

國立交通大學
環境工程研究所
碩士論文

以密閉式藻類毒性試驗研究 α,β -不飽和醛類之
定量結構—活性關係

Using a closed-system algal test to study the structure-activity
relationships of α,β -unsaturated aldehydes

研究生：林思宏

指導教授：陳重元教授

中華民國 一 百 年 六 月

以密閉式藻類毒性試驗研究 α,β -不飽和醛類之定量結構－活性關係

Using a closed-system algal test to study the structure-activity
relationships of α,β -unsaturated aldehydes

學生：林思宏

Student： Sz-Hung Lin

指導教授：陳重元

Adviser：Dr. Chung-Yuan Chen



國立交通大學

環境工程研究所

碩士論文

A Thesis

Submitted to Institute of Environmental Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

In Partial Fulfillment of the Requirements

For a Degree of

Master of Science

In

Environmental Engineering

August 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百年

以密閉式藻類毒性試驗研究 α,β -不飽和醛類 之定量結構－活性關係

學生：林思宏

指導教授：陳重元

國立交通大學環境工程研究所

摘要

本研究使用是單細胞綠藻類 - 月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 為毒性測試物種, 以反應性物質 α,β -不飽和醛作為測試毒物。並以三個反應終點 (Δ DO、Final Yield、Growth Rate) 於密閉式系統中進行毒性測試將此類化合物之物化特性或結構, 與毒性建立統計上的關係 - QSAR 探討 α,β -不飽和醛對生物體造成毒性的作用機制。

親電性參數 $\text{Log} (1/\text{RC}_{50})$ 與親脂性參數 $\text{Log} K_{ow}$ 對於 α,β -不飽和醛藻類毒性有良好相關性, 證明 α,β -不飽和醛造成藻類毒性機制為不飽和 π 鍵與藻類中親核試劑作用 (如: 穀胱甘肽; GSH); 以及 α,β -不飽和醛侵入藻類細胞膜中造成毒性。

具反應性的 α,β -不飽和醛對於月芽藻之毒性數據可使反應性有機物建立更完整毒性數據系統, 增加反應性有機物數據庫完整性。此數據庫資料可運用 QSAR 系統來預測其他 α,β -不飽和醛類的毒性, 並且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。

關鍵字: α,β -不飽和醛類、月芽藻、QSAR、反應性有機物

Using a closed-system algal test to study the structure-activity relationships of α,β -unsaturated aldehydes

Student : Sz-Hung Lin

Advisor : Dr.Chung-Yuan Chen

Institute of Environmental Engineering
National Chiao Tung University

Abstract

A single-cell green algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*) for the toxicity testing species to α, β -unsaturated carbonyl compounds as a test toxic in three reaction endpoints (Δ DO, Final Yield, Growth Rate) on closed system for toxicity testing.

The results of QSAR in three reaction endpoints :

$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 0.965 + 0.968 \text{ Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.169 \text{ LogK}_{\text{OW}}$
 $r^2=0.806$ (Δ DO), $\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 1.200 + 1.000 \text{ Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.113 \text{ LogK}_{\text{OW}}$
 $r^2=0.832$ (Final Yield), $\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 0.985 + 0.997 \text{ Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.075 \text{ LogK}_{\text{OW}}$
 $r^2=0.854$ (Growth Rate).

The QSAR of α,β - unsaturated carbonyl compounds not only predict other α,β - unsaturated carbonyl compounds which untested but also provide tools capable of the rapid screening of chemicals for potential hazards.

Most α,β - unsaturated carbonyl compounds are more than 1, that the toxicity of the reactive compounds are more intense than baseline toxicity. Algae toxicity data on *Pseudokirchneriella subcapitata* of α,β - unsaturated carbonyl compounds make more complete to toxicity datas of reactive organic chemicals.

Keywords: α, β -unsaturated aldehydes, *Pseudokirchneriella subcapitata* , QSAR, reactive organic

致謝

二年來從一個很客氣的小朋友，變成一個嘴巴很賤的宏爺，這一切彷彿都照這計畫進行，這段期間經歷了許多考驗，雖然中間沒有驚豔，但也是很好的經驗。

這二年我養的藻很乖，很聽話很給我面子，雖然它在上一屆很倔強，常常控制組都不給學長姐好臉色，還好我接手以後把我跟它之間的誤會化解了，讓它變成剛猛的猛男藻種，如今它已經交棒給下一屆飼養了，希望往後十年它還能每天都像吃威而鋼一樣健壯，每天都能在 CONTER 上顯示翹翹的圖。

再來就是一個很衝動跟一個很緩慢的好同學，很衝動的阿芳每天都有新的 ideal 在腦中滾來滾去，唯獨腰圍卻還是依然健壯，穩如泰山，相信她那條 S 的牛仔褲應該是衝動所造成犧牲品之一。很緩慢的祥祥，外表看似慈祥內心卻一點也不慈祥，想跟他尬酒最好準備一個帳篷、一個枕頭跟盥洗用具，不然準備倒在路旁看他微笑離去，相信他每次都說要揪卻遲遲讓我只看到空氣人形的 ANGLE 就是他緩慢下最好的證明，緩慢的手腳可能等到 ANGLE 老去他才能趁機而入，但我想與其用榔頭逼他追 ANGLE，倒不如讓他自己看到哪天 ANGLE 嫁人了他才恍然大悟新郎不是他的問境還來的有用(手腳請快點好嘛)。

表完了上面二位當然也是要稱讚他們對我的容忍，沒有你們二個互相照應，我想我今天應該還在恆溫室哭哭等待著我的藻種茁壯發芽，可能還要面對葉老師的苦毒在修一次那會讓人抓狂的地下水，或是甲水甲毒還要重考到第三次等等令人可怕的課程。當然碩一去後龍烤肉，去過 N 次的錢櫃與好樂迪聽我美好的歌聲以及中午一起走去吃到很膩的二餐等等都會是我研究所美好的回憶，我愛你們二位！

最後就要說說這間很神奇的實驗室，歷經介華，庭宇，心渝，以及玉米投與阿土伯等等人離開，以修維修過數次的 CONTER 以及每次都會寫錯我名子的 millpole 還有修一次費用就足以讓實驗室休假 TOC，這間實驗室簡直就是每天都充滿了新的挑戰，只能說還好我畢業了，剩下的麻煩就交給小孟、筱涵、阿表去表現了，加油了小夥子們，在談戀愛跟打球之餘，別忘了給點耐心給 LAB310 跟 311，不然你們就 QQ 了。

感謝已經畢業的學長姐，以及正在努力畢業的學姐還有我已經叫不出名子學弟妹跟衝動的阿芳以及緩慢的祥祥，雖然我們的共同特點就是曾經都吸過老師辦公室特有的煙味然後就沒有了，我還是很高興我進來這間實驗室，畢竟歡欣的宅了 2 年如今我要飛越實驗室，去追我的女朋友了!! 掰掰

關鍵字：宏爺、COCO、麥當勞、壘球、帥哥

中文摘要 I
英文摘要 II
致謝 III
目錄 IV
表目錄 VI
圖目錄 VII

目錄

一、緒論.....	1
1.2 研究目的.....	2
1.3 研究方法及架構.....	2
二、文獻回顧.....	4
2.1 毒性物質-醛類及 α,β -不飽和醛類之介紹.....	4
2.1.1 醛類之介紹.....	4
2.1.2 α,β -不飽和醛之介紹.....	4
2.1.3 醛類之物理特性.....	5
2.1.4 醛類之化學反應.....	5
2.1.5 α,β -不飽和醛類之加成反應.....	8
2.1.6 醛類來源及用途.....	9
2.2 藻類毒性試驗.....	11
2.2.1 藻類毒性試驗特性.....	11
2.2.2 藻類毒性試驗物種介紹.....	11
2.2.3 藻類毒性試驗.....	12
2.2.4 藻類反應終點.....	13
2.2.5 試驗之重要參數.....	14
2.2.6 揮發性有機物試驗.....	17
2.3 定量-結構反應關係.....	18
2.3.1 QSAR 之簡介.....	18
2.3.2 常用之 QSAR 參數.....	19
2.3.3 QSAR 在環境毒物學上的應用.....	21
2.4 α,β -不飽和醛類之 QSAR 研究.....	24
三、基本理論.....	26
3.1 毒性試驗終點.....	26
3.2 常用的單一毒性模式.....	27
3.3 基本生長動力學.....	30
四、實驗設備與方法.....	32

4.1 實驗設備及材料.....	32
4.2 毒性試驗藻種.....	36
4.3 培養基質的配製.....	36
4.4 試驗毒物.....	38
4.5 實驗前準備.....	38
4.6 實驗步驟.....	45
4.6.1 連續式母槽之培養.....	45
4.6.2 藻類毒性試驗.....	46
4.7 RC_{50} 反應性參數值實驗.....	47
4.8 實驗之品保及品管 (QA/QC)	49
五、結果與討論.....	50
5.1 藻類毒性試驗.....	50
5.1.1 藻類毒性試驗結果.....	50
5.1.2 急慢毒性毒性比 ACR (Acute to Chronic toxicity ratio).....	52
5.2 反應性參數試驗結果 (RC_{50}).....	56
5.3 α,β -不飽和醛類 QSAR.....	58
5.3.1 α,β -不飽和醛類數據整理	58
5.3.2 α,β -不飽和醛類 QSAR ($\log K_{ow}$).....	60
5.3.3 α,β -不飽和醛類 QSAR (RC_{50})	61
5.3.4 α,β -不飽和醛類 QSAR (RC_{50} 及 $\log K_{ow}$).....	62
5.3.5 α,β -不飽和醛類 QSAR (RC_{50} 及 $\log K_{ow}$) 去除 tr, tr-2,4-nonadienal、 2,4-hexadienl.....	65
5.4 α,β -不飽和醛類、酮類、酯類	67
5.4.1 α,β -不飽和酮類、酯類之毒性數據	67
5.4.2 α,β -不飽和醛類、酮類、酯類比較.....	67
5.4.3 α,β -不飽和醛類、酮類、酯類 QSAR.....	70
5.5 希夫式鹼參數 $\log (K_{NH_2})$ 之討論.....	75
5.5.1 希夫式鹼參數 $\log (K_{NH_2})$ 介紹.....	75
5.5.2 醛類 7 組與希夫式鹼參數 $\log (K_{NH_2})$ 之 QSAR.....	76
六、總結.....	79
七、參考文獻.....	80
附錄一、原始數據.....	83
附錄二、統計方法.....	104

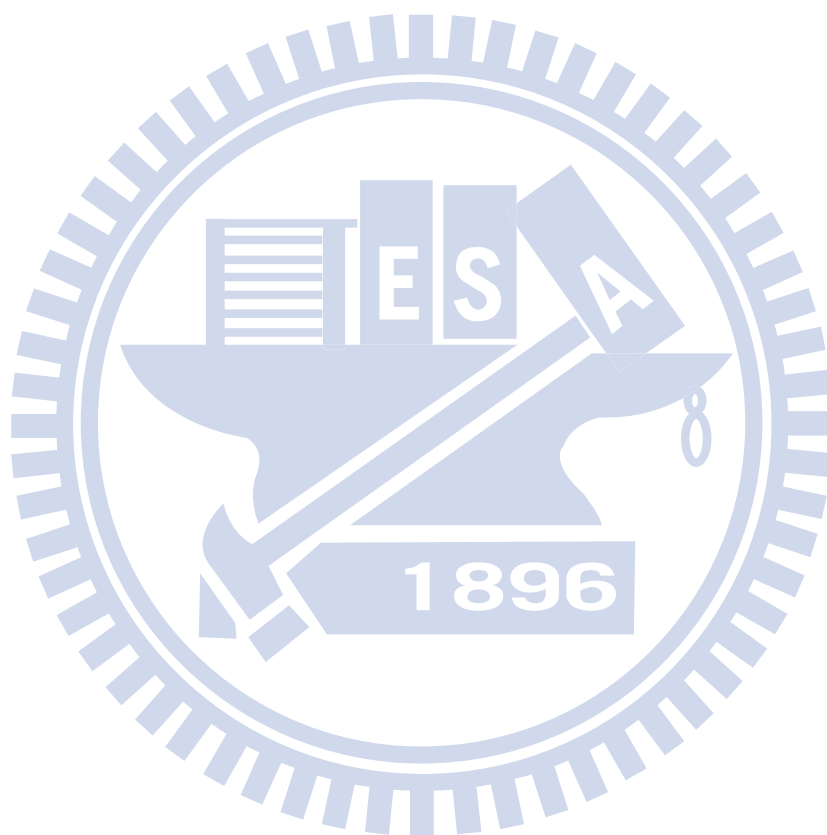
表目錄

Table 2.3.1 Classification of reactive mechanism	23
Table 3.2.1 Weibull、Probit 與 Logit 容忍度分布模式	29
Table 4.3.1 The consist of micro-algae medium	37
Table 4.3.2 The consist of micro-algae medium (EDTA component)	37
Table 4.4.1 Physical and chemical characteristic of α,β -unsaturated aldehydes	39
Table 4.5.1 The conditions of Coulter Counter	43
Table 5.1.1 Toxicity of α,β -unsaturated aldehydes	51
Table 5.1.1 The ACR values based on three endpoints	52
Table 5.1.2 NOEC, LOEC and EC ₁₀ based on three endpoints	53
Table 5.1.3 Coefficients of determination (r^2) for toxicity of algae and other species	54
Table 5.1.4 In comparison of toxicity with other species	55
Table 5.2.1 Reactivity of Aldehydes for RC ₅₀	56
Table 5.3.1 Data of α,β -unsaturated aldehydes for QSAR	59
Table 5.3.2 Result of QSAR for LogK _{OW} of α,β -unsaturated aldehydes	60
Table 5.3.3 Result of QSAR for Log (1/RC ₅₀) of α,β -unsaturated aldehydes	61
Table 5.3.4 Result of QSAR for Log (1/RC ₅₀) & LogK _{OW} of α,β -unsaturated aldehydes(whitout tr, tr-2,4-nonadienal and 2,4-hexadienl)	66
Table 5.4.1 Data sets of α,β -unsaturated Acrylates and α,β -unsaturated Ketones	68
Table 5.4.2 Linear Regression of the alage Toxicity, Log (1/RC ₅₀), Log K _{OW} for α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds	69
Table 5.4.3 Structures of 3-butyn-2-one and 3-buten-2-one	70
Table 5.4.4 Result of QSAR for Log (1/RC ₅₀) & LogK _{OW} of α,β -Unsaturated carbonyl compounds	72
Table 5.4.5 Result of QSAR for Log (1/RC ₅₀) & LogK _{OW} of α,β -Unsaturated carbonyl compounds	72
(without tr, tr-2,4-nonadienal、2,4-hexadienl and 3-butyn-2-one)	72
Table 5.5.1 Data sets of alage toxicity and Log (K _{NH2})	77
Table 5.5.2 Linear Regression of the alage Toxicity, Log (1/RC ₅₀), Log K _{OW} for seven α,β -Unsaturated aldehydes	78
Table 5.5.3 Linear Regression of the alage Toxicity ,Log (1/RC ₅₀),Log K _{OW} , Log(K _{NH2}) for seven α,β -Unsaturated aldehydes	78

圖目錄

Fig 1.3.1 The flow chart of this study	3
Fig 2.1.1 α,β -unsaturated aldehydes	4
Fig 2.1.2 醛類氧化反應	5
Fig 2.1.3 醛類還原反應	5
Fig 2.1.4 還原成烴類	6
Fig 2.1.5 還原胺化反應	6
Fig 2.1.6 氯化物的加成反應	6
Fig 2.1.7 胺衍生物加成	7
Fig 2.1.8 醇類的加成反應	7
Fig 2.1.9 Grignard 試劑加成反應	7
Fig 2.1.10 直接(1,2)加成反應	8
Fig 2.1.11 酸催化直接(1,2)加成反應	8
Fig 2.1.12 共軛(1,4)親核性加成反應	9
Fig 2.2.1 Carbonate system and photosynthesis method for pH balance	14
Fig 2.3.1 Classification of toxicity mechanism in aquatic toxicity tests	22
Fig 3.2.1 Dose-response curve of common toxicity test	27
Fig 4.7.1 The flow chart of RC_{50} experiment	48
Fig 5.1.1 α,β -unsaturated aldehydes sensitivity of toxicity	50
Fig 5.2.1 Structures of 2,4-hexadienl、tr, tr-2,4-heptadienal and tr, tr-2,4-nonadienal	57
Fig 5.3.1 $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Predicted})$ vs $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Observed})$ for delta DO of α,β -unsaturated aldehydes	63
Fig 5.3.2 $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Predicted})$ vs $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Observed})$ for Final Yield of α,β -unsaturated aldehydes	63
Fig 5.3.3 $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Predicted})$ vs $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Observed})$ for Growth Rate of α,β -unsaturated aldehydes	64
Fig 5.3.4 Structure of 2,4-hexadienl and tr, tr-2,4-nonadienal	65
Fig 5.4.1 $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Predicted})$ vs $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Observed})$ for delta DO of α,β -Unsaturated carbonyl compounds	73
Fig 5.4.2 $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Predicted})$ vs $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Observed})$ for Final Yield of α,β -Unsaturated carbonyl compounds	73
Fig 5.4.3 $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Predicted})$ vs $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Observed})$ for Growth Rate of	

α,β -Unsaturated carbonyl compounds.....	74
Fig 5.5.1 Schiff base product in the reaction between primary amine and α,β -unsaturated aldehydes.....	75



一、緒論

1.1 研究緣起

日常生活中人類常暴露在各種各樣具毒性和具致癌性物質當中， α,β -不飽和羰基化合物為其中之一，其來源主要為天然代謝後產物與存在於外界環境中之化合物。 α,β -不飽和羰基結構主要由一個碳碳雙鍵(C=C)結合到一個羰基組(C=O)。鄰近的碳碳雙鍵(C=C)與羰基組(C=O)增加了其親電性[1]。因此，當 α,β -不飽和羰基化合物與特定的蛋白質及DNA作結合時，可能會發生各種不良的影響性。此類 α,β -不飽和羰基化合物可能為醛類，酯類，酮類，主要取決於 α,β -不飽和羰基化合物結構上的排列。

人類暴露於繁多的 α,β -不飽和醛當中，因為它們普遍存在於各種食品與香料物質當中(如2-己烯醛、肉桂醛、檸檬醛)或是為煙草和汽車煙霧中的燃燒副產品[2]。因其對於電子豐富的生物性大分子具反應性，其會產生不良的健康影響，包括一般毒性，致敏感反應，致突變性和致癌性[3, 4]。蛋白質結合是造成器官毒性及過敏性反應的重要因素，因其可以直接損害特定蛋白質的功能[5]。蛋白質結合反應可能為一個主要的因素，誘導其毒性的產生，如水生毒性，呼吸道毒性，皮膚過敏性，肝細胞毒性和致突變性[6]。

此類共價鍵為分子產生毒性影響的主要關鍵，最近的研究提出，毒性-結構的關係常利用不同的毒性反應終點來決定親電子試劑與某些特定的生物性親核試劑的反應強度。外源性的親電物質與細胞內特定的親核位置作用，此種作用型態主要是依賴於硬/軟酸鹼原理[7, 8]。一般的規則：硬親電子試劑偏向硬親核試劑(如：離氨基酸的氨基、DNA)，以及軟親電子試劑偏向軟親核試劑(如：穀胱甘肽)[6]。

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; QSAR)可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，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。

藻類為水體生態系統的主要生產者，當水中毒性質對藻類造成毒性時會導致生態其他消費者受到影響。其廣泛分布於水體環境中、生長週期短、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，適合做為工業廢水的生物活性指標，以及對不同種有機化學物質有不同的反應為毒性測試物種的理想選擇。

