17	2.04	5.47	84800	3.43	0.866	0.635	0.365	0.675	0.293
46.59	1.92	6.49	214300	4.57	1.330	0.975	0.025	0.072	0.058
23.29	1.92	6.39	233000	4.47	1.371	1.005	-0.005	-0.015	0.078
Control	1.87	6.90	228767	5.03	1.362	1.000	0.000	0.000	0.000
1490.72	3.28	3.36	28000	0.08	0.312	0.229	0.771	0.939	0.985
745.36	2.49	2.61	31500	0.12	0.370	0.271	0.728	0.923	0.976
372.68	2.11	2.21	35067	0.11	0.423	0.311	0.688	0.906	0.979
186.34	2.09	3.67	49700	1.58	0.598	0.439	0.560	0.838	0.685
93.17	1.95	5.39	86267	3.44	0.875	0.642	0.358	0.667	0.317
46.59	1.94	6.31	196167	4.38	1.284	0.943	0.056	0.153	0.130
23.29	1.93	6.85	245200	4.92	1.397	1.025	-0.025	-0.077	0.022

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 3-methyl-3-penten-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000

MCV (µm³)： 40.73 Initial pH： 7.57 EDTA(%)： 0

T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR	IR	IR
				mg/L	µspecific	µrelative	(growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	2.02	7.34	184900	5.32	1.256	1.000	0.000	0.000	0.000
224.40	2.29	2.20	17400	-0.09	0.074	0.059	0.941	0.986	1.017
112.20	2.16	3.12	21700	0.96	0.185	0.147	0.853	0.961	0.820
56.10	2.06	4.92	101900	2.86	0.958	0.763	0.237	0.489	0.462
28.05	1.86	5.63	172300	3.77	1.221	0.972	0.028	0.074	0.291
14.03	1.94	6.12	184800	4.18	1.256	1.000	0.000	0.001	0.214
Control	1.99	6.17	164100	4.18	1.196	1.000	0.000	0.000	0.000
224.40	2.34	2.15	14600	-0.19	-0.014	-0.011	1.011	1.003	1.045
112.20	2.08	3.13	17900	1.05	0.088	0.074	0.926	0.981	0.749
56.10	2.09	4.90	95300	2.81	0.924	0.773	0.227	0.461	0.328
28.05	1.82	5.67	177000	3.85	1.234	1.032	-0.032	-0.087	0.079
14.03	1.98	6.52	193100	4.54	1.278	1.068	-0.068	-0.195	-0.086
Control	2.17	7.66	191400	5.49	1.273	1.000	0.000	0.000	0.000
224.40	2.52	2.38	14300	-0.14	-0.024	-0.019	1.019	1.004	1.026
112.20	2.29	3.25	14400	0.96	-0.020	-0.016	1.016	1.003	0.825
56.10	2.10	5.06	115800	2.96	1.022	0.803	0.197	0.429	0.461
28.05	2.02	5.89	173800	3.87	1.225	0.962	0.038	0.100	0.295
14.03	1.93	6.56	199000	4.63	1.293	1.015	-0.015	-0.043	0.157
Control	2.06	7.06	180133	5.00	1.242	1.000	0.000	0.000	0.000
224.40	2.38	2.24	15433	-0.14	0.012	0.010	0.989	0.997	1.028
112.20	2.18	3.17	18000	0.99	0.084	0.068	0.927	0.982	0.802
56.10	2.08	4.96	104333	2.88	0.968	0.779	0.220	0.459	0.424
28.05	1.90	5.73	174367	3.83	1.227	0.989	0.013	0.035	0.233
14.03	1.95	6.40	192300	4.45	1.275	1.028	-0.026	-0.074	0.109

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 4-hexene-3-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm³)： 43.71 Initial pH： 7.47 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	µspecific	µrelative (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	1.76	5.15	153900	3.39	1.164	1.000	0.000	0.000
12.31	1.78	2.18	18000	0.40	0.091	0.078	0.922	0.882
6.15	1.87	2.55	13900	0.68	-0.038	-0.033	1.033	1.008
3.08	1.74	3.44	69500	1.70	0.767	0.659	0.341	0.608
1.54	1.86	4.80	114200	2.94	1.015	0.872	0.128	0.286
0.77	1.65	4.55	146200	2.90	1.138	0.978	0.022	0.055
0.38	1.71	5.24	178600	3.53	1.239	1.064	-0.064	-0.178
0.19	1.56	5.04	180000	3.48	1.242	1.067	-0.067	-0.188
Control	1.57	4.76	144800	3.19	1.134	1.000	0.000	0.000
12.31	1.87	2.15	29400	0.28	0.336	0.297	0.703	0.889
6.15	1.80	2.58	30500	0.78	0.355	0.313	0.687	0.881
3.08	1.87	3.72	64000	1.85	0.725	0.640	0.360	0.622
1.54	1.73	4.67	115600	2.94	1.021	0.901	0.099	0.225
0.77	1.71	4.81	149800	3.10	1.151	1.015	-0.015	-0.039
0.38	1.67	4.90	164300	3.23	1.197	1.056	-0.056	-0.150
0.19	1.65	5.52	184100	3.87	1.254	1.106	-0.106	-0.303
Control	1.58	4.81	137000	3.23	1.106	1.000	0.000	0.000
12.31	2.34	2.67	16400	0.33	0.045	0.040	0.960	0.989
6.15	1.88	2.72	24500	0.84	0.245	0.222	0.778	0.922
3.08	1.66	3.39	75200	1.73	0.806	0.729	0.271	0.507
1.54	1.83	4.79	140300	2.96	1.118	1.011	-0.011	-0.027
0.77	1.66	4.57	159800	2.91	1.183	1.070	-0.070	-0.187
0.38	1.86	5.08	157700	3.22	1.176	1.064	-0.064	-0.170
0.19	1.72	5.23	183300	3.51	1.252	1.132	-0.132	-0.380
Control	1.64	4.91	145233	3.27	1.135	1.000	0.000	0.000
12.31	2.00	2.33	21267	0.34	0.157	0.138	0.846	0.952
6.15	1.85	2.62	22967	0.77	0.187	0.167	0.812	0.939
3.08	1.76	3.52	69567	1.76	0.766	0.676	0.324	0.581
1.54	1.81	4.75	123367	2.95	1.051	0.928	0.072	0.168
0.77	1.67	4.64	151933	2.97	1.157	1.021	-0.020	-0.051
0.38	1.75	5.07	166867	3.33	1.204	1.061	-0.061	-0.166
0.19	1.64	5.26	182467	3.62	1.249	1.102	-0.101	-0.286

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 4-methyl-3-pentene-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm3)： 42.03 Initial pH： 7.58 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	µspecific	µrelative	IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	1.65	4.43	151200	2.78	1.155	1.000	0.000	0.000	0.000
785.80	3.26	3.17	18600	-0.09	0.108	0.093	0.907	0.974	1.032
404.15	2.55	2.92	14200	0.37	-0.027	-0.024	1.024	1.006	0.867
202.07	2.14	3.57	51700	1.43	0.619	0.536	0.464	0.731	0.486
101.04	1.92	3.85	97500	1.93	0.936	0.810	0.190	0.394	0.306
50.52	1.71	4.25	176500	2.54	1.233	1.067	-0.067	-0.186	0.086
25.26	1.72	4.42	159900	2.70	1.183	1.024	-0.024	-0.064	0.029
12.63	1.54	4.38	159600	2.84	1.182	1.023	-0.023	-0.062	-0.022
Control	1.56	4.34	144600	2.78	1.133	1.000	0.000	0.000	0.000
785.80	3.34	3.32	15800	-0.02	0.026	0.023	0.977	0.994	1.007
404.15	2.57	3.04	25300	0.47	0.261	0.231	0.769	0.921	0.831
202.07	2.06	3.47	50800	1.41	0.610	0.538	0.462	0.724	0.493
101.04	1.94	3.99	114800	2.05	1.018	0.898	0.102	0.230	0.263
50.52	1.76	4.55	171200	2.79	1.217	1.075	-0.075	-0.205	-0.004
25.26	1.72	4.27	154500	2.55	1.166	1.029	-0.029	-0.076	0.083
12.63	1.55	4.43	154800	2.88	1.167	1.030	-0.030	-0.079	-0.036
Control	1.47	4.44	140000	2.97	1.117	1.000	0.000	0.000	0.000
785.80	3.69	3.53	9200	-0.16	-0.244	-0.219	1.219	1.046	1.054
404.15	2.57	3.00	19100	0.43	0.121	0.108	0.892	0.967	0.855
202.07	2.02	3.47	59100	1.45	0.686	0.614	0.386	0.647	0.512
101.04	1.91	3.94	111300	2.03	1.002	0.897	0.103	0.230	0.316
50.52	1.81	4.54	176400	2.73	1.232	1.103	-0.103	-0.291	0.081
25.26	1.69	4.49	144700	2.80	1.133	1.015	-0.015	-0.038	0.057
12.63	1.66	4.57	153300	2.91	1.162	1.041	-0.041	-0.106	0.020
Control	1.56	4.40	145267	2.84	1.135	1.000	0.000	0.000	0.000
785.80	3.43	3.34	14533	-0.09	-0.037	-0.034	1.014	1.004	1.032
404.15	2.56	2.99	19533	0.42	0.118	0.105	0.884	0.965	0.851
202.07	2.07	3.50	53867	1.43	0.638	0.563	0.437	0.702	0.497
101.04	1.92	3.93	107867	2.00	0.985	0.869	0.131	0.287	0.295
50.52	1.76	4.45	174700	2.69	1.227	1.082	-0.081	-0.226	0.055
25.26	1.71	4.39	153033	2.68	1.161	1.023	-0.023	-0.060	0.056
12.63	1.58	4.46	155900	2.88	1.171	1.031	-0.031	-0.082	-0.012

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 3-hepten-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm3)： 42.45 Initial pH： 7.45 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	µspecific	µrelative	IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	1.69	7.32	206900	5.63	1.312	1.000	0.000	0.000	0.000
15.66	2.01	2.58	13600	0.57	-0.049	-0.037	1.037	1.007	0.899
7.83	1.74	3.17	17900	1.43	0.088	0.067	0.933	0.985	0.746
3.92	1.77	4.29	39500	2.52	0.484	0.369	0.631	0.872	0.552
1.96	1.72	5.53	142800	3.81	1.127	0.859	0.141	0.334	0.323
0.98	2.14	7.31	202600	5.17	1.302	0.992	0.008	0.022	0.082
0.49	1.90	7.23	204400	5.33	1.306	0.995	0.005	0.013	0.053
0.24	1.78	7.26	210800	5.48	1.321	1.007	-0.007	-0.020	0.027
Control	1.67	7.38	213600	5.71	1.328	1.000	0.000	0.000	0.000
15.66	2.05	2.61	13100	0.56	-0.068	-0.051	1.051	1.010	0.902
7.83	1.70	3.07	18700	1.37	0.110	0.083	0.917	0.981	0.760
3.92	1.81	4.57	39400	2.76	0.483	0.364	0.636	0.877	0.517
1.96	1.82	6.98	189100	5.16	1.267	0.954	0.046	0.123	0.096
0.98	1.89	7.13	200700	5.24	1.297	0.977	0.023	0.065	0.082
0.49	1.83	6.87	202300	5.04	1.301	0.980	0.020	0.057	0.117
0.24	1.80	7.08	197300	5.28	1.288	0.970	0.030	0.082	0.075
Control	1.79	7.39	214800	5.60	1.331	1.000	0.000	0.000	0.000
15.66	2.41	2.64	13700	0.23	-0.045	-0.034	1.034	1.007	0.959
7.83	1.74	3.13	17600	1.39	0.080	0.060	0.940	0.987	0.752
3.92	1.73	4.55	37900	2.82	0.463	0.348	0.652	0.885	0.496
1.96	1.71	6.16	157200	4.45	1.175	0.883	0.117	0.288	0.205
0.98	1.84	7.15	200100	5.31	1.295	0.973	0.027	0.074	0.052
0.49	1.93	6.97	207400	5.04	1.313	0.987	0.013	0.037	0.100
0.24	1.80	7.15	210200	5.35	1.320	0.992	0.008	0.023	0.045
Control	1.72	7.36	211767	5.65	1.324	1.000	0.000	0.000	0.000
15.66	2.16	2.61	13467	0.45	-0.054	-0.041	1.041	1.008	0.920
7.83	1.73	3.12	18067	1.40	0.093	0.070	0.930	0.984	0.753
3.92	1.77	4.47	38933	2.70	0.477	0.360	0.640	0.878	0.522
1.96	1.75	6.22	163033	4.47	1.190	0.899	0.099	0.248	0.208
0.98	1.96	7.20	201133	5.24	1.298	0.981	0.019	0.054	0.072
0.49	1.89	7.02	204700	5.14	1.307	0.987	0.013	0.036	0.090
0.24	1.79	7.16	206100	5.37	1.310	0.990	0.010	0.029	0.049