傳統的藻類毒性試驗，大多是使用批次式開放性的系統來進行實驗對於揮發性有機化學物質，會因為部分化學物質揮發，而造成毒性低估，因此利用連續 (Chemostat) 的方式培養藻類，使藻類於槽中穩定生長，並取穩定生長的藻於 BOD 瓶中進行實驗，因 BOD 瓶為密閉的系統，故可藉此克服有機物揮發的問題[9, 10]。

本研究係以單細胞綠藻類 - 月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 為毒性測試物種、以反應性物質 α,β -不飽和醛作為測試毒物，以三個反應終點 (delta DO、Final Yield、Growth Rate) 於密閉式系統中進行毒性測試將此類化合物之物化特性或結構，與毒性建立統計上的關係- QSAR 探討此類反應性物質對生物體造成毒性之毒性作用機制。

1.2 研究目的

1. 以密閉性藻類毒性實驗，研究 α,β -不飽和醛，以溶氧變化量 (ΔDO) 及藻類細胞密度 (Final Yield) 及藻類細胞生長率 (Growth Rate) 為反應終點求得各毒性物質之半致死濃度 (EC_{50})，可做為毒性資料庫之數據以利更完善的評估。
2. 將各種物化參數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，可預測其他同類有機物之毒性。
3. 藉由 QSAR 從統計學的角度來討論 α,β -不飽和醛毒性與作用機制之關係，建立一個簡單的模式，使得我們得以進一步的解釋可能的作用機制並利用利用親電性物質 α,β -不飽和醛與替代型軟/硬生物性親核試劑之間作用關係，描述 α,β -不飽和醛對於月芽藻所造成之毒性機制。

1.3 研究方法及架構

由參考文獻中蒐集相關資料及數據，並決定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進一步之整理，其後依本研究室所建立之實驗及分析方法完成試驗。

再將試驗後所得數據以 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。詳細流程圖如 Fig 1.3.1

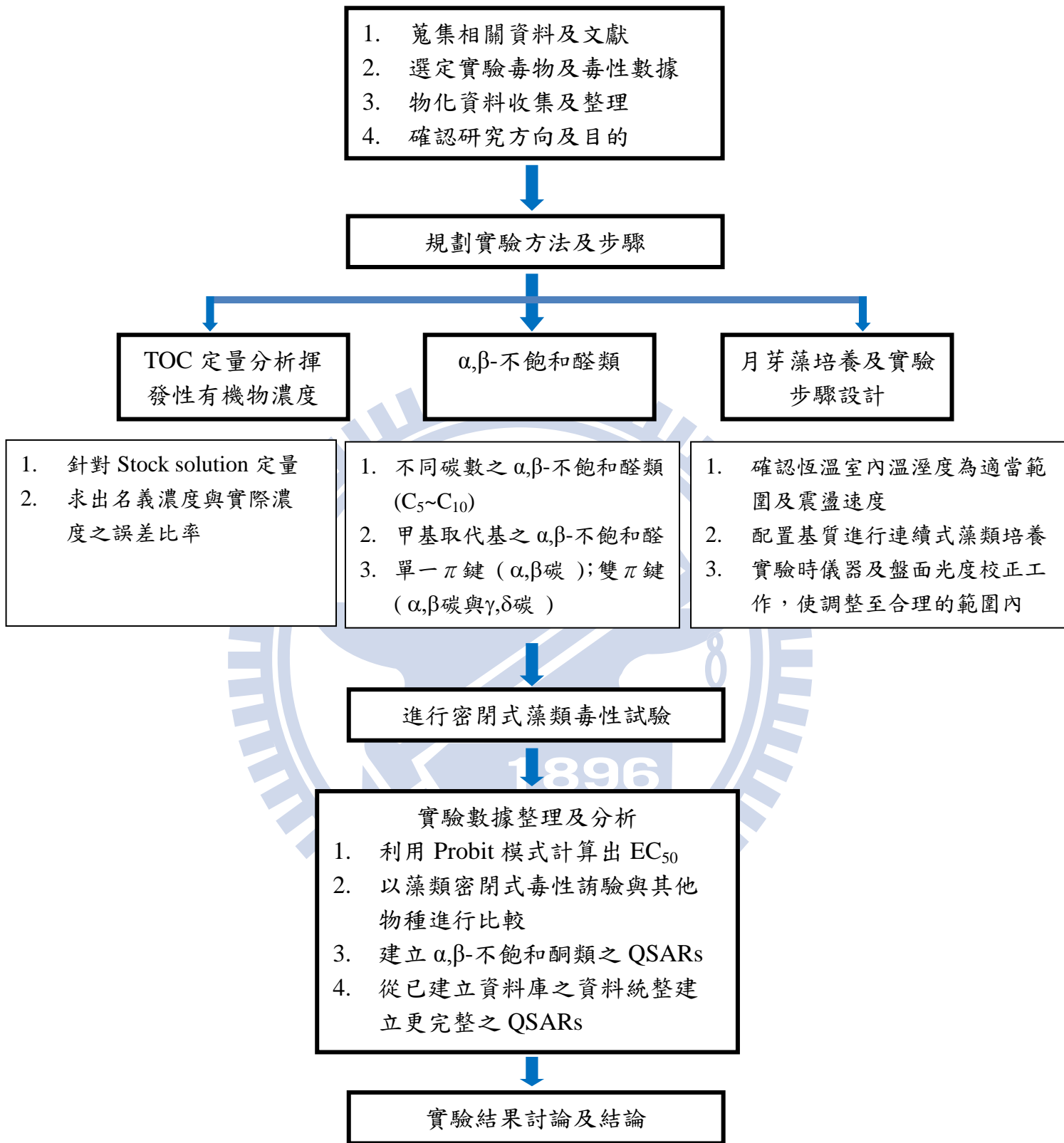


Fig 1.3.1 The flow chart of this study

二、文獻回顧

2.1 毒性物質-醛類及 α, β -不飽和醛類之介紹

2.1.1 醛類之介紹

醛類 (Aldehydes) 是有機化學中一種重要的官能基 (Functional Group)；以一個羰基 ($C=O$) 為中心，羰基上的碳一側接氫原子，化學通式為 $RCHO$ 。醛類是醇類 (Alcohol, $-OH$) 氧化的產物，會再被進一步氧化成酸 ($-C(=O)OH$)。

醛基是帶有極性的，氧原子是碳氧鍵中的負偶極，將碳原子的電子扯向氧原子。根據醛基所結合的烴基的結構，醛可分為脂肪族醛和芳香醛。脂肪族醛又可再分為飽和脂肪醛和不飽和脂肪醛。飽和脂肪醛如乙醛 (CH_3-CHO)、丙醛 (CH_3-CH_2-CHO) 等，其中甲醛、乙醛、丙醛溶於水 C_4 以上的醛由微溶於水至難溶於水；不飽和脂肪醛如丙烯醛 ($CH_2=CH-CHO$)。

醛類的俗名將相對應酸 (*-ic acid*) 以醛 (*-aldehyde*) 取代而得，支鏈醛類以直鏈醛類的衍生物命名。要表示連接位置，可用希臘字母 α -、 β -、 γ -、 δ - 等； χ -碳是帶有 $-CHO$ 基的碳。醛類之 IUPAC 命名法照常法之命名之以帶有 $-CHO$ 基的最長鏈為母結構，以相對應烷之烷 (*-e*) 以醛 (*-al*) 取代而得。取代基之位置以號碼標出，而常以羰基碳為 $C-1$ 。應注意 IUPAC 命名 $C-2$ 相當於俗名之阿爾法 (*alpha*)

2.1.2 α, β -不飽和醛之介紹

α, β -不飽和醛 (α, β -unsaturated aldehydes) 結構主要由一個碳碳雙鍵 ($C=C$) 結合到一個羰基組 ($C=O$) 的醛類， α -C 為接醛基上碳之鄰近相接的碳碳雙鍵 ($C=C$) 之第一個碳， β -C 為接醛基上碳之鄰近相接的碳碳雙鍵 ($C=C$) 之第二個碳。其化學結構如圖 2.1.1 所示

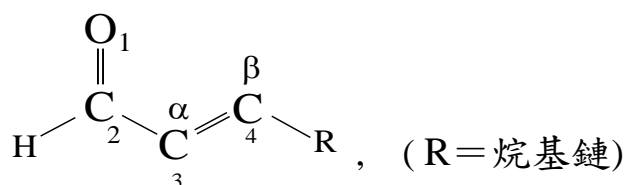


Fig 2.1.1 α, β -unsaturated aldehydes [11]

2.1.3 醛類之物理特性

室溫下，除了甲醛是氣體外，其餘醛均為液體或固體。低級醛有刺激性氣味，而一些芳香醛和中級醛有香味，常用作化妝品和食品的原料。羰基碳以 σ 鍵與其他三個原子連接，這些鍵利用 sp^2 軌域，故在同一平面上。碳剩餘的 p 軌域與氧的 p 軌域重疊形成 π 鍵，氧原子上還留有二對未共用電子對，羰基平面結構鍵角接近 120° 。

因為氧的陰電性高於碳相當多，所以碳-氧雙鍵具有極性，其中羰基上的碳帶極性正電，為親電子性(路易士酸)，可與親核基反應；氧為極性負電具親核性(路易士鹼)[12]。

羰基的極性使醛類成為極性化合物，因此其沸點比其分子量相近極性化合物為高。因其僅有結合於碳的氫，故它們之間不可能有分子間氫鍵；結果其沸點比分子量相近的醇類或羧酸類為低。可能因溶劑與溶質分子間氫鍵之故，低級醛類可溶於水；溶解度界限約在五個碳。醛類皆可溶解於一般有機溶劑[13]。

2.1.4 醛類之化學反應

1. 氧化反應 (Oxidation)

醛類容易被多數平常的無機氧化劑，如氧溴硝酸氧化銀或同錯離子氧化成縮酸。更有力的試劑諸如鉻酸 (chromic acid) 及過錳酸鉀等。其化學反應如圖 2.1.2 所示[13]：

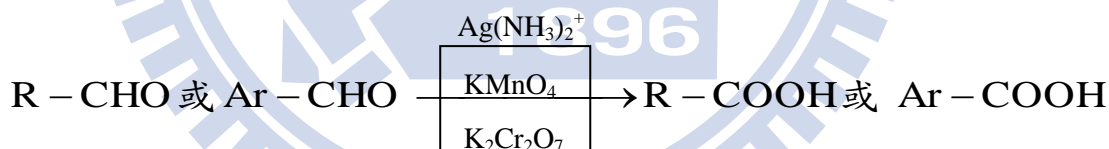


Fig 2.1.2 醛類氧化反應[13]

2. 還原反應(Reduction)

(1) 還原成醇類

醛類被還原成第一醇類，可以接觸氫化或利用化學還原劑如氫化鋁鋁 (LiAlH_4) 等還原之。此種還原可應用於合成其相對應的羰基化合物來獲得某種醇類，特別是對於利用醛醇縮合的產生的醛類有用。其化學反應如圖 2.1.3 所示[13]：

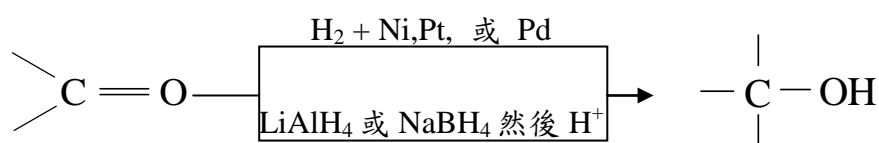


Fig 2.1.3 醛類還原反應[13]

(2) 還原成烴類

醛類可經下列二反應還原成烴類：(a)以鋅汞齊 (amalgamated zinc)與濃鹽酸作用的 Clemmensen 還原法；(b)以肼 (hydrazine) NH_2NH_2 與 KOH 或第三丁醇鉀 (potassium *tert*-butoxide)等強鹼作用的 Wolff-Kishner 還原法。其化學反應如圖 2.1.4 所示[13]：

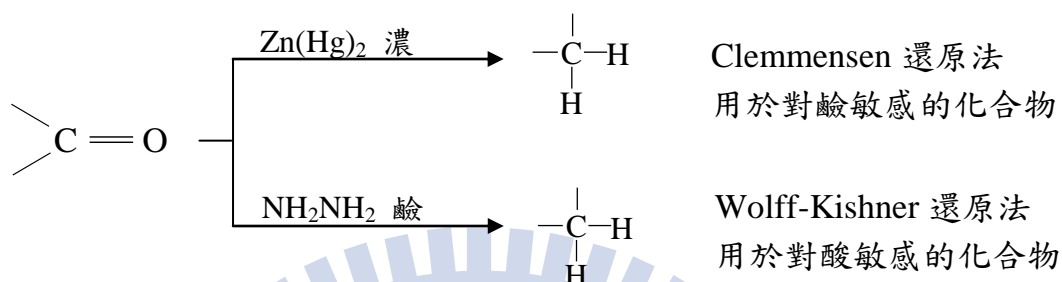


Fig 2.1.4 還原成烴類

(3) 還原胺化反應

甚多醛類 (RCHO)有還原胺化反應；及氮存在下的還原轉變成胺。還原可由催化劑或利用氰氫硼酸鈉 (NaBH_3CN) 完成。反應涉及含一碳氮雙鍵 ($\text{C}=\text{N}$) 的中間物 (一種亞胺, $\text{RCH}=\text{NH}$ 或 $\text{R}_2\text{C}=\text{NH}$) 的還原。其化學反應如圖 2.1.5 所示[13]：

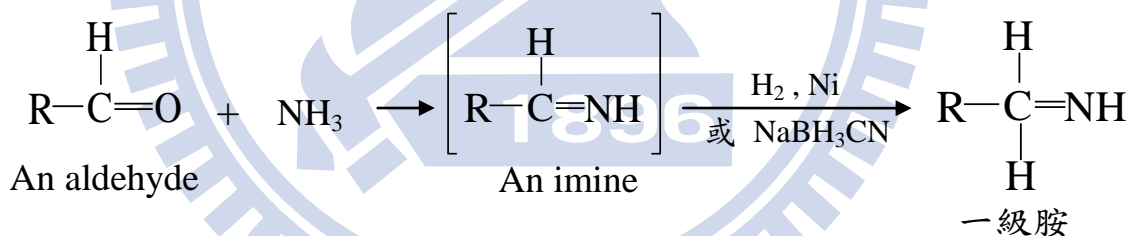


Fig 2.1.5 還原胺化反應

3. 氰化物的加成反應

H₂CN 之各元素加在醛類或同類的羰基上則產生稱為氰醇類 (cyanohydrins) 的化合物。此反應成礦酸於羰基化合物及氰化鈉水溶液的混合物中來完成。其化學反應如圖 2.1.6 [13]所示：

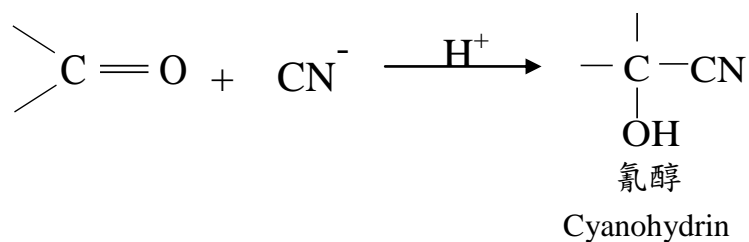


Fig 2.1.6 氰化物的加成反應

4. 胺衍生物加成反應

醛與胺或一級胺 ($R'NH_2$) 反應可生成亞胺，胺親核性加到羰基上，接著脫去一水分子即生成亞胺。其反應如圖 2.1.7 所示[12]：

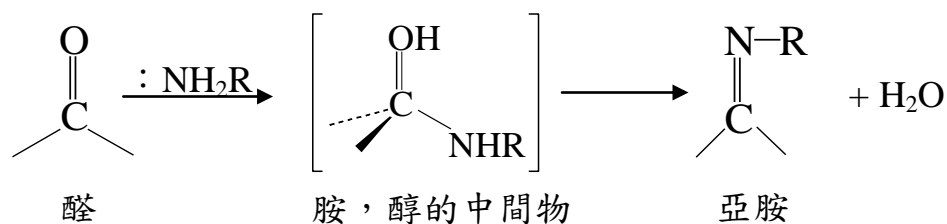


Fig 2.1.7 胺衍生物加成[12]

5. 醇類的加成反應

在無水酸存在下，醇類加於醛類的羰基產生縮醛類(acetals)。此反應將醛與過量無水醇及少量無水酸(常用氯化氫)，共置以完成之。其化學反應如圖 2.1.8 所示[13]：

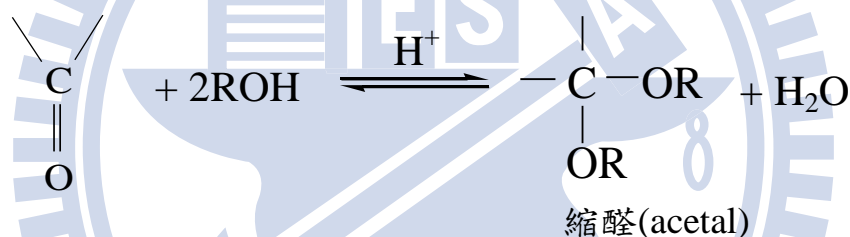


Fig 2.1.8 醇類的加成反應[13]

6. Cannizzaro 試劑的加成反應

在濃鹼的存在下，不含 α -氫的醛類進行自身氧化還原反應產生醇及縮酸鹽的混合物。此反應稱為 Cannizzaro 反應，一般係使醛與濃氫氧化物水溶液或酒精放至於室溫另其發生反應。其化學反應如圖 2.1.9 所示[13]：

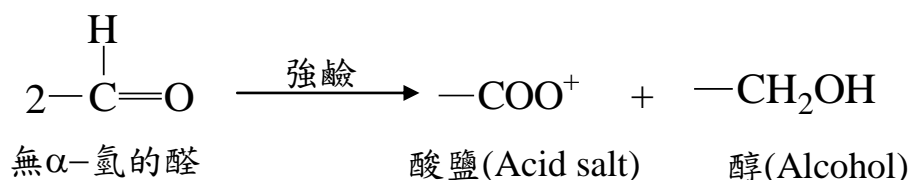


Fig 2.1.9 Grignard 試劑加成反應[13]

2.1.5 α,β -不飽和醛類之加成反應

當 α,β -不飽和醛與親核性試劑反應時，它們可以依兩種方式進行：它們可能循一種簡單加成反應(simple addition)進行，即直接(1,2)加成反應，就是親核劑直接對羰基的雙鍵進行加成反應；或者，它們也可循一種共軛加成反應(conjugate addition)進行，即共軛(1,4)加成反應，就是親核劑對 α,β -不飽和羰基化合物上得 β 碳進行加成反應。

1. 直接(1,2)加成反應(nucleophilic addition reaction)

醛最常見的反應是親核性加成反應，親核試劑加到羰基電子的碳上生成鍵結，同時羰基的碳由 sp^2 混成軌域變為 sp^3 ，而 $C=O$ 雙鍵的一對電子移至氧原子上，形成過渡狀態[12]。在過渡狀態中，碳開始獲得其生成物所具有之四面體組態[13]。其反應如圖 2.1.10 所示：

如有酸的存在，氫離子則連接於羰基氧上，此種優先質子化能使氧獲得 π 電子而不接受負電荷，故降低了親核性攻擊的活化能。因此醛類的親核性加成反應可受酸類的催化[13]。其反應如圖 2.1.11 所示：