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 5-methyl-5-hexen-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm3)： 44 Initial pH： 7.56 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR	IR	IR
				mg/L	µspecific	µrelative	(growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	2.10	4.82	176800	2.72	1.233	1.000	0.000	0.000	0.000
918.30	2.86	3.27	31600	0.41	0.373	0.302	0.698	0.897	0.849
459.15	2.25	3.24	34500	0.99	0.416	0.338	0.662	0.879	0.636
199.41	2.31	4.25	83800	1.94	0.860	0.697	0.303	0.575	0.287
99.71	2.06	4.50	160100	2.44	1.184	0.960	0.040	0.103	0.103
49.85	2.02	4.02	154300	2.00	1.165	0.945	0.055	0.139	0.265
24.93	2.09	4.80	177400	2.71	1.235	1.001	-0.001	-0.004	0.004
Control	2.10	4.79	181500	2.69	1.247	1.000	0.000	0.000	0.000
918.30	2.94	3.31	28600	0.37	0.323	0.259	0.741	0.918	0.862
459.15	2.32	3.14	34400	0.82	0.415	0.333	0.667	0.883	0.695
199.41	2.16	3.98	95400	1.82	0.925	0.742	0.258	0.517	0.323
99.71	2.07	3.98	136600	1.91	1.105	0.886	0.114	0.270	0.290
49.85	1.92	4.70	202300	2.78	1.301	1.044	-0.044	-0.125	-0.033
24.93	2.12	4.59	192100	2.47	1.275	1.023	-0.023	-0.064	0.082
Control	2.14	4.69	176100	2.55	1.232	1.000	0.000	0.000	0.000
918.30	3.06	3.29	39200	0.23	0.480	0.390	0.610	0.850	0.910
459.15	2.22	2.77	30200	0.55	0.350	0.284	0.716	0.906	0.784
199.41	2.20	3.76	90700	1.56	0.900	0.731	0.269	0.530	0.388
99.71	1.88	4.14	171700	2.26	1.219	0.990	0.010	0.027	0.114
49.85	1.9	4.39	183800	2.49	1.253	1.017	-0.017	-0.048	0.024
24.93	1.97	4.73	203000	2.76	1.303	1.058	-0.058	-0.167	-0.082
Control	2.11	4.77	178133	2.65	1.237	1.000	0.000	0.000	0.000
918.30	2.95	3.29	33133	0.34	0.392	0.317	0.680	0.889	0.873
459.15	2.26	3.05	33033	0.79	0.394	0.318	0.681	0.889	0.704
199.41	2.22	4.00	89967	1.77	0.895	0.723	0.276	0.540	0.332
99.71	2.00	4.21	156133	2.20	1.169	0.945	0.053	0.135	0.170
49.85	1.95	4.37	180133	2.42	1.240	1.002	-0.005	-0.012	0.087
24.93	2.06	4.71	190833	2.65	1.271	1.027	-0.028	-0.078	0.003

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 3-octene-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm3)： 43.36 Initial pH： 7.58 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR		
				mg/L	µspecific	µrelative	(growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.77	4.78	154300	3.01	1.165	1.000	0.000	0.000	0.000
10.87	1.97	2.92	24900	0.95	0.253	0.217	0.783	0.929	0.684
5.43	1.7	3.1	37200	1.4	0.454	0.390	0.610	0.841	0.535
2.72	1.57	3.54	72000	1.97	0.784	0.673	0.327	0.591	0.346
1.36	1.58	3.78	88800	2.2	0.889	0.763	0.237	0.470	0.269
0.68	1.74	4.95	162800	3.21	1.192	1.023	-0.023	-0.061	-0.066
0.34	1.81	5.79	188600	3.98	1.266	1.086	-0.086	-0.246	-0.322
0.17	1.66	4.71	157100	3.05	1.174	1.008	-0.008	-0.020	-0.013
Control	1.7	4.89	171300	3.19	1.218	1.000	0.000	0.000	0.000
10.87	2.15	2.92	27000	0.77	0.294	0.241	0.759	0.923	0.759
5.43	1.78	3.08	39200	1.3	0.480	0.394	0.606	0.845	0.592
2.72	1.59	3.27	68700	1.68	0.761	0.625	0.375	0.656	0.473
1.36	1.77	4.95	121400	3.18	1.046	0.859	0.141	0.319	0.003
0.68	1.66	4.83	196800	3.17	1.287	1.057	-0.057	-0.163	0.006
0.34	1.69	5.39	181800	3.7	1.247	1.024	-0.024	-0.067	-0.160
0.17	1.77	5.15	170800	3.38	1.216	0.999	0.001	0.003	-0.060
Control	1.75	5.37	169700	3.62	1.213	1.000	0.000	0.000	0.000
10.87	2.09	2.77	24700	0.68	0.249	0.206	0.794	0.937	0.812
5.43	1.94	3.3	37600	1.36	0.459	0.379	0.621	0.854	0.624
2.72	1.64	3.91	71500	2.27	0.781	0.644	0.356	0.635	0.373
1.36	1.46	4.17	104400	2.71	0.970	0.800	0.200	0.422	0.251
0.68	1.67	4.17	119400	2.5	1.037	0.855	0.145	0.325	0.309
0.34	1.75	5.16	173800	3.41	1.225	1.010	-0.010	-0.027	0.058
0.17	1.75	5.48	188100	3.73	1.264	1.042	-0.042	-0.119	-0.030
Control	1.74	5.01	165100	3.27	1.199	1.000	0.000	0.000	0.000
10.87	2.07	2.87	25533	0.80	0.266	0.221	0.778	0.930	0.756
5.43	1.81	3.16	38000	1.35	0.465	0.388	0.612	0.847	0.587
2.72	1.60	3.57	70733	1.97	0.775	0.647	0.353	0.629	0.397
1.36	1.60	4.30	104867	2.70	0.968	0.807	0.189	0.401	0.176
0.68	1.69	4.65	159667	2.96	1.172	0.978	0.014	0.036	0.096
0.34	1.75	5.45	181400	3.70	1.246	1.040	-0.039	-0.109	-0.129
0.17	1.73	5.11	172000	3.39	1.218	1.016	-0.017	-0.046	-0.035

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物： 6-methyl-5-hepten-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm3)： 41.85 Initial pH： 7.58 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

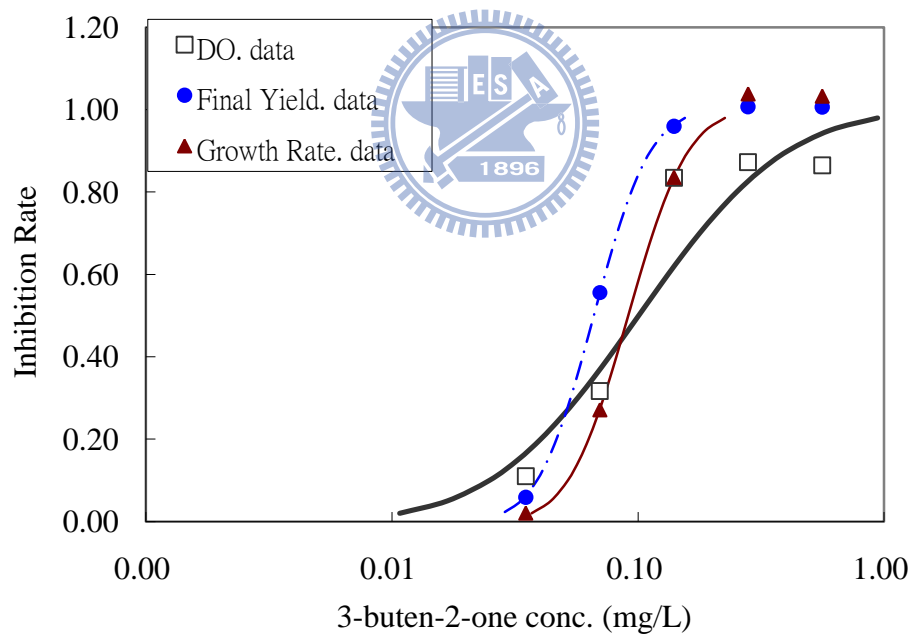
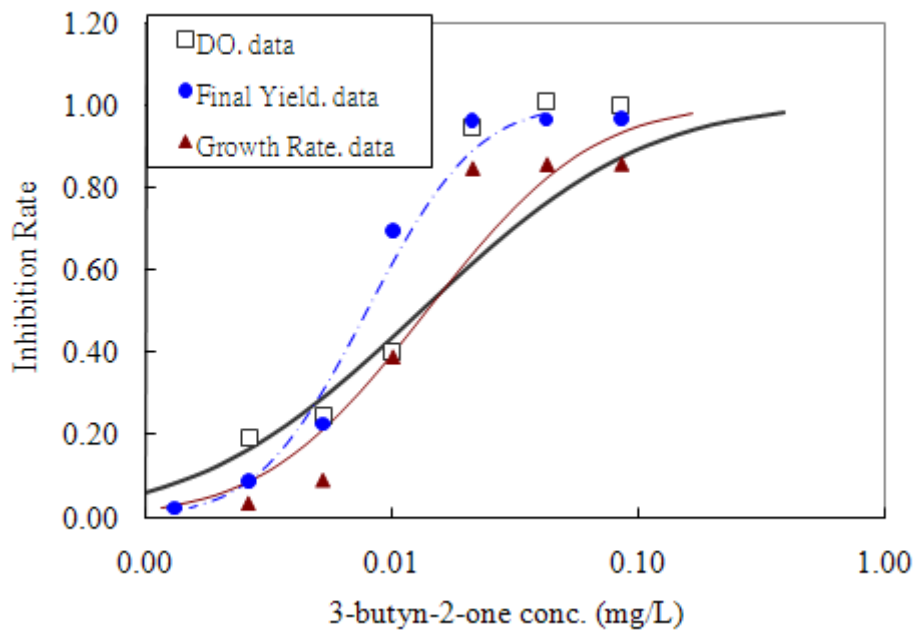
Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR	IR	IR
				mg/L	µspecific	µrelative	(growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.85	6.26	204100	4.41	1.305	1.000	0.000	0.000	0.000
715.00	3.17	4.41	35000	1.24	0.424	0.325	0.675	0.894	0.719
352.00	2.40	2.68	26500	0.28	0.285	0.218	0.782	0.939	0.937
176.00	1.99	2.62	25500	0.63	0.265	0.203	0.797	0.944	0.857
88.00	1.99	3.21	91100	1.22	0.902	0.691	0.309	0.598	0.723
44.00	1.85	5.71	195200	3.86	1.283	0.983	0.017	0.047	0.125
22.00	1.86	6.14	212600	4.28	1.326	1.016	-0.016	-0.045	0.029
11.00	1.79	6.03	214800	4.24	1.331	1.020	-0.020	-0.057	0.039
Control	1.84	6.36	214000	4.52	1.329	1.000	0.000	0.000	0.000
715.00	3.27	3.76	23700	0.49	0.229	0.172	0.828	0.956	0.892
352.00	2.49	3.39	26600	0.90	0.286	0.216	0.784	0.942	0.801
176.00	2.03	2.60	25700	0.57	0.269	0.203	0.797	0.946	0.874
88.00	1.92	3.03	100300	1.11	0.950	0.715	0.285	0.571	0.754
44.00	1.91	6.31	223200	4.40	1.350	1.016	-0.016	-0.046	0.027
22.00	1.88	6.38	211000	4.50	1.322	0.995	0.005	0.015	0.004
11.00	1.87	7.35	224900	5.48	1.354	1.019	-0.019	-0.055	-0.212
Control	1.84	6.95	224400	5.11	1.353	1.000	0.000	0.000	0.000
715.00	3.39	3.48	23000	0.09	0.214	0.158	0.842	0.962	0.982
352.00	2.44	3.16	25800	0.72	0.271	0.200	0.800	0.948	0.859
176.00	2.01	2.58	26700	0.57	0.288	0.213	0.787	0.944	0.888
88.00	1.74	2.96	96300	1.22	0.930	0.687	0.313	0.612	0.761
44.00	1.91	6.00	207700	4.09	1.314	0.971	0.029	0.080	0.200
22.00	1.84	5.66	207800	3.82	1.314	0.972	0.028	0.079	0.252
11.00	1.88	6.08	211800	4.20	1.324	0.979	0.021	0.060	0.178
Control	1.84	6.52	214167	4.68	1.329	1.000	0.000	0.000	0.000
715.00	3.28	3.88	27233	0.61	0.289	0.218	0.776	0.939	0.870
352.00	2.44	3.08	26300	0.63	0.281	0.211	0.789	0.943	0.865
176.00	2.01	2.60	25967	0.59	0.274	0.206	0.794	0.945	0.874
88.00	1.88	3.07	95900	1.18	0.927	0.698	0.302	0.594	0.747
44.00	1.89	6.01	208700	4.12	1.316	0.990	0.010	0.027	0.120
22.00	1.86	6.06	210467	4.20	1.321	0.994	0.007	0.019	0.103
11.00	1.85	6.49	217167	4.64	1.336	1.006	-0.005	-0.015	0.009

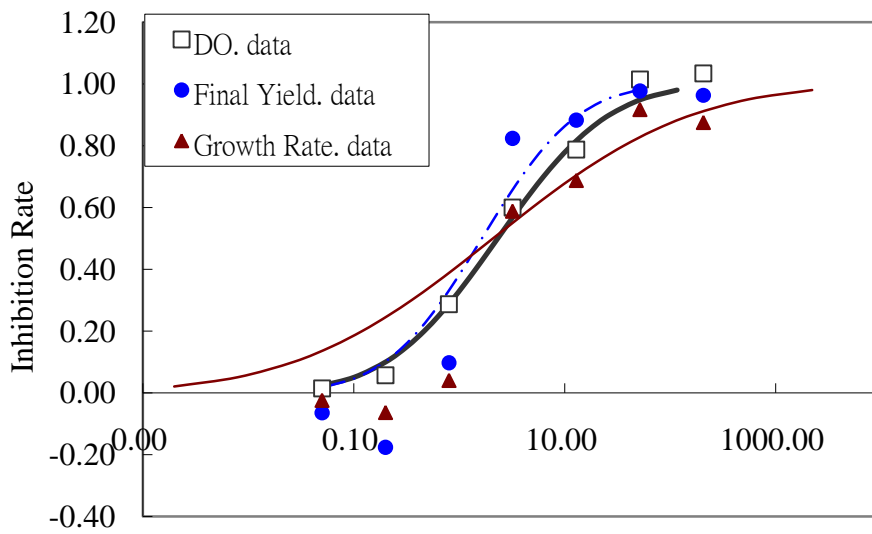
IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

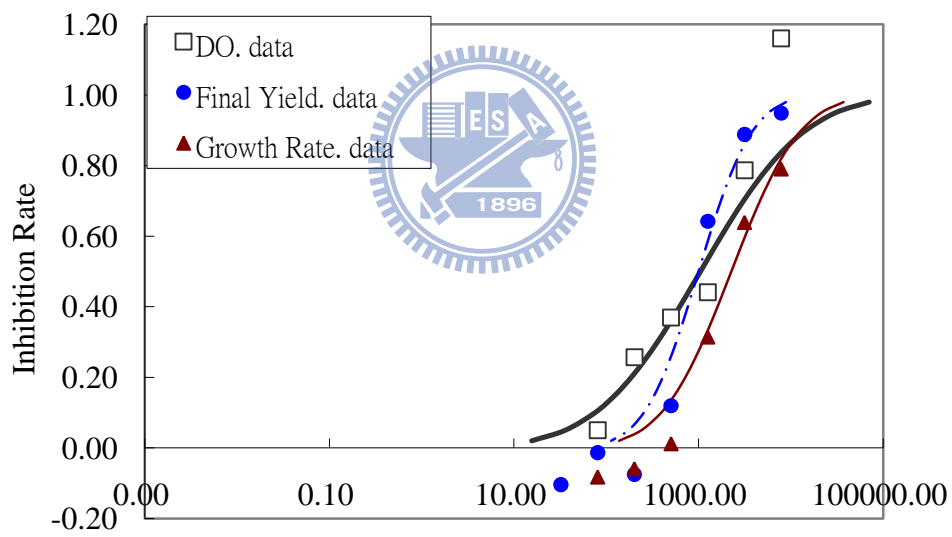
實驗毒物： 3-nonene-2-one 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (µm3)： 43.64 Initial pH： 7.44 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR	IR	IR
				mg/L	µspecific	µrelative	(growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.84	5.06	153800	3.22	1.164	1.000	0.000	0.000	0.000
67.14	2.97	3.29	31900	0.32	0.377	0.324	0.676	0.878	0.901
31.39	2.37	2.73	32100	0.36	0.380	0.327	0.673	0.877	0.888
15.64	2.08	3.28	35700	1.20	0.434	0.373	0.627	0.851	0.627
7.82	1.96	4.18	70800	2.22	0.776	0.667	0.333	0.598	0.311
3.91	1.83	5.23	124100	3.40	1.057	0.908	0.092	0.214	-0.056
1.96	1.73	4.81	147400	3.08	1.143	0.982	0.018	0.046	0.043
0.98	1.74	5.53	170500	3.79	1.215	1.044	-0.044	-0.120	-0.177
Control	1.78	5.96	191500	4.18	1.273	1.000	0.000	0.000	0.000
67.14	2.98	3.59	27500	0.61	0.303	0.238	0.762	0.929	0.854
31.39	2.23	2.62	33400	0.39	0.400	0.314	0.686	0.896	0.907
15.64	2.10	3.17	29700	1.07	0.342	0.268	0.732	0.917	0.744
7.82	1.95	4.60	78400	2.65	0.827	0.649	0.351	0.641	0.366
3.91	1.82	4.70	112500	2.88	1.007	0.791	0.209	0.448	0.311
1.96	1.80	5.22	158100	3.42	1.178	0.925	0.075	0.189	0.182
0.98	1.82	5.17	166300	3.35	1.203	0.945	0.055	0.143	0.199
Control	1.95	6.57	196900	4.62	1.287	1.000	0.000	0.000	0.000
67.14	3.13	3.45	27700	0.32	0.307	0.238	0.762	0.930	0.931
31.39	2.31	2.58	30400	0.27	0.353	0.274	0.726	0.915	0.942
15.64	1.99	4.29	71700	2.30	0.782	0.608	0.392	0.688	0.502
7.82	1.83	4.13	79000	2.30	0.831	0.645	0.355	0.648	0.502
3.91	1.82	5.06	127200	3.24	1.069	0.830	0.170	0.383	0.299
1.96	1.82	5.80	175800	3.98	1.231	0.956	0.044	0.116	0.139
0.98	1.86	5.37	171900	3.51	1.219	0.947	0.053	0.137	0.240
Control	1.86	5.86	180733	4.01	1.242	1.000	0.000	0.000	0.000
67.14	3.03	3.44	29033	0.42	0.329	0.267	0.735	0.915	0.896
31.39	2.30	2.64	31967	0.34	0.378	0.305	0.696	0.898	0.915
15.64	2.06	3.58	45700	1.52	0.519	0.416	0.552	0.815	0.620
7.82	1.91	4.30	76067	2.39	0.811	0.654	0.348	0.632	0.403
3.91	1.82	5.00	121267	3.17	1.044	0.843	0.160	0.359	0.208
1.96	1.78	5.28	160433	3.49	1.184	0.954	0.048	0.122	0.128
0.98	1.81	5.36	169567	3.55	1.213	0.979	0.026	0.067	0.114

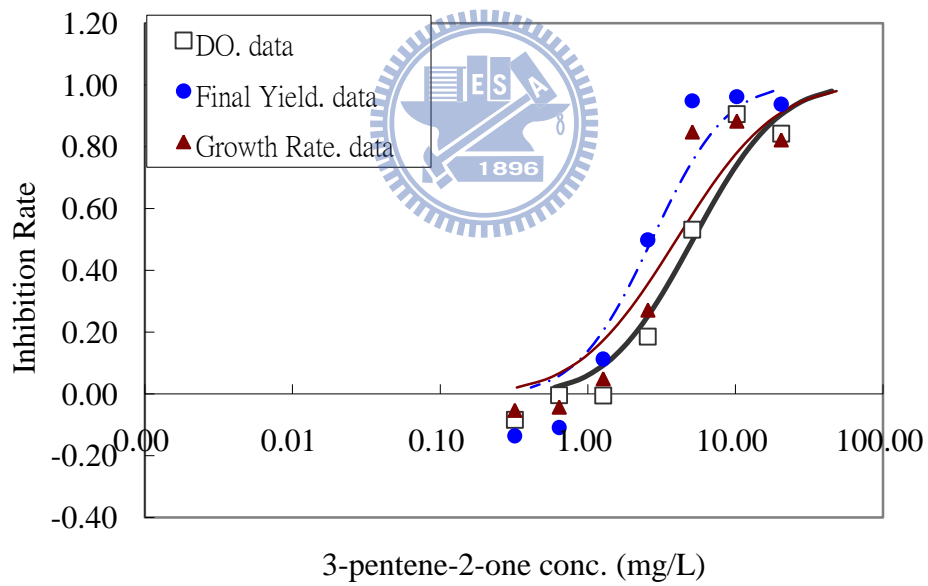
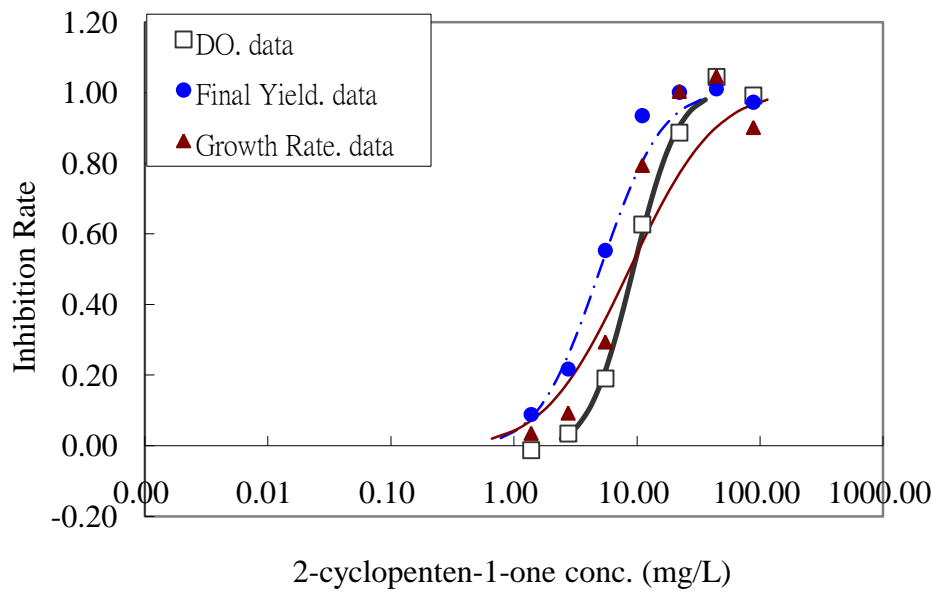


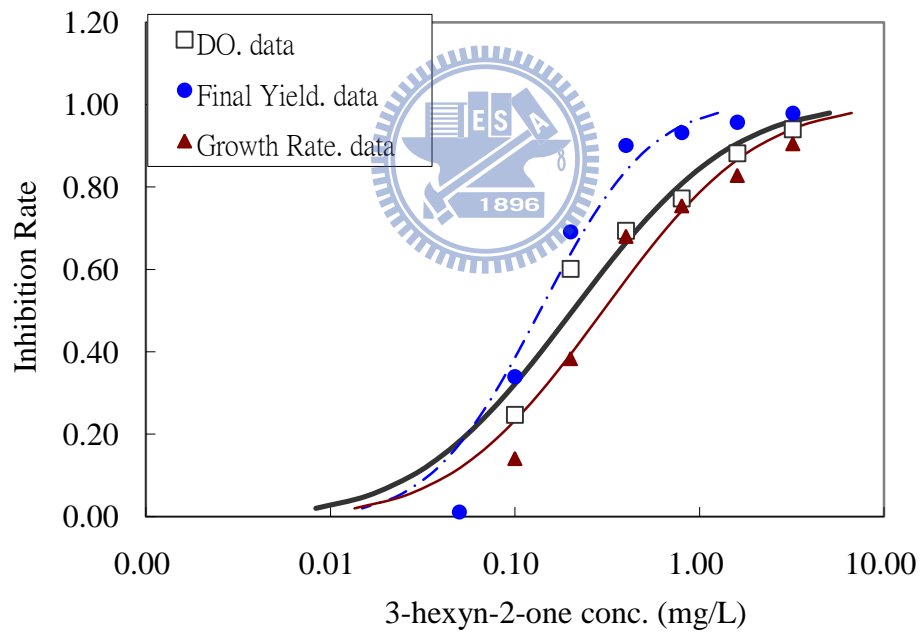
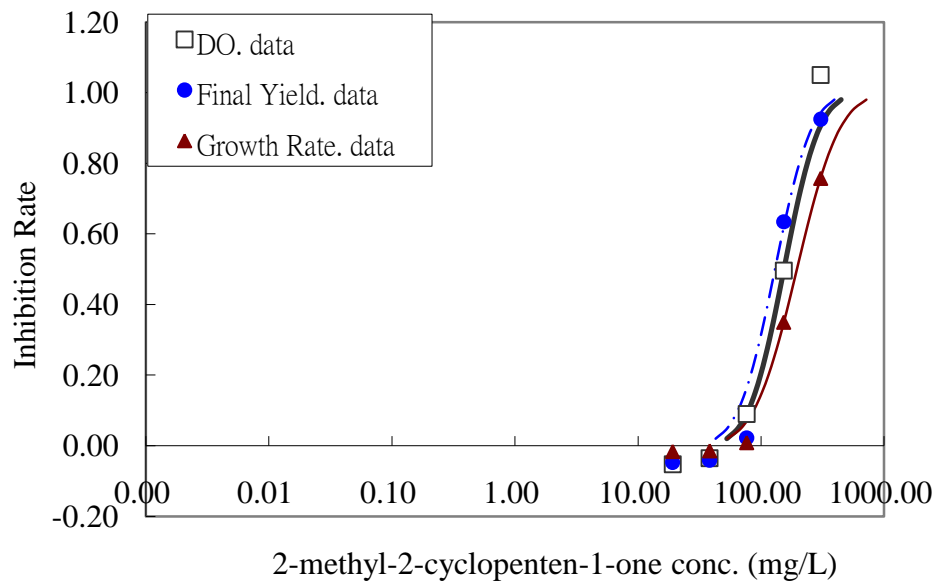