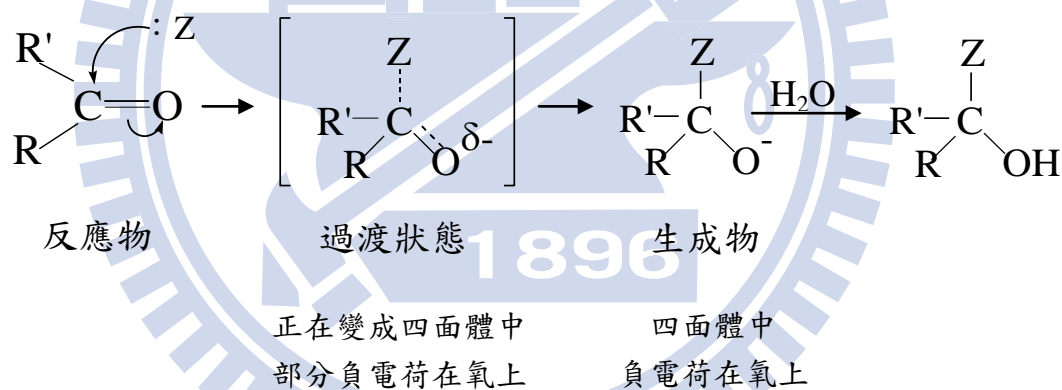


Fig 2.1.10 直接(1,2)加成反應[13]

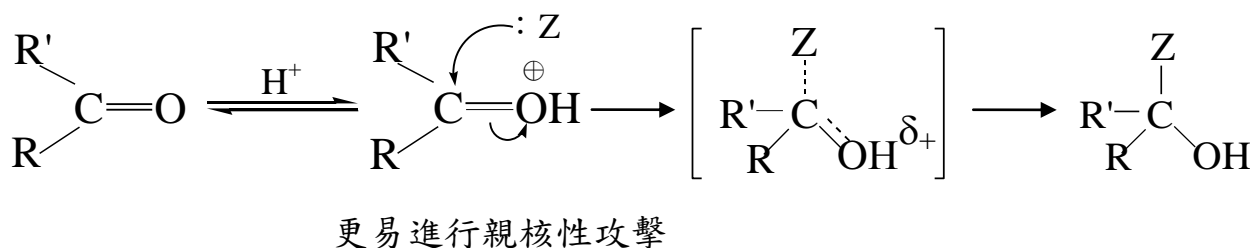


Fig 2.1.11 酸催化直接(1,2)加成反應[13]

2. 共軛(1,4)親核性加成反應 (conjugate addition)

當 α,β -不飽和醛類與親核性試劑反應時，它們可以依二種方式進行：當它們循一種簡單加成反應 (simple addition) 進行時，那就是親核試劑直接對羰基上雙鍵進行加成反應；或者它們也可能循一種共軛加成反應 (conjugate addition) 進行[14]。其反應如圖 2.1.12 所示：

共軛加成反應，首先會生成一可穩定共振的烯醇離子(enolate ion) 接著 α 碳產生質子化，而得到飽和的醛。

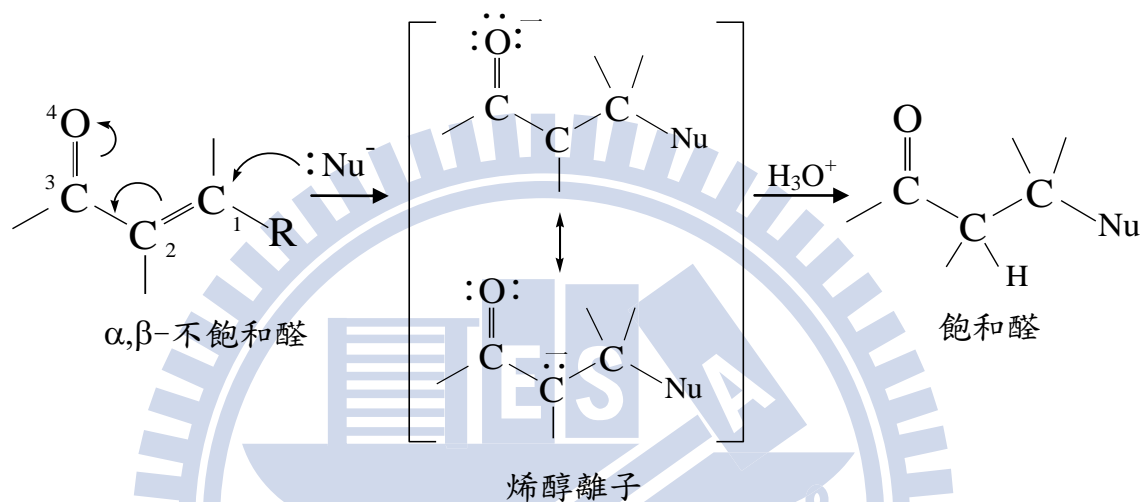


Fig 2.1.12 共軛(1,4)親核性加成反應[12]

2.1.6 醛類來源及用途

中級分子量而不形成氫鍵的天然產物通成頗具有揮發性[15]。在開的植物中，這些化合物主要的任務是吸引昆蟲、蜜蜂蝴蝶，協助傳粉作用。醛類被發現廣佈於動植物界，許多羰基化合物是香料，香劑，及酒類芬芳氣味的來源。如：樟腦 (camphor)、香草精 (vanilla)、桂皮醛 (cinnamom) 等[15]。

在工業上，常使用的醛類化合物有甲醛、乙醛及丙烯醛三種：

1. 甲醛(Mathenal,Formaldehyde)

甲醛為最簡單的醛類化合物，其反應性為醛類單一官能基化合物中最高的，於工業製程中廣泛使用。尿素甲醛樹脂、三聚氰胺樹脂、苯酚甲醛樹脂、聚氧化甲烯 (polyoxymethene, 甲醛和三環氧乙烷的聚合物)、丁二醛等均是由甲醛製造的產品，其中以合成樹脂工業以 50% 佔大部分。甲醛與甲醛衍生物的銷售價值超過 1450 億美元，佔美國與加拿大 GDP 的 1.2%。

農業、造紙業、紡織工業、染料及醫藥分析常使用甲醛為溶劑或反應物。甲醛是建築磚塊合成的重要原料；紡織業者則利用甲醛使布料具有抗皺性；甲醛也是汽車製造業關鍵原料，用來製造傳輸元件、電氣系統、發動機缸體、門板、車軸等。此外，甲醛廣泛使用於木材加工與家具製造業，甲醛與酚、尿素或三聚氰胺等生成熱固性酚醛樹脂、尿素甲醛樹脂、三聚氰胺樹脂是常使用於合板或地毯的永久性黏著劑。甲醛亦可當作濕強度 (wet-strength) 樹脂添加於衛生用紙製品如面紙、餐巾紙與滾筒衛生紙等。

甲醛有毒，40% 甲醛水溶液可作為殺菌劑或防腐劑，亦可使用於疫苗製程上，用來製造滅活細菌類毒素疫苗產品。建材常使用的甲醛樹脂，是一種比較常見室內空氣污染物有引發過敏與致癌的危險性。當空氣中甲醛濃度達 0.1ppm 時，會刺激眼睛、黏膜導致流淚，吸入過量甲醛會引起頭痛、喉嚨燒灼、呼吸困難、引發或加重哮喘症狀。因此早在 1987 年美國環保局 (U.S.EPA) 將甲醛列為人類可能致癌物，經過研究，1995 年世衛組織國際癌症研究機構 (International Agency for Research on Cancer) 亦將甲醛劃分為一可能的人類致癌物，根據進一步的信息評估與研究數據顯示，甲醛與鼻竇癌、鼻咽癌及白血病有關，在 2004 年 6 月國際癌症研究機構將其重新分類為人類致癌物質。

2. 乙醛 (Ethenal, Acetaldehyde)

乙醛主要為製造醋酸或醋酸酐、丁醛、乙酸乙烯酯、樹脂及吡啶 (pyridine) 衍生物的中間物。使用於水果或魚類的保存、酒精的變性劑、燃料組成、膠質堅固劑、皮革防霉劑以及橡膠與造紙業的溶劑等。除化學合成外，乙醛存在於碳氫化合物的氧化物、高等植物光合作用的中間產物、成熟的水果 (少量)、暴露於空氣中的酒類等。它也是人體醣類新陳代謝的中間產物，因此少量存在於血液中。資料顯示，新鮮菸草葉及其煙霧中，亦含有乙醛，與尼古丁產生協同效應，增加青少年成癮性。此外，汽機車內燃機所排放的廢氣亦含有乙醛。

乙醛是一種可能的致癌物質：國際癌症研究機構 (IRAC) 指出，在動物實驗中，有充足證據顯示乙醛的致癌性。乙醛結合蛋白質，會破壞 DNA 與造成肌肉異常發展。研究 818 位嚴重酗酒患者發現，他們在乙醇脫氫酶基因上有缺陷，因此比正常人更易在上消化道與肝臟罹患癌症。

3. 丙烯醛 (Propenal, Acrolein)

丙烯醛因具有共軛羰基與乙烯基 (vinyl group) 所以有高反應性可用來製備聚酯樹脂 (polyester resin)、聚胺基甲酸乙酯 (polyurethane)、丙二醇、丙烯酸、丙烯腈、丙三醇等，所以廣泛用於工業製程中，如紡織業、造紙業、橡膠業、製藥業、塑膠業及樹脂合成等。

丙烯醛對肺有嚴重的刺激性，也可當做催淚劑，在一次世界大戰當作生化武器使用。丙烯醛濃度達 2 ppm 對人體有立即性的傷害。2006

年 10 月，研究人員發現菸草煙霧中的丙烯醛與罹患肺癌有相當的關連性。此外，他曾被作為廢水的除臭劑。

2.2 藻類毒性試驗

2.2.1 藻類毒性試驗特性

藻類對於水中毒性則相當敏感，較常用於急毒性之生物指標。而在水體生物毒性試驗中，藻類由於下列優點而被廣泛用於進行毒性之研究：

1. 藻類在水生生態系統中是主要的生產者，且其處於食物鏈底部，若其遭受到毒性化學物質的危害，則會對水生系統之營養層級造成很大的影響。
2. 藻類的培養以及取得較其他物種容易許多，且所需要的成本較低，並可快速進行試驗，可以節省更多的時間與成本。
3. 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期或生命週期之限制。
4. 相對於魚類及無脊椎動物試驗，藻類試驗有較佳的敏感度及較優的再現。尤其於密閉式之藻類毒性試驗中[16]。

2.2.2 藻類毒性試驗物種介紹

在自然水體中存在於相當多種藻類，於標準測試方法公佈之試驗藻種也相當多，本實驗所使用之月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)屬於綠藻(Chlorophyceae)，其特色為單細胞成群但不糾結且不移動，一般細胞體積為 40 至 60 μm^3 且重量介於 10 至 20 pg/cell 之間。其體型成半月型，故稱月芽藻。此類的藻類較其他微生物試驗來的敏感[17]，這也是本研究選取此類藻類做實驗的主要原因之一。月芽藻一旦生長條件不適或遭受毒性物質危害時，其顏色會由原先的綠色轉為微黃色，因此很容易於培養中觀察。

且細胞變肥厚且半月型彎曲程度會變小，以顆粒記數器觀察其粒徑的分佈變化也可發現大粒徑的藻類分佈變多，而小顆粒的藻類分佈相對減少。實驗藻種購自於 University of Texas, Austin。

2.2.3 藻類毒性試驗

藻類毒性試驗可分為批次式和連續式兩種。而目前已有的標準藻類毒性試驗，大都屬於批次式的試驗方法，如 U.S.EPA 所採用的 Fresh water algae acute toxicity test、OECD 所採用的 Algal growth inhibition test guideline、ISO 所採用的 Water quality-algal growth inhibition test、APHA 所採用的 Toxicity testing with phyto-plankton 及 ASTM 所採用 Standard Guide for Conducting Static 96h toxicity tests with Microalgae 等。

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。若再依據試驗中與外界氣體是否有接觸而進行分類，可分成開放式批次實驗與密閉式批次實驗兩種。開放式批次實驗系統雖然可以藉由震盪與外界空氣接觸，而達到提供碳源之目的，但若考慮揮發性有機物於實驗期間的揮發行為，則在濃度上的控制將是一大難題。相反地，密閉式批次實驗並無毒物揮發之問題存在，其藻類生長所需之碳源則必須提高(基質或 headspace)。

連續式毒性試驗為控制基質以連續方式加入系統中，較符合自然水體的真實情況且代謝物亦同時流出，因此使得藻類保持於良好的生長環境之中。但是由於整體系統流量不易控制，所以目前並無一套標準的試驗方法。連續式毒性試驗又可分為恆濁器(Turbidostat)和恆化器(Chemostat)兩種。恆濁器是利用光電原理來控制，當槽內細胞密度超過穩定值時，系統將流入新鮮基質以稀釋槽內的細胞密度。恆化器是利用穩定的基質進流率，而達到系統細胞密度的穩定。

本研究使用兼具實用性、敏感性及簡便性的藻類毒性試驗法進行實驗試驗期間所需的藻類由「連續式培養方法」建立的藻液培養母槽取得，在試驗方面則採「批次 BOD 瓶式的藻類毒性試驗」進行，內容描述分別如下：

1. 連續式培養方法 (Continuous culture technique)

培養步驟可分為三，第一為藻類活化，即將保存於冰箱中含洋菜膠

的 *Pseudokirchneriella subcapitata* 活化，第二為批次培養，即經過數天活化後，將藻類加入定量的營養鹽基質的錐形瓶進行批次培養，第三為連續式培養，即待錐形瓶中藻類的數目已達最大生長量的 80%~90%(藻數約 $2.2\sim 2.8 \times 10^6$ cells / mL)時，置入於連續式培養母槽中，而營養鹽的供給主要由蠕動幫浦控制，也就是可由控制稀釋率(dilution rate, 即 $D = \text{基質流入量} / \text{反應槽體積}$ 之比值)來決定槽中細胞密度之多寡。當在低稀釋率時，會使營養鹽濃度降低，接著細胞的毒性容忍度也跟著降低，如此會導致細胞有較高的敏感性。當改變稀釋率則母槽約需 2~4 天即可達到新的 steady state。為了讓藻類達到較佳的敏感性，本實驗將稀釋率設為 0.30 day^{-1} (水力停留時間為 3.3 day) 來提供適量基質使藻類的生長與營養鹽的供給達成一動態的平衡，讓藻類在 exponential phase 和 stationary phase 可停留較久，待系統達到穩定後，即可由母槽中取出藻液進行毒性試驗而不會污染到母槽。

根據 Chen and Lin[18] 以連續式藻類母槽系統 (chemostat) 為基礎進行培養藻類，chemostat 的容量為四公升，培養期間不僅有新鮮基質流入也有代謝物的流出，此狀態與自然水體較相似，可改善了「批次式培養(batch culture)」的缺點，即可避免加入的營養鹽完全拘限在一密閉空間，而導致的匱乏和變質的現象和代謝物累積情形。

2. 批次藻類毒性試驗 (Batch of toxicity tests with microalgae)

Chen and Huang [9]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。

2.2.4 藻類反應終點

在藻類毒性試驗中，若能正確的應用試驗結果之觀測終點，即可得知藻類受到毒物影響之生長抑制情況。一般應用的藻類生長參數為：1.細胞密度 2.乾重 3.葉綠素 4.產氧量、ATP 及 DNA 等等。此外，藻類生長抑制的情形也易受儀器的精密度、敏感性、偵測極限及測量時間的影響，因此研究人員應先考慮實驗之器材及設備的可用性及性質，以減少毒性試驗結果所產生之誤差。

目前針對批次式培養之藻類毒性試驗中，多以測量生物質量(biomass)

為量測終點。所謂的生物質量即是測量生物乾重及數目。Christensen et. al. [19]認為以生物質量求得的抑制率做為觀測終點較其它參數(總細胞數目、細胞體積)為佳。但直接量測生物乾重十分費時且程序繁瑣，因此目前皆利用電子顆粒計數器、光學顆粒計數器等量測生物乾重，而這些方法不僅簡單、快速，所需的藻液量亦少，且與生物乾重間有良好的相關性。此外溶氧測定也擁有成本低廉、試驗時間短等優點。因此，本研究將以觀測藻類細胞密度(Final yield and Growth rate)及溶氧變化(DO)，以電子顆粒計數器測量細胞密度，溶氧測定儀測量藻液中溶氧量之變化量，並藉由 probit 模式將實驗結果轉變成藻類生長抑制率及斜率。

2.2.5 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。下列為本研究中所考慮之參數：

1. 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，則重復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，毒性會提高十倍左右。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 2.2.5.1 所示：

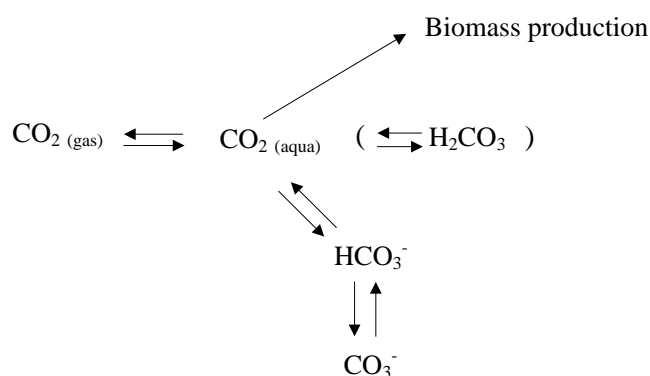


Fig 2.2.1 Carbonate system and photosynthesis method for pH balance[20]

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. [10] 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 [18] 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。

2. 光照強度

Nyholm and Kälqvist [20] 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 [22] 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。

3. 溫度

採用 U.S. EPA [22] 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。

4. 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[10]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。

5. 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 [23]，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[10] 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 PO_4^{3-} -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 NO_3^- -N 及 NH_4^+ -N 皆能被藻類吸收，在 ISO 和 OECD 用的是 NH_4^+ (NH_4Cl) 形態，U.S.EPA 用的則為 NO_3^- ($NaNO_3$) 形態。Millington et al.[24]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 [25, 26]。因此，1996 年 U.S. EPA [22] 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。

2.2.6 揮發性有機物試驗

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 [27]。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：

- (1) 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。
- (2) 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

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。
4. 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[28]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：

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

其中 penetration 最常使用的參數為 $\text{Log}K_{ow}$ ，而 interaction 則為許多不同的親電性參數，像是 pKa 以及分子軌域能量(E_{homo} 和 E_{lumo})參數等。

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：

1. 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 ($\text{log } K_{ow}$) 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」相有關。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.[29]指出擁有越高 $\text{log } P$ 的物質會增加物質在水中與生物(Biophases)的平衡時間，因而增加其 LC_{50} ratio ($24\text{h } \text{LC}_{50} / 96\text{h } \text{LC}_{50}$)。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 $\text{log } P$ ，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[28]。

2. 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。上述之所有參數皆描述一些基團 (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)。

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。

3. 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。

4. 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。

5. 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。

$$\begin{array}{ll}
 MV = MW / \rho & MW : \text{分子量} \quad \rho : \text{密度} \\
 MR = MV \times [n^2 - 1/n^2 + 2] & n : \text{折射係數} \\
 PA = MV \times \gamma^{1/4} & \gamma : \text{表面張力}
 \end{array}$$

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]。

Russom et al. [29]則將有機物分成圖2.3.3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。