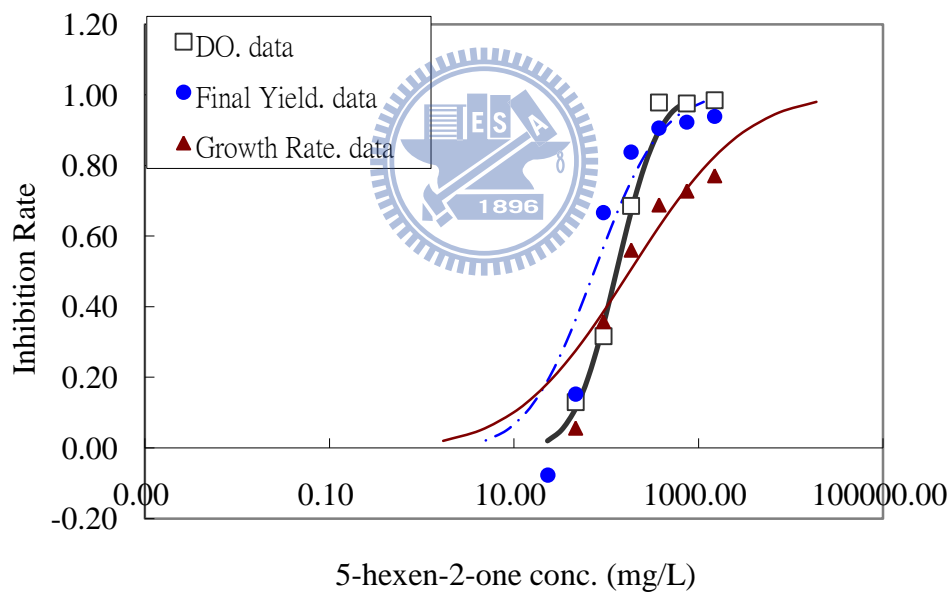
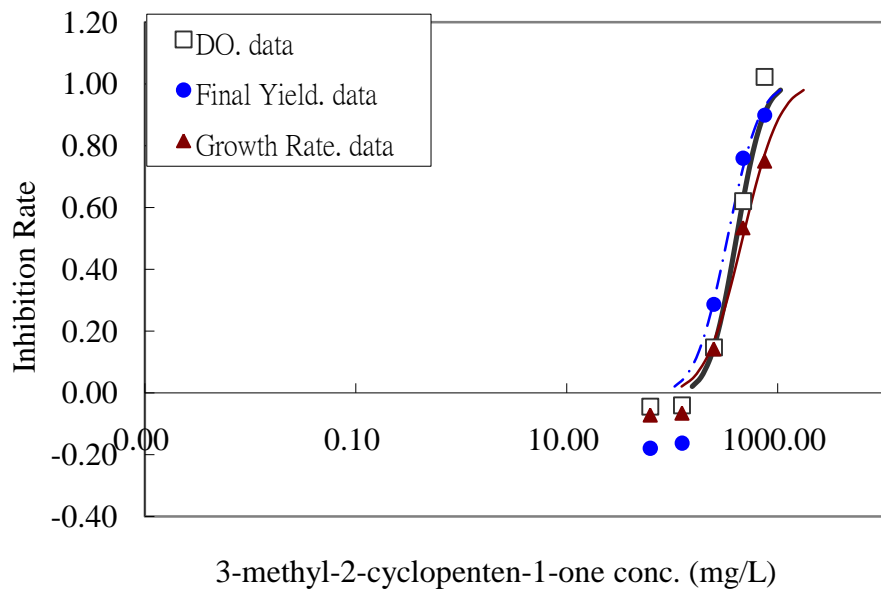
3-chloro-2-butanone conc. (mg/L)

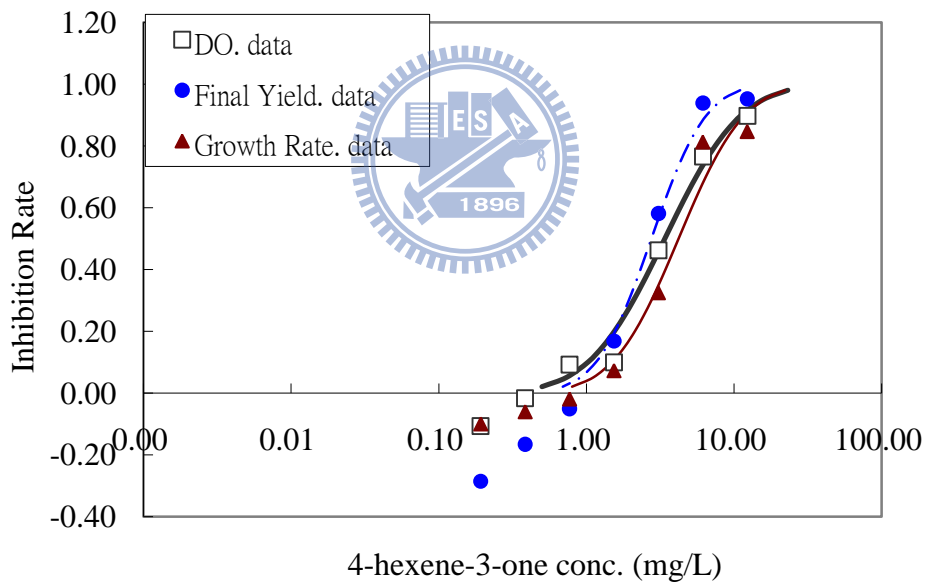
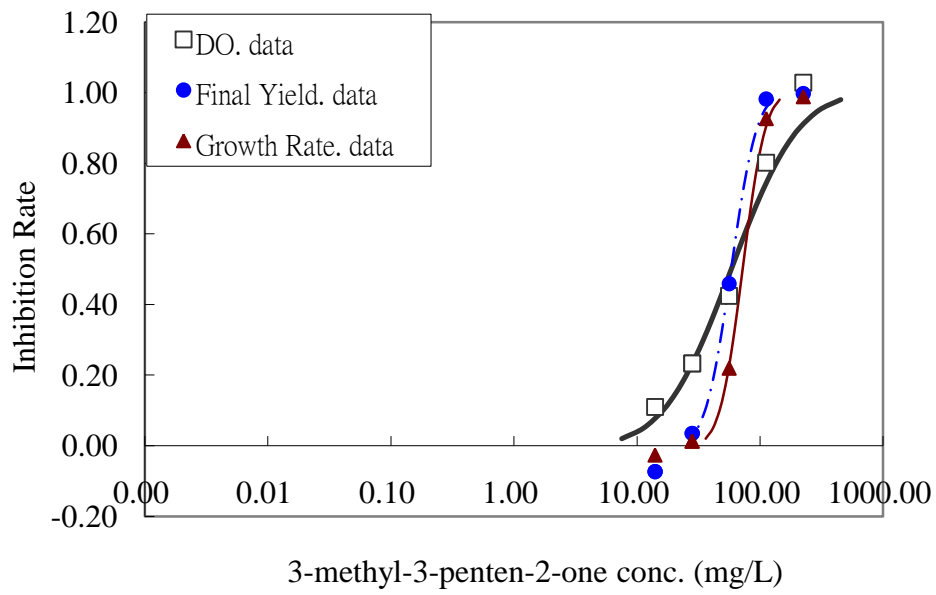


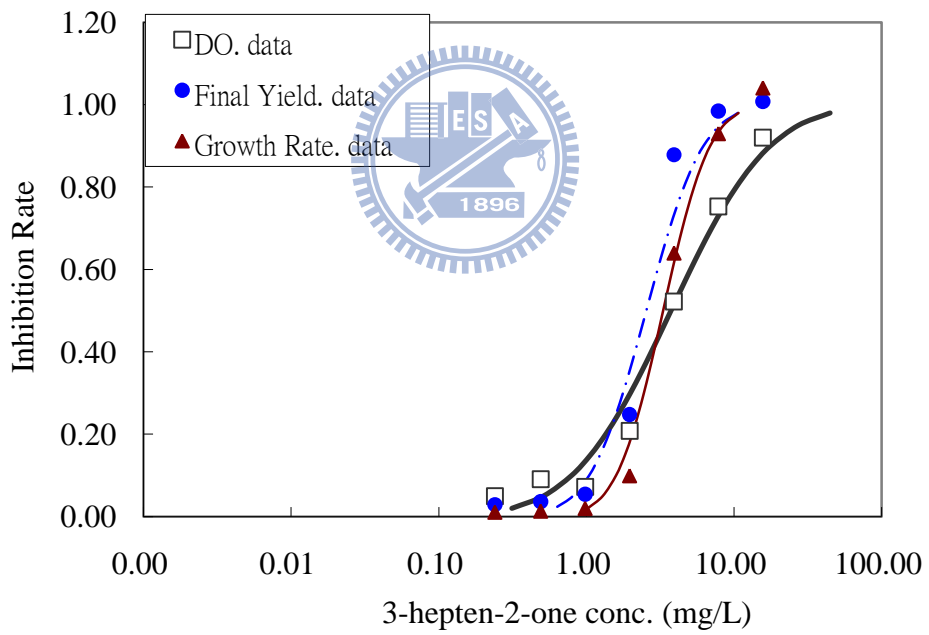
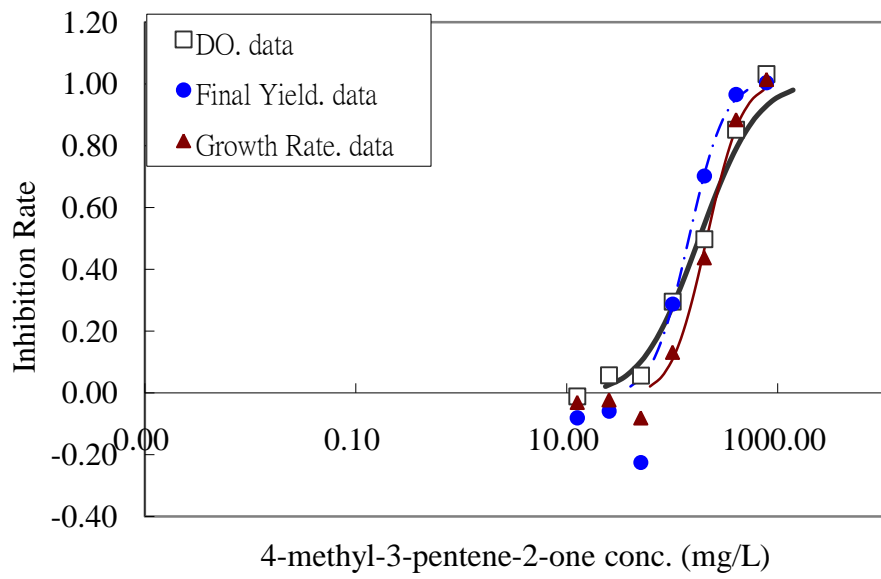
methyl ethyl ketone conc. (mg/L)