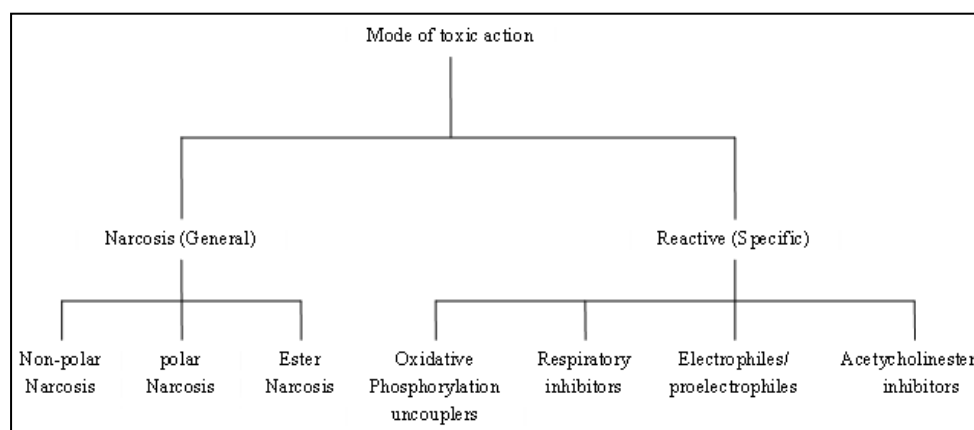


Fig 2.3.1 Classification of toxicity mechanism in aquatic toxicity tests[29]

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產生麻醉效應，但此效應於低濃度中會被許多特異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 [43]

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 -不飽和醛類之 QSAR 研究

α,β -不飽和醛類 QSAR 研究物種多樣，如 Schultz 於 2005 年[11]發表利用纖毛蟲 (*Tetrahymena pyriformis*) 來研究 α,β -不飽和化合物之 QSAR，其中包含了 14 種 α,β -不飽和醛類，其餘 α,β -不飽和化合物為酮類及酯類。研究中表示 α,β -不飽和醛類利用親脂性參數 $\text{Log } K_{ow}$ 及電性參數羰基上碳與氧之間部份電荷差值 ($Q_{C2}-Q_{O1}$) 來與纖毛蟲毒性數據進行回歸，如下所示：

$$\text{Log}(\text{IGC}_{50}^{-1}) = 0.279(\text{log } K_{ow}) - 140.7(Q_{C2} - Q_{O1}) + 70.3$$
$$n = 14; \quad r^2 = 0.868$$

$\text{Log}(\text{IGC}_{50}^{-1})$ ：纖毛蟲毒性倒數後取對數；(單位：mM)； n ：樣品數
 r^2 ：相關性係數平方

由以上回歸式可發現，親脂性參數 $\text{Log } K_{ow}$ 及羰基上碳與氧之間部份電荷差值 ($Q_{C2}-Q_{O1}$) 此二項物化參數對於纖毛蟲毒性上回歸相關性佳 ($r^2=0.868$)，表示 α,β -不飽和醛類其毒性作用機制為毒物侵入纖毛蟲細胞膜產生毒性以及醛類羰基 ($\text{C}=\text{O}$) 上反應性與纖毛蟲體內親核性物質作用產生毒性。

另外 Yarbrough 與 Schultz 於 2007[41]發表了一篇有關於 α,β -不飽和化合物對於替代型親核試劑 (穀胱甘肽; GSH) 之間反應性與纖毛蟲毒性上之關係，於裡面 41 種化合物中包含了 7 種 α,β -不飽和醛類，其回歸方程如下：

$$\text{Log}(\text{IGC}_{50}^{-1}) = 0.936(\text{log } RC_{50}^{-1}) + 0.508$$
$$n = 41; \quad r^2 = 0.846$$

$\text{Log}(\text{IGC}_{50}^{-1})$ ：纖毛蟲毒性倒數後取對數；(單位：mM)； n ：樣品數
 r^2 ：相關性係數平方

由以上回歸式可發現其親電性參數 ($\text{Log } RC_{50}^{-1}$) 對於含有不飽和鍵化合物纖毛蟲毒性數據之間回歸相關性佳 ($r^2=0.846$)，表示對於含有不飽和鍵之化合物，其對於纖毛蟲毒性作用機制可能為不飽和鍵與纖毛蟲體內親核性物質 (如穀胱甘肽; GSH) 反應後，造成纖毛蟲毒性產生。

除了纖毛蟲研究外，Chan K. [7]於2008年利用老鼠肝細胞毒性 (hepatocyte Toxicity) 來研究 α,β -不飽和醛類之QSAR，其選用了11種 α,β -不飽和醛類。利用硬親電性參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 與老鼠肝細胞毒性回歸其回歸方程如下：

$$\text{Log} (LC_{50}) = 2.181 - 0.332 \log K_{\text{NH}_2}$$
$$n = 11; \quad r^2 = 0.742$$

$\text{Log} (LC_{50})$ ：老鼠肝細胞毒性取對數；(單位： μM)； n ：樣品數
 r^2 ：相關性係數平方

其中親電性參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 為測定醛類羰基 ($\text{C}=\text{O}$) 與替代型硬親核試劑 (丁胺；Butylamine) 之間反應能力為二階反應速率常數 (K_{NH_2})，將其作用結果利用 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 表示；單位為 ($\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)。若此數值越高表示其醛類越容易與生物體內硬親核試劑作用產生希夫式鹼的形成 (Schiff-base formation)，造成生物體致癌性、皮膚過敏性，肝細胞毒性和致突變性等產生。

由以上回歸式可發現，硬親電性參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 與老鼠肝毒性數據之相關性不差 ($r^2 = 0.742$)，表示造成造成老鼠肝細胞毒性的作用機制，可能為醛類羰基 ($\text{C}=\text{O}$) 與老鼠肝細胞作用產生希夫式鹼 (Schiff-base)，使得老鼠肝細胞產生病變。

α,β -不飽和醛類 QSAR 廣泛研究於不同物種上 (如：纖毛蟲、或老鼠肝細胞等)，對於藻類毒性上的研究仍就缺乏，因此以密閉性藻類毒性實驗研究 α,β -不飽和醛類之 QSAR，以溶氧變化量 (ΔDO) 及藻類細胞密度 (Final Yield) 及藻類細胞生長率 (Growth Rate) 作為試驗終點求得各毒性物質之半致死濃度 (EC_{50})，可做為毒性資料庫之數據以利更完善的評估。

三、基本理論

3.1 毒性試驗終點

藻類毒性試驗終點可分為兩種：(一)利用含有藻類溶液的溶氧濃度變化(Delta DO, ΔDO)，討論有機物毒性對藻類光合作用的影響 (二)利用藻細胞顆粒數的變化，討論有機物毒性對藻類 growth rate 和 final yield 的影響。以下說明各種抑制率的算法：

1. 以溶氧濃度變化為觀測終點時，毒物對藻類 ΔDO 的抑制率算法：

$$\text{Inhibition rate on } \Delta DO = 1 - \frac{\Delta DO_t}{\Delta DO_c}$$

ΔDO_t ：為有添加毒物的處理組藻類於四十八小時後的溶氧變化值

ΔDO_c ：為無添加毒物的控制組藻類於四十八小時後的溶氧變化值

2. 本研究進行藻類毒性試驗初期的植種藻細胞數為 15000 cells/ml，因此以藻細胞顆粒數的變化為觀測終點時，毒物對藻類 growth rate 的抑制率算法：

$$\text{Inhibition rate on growth rate} = 1 - \frac{\ln\left(\frac{N_t}{15000}\right)}{\ln\left(\frac{N_c}{15000}\right)}$$

N_t ：表示有添加毒物的處理組藻細胞顆粒數

N_c ：表示無添加毒物的控制組藻細胞顆粒數

3. 本研究主要針對有機物毒性對藻類 final yield 的影響，在不同濃度下有機物對藻類 final yield 的抑制率算法如下：

$$\text{Inhibition rate on growth rate} = 1 - \frac{N_t - 15000}{N_c - 15000}$$

N_t :表示有添加毒物的處理組藻細胞顆粒數

N_c :表示無添加毒物的控制組藻細胞顆粒數

3.2 常用的單一毒性模式

受測試生物受到毒性物質作用時，所受影響或死亡之百分率，會隨著毒性物質濃度成 S 型曲線關係，稱為濃度反應關係，若已知毒物進入生物體內的量，則可稱為劑量反應關係(Dose-response curve)，其中 x 軸為有機物濃度，而 y 軸為反應百分比。在毒性試驗過程中，受測生物受毒性影響造成 50% 抑制或死亡，則稱為 EC_{50} (Effect Concentration 50%) 或 LC_{50} (Lethal Concentration 50%)。

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})。

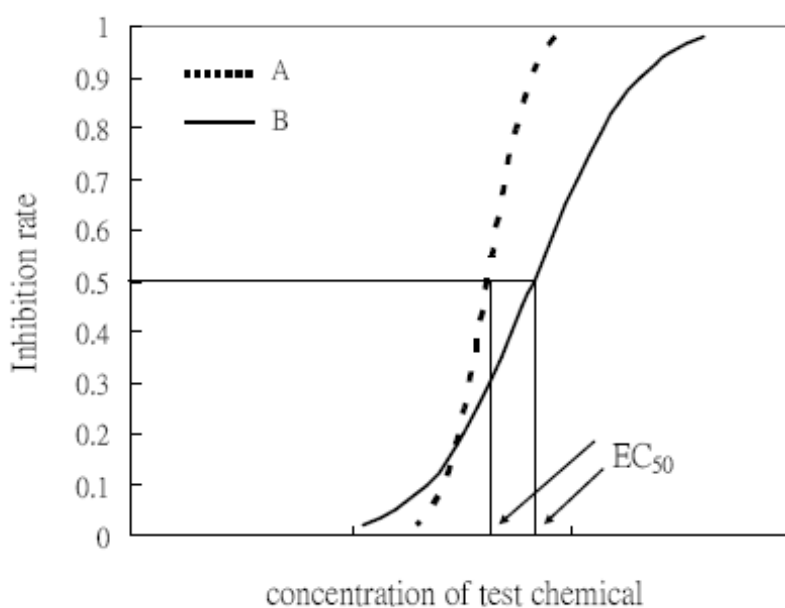


Fig 3.2.1 Dose-response curve of common toxicity test

由於欲從原來數據直接求得 EC50 並不容易，通常必須藉由數學關係式將 S 型轉為以便求取，這也必須藉由數學轉換模式以便求取，此種數學轉換模式便稱為劑量反應關係模式，一般常用的劑量反應關係模式分為 Probit、Weibull 與 Logit 三種，而表 3.2.1 針對 Weibull、Probit 與 Logit 三種模式的容忍度分布公式。下列為常用模式之解釋：

1. Probit：為最常用的劑量-反應(dose-response)模式，其假設生物對毒性物質的容忍度分布為常態分布(Log-normal distribution)，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。在 Probit 轉換式中，毒性物質之 S 型濃度反應曲線先轉換成 NED(Normal Equivalent Deviation)scale 之直線，其中 50 %抑制率(P)對應至 NED scale 上時為 0，而 84.1% 則對應為 1，而 NED scale 的座標值加上 5 即為 Probit 座標之概率單位 Y 值 ($Y = \text{NED} + 5$)，當 $Y = 5$ 時表示一半的測試生物受到毒性物質抑制，此時對應的毒物濃度就是 EC50。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。

2. Weibull：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，logit 模式相同皆假設毒性物質會在生物體內受體產生化反應。
3. Logit：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

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

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	$Y = \alpha + \beta \log(z)$	$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2})$	$\int_{-\infty}^{Y-5} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2} (1 + \operatorname{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$
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	$\int_{Y-5}^{\infty} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2} (1 - \operatorname{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$	$Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(2p - 1)$	$Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(1 - 2Q)$
Logit	$\frac{1}{1 + e^{\theta} z^{\phi}} = \frac{1}{1 + e^t}$	$1 = \ln(\frac{P}{1 - P})$	$1 = \ln(\frac{1 - Q}{Q})$

3.3 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，當系統達到平衡（Steady State）時：

1. 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。

2. 由反應槽內之基質平衡可得下式：

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

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

當系統達平衡時，

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

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

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



四、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 (M Ω -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 100 rpm，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。
5. 紗布：藻類於批次培養時，使用消毒紗布覆蓋在三角錐瓶瓶口，其用意為防止異物進入並便利空氣中之 CO_2 流通而提供藻類生長所需之碳源。每次使用前皆經過滅菌斧殺菌。
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。需定時以泡沫流量計校正流量。
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 μ m 標準顆粒乳液來校正。配有 50 及 100 μ m 孔徑之玻璃管。本實驗使用 100 μ m 孔徑之玻璃管，量測之顆粒直徑範圍為 2 μ m~60 μ m
14. 電腦及分析軟體：使用桌上性電腦，視窗 XP (WindowsXP) 之程式並配合電子顆粒計數器所需之軟體 (Multisizer Accucomp V. 2.01) 來進行顆粒計數之分析。使用時可直接將電子顆粒計數器之數值輸送至電腦中進行分析。
15. 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。
16. 光度測定計：使用 TOPCON 產牌，型號 IM-2D，單位為 lux。
17. 酸鹼度 (pH) 測定儀：使用 Suntex 公司，Model SP-2500 之 pH 測定儀。其精確度為 ± 0.01 。
18. 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 0.0~60.0mg/L 精準度為 $\pm 0.1\%$ 。

19. 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 6m³。用於降低營養基質中之溶氧值，並確保能提供足夠之碳源。鋼瓶上備有一流量計，曝氣時之曝器流量控制在 600ml/min。
20. 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。
21. 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。
22. 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。
23. 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。
24. 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 0.0521m³。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。
25. 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。
26. 分析天秤：量測藥品用，產牌 Precisa 205A，精確度至 0.01mg。
27. 定量吸管：使用 SOCOREX 公司，可調式移液器，容量為 100~1000μl 及 0.1~5 ml 兩種。
28. 濾膜：使用之濾膜分成兩種，過濾營養基質時使用 Gelman Science 九型號 66191 之 0.45μm 濾膜，過濾 Isoton II 時使用 60301 之 0.2μm 濾膜。
29. 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}、C'_{carb} 部分電荷值(Q₁)、O'_{carb} 部分電荷值(Q₂)，以 ChemOffice 軟體建立所需要的輸出檔，再將

其輸入 MOPAC 計算而得。以 ChemOffice 軟體建立所需要的輸出檔再將其輸入 MOPAC 計算而得。

30. QSAR 中物化參數分析統計軟體 Minitab 15 版統計軟體。

31. 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。藥品 (stock solution) 配置後，利用總有機碳(TOC)分析儀器校正 stock solution 濃度。



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 培養基質的配製

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 1 公升。接著以 0.1 N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養基質之 pH 值調至 7.50 ± 0.10 。

- (1) 硝酸鈉貯備液：溶解 12.750 g NaNO_3 於 500 ml 去離子水。
- (2) 氯化鎂貯備液：溶解 6.082 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水。
- (3) 氯化鈣貯備液：溶解 2.205 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水。
- (4) 微營養鹽貯備液：溶解下列所有藥品於 500 ml 去離子水。

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

- (5) 硫酸鎂貯備液：溶解 7.35 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水中。
- (6) 磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522 g K_2HPO_4 於 500 ml 去離子水中。
- (7) 碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g NaHCO_3 於 500 ml 去離子水中。

其中微營養鹽貯備液中，EDTA 分別有 100% 及 0% 二種。100% 是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時也使用 100%，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。最後配成之營養基質，所含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 $0.45 \mu\text{m}$ 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 (µg/L)	element	Final conc. (µg/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	0.04
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	300		

4.4 試驗毒物

本研究主要是利用BOD瓶進行十四種 α,β -不飽和醛類的藻類毒性試驗，試驗共進行二次以上操作，每一操作為三重複，每一重複為七組不同濃度及一組控制組，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4.4.1。

4.5 實驗前準備

1. 玻璃器皿

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，之後再以自來水沖洗5至6次後，再的去離子水沖洗3至4次，至入烘箱中以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，1.1Kg/cm²、121°C的條件滅菌15分鐘(定量瓶於泡酸液清洗完後，置於架上陰乾即可)

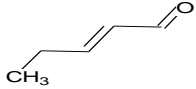
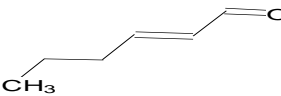
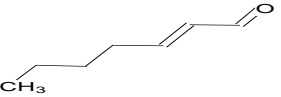
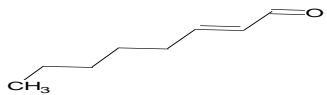
2. 藻類之培養及保存

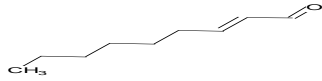
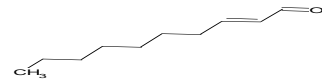
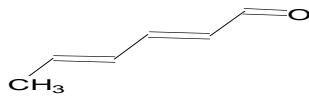
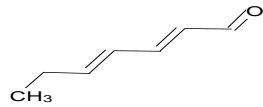
開始時先進行固態培養基的培養，固態培養基組成和液態培養基相同但加1%之洋菜膠(Agar)，通常可保存約6個月(在4°C下)。藻類每四個星期移植至新的培養皿以保持菌種的健康。另外也做液態培養基的培養，通常可保存4個星期(4°C下)，四個星期後繼續做移植以保存菌種。

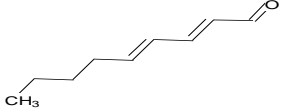
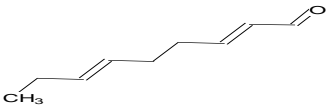
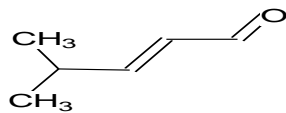
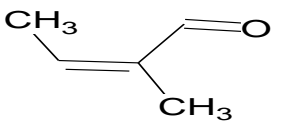
3. ISOTON II 之配製及電子顆粒計數器之操作

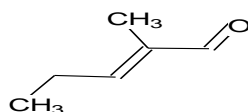
ISOTON II 之作用主要是作為電子顆粒計數器之導電溶液，也就是說，電子顆粒計數器中所用之溶液皆為ISOTON II。ISOTON II 的配製比例為1公升的超純水中加入10g 氯化鈉(NaCl)，攪拌使其混合均勻，然後以電導計測量其導電度，所需要之導電度為17mmho。若是導電度低於17mmho，則再慢慢加入氯化鈉，攪拌均勻，直到導電度為17mmho；相反的，如果導電度超過了17mmho，則慢慢加入超純水，攪拌均勻，直到導電度降至17mmho。待導電度達17mmho 後再以0.2 μ m 之濾膜過濾此溶液其濾液即是我們所要之ISOTON II 溶液，以顆粒計數器量測到之食鹽顆粒數空白值須小於200。

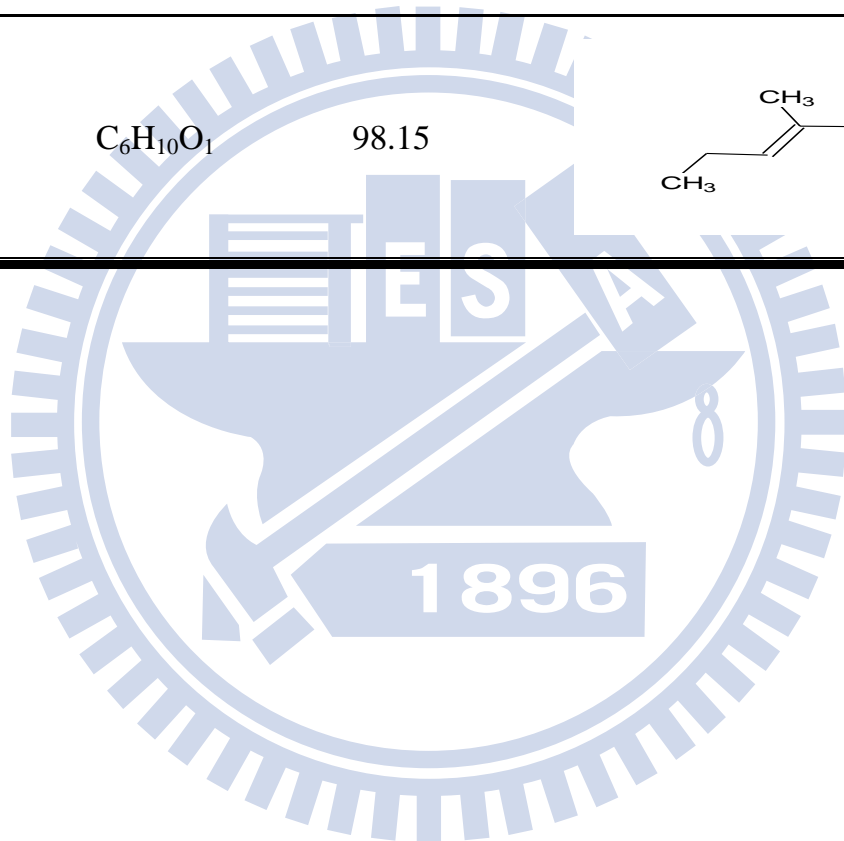
Table 4.4.1 Physical and chemical characteristic of α,β -unsaturated aldehydes