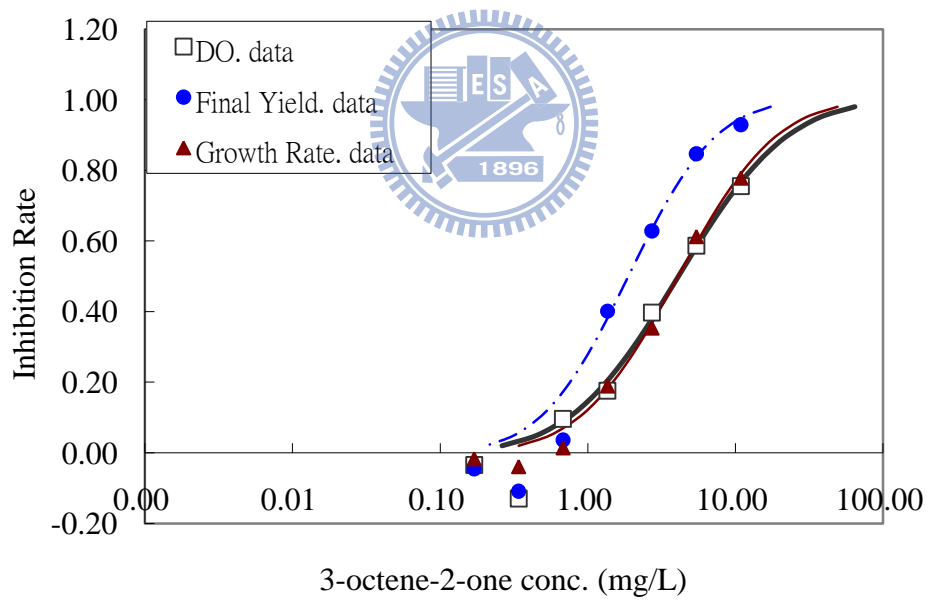
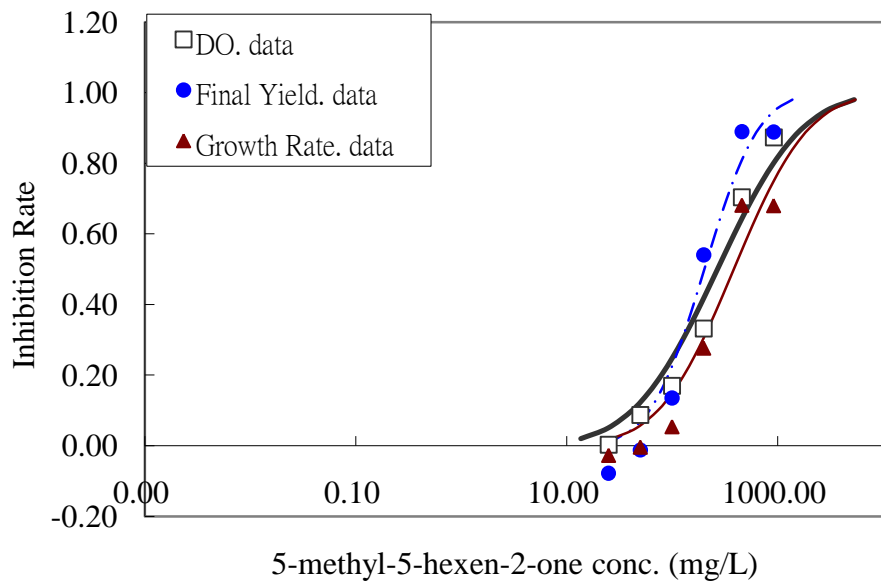


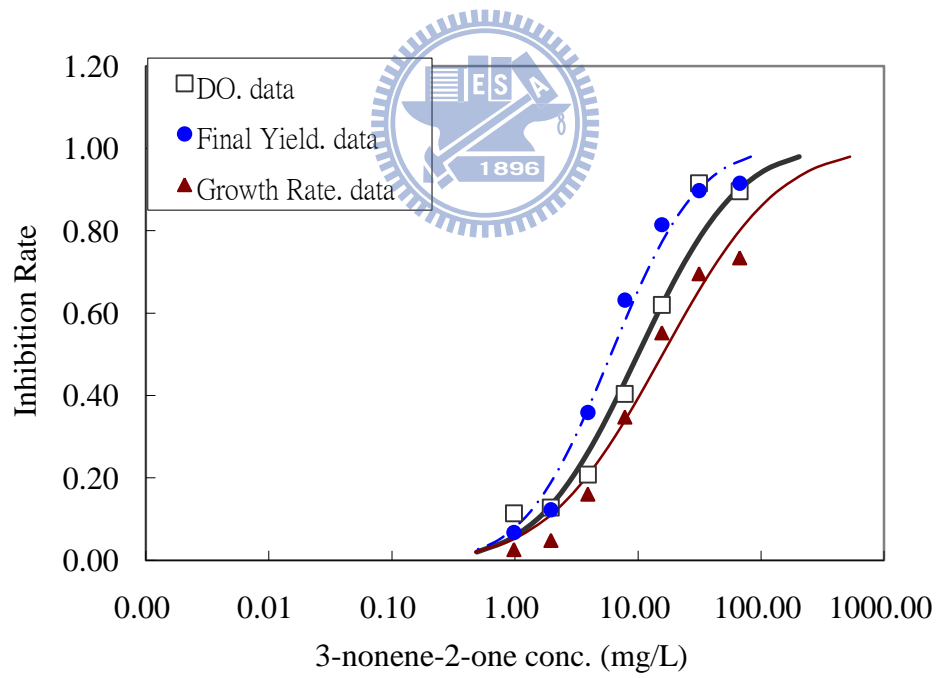
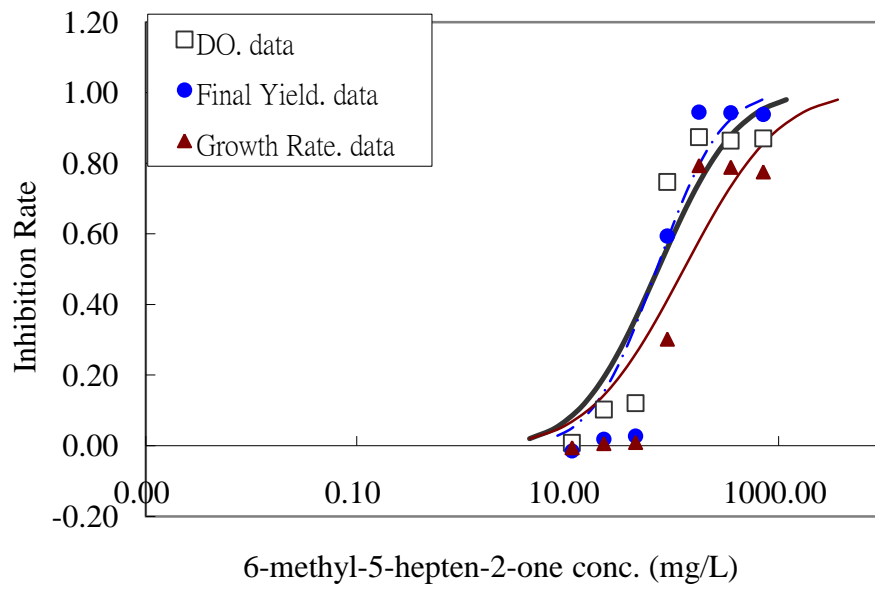












附錄二、統計方法



(一)一般迴歸分析法

- 1.先安裝好 Minitab 15 統計軟體
- 2.打開軟體，新建立一個檔案
- 3.將所有參數值鍵入，以及試驗毒化物名稱

輸入參數值名稱

輸入參數值

	C1-T	C2-T	C3	C4	C5	C6	C7	C8
	chemical	CAS No.	log(EC50) ⁻¹ (bio)	log(EC50) ⁻¹ (To)	log(EC50) ⁻¹ (Gro)	HEAT OF FORMATION(kJ)	TOTAL ENERGY	ELECTRONIC ENER
1	3-hexyn-2-one	1679-36-3	2.88014	2.06899	2.50074	102.000	-1130.22	-12
2	3-buten-2-one	1423-60-5	3.92993	3.71908	3.68689	*	*	-14
3	3-methyl-3-penten-2-one	565-62-8	0.22726	0.22507	0.13384	-147.401	-1226.13	-15
4	5-hexen-2-one	109-49-9	0.12229	-0.12012	-0.26393	-165.873	-1226.32	-14
5	3-hepten-2-one	1119-44-4	1.64351	1.47747	1.52992	-192.423	-1382.13	-16
6	4-methyl-3-penten-2-one	141-79-7	-0.16658	-0.26506	-0.33749	226.371	-1222.25	-15
7	4-hexen-3-one	2497-21-4	1.55122	1.46075	1.36781	-170.489	-1226.36	-14
8	3-nonene-2-one	14309-57-0	3.6581	3.705	0.94605	-248.552	-1699.79	-21
9	3-penten-2-one	625-33-2	3.02611	2.84133	2.88661	-97.193	-914.53	-10
10	3-buten-2-one	78-94-4	-0.25573	-0.37984	-0.53549	-187.180	-1382.08	-17
11	5-methyl-5-hexene-2-one	3240-09-3	1.82642	1.48654	1.48900	-221.505	-1537.97	-19
12	3-octene-2-one	1669-44-9	1.21408	0.94348	0.97387	-73.702	-1042.51	-12
13	2-cyclopenten-1-one	990-30-3	0.25730	0.24466	-0.00021	-215.986	-1537.91	-20
14	2-methyl-2-cyclopenten-1-one	1120-73-6	-0.13042	-0.20387	-0.30940	-76.412	-1198.08	-14
15	3-methyl-2-cyclopenten-1-one	2758-18-1	-0.54162	-0.62666	-0.68577	-109.961	-1198.43	-14
16	Methyl ethyl ketone*	78-93-3	*	*	*	-242.296	-943.34	-10

4.一般迴歸分析，選擇 Stat→Regression

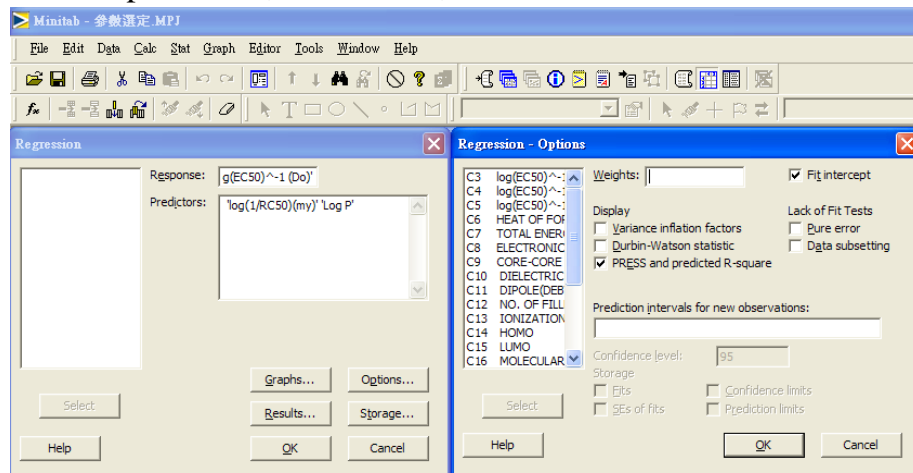
5.挑選應變數與參數

應變數

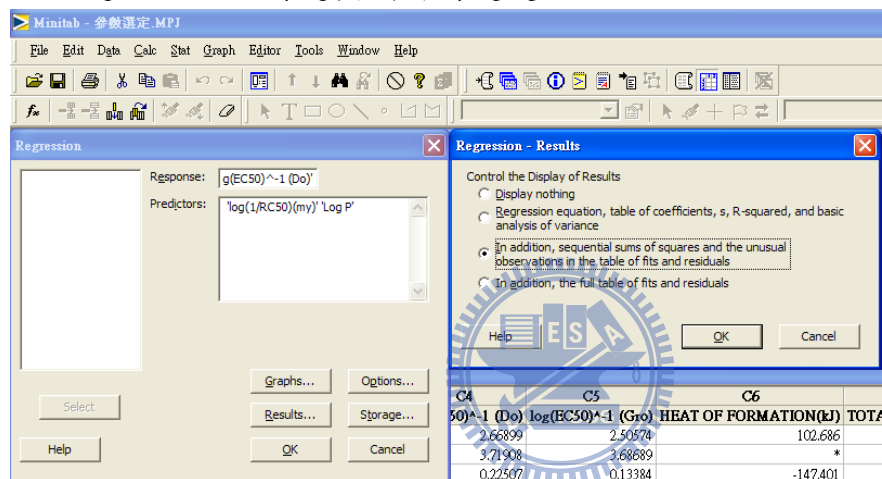
參數

所有參數列表

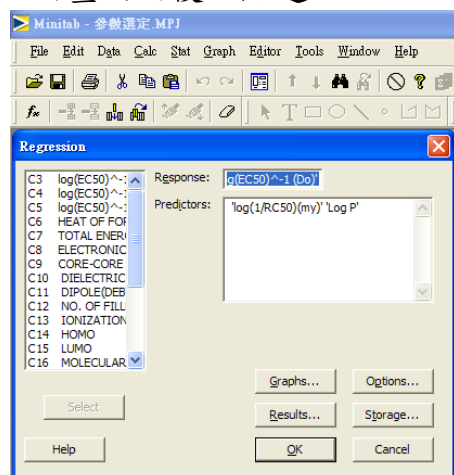
6. 點選 options → 勾選其圖片勾選處 → 點選 OK



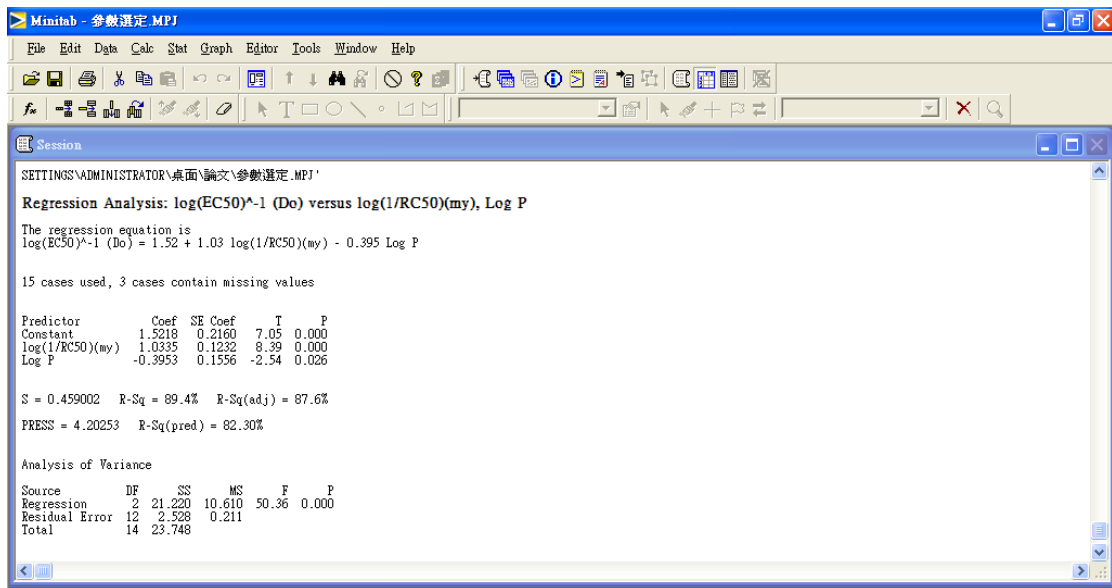
7. 點選 Results → 勾選其圖片勾選處 → 點選 OK



8. 回畫面之後 → 點選 OK

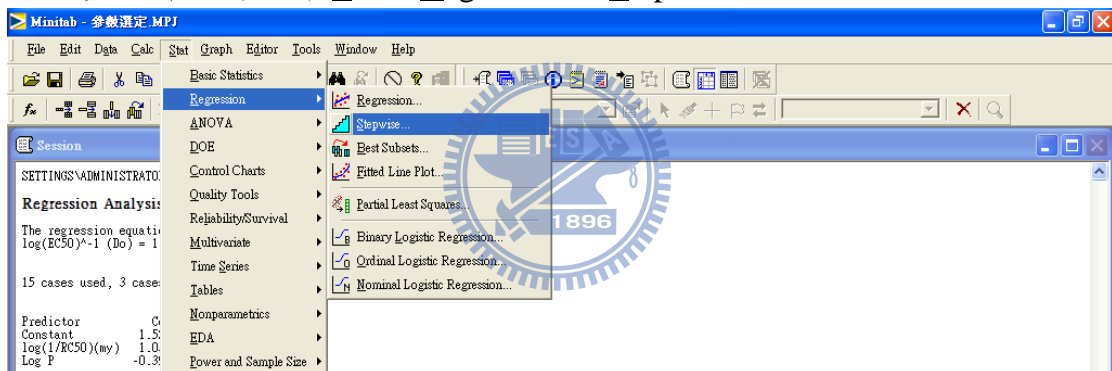


9. 結果如下

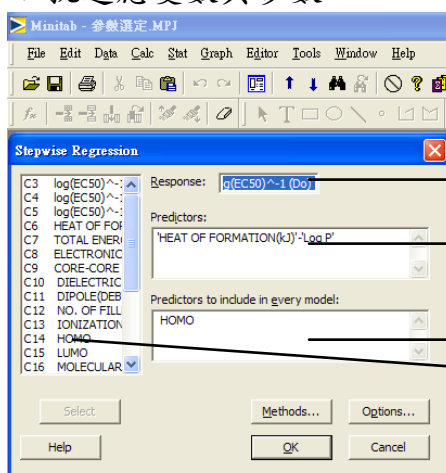


(二) 逐步迴歸分析法適用挑選參數

1. 逐步迴歸分析選擇 Stat → Regression → Stepwise



2. 挑選應變數與參數



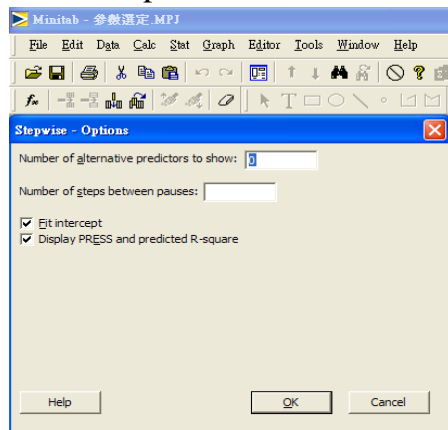
應變數(毒性數據)

選擇參數選列

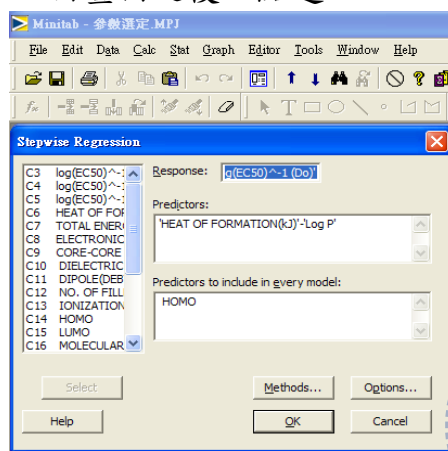
逐一選擇參數選列

所有參數列表

3. 點選 options → 勾選其圖片勾選處 → 點選 OK



4. 回畫面之後 → 點選 OK



5. 結果如下

Stepwise Regression: log(EC50)⁻¹ versus HEAT OF FORM, TOTAL ENERGY, ...
 Alpha-to-Enter: 0.15 Alpha-to-Remove: 0.15

Response is log(EC50)⁻¹ (Do) on 19 predictors, with N = 14
 N(cases with missing observations) = 4 N(all cases) = 18

Step	1	2	3	4
Constant	-34.68	-17.65	-16.57	-13.64
HOMO	-3.46	-1.81	-1.79	-1.53
T-Value	-8.95	-3.27	-3.67	-3.23
P-Value	0.000	0.007	0.004	0.010
log(1/RC50)(my)		0.56	0.66	0.77
T-Value		3.47	4.40	5.01
P-Value		0.005	0.001	0.001
Q3- α			2.6	3.2
T-Value			2.05	2.64
P-Value			0.067	0.027
HEAT OF FORMATION(kJ)				0.00098
T-Value				1.64
P-Value				0.135
S	0.417	0.301	0.265	0.245
R-Sq	86.98	93.78	95.62	96.63
R-Sq(adj)	85.89	92.65	94.31	95.13
PRESS	2.70082	1.66504	1.56798	2.40668
R-Sq(pred)	83.17	89.63	90.23	85.01

選出之合適參數

預測能力相關係數

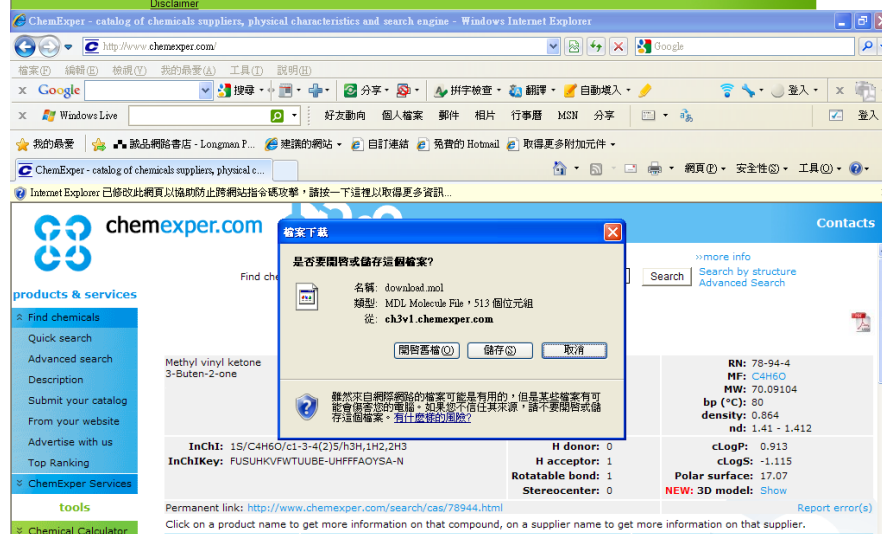
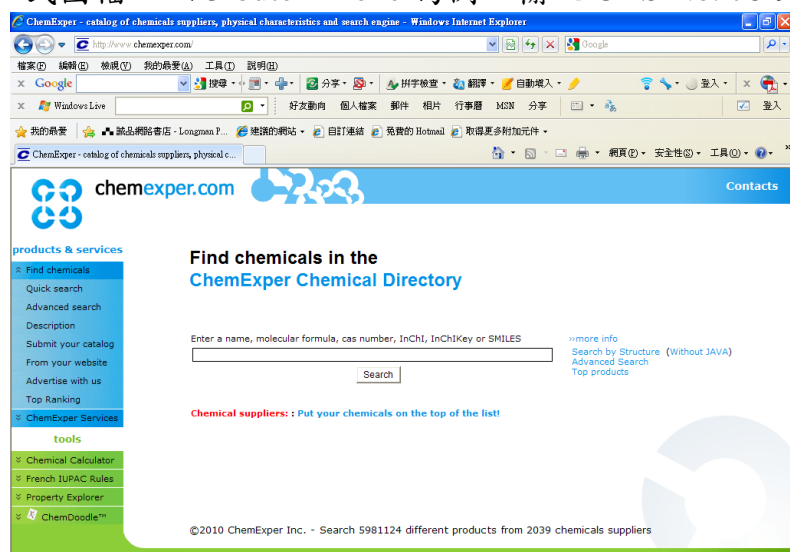
對應值

6. 將逐步迴歸分析法所挑出之合適參數 → 跑一般迴歸分析即可。

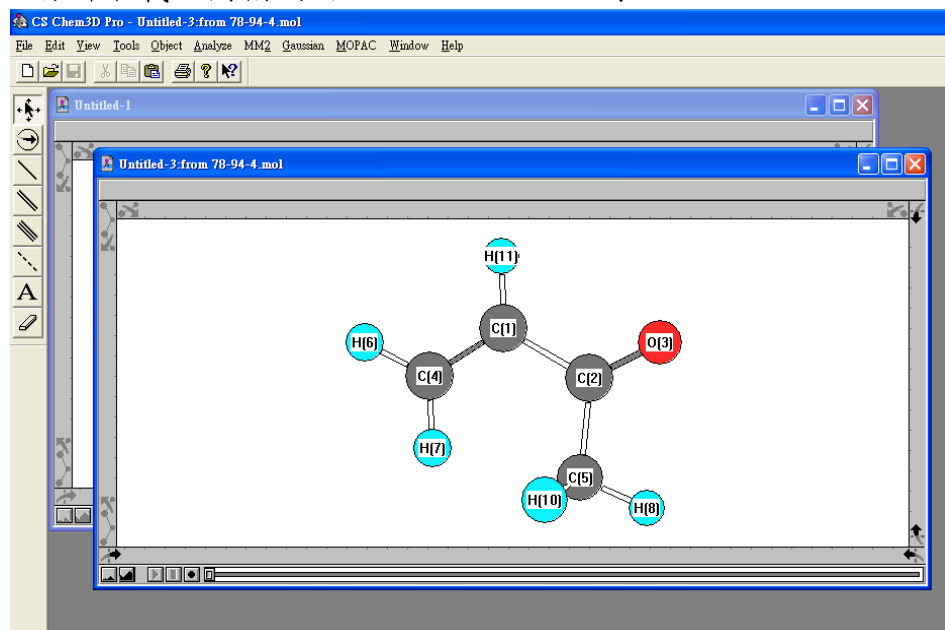
附錄三、參數計算軟體使用方法



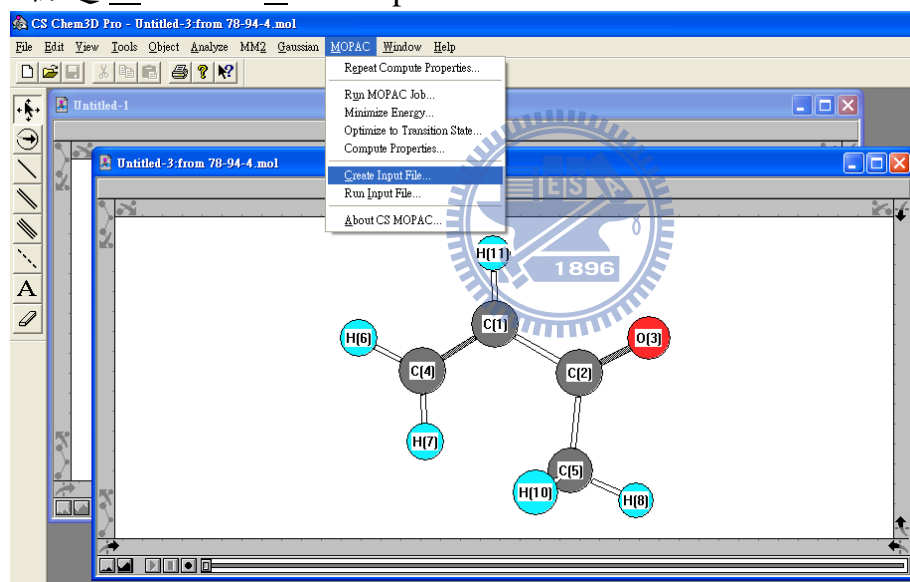
1. 先安裝好 CS Chem3D Pro 計算軟體
2. 開啟檔案並建立一新檔
3. 選擇欲分析之毒化物，至網站 <http://www.chemexper.com/> 下載其分析結構式圖檔。以 3-buten-2-one 為例，輸入 CAS No. 78-94-4