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Log P	Solubility at 25°C (mg/L)
tr-2-pentenal	1576-87-0	C ₅ H ₈ O ₁	84.12		1.09	14980
tr-2-hexenal	6728-26-3	C ₆ H ₁₀ O ₁	98.15		1.58	5261
tr-2-heptenal	18829-55-5	C ₇ H ₁₂ O ₁	112.17		2.07	1810
tr-2-octenal	2548-87-0	C ₈ H ₁₄ O ₁	126.20		2.57	612.7

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Log P	Solubility at 25°C (mg/L)
tr-2-nonenal	18829-56-6	C ₉ H ₁₆ O ₁	140.23		3.06	204.9
tr-2-decenal	3913-81-3	C ₁₀ H ₁₈ O ₁	154.25		3.55	67.82
2,4-hexadienal	142-83-6	C ₆ H ₈ O ₁	96.13		1.37	8135
tr,tr-2,4-heptadienal	4313-03-5	C ₇ H ₁₀ O ₁	110.16		1.86	2805

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Log P	Solubility at 25°C (mg/L)
tr,tr-2,4-nonadienal	5910-87-2	C ₉ H ₁₄ O ₁	138.21		2.84	318.8
tr-2,cis-6-nonadienal	557-48-2	C ₉ H ₁₄ O ₁	138.21		2.84	318.8
4-methyl-2-pentenal	5362-56-1	C ₆ H ₁₀ O ₁	98.15		1.51	6079
tr-2-methyl-2-butenal	497-03-0	C ₅ H ₈ O ₁	84.12		1.15	13420

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Log P	Solubility at 25°C (mg/L)
2-methyl-2-pentenal	623-36-9	$C_6H_{10}O_1$	98.15		1.64	4710



4. 電子顆粒計數法及操作原理

電子顆粒計數器在使用前須先暖機約半小時以使機器內之管路可抽至真空狀態，使用前後皆須流洗管路，並補充上方之300ml ISOTON 抽取溶液。在電子顆粒計數器內有一根玻璃管，操作中需浸入含有Isoton 稀釋樣品的燒杯中。而在玻璃管近底端的側面具有半透膜的精密小圓孔，用以吸取水樣。在玻璃管內外各有一電極片通以直流電，當水樣中所含之顆粒經過圓孔時，會暫時性地干擾到電流，其干擾正比於每個顆粒的大小。所產生的電阻則由示波器的波峰顯示，其高度正比於顆粒的多少，個別的脈衝數由電子數位器直接記錄顯示。而水樣在量測的過程須加以攪拌以使顆粒均勻分佈。電子顆粒計數法適用於單顆粒藻類之計數，*Pseudokirchneriella subcapitata*。電子顆粒計數器主要條件設定如下表4.5.1。本實驗採用50 μ m 孔徑之毛細玻璃管，其設定之量測粒徑上下限為2.622 μ m 至30 μ m。量測時所取之藻液量依生長情形而定，若藻液色澤較深時則取1 ml，若藻液色澤較淺則取5 ml，放入50 ml 之量瓶內，再加入 Isoton 至50 ml。將之倒入燒杯，放進顆粒計數器內量測。以顯示之讀數值扣除空白顆粒數之數值（純Isoton 之背景值），連續三次其值相差在2% 者之平均值為量測值。

Table 4.5.1 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

5. 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和錫箔紙，組裝於震盪器四周，調整木板大小及形狀，使整個震盪器盤面光度落在 $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之範圍內，以減少實驗之誤差。

6. 溶氧測定儀之校正

本研究以溶氧為試驗終點時需記錄實驗之初始溶氧與48 小時恆溫震盪實驗後之最終溶氧，進而將溶氧增加量與控制組比較計算出不同處理濃度之抑制率。使用溶氧測定儀之前須先將其偵測頭以去離子水沖洗充分濕潤後，放置一段時間觀測其在空氣中之飽和溶氧量是否為8.5 mg/L 上下，若其值相去甚遠則需進行校正，校正方法為將電極置於2.5 公分左右水量之BOD 瓶（可視同100%溼度），轉鈕至校正鍵，輸入校正值（100 %）確認後轉回一般測定鍵，連續反覆校正三次。每月定期更換CLARK-TYPE 薄膜與3M 氯化鉀電解質；若有必要時，需以亞硫酸鈉30%將PROBE表面清洗乾淨，不要殘留任何化學物質，而得0%之DO 溶液，進行零點校正。

4.6 實驗步驟

4.6.1 連續式母槽之培養

本實驗選擇以連續式母槽培養方法配合批次式藻類毒性試驗，以下將介紹連續式母槽培養之方法與步驟。

1. 連續式藻類培養之步驟如下：

- (1) 接種環以酒精燈滅菌後，刮取固態培養基上之藻種些許，將其放入250ml 錐形瓶中加入基質（含100% EDTA）至100ml，錐形瓶瓶口封上滅菌紗布後放到震盪器上震盪以活化藻類。
- (2) 當250ml 錐形瓶中之瓶藻類生長至一定大小(顏色明顯變綠)時，將之倒入1000 ml 錐形瓶中加入900ml 基質培養，形成1000ml批次式培養。
- (4) 當1000 ml 錐形瓶中之藻類生長至一定數目時即可將之到入5公升之連續式培養母槽中，並加入3公升之基質。通常2~3 天後藻細胞數目達到一定數目後即可開始入流新鮮基質。
- (3) 每日皆需配製約1~2公升新鮮之基質(含10% EDTA)提供藻類充足之養份，確實測量溢流率以調整pump進流速度至液流率為1000ml/day 為準，並每日量測連續式培養母槽中藻細胞之細胞密度（Cell Density）、平均細胞體積（Mean Cell Volume）以了解藻類之生長情況。
- (4) 當母槽之Cell Density 達到 $1.7\sim 2.2 \times 10^6$ cells/ml，MCV 值達到39~46時即可自母槽取出藻液開始進行毒性試驗。

2. 藻類培養環境設計如下：

5 公升之連續式培養母槽及裝營養基質之廣口瓶、無菌膠管等經過清洗、殺菌之後，置於 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 之溫度控制室中，並將連續式培養母槽放置在磁石攪拌器上連續攪拌，攪拌具有混合和避免藻類沈澱之功能，能使藻液和加入之營養鹽以及曝氣之氣體均勻的混合。連續式培養母槽所需之燈光由一方照射，使用白冷光燈，其光照強度為 4300 ± 10

%lux。本實驗中，連續式培養母槽之曝氣設備所提供之曝氣量為250 ml/min，且空氣進入母槽之前先經洗滌瓶和空氣濾膜，以去除空氣中之雜質，並藉此濕潤空氣。

4.6.2 藻類毒性試驗

當母槽之Cell Density 達到 $1.7\sim 2.2 \times 10^6$ cells/ml，MCV 值達到 39~46 時，就可以做密閉式藻類毒性試驗。首先必須配置稀釋水，接下來以二氧化碳 (CO₂) 及氮氣 (N₂) 之混合氣進行曝氣約十五分鐘，曝氣步驟可以降低營養基質中之溶氧值使初始溶氧降低至1.0 mg/l 上下並增加其CO₂濃度。並且由母槽所測得之藻細胞數換算得到欲使每個BOD 瓶初始細胞密度為 1.5×10^4 cells/ml 所需加之藻液量，隨後自培養母槽中取出適量之藻液，分別加入各個BOD 瓶內。隨後加入曝氣好之純水，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。之後一一測量每個BOD 瓶之初始溶氧值並紀錄之，BOD 瓶測完溶氧後以瓶蓋進密封以達到水封之目的，然後將BOD 瓶置於震盪器上震盪48 小時。實驗條件控制在溫度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，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。於48 個小時後BOD 瓶自震盪器上取下，隨後量測各個BOD 瓶中之最終溶氧值 (Final DO, DO_f)。由最終溶氧值減掉初始溶氧值可得到一溶氧差，為淨溶氧值 (ΔDO)。測完溶氧後接著利用顆粒計數器測量每個BOD 瓶的藻類細胞密度。透過劑量反應關係模式之分析可以得到以淨溶氧差值 (ΔDO) 以及藻細胞密度為試驗終點之EC50 值，並可以得到毒性物質與藻類之劑量反應關係圖。

每一化合物至少做兩次以上的試驗，第一次會先做 range finding，找出其可能的濃度抑制範圍，接著才做確定試驗。而每一組試驗中做七個濃度，包含控制組就有八瓶，每一濃度做三重複，而控制組是不加任何毒性物質的。

4.7 RC₅₀ 反應性參數值實驗

此反應性參數值實驗 (RC₅₀) 為參照 Schultz 此作者於 2005[11] 年所發表之實驗方式所進行，主要實驗流程如 Fig 4.7.1 所示。

實驗步驟如下：

1. 配製磷酸緩衝溶液 (buffer)：將 9.38 g KH₂PO₄ 與 9.98 g Na₂HPO₄ 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 RC₅₀ 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 一個加入 GSH，另一個只有磷酸緩衝溶液 (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 GSH 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。

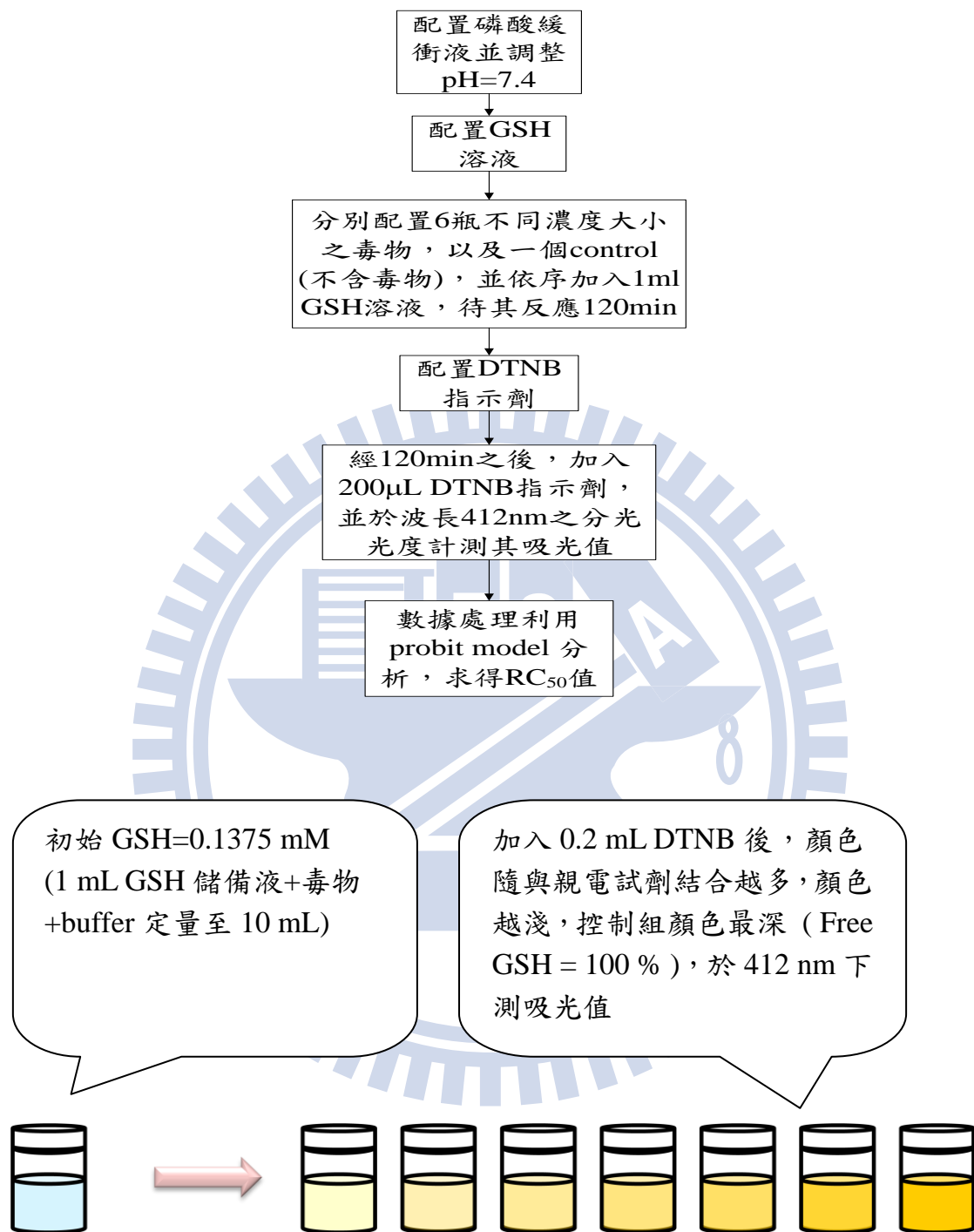


Fig 4.7.1 The flow chart of RC₅₀ experiment

4.8 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：

- (1) 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
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) 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。

五、結果與討論

5.1 藻類毒性試驗

5.1.1 藻類毒性試驗結果

本研究以十三種 α,β -不飽和醛類試驗毒物、月芽藻為測試物種，進行密閉式藻類毒性試驗，以三種反應終點—DO (delta DO)、FY (Final Yield) 及 GR (Growth Rate)，觀察此類化合物對月芽藻之毒性影響，實驗結果見 (Table 5.1.1)。

實驗求得各反應終點之 EC_{50} 如 Table 5.1.1 所示 (原始數據及濃度—反應關係曲線參見附錄一)，比較三種反應終點對毒性之敏感度，以整理觀察得知 (Fig 5.1.1) 以 FY 之敏感度為最高、其次為 DO，GR 之敏感度為最低。

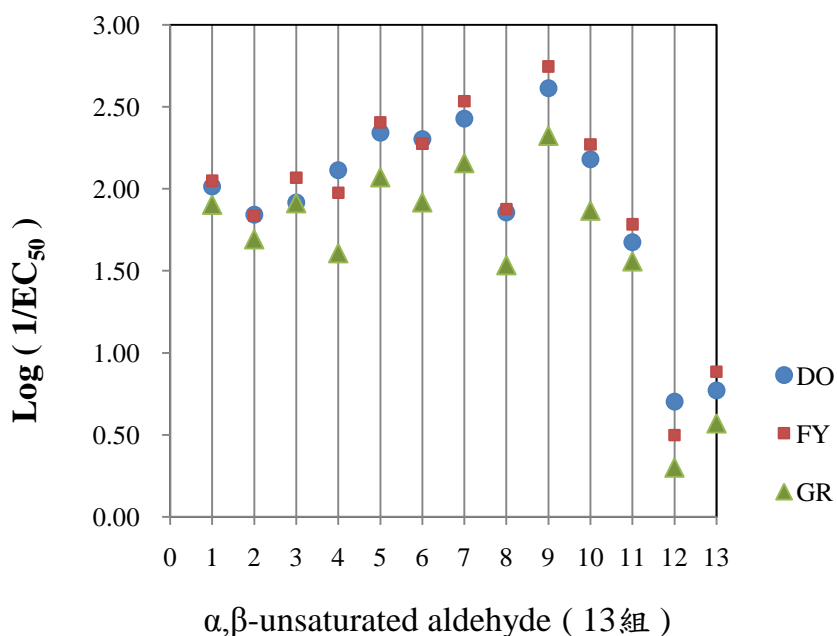


Fig 5.1.1 α,β -unsaturated aldehydes sensitivity of toxicity

Table 5.1.1 Toxicity of α,β -unsaturated aldehydes

Compound	Log (1/EC ₅₀) Delta DO (mM)	Log (1/EC ₅₀) Final Yield (mM)	Log (1/EC ₅₀) Growth Rate (mM)	LogK _{ow}
tr-2-pentenal	2.01	2.05	1.90	1.09
tr-2-hexenal	1.84	1.84	1.69	1.58
tr-2-heptenal	1.92	2.07	1.91	2.07
tr-2-octenal	2.11	1.98	1.61	2.57
tr-2-nonenal	2.34	2.40	2.07	3.06
tr-2-decenal	2.30	2.28	1.92	3.55
2,4-hexadienl	2.43	2.53	2.16	1.37
tr,tr-2,4-heptadienal	1.86	1.88	1.54	1.86
tr,tr-2,4-nonadienal	2.61	2.75	2.32	2.84
tr-2,cis-6-nonadienal	2.18	2.27	1.87	2.84
4-methyl-2-pentenal	1.68	1.78	1.56	1.51
2-methyl-2-pentenal	0.70	0.50	0.30	1.15
tr-2-methyl-2-butenal	0.77	0.88	0.57	1.64

5.1.2 急慢性毒性比 ACR (Acute to Chronic toxicity ratio)

由於慢性毒性試驗所需時間、成本及人力皆較急性毒性試驗來得多，且毒性化學物質於環境危害之評估上，缺乏長時間暴露之慢性毒性實驗數據，因此以急慢性毒性比去推估慢性毒性之影響，極為重要。ACR 值之計算為急性毒性除以慢性毒性，本研究以藻類毒性試驗各反應終點之 EC_{50} 為急性毒性結果 NOEC 及 EC_{10} 則作為慢性毒性結果，以求得 ACR 值。

Table 5.1.1 為藻類毒性試驗各反應終點之 ACR 值，以 $EC_{50}/NOEC$ 來計算 ACR 值，平均上為 2.45~4.68，以 EC_{50}/EC_{10} 計算平均則為 2.95~4.44，反應終點 (DO) ACR 值為最高，反應終點 (DO) ACR 值為最低。研究中以不同反應終點及計算方式求得之 ACR 平均值為 3.59，而大部分實際應用上所使用之值為 10，為合理範圍之內。

Table 5.1.1 The ACR values based on three endpoints

化合物	$EC_{50}/NOEC$			EC_{50}/EC_{10}		
	DO	FY	GR	DO	FY	GR
tr-2-pentenal	1.95	1.81	2.52	1.87	1.71	1.74
tr-2-hexenal	2.83	2.86	3.97	2.59	3.50	2.68
tr-2-heptenal	1.98	1.40	2.00	1.70	1.90	1.99
tr-2-octenal	1.26	3.47	8.07	1.41	3.55	6.00
tr-2-nonenal	3.70	6.40	6.90	2.79	4.92	5.96
tr-2-decenal	2.03	2.15	4.89	1.08	7.78	4.64
2,4-hexadienl	2.51	3.92	4.66	4.52	3.41	5.28
tr,tr-2,4-heptadienal	3.93	3.75	4.12	3.73	3.80	3.94
tr,tr-2,4-nonadienal	1.14	1.69	4.46	5.01	5.64	10.46
tr-2,cis-6-nonadienal	2.71	4.39	5.55	2.91	3.80	6.77
4-methyl-2-pentenal	1.93	6.01	2.52	3.23	2.43	2.37
2-methyl-2-pentenal	3.92	3.14	4.94	3.37	2.04	2.11
tr-2-methyl-2-butenal	1.96	3.01	6.19	4.17	2.74	3.75
平均	2.45	3.39	4.68	2.95	3.63	4.44