4.將所下載之圖檔利用 CS Chem3D Pro 開啟



5.點選 MOPAC→Create Input File



6.設定依照下面圖示設定

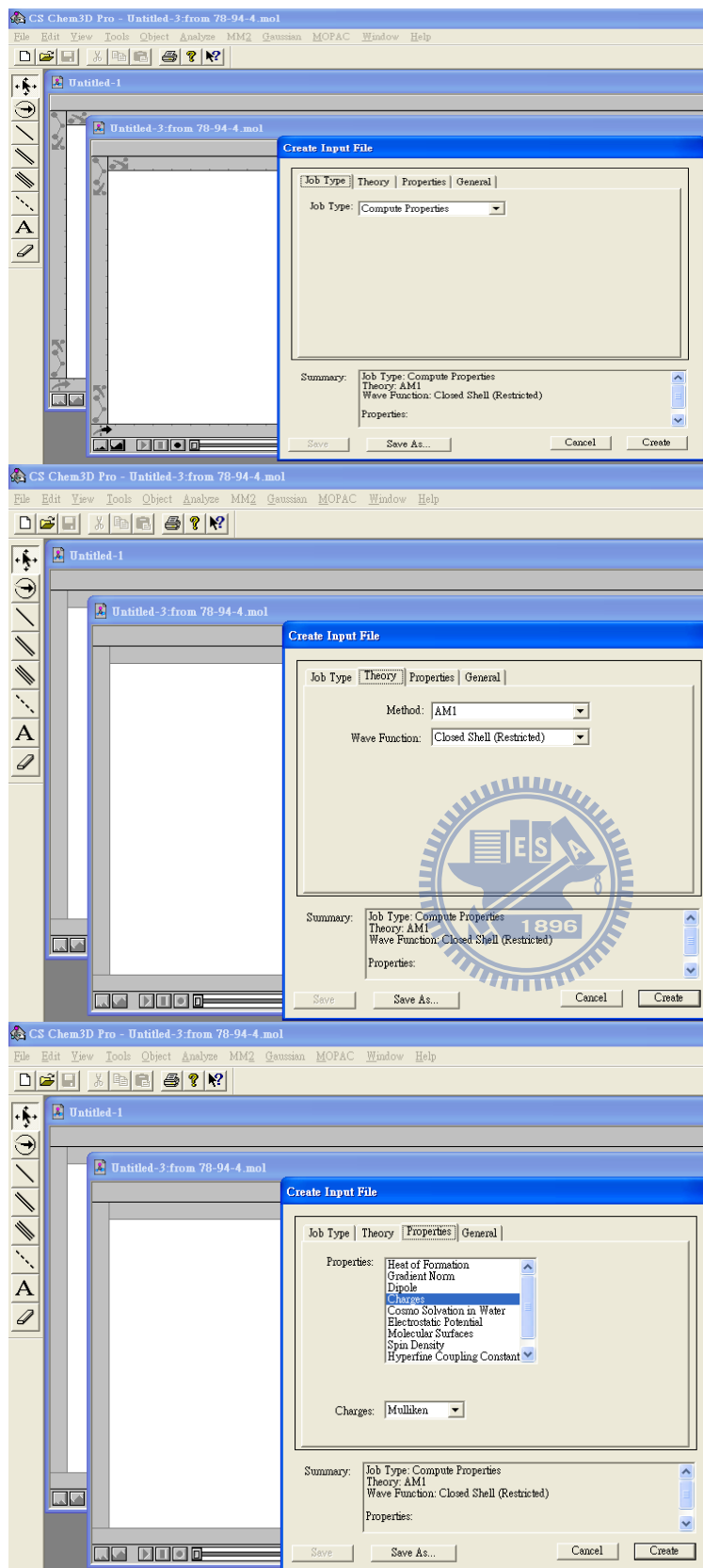
Job Type: Compute Properties

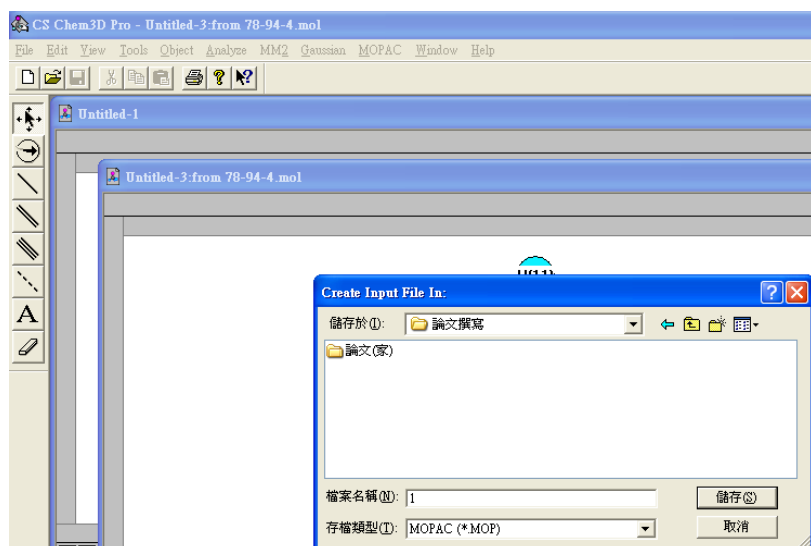
Theory: AM1

Wave Function: Closed Shell (Restricted)

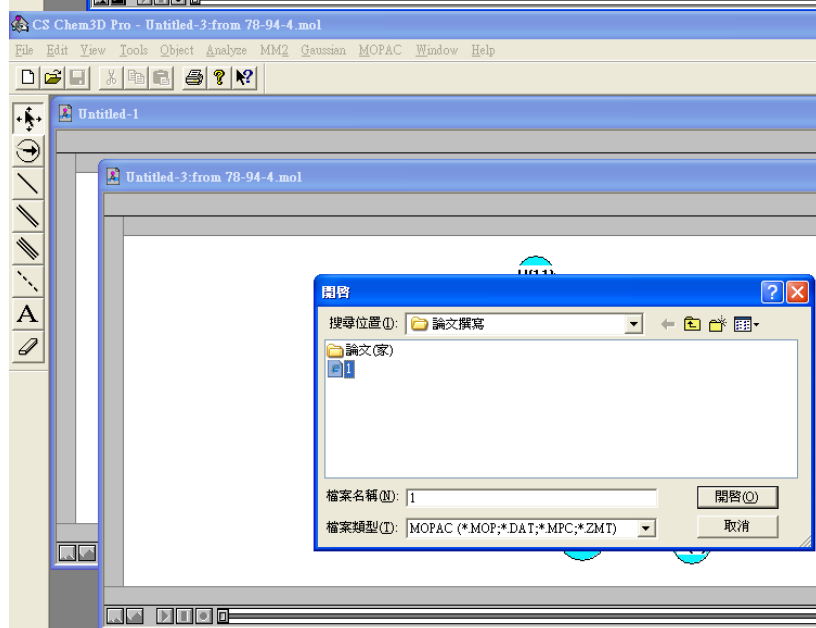
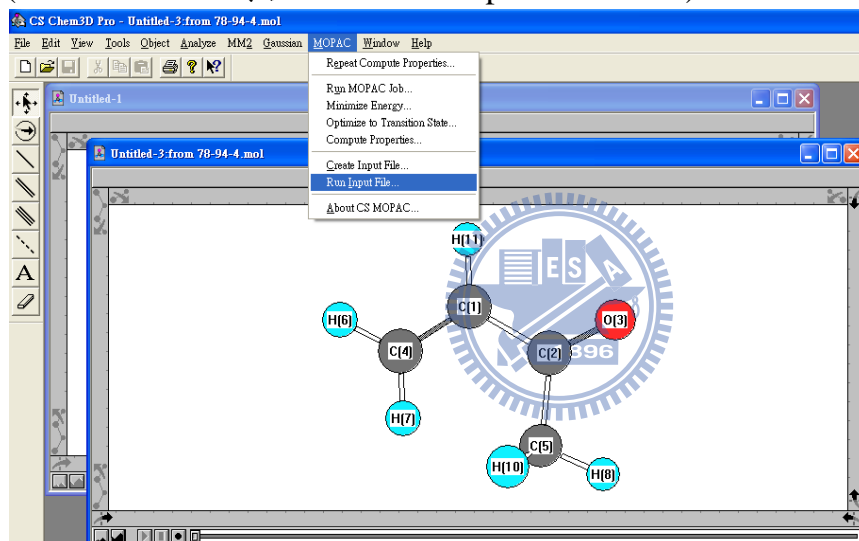
Properties: Mulliken Charges

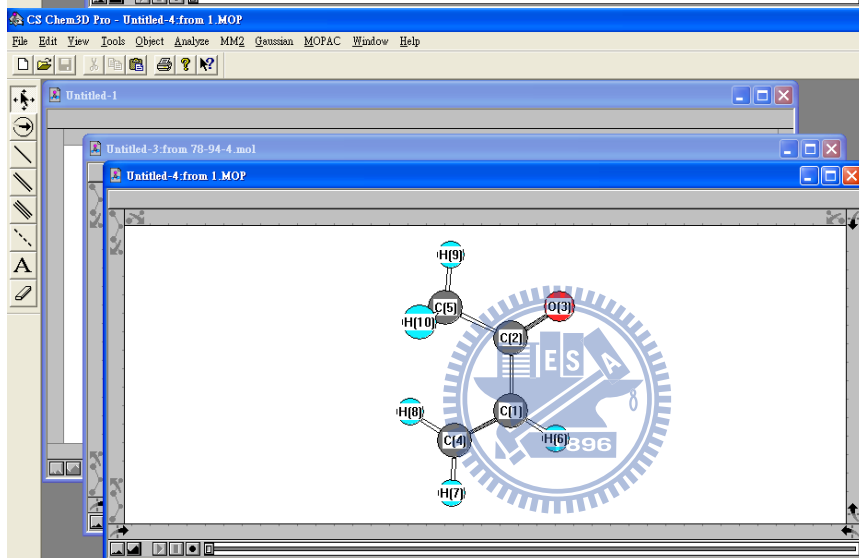
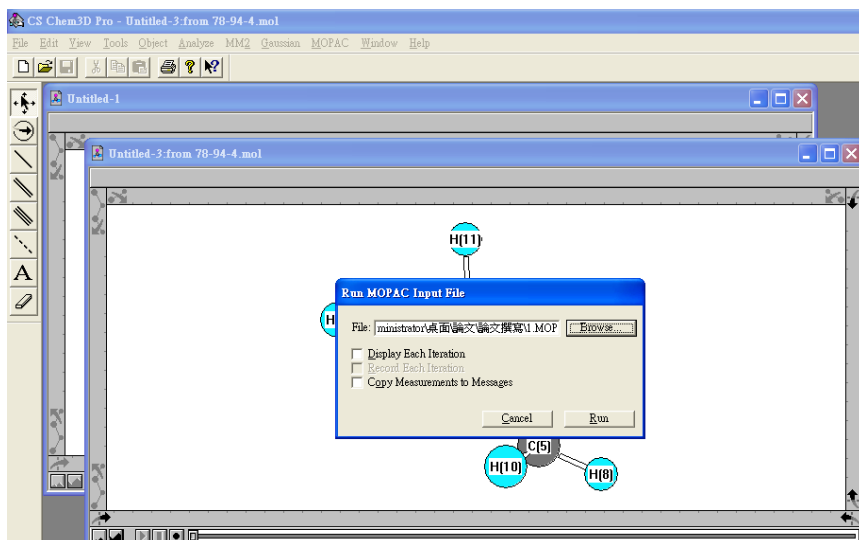
設定完成後→按 Create→按儲存建檔(ex : 1.MOPAC Input File)