Table 5.1.2 NOEC, LOEC and EC₁₀ based on three endpoints

化合物	DO			FY			GR		
	NOEC	LOEC	EC ₁₀	NOEC	LOEC	EC ₁₀	NOEC	LOEC	EC ₁₀
tr-2-pentenal	0.42	0.83	0.44	0.42	0.83	0.44	0.42	0.83	0.60
tr-2-hexenal	0.50	1.00	0.55	0.50	1.00	0.41	0.50	1.00	0.74
tr-2-heptenal	0.69	1.38	0.80	0.69	1.38	0.51	0.69	1.38	0.69
tr-2-octenal	0.77	1.54	0.69	0.39	0.77	0.38	0.39	0.77	0.52
tr-2-nonenal	0.17	0.35	0.23	0.09	0.17	0.11	0.17	0.35	0.20
tr-2-decenal	0.38	0.76	0.71	0.38	0.76	0.11	0.38	0.76	0.40
2,4-hexadienl	0.14	0.29	0.08	0.07	0.14	0.08	0.14	0.29	0.13
tr,tr-2,4-heptadienal	0.39	0.78	0.41	0.39	0.78	0.39	0.78	1.56	0.81
tr,tr-2,4-nonadienal	0.29	0.59	0.07	0.15	0.29	0.04	0.15	0.29	0.06
tr-2,cis-6-nonadienal	0.34	0.68	0.31	0.17	0.34	0.19	0.34	0.68	0.28
4-methyl-2-pentenal	1.08	2.15	0.64	0.27	0.54	0.67	1.08	2.15	1.14
2-methyl-2-pentenal	4.25	8.50	4.94	8.50	17.0	13.1	8.50	17.0	19.9
tr-2-methyl-2-butenal	8.50	17.0	3.99	4.25	8.50	4.67	4.25	8.50	7.02

NOEC、LOEC 及 EC₁₀ 單位 : mg/L

5.1.3 其他毒性試驗物種之比較

1. 與其他物種之間相關性

以月芽藻之毒性結果與其他物種之毒性進行相關性分析，所得之相關係數 (r^2)，如Table 5.1.3所示。

可觀察出月芽藻與肝毒性及纖毛蟲毒性之 r^2 值二者皆落在六成到七成範圍之間，造成此現象原因為醛類對於各種不同物種主要毒性作用機制不同而產生差異，其另一個原因可能為本研究所使用之毒物：醛類其為一個極度易揮發性物質，其實驗過程中易暴露於空氣中而導致毒性濃度降低故在本研究所使用密閉式藻類實驗方法可克服此問題，並且在配置毒物儲備液時 (stock solution) 也將其利用TOC定量藉此克服藥物在配置儲備液時所造成的濃度損失，將其揮發性毒物所產生之誤差降至最低。此現象推測可能也是藻類毒性數據與肝毒性及纖毛蟲毒性所產生之差異原因之一。

2. 敏感度比較

以藻類毒性試驗各反應終點與不同試驗物種，比較不同物種對 α, β -不飽和醛之毒性，如 Table 5.1.4：纖毛蟲 (*Tetrahymena pyriformis*) 40 h 之 EC_{50} (50% Effective Concentration) [42]、老鼠肝細胞 (Rat hepatocyte) 之 LC_{50} [7]，毒性數值單位為 mM，並將此值之倒數取對數 $\text{Log} [1/(\text{毒性值})]$ 比較物種間敏感度及相關性。

Table 5.1.4 中，根據藻類及各物種之毒性 (表中呈現之值越大毒性越強) 進行敏感度排序，利用 Excel 以各化合物對不同物種之毒性排序取平均值，將此平均值排序而得到物種敏感度排序。根據敏感度排序 (高至低)：藻類 FY > 藻類 DO > 藻類 GR > 纖毛蟲 > 肝細胞。

Table 5.1.3 Coefficients of determination (r^2) for toxicity of algae and other species

月芽藻	纖毛蟲 (13)	肝細胞 (7)
DO	0.708	0.678
FY	0.667	0.764
GR	0.627	0.660

()：括弧內代表數據組數

Table 5.1.4 In comparison of toxicity with other species

Compound	Log (1/EC ₅₀) Delta DO (mM)	Log(1/EC ₅₀) Final Yeild (mM)	Log (1/EC ₅₀) Growth Rate (mM)	Log (1/IGC ₅₀) <i>Tetrahymena pyriformis</i> (mM)	Log (1/LC ₅₀) <i>Cytotoxicity</i> (mM)
tr-2-pentenal	2.01	2.05	1.90	0.66 ^a	0.643 ^c
tr-2-hexenal	1.84	1.84	1.69	0.76 ^a	0.619 ^c
tr-2-heptenal	1.92	2.07	1.91	1.05 ^a	0.823 ^c
tr-2-octenal	2.11	1.98	1.61	1.20 ^a	0.730 ^c
tr-2-nonenal	2.34	2.40	2.07	1.60 ^a	0.886 ^c
tr-2-decenal	2.30	2.28	1.92	1.85 ^a	-
2,4-hexadienl	2.43	2.53	2.16	0.75 ^a	-
tr,tr-2,4-heptadienal	1.86	1.88	1.54	0.86 ^a	-
tr,tr-2,4-nonadienal	2.61	2.75	2.32	1.22 ^a	0.959 ^c
tr-2,cis-6-nonadienal	2.18	2.27	1.87	1.34 ^a	0.745 ^c
4-methyl-2-pentenal	1.68	1.78	1.56	0.82 ^b	-
2-methyl-2-pentenal	0.70	0.50	0.30	-0.14 ^a	-
tr-2-methyl-2-butenal	0.77	0.88	0.57	-0.02 ^a	-
敏感度平均	1.90	1.94	1.65	0.92	0.772
敏感度排名	2	1	3	4	5

^a[42] ; ^b[11] ; ^c[7]

5.2 反應性參數試驗結果 (RC₅₀)

Table 5.2.1 Reactivity of Aldehydes for RC₅₀

Compound	RC ₅₀ (mM)	文獻 RC ₅₀ (mM)	Log (1/RC ₅₀)
tr-2-pentenal	0.15	0.78 ^a	0.83
tr-2-hexenal	0.27	0.76 ^a	0.58
tr-2-heptenal	0.28	-	0.55
tr-2-octenal	0.28	0.28 ^b	0.55
tr-2-nonenal	0.27	-	0.57
tr-2-decenal	0.48	-	0.32
2,4-hexadienl	1.40	1.52 ^b	-0.15
tr,tr-2,4-heptadienal	1.35	-	-0.13
tr,tr-2,4-nonadienal	0.55	-	0.26
tr-2,cis-6-nonadienal	0.29	-	0.53
4-methyl-2-pentenal	0.34	1.10 ^a	0.47
2-methyl-2-pentenal	13.8	-	-1.14
tr-2-methyl-2-butenal	16.6	21.0 ^a	-1.22

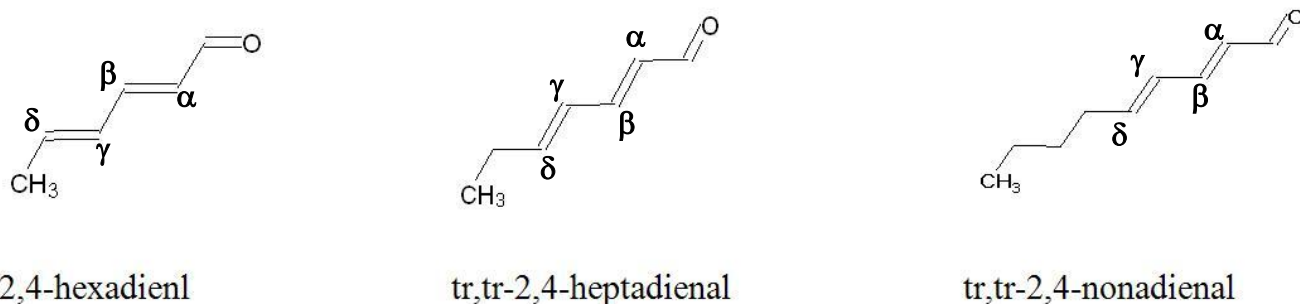
^a [43] ; ^b[41]

Table 5.2.1 為此實驗中反應性參數之結果，由 Log (1/RC₅₀)反應性大可觀察出以下幾點：

- 於 α -carbon 碳上接有甲基之化合物其對於 GSH 反應性會降低，原因為二：
 - 甲基取代基若位於 π 鍵上之 α 碳上可能會造成之空間阻礙 (steric hindrance) 使得共價鍵 (covalent bonding) 與 GSH 作用活性降低[42]。
 - 烷基團本身具有正電荷誘導效應 (positive inductive effect) [44] 導致醛類本身對於負電荷物質 (如：GSH) 反應能力降低。

2. 2,4-hexadienl、tr, tr-2,4-heptadienal、tr, tr-2,4-nonadienal 結構檢視發現到這3種化合物比一般 α, β -不飽和醛類在 γ, δ 碳上多出一個 π 鍵 (見 Fig 5.2.1)，所以此類擴展性共軛系統的化合物 (extended conjugated system) 在 β 碳上及 δ 碳上皆具有反應性較傳統邁克基型加成作用 (共軛 1,4-addition) 多具有 δ 碳上的反應能力。

Bohme 於 2010 年發表論文中[44]，其中在探討穀胱甘肽與化合物結構之間的關係提到此類擴展性共軛系統的化合物 (extended conjugated system) 特性，Bohme 表示擴展的共軛系統在 β 碳上及 δ 碳上會共同分享正電荷，導致此類化合物之親電子能力下降[44]，可能造成其與 GSH 反應能力較一般正常邁克基型加成醛類低。



2,4-hexadienl

tr, tr-2,4-heptadienal

tr, tr-2,4-nonadienal

註： $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ 分為羰基數來第 1, 2, 3, 4 個碳

Fig 5.2.1 Structures of 2,4-hexadienl、tr, tr-2,4-heptadienal and tr, tr-2,4-nonadienal

3. α, β -不飽和醛類碳鏈越長其與 GSH 反應能力稍微下降。由 tr-2-pentenal (碳數: 5) 至 tr-2-decenal (碳數:10) 可觀察出隨著 α, β -不飽和醛類碳鏈增加其 $\text{Log} (1/\text{RC}_{50})$ 值，由 0.83 降至 0.32。可能原因為碳鏈增加其 LogK_{ow} 上升，導致其與 GSH 反應能力下降。碳數與 $\text{Log} (1/\text{RC}_{50})$ 值如下表所示：

化合物	碳數	$\text{Log} (1/\text{RC}_{50})$ (mM)
tr-2-pentenal	5	0.83
tr-2-hexenal	6	0.58
tr-2-heptenal	7	0.55
tr-2-octenal	8	0.55
tr-2-nonenal	9	0.57
tr-2-decenal	10	0.32

5.3 α,β -不飽和醛類 QSAR

5.3.1 α,β -不飽和醛類數據整理

Table 5.3.1 列出本實驗 α,β -不飽和醛類藻類 QSAR 所需實驗數據並將此結果利用 QSAR 來討論 α,β -不飽和醛類藻類結構與毒性之間相關性。

此研究探討 QSAR 之三項重要參數為：

1. 對數正辛醇/水分配係數 ($\text{Log } K_{ow}$)：為一個有機化合物對於生物膜親和力替代性指標。
2. 親電性參數 $\text{Log} (1/\text{RC}_{50})$ ：為一個利用替代性親核試劑 (GSH) 來定量醛類與親核試劑作用形成邁克基型加成 (Michael-type addition) 之作用強弱；單位為 (mM)。
3. 希夫式鹼參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ ：為 Chan K.[7]在 2008 年所提出，是一種胺類反應性測定參數 (Amine Reactivity Assay)，其方式為利用替代型親核試劑丁胺 (Butylamine) 與醛類作用，並測定丁胺與醛類形成希夫式鹼之反應反應能力，為二階反應速率常數 (K)，將其作用結果利用 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 表示；單位為 ($\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)。

將於以下章節討論上述三個重要參數與 α,β -不飽和醛類藻類毒性數據之 QSAR 關係，其中藻類毒性三個反應終點 (ΔDO 、Final Yield、Growth Rate)數據，將其值倒數後取對數後表示 (Table 5.3.1)；單位為：(mM)

Table 5.3.1 Data of α,β -unsaturated aldehydes for QSAR

Compound	CAS number	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/RC ₅₀)	LogK _{ow}
		Delta DO (mM)	Final Yeild (mM)	Growth Rate (mM)	(mM)	
tr-2-pentenal	1576-87-0	2.01	2.05	1.90	0.83	1.09
tr-2-hexenal	6728-26-3	1.84	1.84	1.69	0.58	1.58
tr-2-heptenal	18829-55-5	1.92	2.07	1.91	0.55	2.07
tr-2-octenal	2548-87-0	2.11	1.98	1.61	0.55	2.57
tr-2-nonenal	18829-56-6	2.34	2.40	2.07	0.57	3.06
tr-2-decenal	3913-81-3	2.30	2.28	1.92	0.32	3.55
2,4-hexadienl	142-83-6	2.43	2.53	2.16	-0.15	1.37
tr, tr-2,4-heptadienal	4313-03-5	1.86	1.88	1.54	-0.13	1.86
tr, tr-2,4-nonadienal	5910-87-2	2.61	2.75	2.32	0.26	2.84
tr-2, cis-6-nonadienal	557-48-2	2.18	2.27	1.87	0.53	2.84
4-methyl-2-pentenal	5362-56-1	1.68	1.78	1.56	0.47	1.51
2-methyl-2-pentenal	497-03-0	0.70	0.50	0.30	-1.14	1.15
tr-2-methyl-2-butenal	623-36-9	0.77	0.88	0.57	-1.22	1.64

5.3.2 α,β -不飽和醛類 QSAR (Log K_{ow})

將親脂性參數 LogK_{ow} 與 α,β -不飽和醛類毒性數據回歸後結果列於 Table 5.3.2，可看出親脂性參數 LogK_{ow} 與藻類毒性數據三個反應終點 (delta DO、Final Yield、Growth Rate) 回歸後相關係數 (r^2) 差， r^2 範圍為 0.147~0.262 之間。

由此結果 ($r^2 = 0.147 \sim 0.262$) 可發現具有反應性 α,β -不飽和醛類單一利用親脂性參數 LogK_{ow} 與其藻類毒性數據回歸時，其相關性符合預期因其親脂性參數 LogK_{ow} 較偏向毒性作用機制為麻醉性毒物 (baseline narcotics) 之作用機制，所以當利用此參數 (LogK_{ow}) 來回歸反應性毒性物質 (α,β -不飽和醛類) 時，會造成相關性降低現象發生。

因此於章節 5.3.3 時，將加入反應性參數 (如：RC₅₀) 來觀察時是否會使得 QSAR 相關性增加。

Table 5.3.2 Result of QSAR for LogK_{ow} of α,β -unsaturated aldehydes

反應終點	樣品數(N)	回歸方程式	相關係數(r^2)
Delta DO	13	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 1.04 + 0.413 \text{ LogK}_{\text{ow}}$	0.262
Final Yield	13	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 1.05 + 0.424 \text{ LogK}_{\text{ow}}$	0.230
Growth Rate	13	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 0.932 + 0.343 \text{ LogK}_{\text{ow}}$	0.147

5.3.3 α,β -不飽和醛類 QSAR (RC_{50})

將 RC_{50} 值倒數後取 Log 可得 $\text{Log}(1/RC_{50})$ ，將其與 α,β -不飽和醛類毒性數據回歸後結果列於 table 5.3.3。可看出親電性參數 $\text{Log}(1/RC_{50})$ 與藻類毒性數據三個反應終點(ΔDO 、Final Yield、Growth Rate)回歸後相關係數 (r^2)不佳， r^2 範圍為 0.573~0.628 之間。

由此結果 ($r^2 = 0.573 \sim 0.628$) 可發現具有反應性 α,β -不飽和醛類利用單一反應性參數 $\text{Log}(1/RC_{50})$ 與其藻類毒性數據回歸後，其相關性 ($r^2 = 0.573 \sim 0.628$) 略較於親脂性參數 ($\text{Log } K_{OW}$) 相關性高 ($r^2 = 0.147 \sim 0.262$) 推測 α,β -不飽和醛類主要毒性作用機制較偏向親核性取代，故利用反應性參數 $\text{Log}(1/RC_{50})$ 對藻類毒性數據回歸時其相關性 (r^2) 會較親脂性參數 ($\text{Log } K_{OW}$) 來得高。

此結果雖然發現 α,β -不飽和醛類主要毒性作用機制較偏向親核性取代但可能其 α,β -不飽和醛類其部份毒性為親脂性作用機制所貢獻，故後面將把親脂性參數 ($\text{Log } K_{OW}$) 及親電性參數 $\text{Log}(1/RC_{50})$ 與藻類毒性數據回歸來觀察是否結合此二項參數與藻類毒性是否具一定相關性。

Table 5.3.3 Result of QSAR for $\text{Log}(1/RC_{50})$ of α,β -unsaturated aldehydes

反應終點	樣品數(N)	回歸方程式	相關係數(r^2)
Delta DO	13	$\text{Log}(1/EC_{50}) = 1.30 + 0.566 \text{Log}(1/RC_{50})$	0.615
Final Yield	13	$\text{Log}(1/EC_{50}) = 1.33 + 0.605 \text{Log}(1/RC_{50})$	0.573
Growth Rate	13	$\text{Log}(1/EC_{50}) = 1.23 + 0.661 \text{Log}(1/RC_{50})$	0.628

5.3.4 α,β -不飽和醛類 QSAR (RC_{50} 及 $\text{Log } K_{ow}$)

將親脂性參數 $\text{Log}K_{ow}$ 及親電性參數 $\text{Log} (1/RC_{50})$ 與 α,β -不飽和醛類毒性數據回歸後結果列於 Table 5.3.4 。可發現若將此二項參數與藻類毒性數據三個反應終點(ΔDO 、Final Yield、Growth Rate) 回歸後相關係數也是呈現 (r^2)不佳之現象， r^2 範圍為 0.644~0.690 之間。

有鑑於此，我們將三個反應終點(ΔDO 、Final Yield、Growth Rate) 藻類毒性預測值 $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Predicted})$ 與藻類毒性實驗值 $\text{Log} (1/EC_{50}, \text{Observed})$ 作圖，嘗試找出造成此相關性 (r^2) 下降之原因為哪種化合物，並解釋何謂此類化合物其預測值 (Predicted) 偏離實驗值 (Observed) 主要原因為何，其結果見 Fig 5.3.1、Fig 5.3.2 及 Fig 5.3.3。

Table 5.3.4 Result of QSAR for $\text{Log} (1/RC_{50})$ & $\text{Log}K_{ow}$ of α,β -unsaturated aldehydes

反應終點	樣品數(N)	回歸方程式	相關係數(r^2)
Delta DO	13	$\text{Log} (1/EC_{50}) = 1.30 + 0.566 \text{Log}(1/RC_{50}) + 0.248 \text{Log}K_{ow}$	0.679
Final Yield	13	$\text{Log}(1/ EC_{50}) = 1.33 + 0.605 \text{Log}(1/RC_{50}) + 0.248 \text{Log}K_{ow}$	0.644
Growth Rate	13	$\text{Log}(1/ EC_{50}) = 1.23 + 0.661 \text{Log}(1/RC_{50}) + 0.151 \text{Log}K_{ow}$	0.690

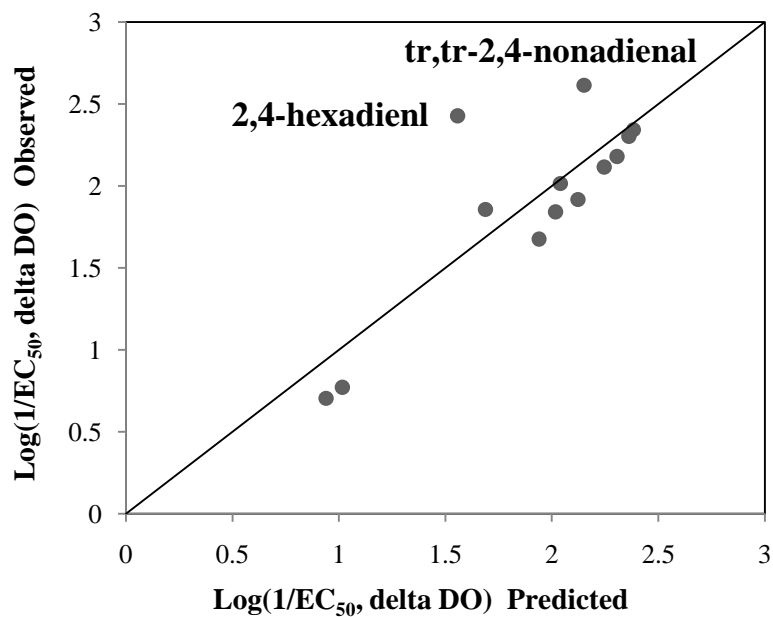


Fig 5.3.1 $\text{Log}(1/\text{EC}_{50}, \text{Predicted})$ vs $\text{Log}(1/\text{EC}_{50}, \text{Observed})$ for delta DO of α, β -unsaturated aldehydes

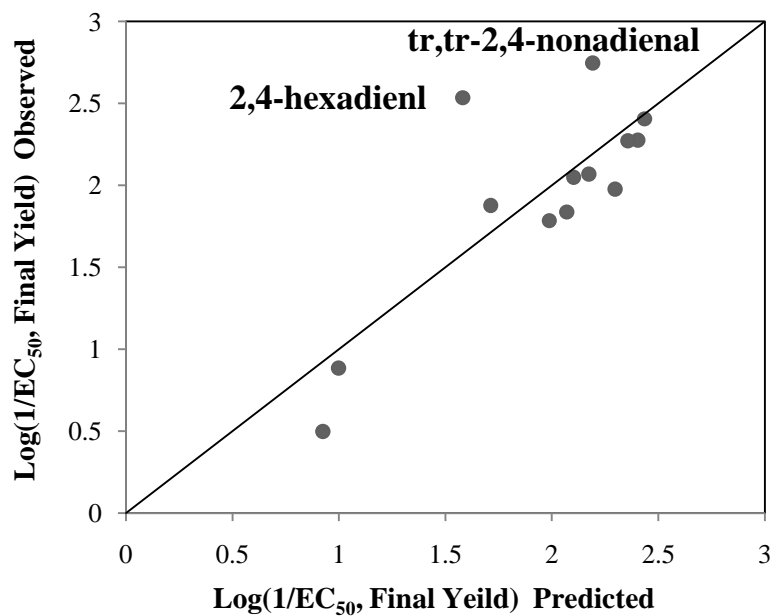


Fig 5.3.2 $\text{Log}(1/\text{EC}_{50}, \text{Predicted})$ vs $\text{Log}(1/\text{EC}_{50}, \text{Observed})$ for Final Yield of α, β -unsaturated aldehydes

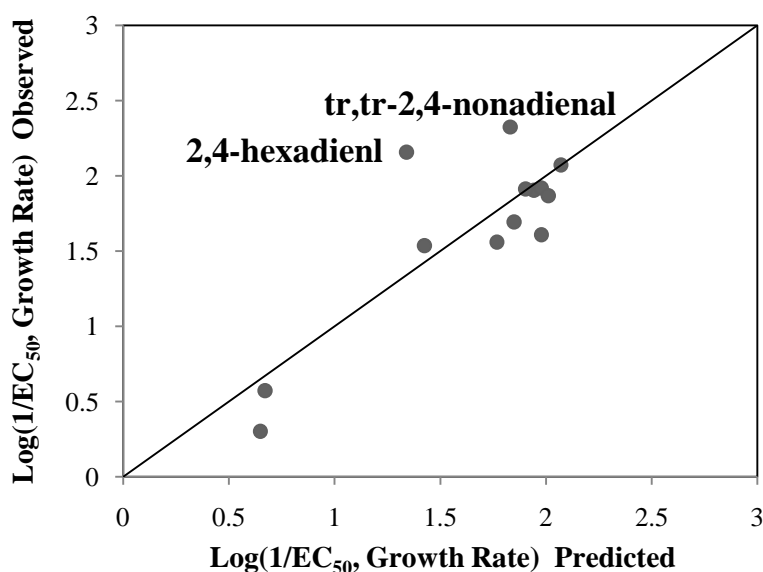


Fig 5.3.3 Log (1/EC₅₀, Predicted) vs Log (1/EC₅₀, Observed) for Growth Rate of α,β -unsaturated aldehydes

由 Fig 5.3.1、Fig 5.3.2 及 Fig 5.3.3 可得知 tr,tr-2,4-nonadienal 及 2,4-hexadienl 此二種化合物於三個反應終點 (delta DO、Final Yeild、Growth Rate) 之預測值 Log (1/EC₅₀, Predicted) 與藻類毒性實驗值 Log (1/EC₅₀, Observed) 作圖中皆偏離對角線，表示此二種化合物 (tr,tr-2,4-nonadienal、2,4-hexadienl) 之預測性不佳。

造成此現象的原因為 tr,tr-2,4-nonadienal 與 2,4-hexadienl 此二種化合物其 Log (1/RC₅₀) 值偏低 (分別為 0.26、-0.15)，但對於藻類毒性 Log (1/EC₅₀) 值無偏低之情況發生，所以當預測其毒性時，較低的 Log (1/RC₅₀) 值使得其預測出來的值偏低，偏低的預測值使得預測時產生低估的情況發生，使得 QSAR 預測能力降低。

因此將二種化合物 (tr,tr-2,4-nonadienal、2,4-hexadienl) 結構檢視發現到這二種化合物比一般 α,β -不飽和醛類在 γ,δ 碳上多出一個 π 鍵 (見 Fig 5.3.4)，所以此類擴展性共軛系統的化合物 (extended conjugated system) 在 β 碳上及 δ 碳上皆具有反應性較一般邁克基型加成作用 (共軛 1,4-addition) 多具有 δ 碳上的反應能力。

Bohme 於 2010 年發表論文中[44]，其中在探討穀胱甘肽與化合物結構之間的關係提到此類擴展性共軛系統的化合物 (extended conjugated system) 特性，Bohme 表示擴展的共軛系統在 β 碳上及 δ 碳上會共同分享正電荷，導致此類化合物之親電子能力下降[44]，可能造成其與 GSH 反應能力較一般邁克基型加成醛類低。

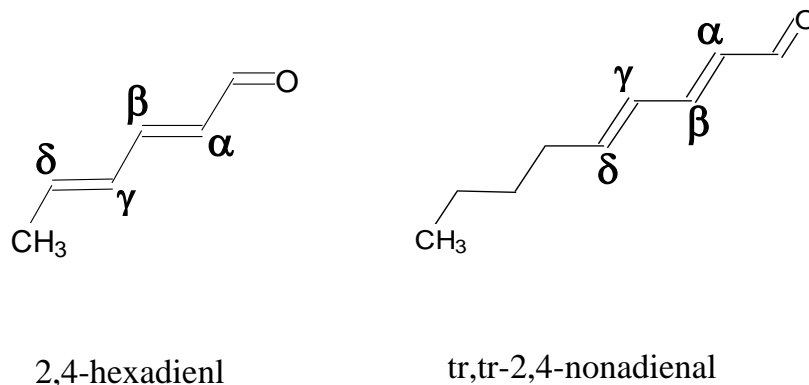


Fig 5.3.4 Structure of 2,4-hexadienl and tr, tr-2,4-nonadienal

5.3.5 α, β -不飽和醛類 QSAR (RC_{50} 及 $\text{Log } K_{ow}$) 去除 tr, tr-2,4-nonadienal、2,4-hexadienl

由以上敘述可得知化合物 2,4-hexadienl 與 tr, tr-2,4-nonadienal 此二項化合物結構因其比一般 α, β -不飽和醛類多出一個 π 鍵，造成其與 GSH 反應能力較一般正常邁克基型加成醛類低，使得當利用親脂性參數 $\text{Log } K_{ow}$ 及親電性參數 $\text{Log} (1/RC_{50})$ 與 α, β -不飽和醛類毒性數據回歸時，會使得其相關性 (r^2) 下降，故降此二項化合物去除後回歸可得到較高之回歸性 (見 Table 5.3.5)

由 table 5.3.5 可觀察出將 2,4-hexadienl 與 tr, tr-2,4-nonadienal 去除後其所得之相關性 (r^2) 有明顯的提升， r^2 範圍為 0.935~0.954 之間，顯示良好之相關性。由此推斷正辛醇/水分配係數 ($\text{Log } K_{ow}$) 及反應性參數 $\text{Log} (1/RC_{50})$ 對於 α, β -不飽和醛此類化合物造成水生生物毒性作用有一定比例之貢獻性。

所以當此類化合物為同一種結構類似之集合，可利用 QSAR 方程式將其物化參數帶入進而可推測出其他結構類似之毒性數據。且可進而利用於 REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals ; 化學品註冊、評估、授權法案) 上，其為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，對於每項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。

Table 5.3.5 Result of QSAR for Log (1/RC₅₀) & LogK_{OW} of α,β-unsaturated aldehydes
(whitout tr,tr-2,4-nonadienal and 2,4-hexadienl)

反應終點	樣品數(N)	回歸方程式	相關係數(r ²)
Delta DO	11 ^a	Log (1/EC ₅₀) = 1.11 + 0.601 Log(1/RC ₅₀) + 0.279 LogK _{OW}	0.954
Final Yield	11 ^a	Log(1/ EC ₅₀) = 1.12 + 0.646 Log(1/RC ₅₀) + 0.276 LogK _{OW}	0.935
Growth Rate	11 ^a	Log(1/ EC ₅₀) = 1.06 + 0.696 Log(1/RC ₅₀) + 0.172 LogK _{OW}	0.937

^a : 樣品數去除 2,4-hexadienl 及 tr,tr-2,4-nonadienal

5.4 α,β -不飽和醛類、酮類、酯類

5.4.1 α,β -不飽和酮類、酯類之毒性數據

Table 5.4.1 為本研究室之前所做之 α,β -不飽和酮類、酯類相關 QSAR 毒性數據，此二類化合物（酮類及酯類）與醛類具有相同之結構（ α,β -不飽和鍵），所以也會與親核試劑形成共軛（1,4）親核性加成反應（conjugate addition）（見 Fig 2.1.12）。

Table 5.4.1 中選用 11 種 α,β -不飽和醛類（去除 2,4-hexadienal 與 tr, tr-2,4-nonadienal）、13 種 α,β -不飽和酮類及 7 種 α,β -不飽和酯類，利用三個反應終點（delta DO、Final Yield、Growth Rate）藻類毒性數據與親脂性參數 $\text{Log}K_{\text{OW}}$ 及親電性參數 $\text{Log}(1/\text{RC}_{50})$ 回歸，回歸後結果列於 Table 5.4.2。

5.4.2 α,β -不飽和醛類、酮類、酯類比較

由 Table 5.4.2 可觀察出三個反應終點（delta DO、Final Yield、Growth Rate）所得之 QSAR 結果皆相似，以醛類 $\text{Log}(1/\text{RC}_{50})$ 之係數（A）為例其 delta DO（ $A=0.601$ ）、Final Yield（ $A=0.646$ ）及 Growth Rate（ $A=0.696$ ）三個反應終點之係數（A）差距不大，另外 $\text{Log}K_{\text{OW}}$ 之係數（B）及常數項（C）三個反應終點彼此之間數值也皆相近。因此比較 α,β -不飽和醛類、酮類、酯類將以反應終點 Growth Rate 為代表，來討論三者之間關係。

由反應終點 Growth Rate 觀察可發現， α,β -不飽和酮、酯類毒性來源主以親電性參數（ $\text{Log} \text{RC}_{50}^{-1}$ ）所貢獻較多，大約為 α,β -不飽和醛類 1.5 倍左右，可由親電性參數（ $\text{Log} \text{RC}_{50}^{-1}$ ）之係數（A）觀察出。（酮類/醛類 = $1.06/0.696$ ）（酯類/醛類 = $0.955/0.696$ ）。

再來利用親脂性參數 $\text{Log}K_{\text{OW}}$ 前面之係數（B）可發現 α,β -不飽和醛類毒性來源依賴於親脂性參數（ $\text{Log} K_{\text{OW}}$ ）比例較酮類及酯類高，大約為 α,β -不飽和酯類 1.50 倍左右（醛類/酯類 = $0.172/0.111$ ），酮類則為負數（ $B=-0.146$ ）呈現對毒性貢獻性為減弱之現象。

由上所述可發現：

1. 親電性參數（ $\text{Log} \text{RC}_{50}^{-1}$ ）毒性影響性：酮 > 酯 > 醛
2. 親脂性參數（ $\text{Log} K_{\text{OW}}$ ）毒性影響性：醛 > 酯 > 酮

Table 5.4.1 Data sets of α,β -unsaturated Acrylates and α,β -unsaturated Ketones

Compound	CAS number	Log(1/EC ₅₀) Delta DO(mM)	Log(1/EC ₅₀) Final Yeild(mM)	Log(1/EC ₅₀) Growth Rate(mM)	Log(1/RC ₅₀) (mM)	LogK _{ow}
^a α,β -不飽和酯類						
Methyl Acrylate	96-33-3	1.19	1.33	1.12	0.39	0.73
Ethyl Acrylate	140-88-5	1.15	1.74	1.22	0.41	1.22
Propargyl Acrylate	10477-47-1	2.05	2.23	2.08	0.93	0.94
Isobutyl Acrylate	106-63-8	1.71	2.23	1.71	0.50	2.13
2-Hydroxy ethyl Acrylate	2499-95-8	1.68	2.12	1.62	0.52	-0.25
Methyl Methacrylate	818-61-1	-0.69	-0.41	-0.72	-1.85	1.28
Vinyl Methacrylate	80-62-6	1.36	1.54	1.16	-0.33	1.63
^b α,β -不飽和酮類						
3-hexyn-2-one	1679-36-3	2.67	2.85	2.51	1.05	0.17
3-butyln-2-one	1423-60-5	3.72	3.93	3.69	1.23	-0.52
3-methyl-3-penten-2-one	565-62-8	0.23	0.23	0.13	-0.68	1.37
5-hexen-2-one	109-49-9	-0.12	0.12	-0.26	-1.46	1.10
3-hepten-2-one	1119-44-4	1.48	1.64	1.53	0.53	1.80
4-methyl-3-penten-2-one	141-79-7	-0.27	-0.17	-0.34	-1.32	1.37
4-hexen-3-one	2497-21-4	1.46	1.55	1.37	0.80	1.31
3-nonene-2-one	14309-57-0	1.15	1.37	0.95	0.54	2.79
3-pentene-2-one	625-33-2	1.21	1.49	1.32	0.82	0.52
3-buten-2-one	78-94-4	2.84	3.03	2.89	1.12	0.41
5-methyl-5-hexene-2-one	3240-09-3	-0.38	-0.26	-0.54	-1.56	1.65
3-octene-2-one	1669-44-9	1.49	1.83	1.49	0.59	2.29
2-cyclopenten-1-one	930-30-3	0.94	1.21	0.97	0.26	0.71
2-methyl-2-cyclopenten-1-one	1120-73-6	-0.20	-0.13	-0.31	-0.94	1.26
3-methyl-2-cyclopenten-1-one	2758-18-1	-0.63	-0.54	-0.69	-1.28	1.26

^a 陳心渝,2010 [45] ; ^b 黃聖然,2010[46]

Table 5.4.2 Linear Regression of the alage Toxicity (delta DO · Final Yield · Growth Rate), Log (1/RC₅₀), Log K_{OW} for α,β-Unsaturated Carbonyl Compounds

$$\text{Log} (1/\text{EC}_{50}) = \mathbf{A} \text{Log} (1/\text{RC}_{50}) + \mathbf{B} \text{Log} \text{K}_{\text{OW}} + \mathbf{C}$$

Compound	樣品數(N)	A	B	C	相關係數平方(r ²)
反應終點 (delta DO)					
α,β-不飽和醛	N = 11 ^a	0.601	0.279	1.11	0.954
α,β-不飽和酮	N = 13	1.030	-0.395	1.52	0.894
α,β-不飽和酯	N = 7	0.926	0.103	1.02	0.895
反應終點 (Final Yield)					
α,β-不飽和醛	N = 11 ^a	0.646	0.276	1.12	0.935
α,β-不飽和酮	N = 13	1.080	-0.382	1.68	0.895
α,β-不飽和酯	N = 7	0.968	0.140	1.31	0.904
反應終點 (Growth Rate)					
α,β-不飽和醛	N = 11 ^a	0.696	0.172	1.06	0.922
α,β-不飽和酮	N = 13	1.060	-0.416	1.49	0.911
α,β-不飽和酯	N = 7	0.955	0.111	0.97	0.933

^a : 樣品數去除 2,4-hexadienl 及 tr,tr-2,4-nonadienal

5.4.3 α,β -不飽和醛類、酮類、酯類 QSAR

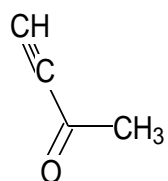
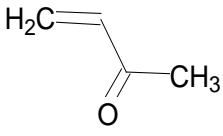
將本研究13種 α,β -不飽和醛類與研究室之前所做的7種 α,β -不飽和酯類及15種 α,β -不飽和酮類收集後，總共為35種 α,β -不飽和羰基化合物 (α,β -unsaturated carbonyl compounds)。將35種 α,β -不飽和羰基化合物藻類毒性數據 (Table 5.3.1及Table 5.4.1) 與親脂性參數 $\text{Log}K_{\text{OW}}$ 及親電性參數 $\text{Log} (1/\text{RC}_{50})$ 二項參數進行QSAR，其回歸結果列於Table 5.4.4。

Table 5.4.4 顯示 α,β -不飽和羰基化合物藻類毒性數據與親脂性參數 $\text{Log}K_{\text{OW}}$ 及親電性參數 $\text{Log} (1/\text{RC}_{50})$ 二項參數回歸後，相關性普通 ($r^2=0.726\sim 0.781$)。

因此將 35 種 α,β -不飽和羰基化合物藻類毒性預測值 $\text{Log} (1/\text{EC}_{50, \text{Predicted}})$ 與藻類毒性實驗值 $\text{Log} (1/\text{EC}_{50, \text{Observed}})$ 作圖，見 Fig 5.4.1、Fig 5.4.2、Fig 5.4.3。

由 Fig 5.4.1、Fig 5.4.2、Fig 5.4.3 可觀察出，化合物 2,4-hexadienl、tr, tr-2,4-nonadienal 及 3-butyn-2-one 於圖中偏離對角線較多，表示這3種化合物其預測值與實驗值之間差異較高，造成預測能力不準確。化合物 2,4-hexadienl 及 tr, tr-2,4-nonadienal 屬於 α,β -不飽和醛類其於圖中造成偏離對角線較多的原因，章節 5.3.4 中已詳細說明。化合物 3-butyn-2-one 則屬於 α,β -不飽和酮類，其為三鍵化合物，結構式見 Table 5.4.3 (左圖)。

Table 5.4.3 Structures of 3-butyn-2-one and 3-buten-2-one

化合物	3-butyn-2-one	3-buten-2-one
結構式		
分子式	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}$	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}$
分子量	68.08	70.09