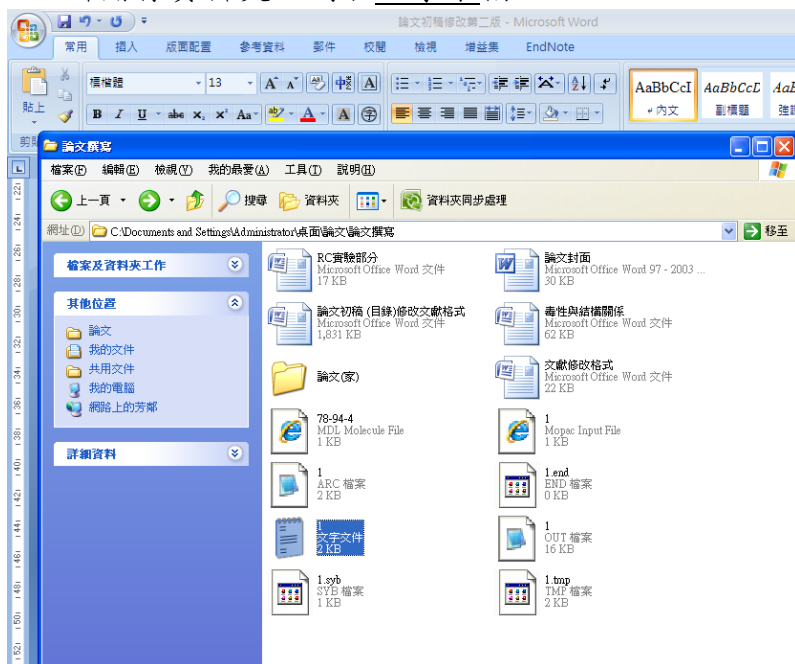


7. 依照前步驟所建製之 MOPAC 檔 → Run Input File
 (ex : Browse → 開啓 1.MOPAC Input File → Run)





8.至所儲存資料夾→開啓記事本檔



1- 記事本

檔案(F) 編輯(E) 格式(O) 檢視(V) 說明(H)

1SCF MMOK GEO-OK AM1 MULLIK

SUMMARY OF AM1 CALCULATION

MOPAC 97.00

C4 H6 O 2010/11/ 4

1SCF MMOK GEO-OK AM1 MULLIK

1SCF WAS SPECIFIED, SO BFGS WAS NOT USED
SCF FIELD WAS ACHIEVED

HEAT OF FORMATION	=	-18.413042	KCAL =	-77.04017	KJ
ELECTRONIC ENERGY	=	-2962.171425	EU		
CORE-CORE REPULSION	=	2047.850862	EU		
DIPOLE	=	2.99418	DEBYE	SYMMETRY:	Cs
NO. OF FILLED LEVELS	=	14			
IONIZATION POTENTIAL	=	-10.567780	EU		
HOMO LUMO ENERGIES (EU)	=	-10.568	0.183		
MOLECULAR WEIGHT	=	70.091			
SCF CALCULATIONS	=	1			
COMPUTATION TIME	=	0.039	SECONDS		

FINAL GEOMETRY OBTAINED

1SCF MMOK GEO-OK AM1 MULLIK

C	0.00000000	0	0.00000000	0	0.00000000	0	0	0	-0.2317
C	1.51696800	1	0.00000000	0	0.00000000	0	1	0	0.2540
O	1.20799300	1	122.8323670	1	0.00000000	0	2	1	-0.2725
C	1.33697500	1	117.5990140	1	179.9996340	1	1	2	-0.1779

CHARGE

此為 E_{homo} 、 E_{lumo}
 $E_{\text{homo}} = -10.568$
 $E_{\text{lumo}} = 0.183$

9.接著觀察部分電荷值

View→Settings→依下列圖示設定

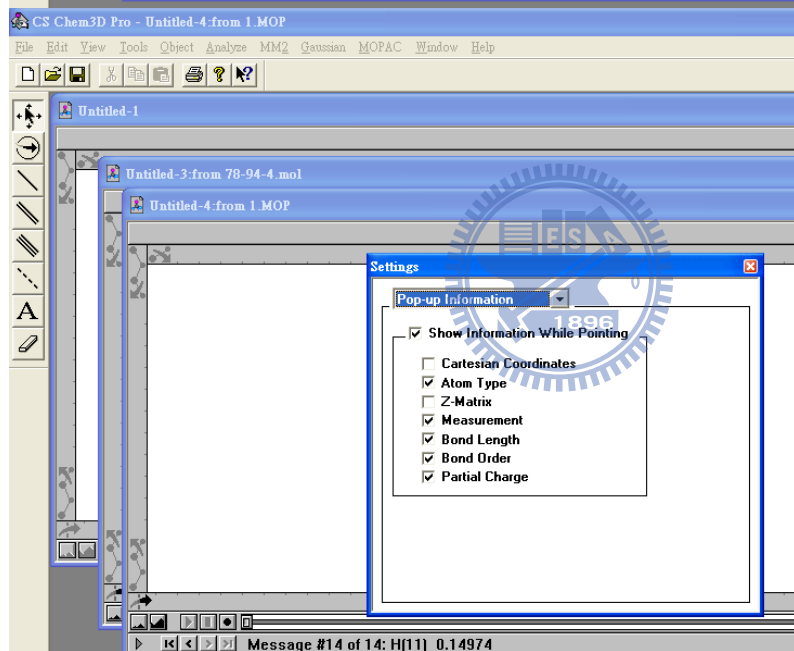
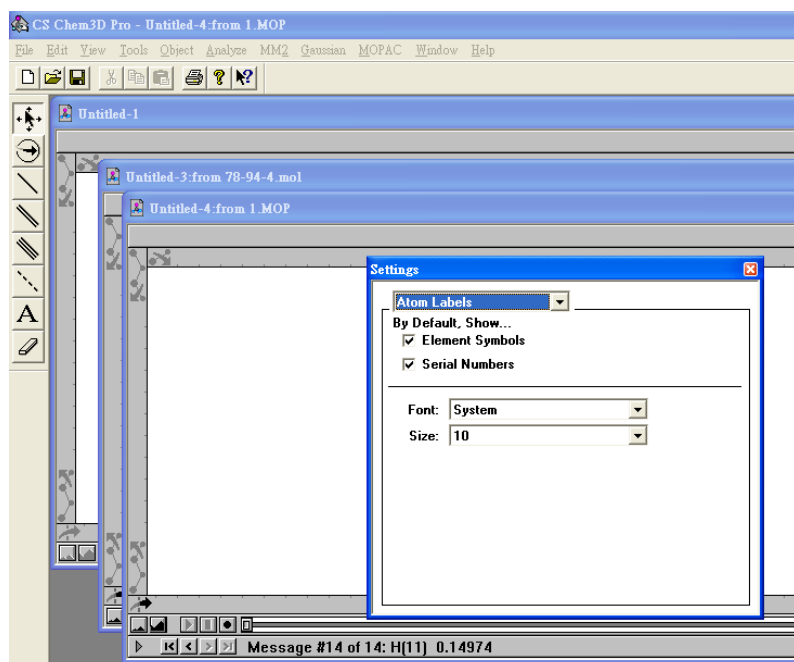
CS Chem3D Pro - Untitled-4 from 1.MOP

File Edit View Tools Object Analyze MM2 Gaussian MOPAC Window Help

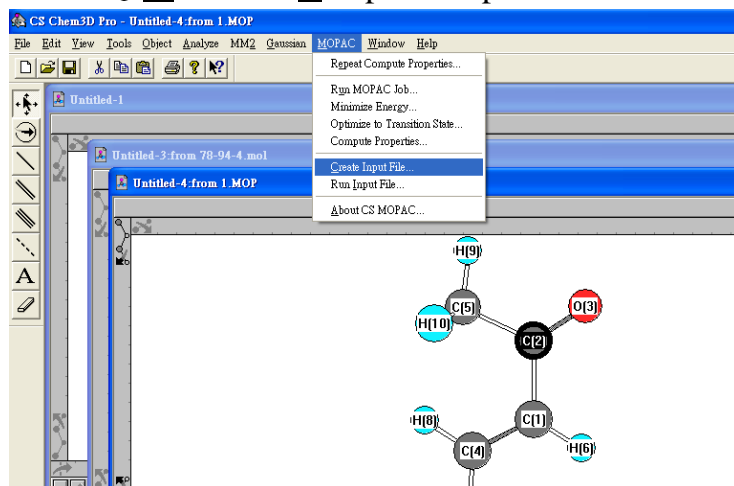
✓ Toolbar
✓ Tools Palette
Settings

- Solvent Accessible...
- Total Charge Density...
- Total Spin Density...
- Molecular Electrostatic Potential...
- Molecular Orbitals...
- Partial Charges...
- 3-Membered Ring Angles.TBL
- 4-Membered Ring Angles.TBL
- 4-Membered Ring Torsionals.TBL
- Angle Bending Parameters.TBL
- Atom Types.TBL
- Bond Stretching Parameters.TBL
- Conjugated Psystem Atoms.TBL
- Conjugated Psystem Bonds.TBL
- Electronegativity Adjustments.TBL
- Elements.TBL
- MM2 Atom Type Parameters.TBL
- MM2 Constants.TBL
- Out-of-Plane Bending Parameters.TBL
- References.TBL
- Substructures.TBL
- Torsional Parameters.TBL
- VDW Interactions.TBL

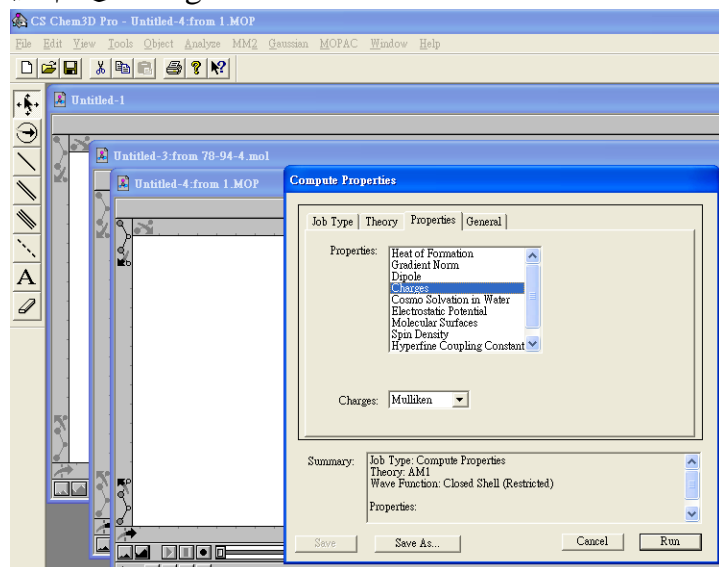
Message #14 of 14: H[11] 0.14974



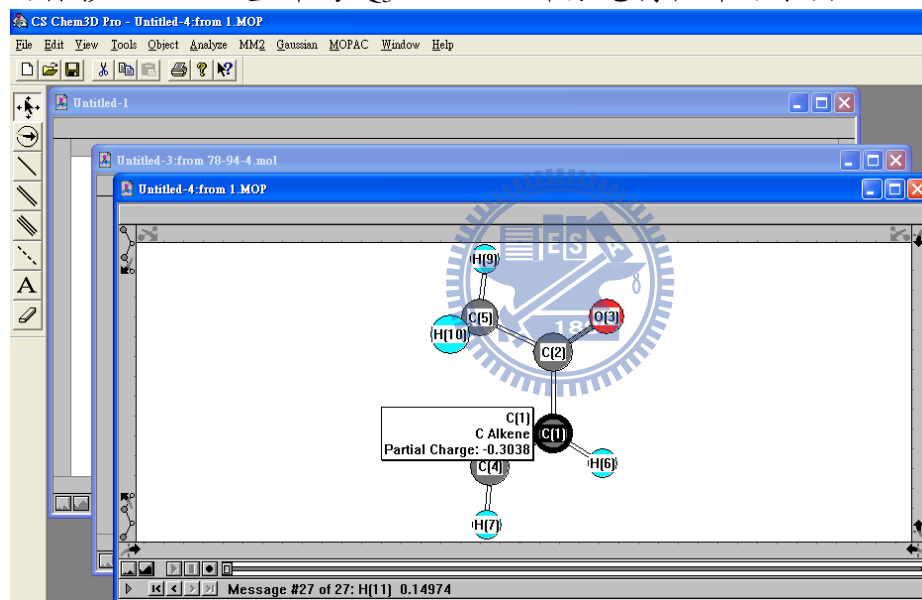
10. 點選 MOPAC→Compute Properties



僅單選 Charge→Run



游標移至 α -C 位置即為 $Q_3 = -0.3038$ 部分電荷值即可求出



游標移至 β -C 位置即為 $Q_4 = -0.2841$ 部分電荷值即可求出