化合物 3-butyn-2-one 其對於藻類的毒性為 α,β -不飽和酮類中毒性最高的化合物 (見 Table5.4.1)。主要原因為 3-butyn-2-one 在其結構中具有三鍵結構，此三鍵結構具有強烈反應性，對於藻類具有強烈毒性。例如由 Table5.4.3 來看，相近分子量的二項 α,β -不飽和酮類 (3-butyn-2-one 及 3-buten-2-one) 之間主要差異在於 3-butyn-2-one 為三鍵結構化合物；3-buten-2-one 為雙鍵結構化合物，毒性大小 3-butyn-2-one > 3-buten-2-one。

Yarbrough 此學者於 2007 年發表的文章中提到，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[41]。

因此化合物 3-butyn-2-one 可能為其結構中含有三鍵，導致其具有強烈反應性，造成藻類劇烈毒性使得其預測值與實驗值之間差異性增加，於回歸式中導致 r^2 值降低。

將化合物 2,4-hexadienl、tr,2,4-nonadienal 及 3-butyn-2-one 於 35 種 α,β -不飽和羰基化合物去除後，重新與親脂性參數 LogK_{ow} 及親電性參數 $\text{Log} (1/\text{RC}_{50})$ 二項參數進行 QSAR，其結果列於 Table 5.4.5。可發現將此 3 個化合物去除後，相關性由 ($r^2=0.726\sim 0.781$) 提昇至 ($r^2=0.806\sim 0.854$) 表現出較佳之相關性。

α,β -不飽和羰基化合物可利用 QSAR 方程式將其物化參數帶入進而可推測出其他結構類似之毒性數據。且可進而利用於 REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals ；化學品註冊、評估、授權法案) 上。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。

Table 5.4.4 Result of QSAR for Log (1/RC₅₀) & LogK_{OW} of α,β-Unsaturated carbonyl compounds

反應終點	樣品數(N)	回歸方程式	相關係數(r ²)
Delta DO	35	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 1.19 + 1.03 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.092 \text{LogK}_{\text{OW}}$	0.726
Final Yield	35	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 1.41 + 1.06 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.045 \text{LogK}_{\text{OW}}$	0.756
Growth Rate	35	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 1.19 + 1.06 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.057 \text{LogK}_{\text{OW}}$	0.781

Table 5.4.5 Result of QSAR for Log (1/RC₅₀) & LogK_{OW} of α,β-Unsaturated carbonyl compounds
(without tr, tr-2,4-nonadienal 、 2,4-hexadienl and 3-butyn-2-one)

反應終點	樣品數(N)	回歸方程式	相關係數(r ²)
Delta DO	32 ^a	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 0.965 + 0.968 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.169 \text{LogK}_{\text{OW}}$	0.806
Final Yield	32 ^a	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 1.200 + 1.000 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.113 \text{LogK}_{\text{OW}}$	0.832
Growth Rate	32 ^a	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 0.985 + 0.997 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.075 \text{LogK}_{\text{OW}}$	0.854

^a : without tr, tr-2,4-nonadienal 、 2,4-hexadienl and 3-butyn-2-one

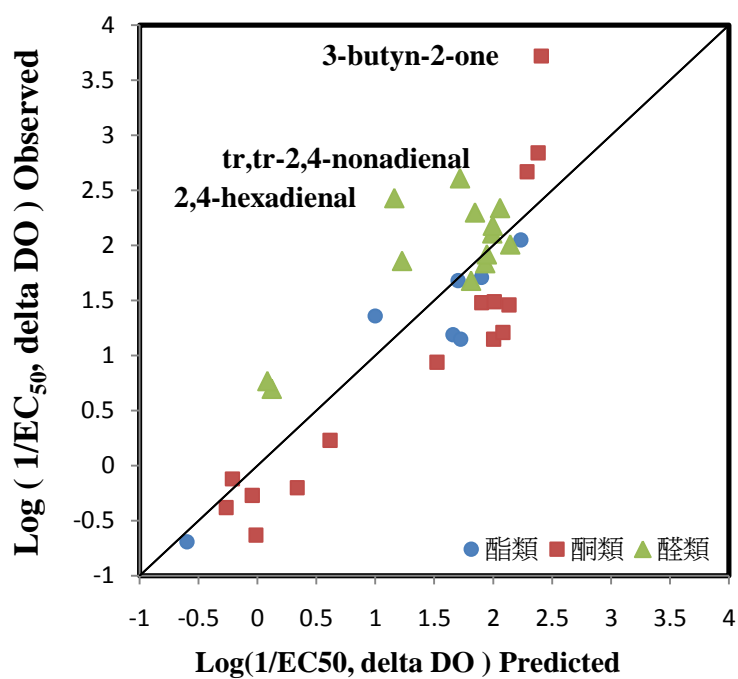


Fig 5.4.1 $\text{Log}(1/\text{EC}_{50}, \text{Predicted})$ vs $\text{Log}(1/\text{EC}_{50}, \text{Observed})$ for delta DO of α, β -Unsaturated carbonyl compounds

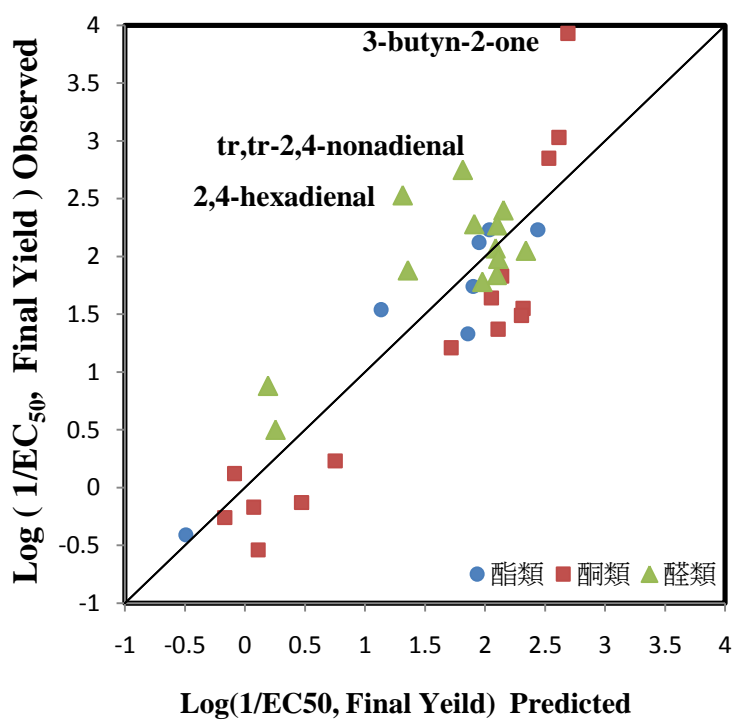


Fig 5.4.2 $\text{Log}(1/\text{EC}_{50}, \text{Predicted})$ vs $\text{Log}(1/\text{EC}_{50}, \text{Observed})$ for Final Yield of α, β -Unsaturated carbonyl compounds

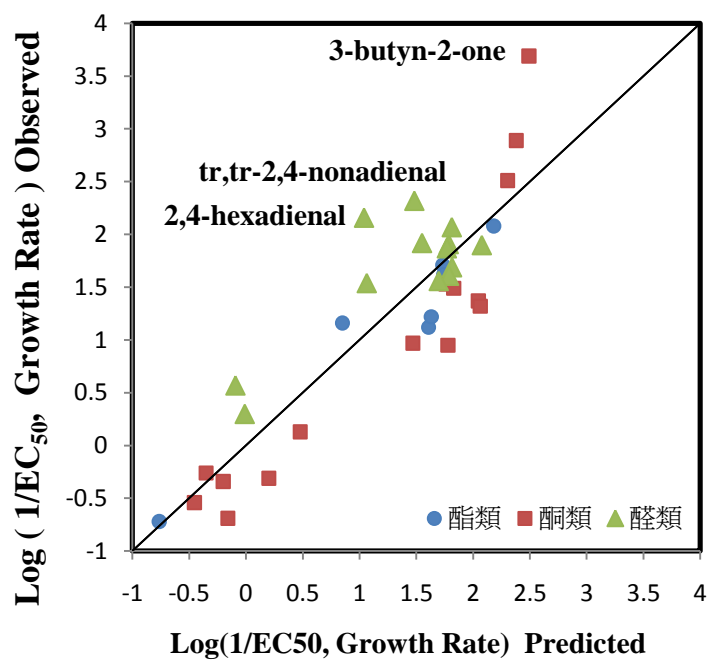
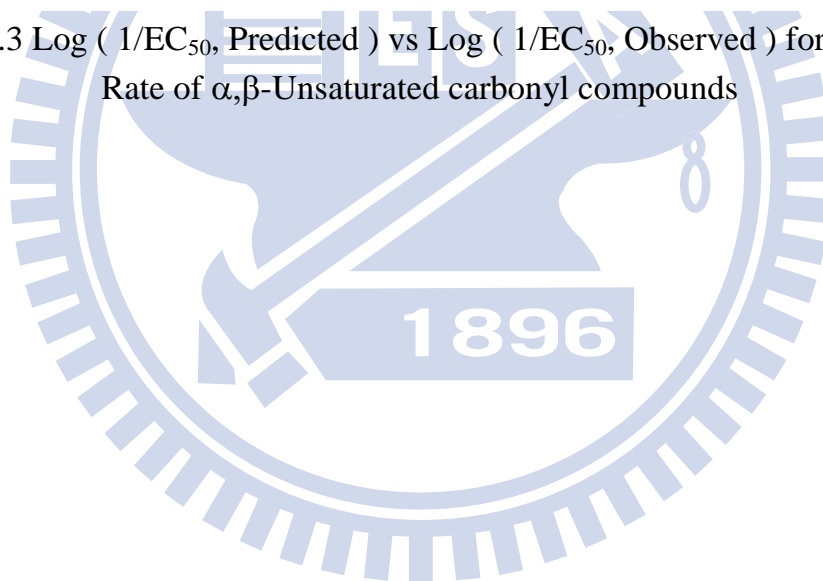


Fig 5.4.3 Log (1/EC₅₀, Predicted) vs Log (1/EC₅₀, Observed) for Growth Rate of α,β -Unsaturated carbonyl compounds



5.5 希夫式鹼參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 之討論

5.5.1 希夫式鹼參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 介紹

希夫式鹼參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 為 Chan K.[7] 在 2008 年所提出，是一種胺類反應性測定參數 (Amine Reactivity Assay)，其方式為利用替代型親核試劑丁胺 (Butylamine) 與醛類作用，並測定丁胺與醛類形成希夫式鹼之反應反應能力，為二階反應速率常數 (K)，將其作用結果利用 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 表示；單位為 $(\text{M}^{-1} \text{min}^{-1})$ 。醛類與胺類 (Amine) 作用形成希夫式鹼 (Schiff-base formation) 主要作用機制見 Fig 5.5.1

在 Chan K.[7] 所發表的報告裡面，其中有 7 個化合物與本篇論文相同所以將 Chan K.[7] 與本篇相同之 7 個化合物參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 予以討論，研究是否希夫式鹼參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 與 α, β -不飽和醛的藻類毒性數值，具有相關性，因為 α, β -不飽和醛具有二種反應性機制，一種為前面討論所提到之親核性加成反應 (conjugate addition) (見 Fig 2.1.12)，另一種則為此類希夫式鹼的形成 (Schiff-base formation) (見 Fig 5.5.1)。

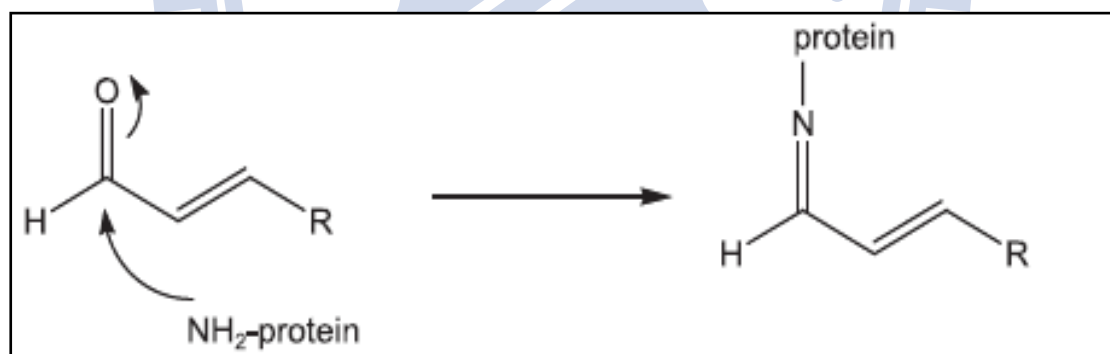


Fig 5.5.1 Schiff base product in the reaction between primary amine and α, β -unsaturated aldehydes [7].

5.5.2 醛類 7 組與希夫式鹼參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 之 QSAR

Table5.5.1 為本研究與 Chan K.[7]相同 7 個化合物之藻類毒性數據與希夫式鹼參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 數值。

將 Table5.5.1 數據回歸後結果列於 Table5.5.2 可發現如果只利用親電性參數 $\text{Log} (1/\text{RC}_{50})$ 及親脂性參數 $\text{Log} (K_{\text{OW}})$ 可發現三個反應終點 (ΔDO 、Final Yield、Growth Rate) 顯示其相關性不佳 (r^2 範圍為 0.283~0.581 之間)，造成此現象主要原因是此 7 組醛類中包含了化合物 tr, tr-2,4-nonadienal，因其比一般 α, β -不飽和醛類多出一個 π 鍵，造成其與 GSH 反應能力較一般正常邁克基型加成醛類低，使得當利用親脂性參數 $\text{Log} K_{\text{OW}}$ 及親電性參數 $\text{Log} (1/\text{RC}_{50})$ 與 α, β -不飽和醛類毒性數據回歸時，會使得其相關性 (r^2) 下降。

然而若將希夫式鹼參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 加入回歸後 (結果列於 Table5.5.3) 可發現三個反應終點 (ΔDO 、Final Yield、Growth Rate) 顯示相關性 (r^2) 有提高之情況 (r^2 範圍為 0.746~0.883 之間)，造成此結果的原因推測為其二者毒性作用機制可能互相補足單一作用機制之誤差當親核性加成作用機制不明顯時，可能會以其他毒理作用機制表現 (如：希夫式鹼形式)，因此可減少預測毒性時所造成之誤差。

由上面所述可得知希夫式鹼參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 可能對於 α, β -不飽和醛毒性有相當程度之貢獻性，但仍需更多 α, β -不飽和醛類數據及希夫式鹼參數 $\text{Log} (K_{\text{NH}_2})$ 來回歸佐證，才能加以提升此現象之正確性。

Table 5.5.1 Data sets of alage toxicity and Log (K_{NH2})

Compound	Log(1/EC ₅₀) Delta DO(mM)	Log(1/EC ₅₀) Final Yeild(mM)	Log(1/EC ₅₀) Growth Rate(mM)	Log(K_{NH2}) ^a (M ⁻¹ min ⁻¹)	Log(1/RC ₅₀) (mM)	Log K _{ow}
tr-2-pentenal	2.01	2.05	1.90	-0.21	0.83	1.09
tr-2-hexenal	1.84	1.84	1.69	-0.40	0.58	1.58
tr-2-heptenal	1.92	2.07	1.91	-0.45	0.55	2.07
tr-2-octenal	2.11	1.98	1.61	-0.64	0.55	2.57
tr-2-nonenal	2.34	2.40	2.07	-0.16	0.57	3.06
tr,tr-2,4-nonadienal	2.61	2.75	2.32	0.16	0.26	2.84
tr-2-cis-6-nonadienal	2.18	2.27	1.87	-0.03	0.53	2.84

^a[7]

Table 5.5.2 Linear Regression of the alage Toxicity (delta DO 、 Final Yield 、 Growth Rate), Log (1/RC₅₀), Log K_{OW} for seven α,β -Unsaturated aldehydes

反應終點	樣品數(N)	回歸方程式	相關係數(r ²)
Delta DO	7	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 2.06 - 0.553 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.171 \text{LogK}_{\text{ow}}$	0.581
Final Yield	7	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 2.31 - 0.822 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.146 \text{LogK}_{\text{ow}}$	0.537
Growth Rate	7	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 2.27 - 0.715 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.014 \text{LogK}_{\text{ow}}$	0.283

Table 5.5.3 Linear Regression of the alage Toxicity (delta DO 、 Final Yield 、 Growth Rate),Log (1/RC₅₀),Log K_{OW}, Log(K_{NH2}) for seven α,β-Unsaturated aldehydes

反應終點	樣品數(N)	回歸方程式	相關係數(r ²)
Delta DO	7	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 2.05 - 0.247 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.156 \text{LogK}_{\text{ow}} + 0.505 \text{Log}(K_{\text{NH2}})$	0.800
Final Yield	7	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 2.30 - 0.375 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 0.124 \text{LogK}_{\text{ow}} + 0.738 \text{Log}(K_{\text{NH2}})$	0.883
Growth Rate	7	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = 2.26 - 0.317 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) - 0.006 \text{LogK}_{\text{ow}} + 0.657 \text{Log}(K_{\text{NH2}})$	0.746

六、總結

1. α,β -不飽和醛含有兩種不同的親電性位置對應於兩種不同的毒性途徑， β 碳上進行為邁克基型加成作用（共軛 1,4-addition）；羰基碳上則進行希夫鹼的形成反應（Schiff-base formation）。
2. 利用親脂性參數 $\text{Log}K_{\text{OW}}$ 及親電性參數 $\text{Log}(1/\text{RC}_{50})$ 此二項參數與 α,β -不飽和醛類毒性數據回歸時，將此二種化合物（2,4-hexadienl 及 tr, tr-2,4-nonadienal）移除後可觀察出三個反應終點（ ΔDO 、Final Yield、Growth Rate）之相關性係數平方值（ r^2 ）皆有良好的相關性。
3. 希夫式鹼參數 $\text{Log}(K_{\text{NH}_2})$ 可能對於 α,β -不飽和醛毒性有相當程度之貢獻性，但仍需更多 α,β -不飽和醛類數據及希夫式鹼參數 $\text{Log}(K_{\text{NH}_2})$ 來回歸佐證，才能加以提升此現象之正確性。
4. 親電性參數（ $\text{Log} \text{RC}_{50}^{-1}$ ）毒性影響性：酮 > 酯 > 醛。
5. 親脂性參數（ $\text{Log} K_{\text{OW}}$ ）毒性影響性：醛 > 酯 > 酮。
6. 具反應性的 α,β -不飽和醛對於月芽藻之毒性數據，可使反應性有機物建立更完整毒性數據，增加反應性有機物數據庫完整性
7. α,β -不飽和羰基化合物可利用 QSAR 方程式將其物化參數帶入進而可推測出其他結構類似之毒性數據。且可進而利用於 REACH（Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals 化學品註冊、評估、授權法案）上。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。

七、參考文獻

- [1] Alméras E, Stolz S, Vollenweider S, Reymond P, Mène-Saffrané L, Farmer EE. 2003. Reactive electrophile species activate defense gene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal* 34:205-216.
- [2] O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N. 2005. Aldehyde Sources, Metabolism, molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. *Critical Reviews in Toxicology* 35:609-662.
- [3] Benigni R, Passerini L, Rodomonte A. 2003. Structure–activity relationships for the mutagenicity and carcinogenicity of simple and α,β -unsaturated aldehydes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42:136-143.
- [4] Dimitrov S, Koleva Y, Schultz TW, Walker JD, Mekenyan O. 2004. Interspecies quantitative structure-activity relationship model for aldehydes: Aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:463-470.
- [5] Erve JCL. 2006. Chemical toxicology: reactive intermediates and their role in pharmacology and toxicology. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2:923-946.
- [6] Schultz TW, Carlson RE, Cronin MTD, Hermens JLM, Johnson R, O'Brien PJ, Roberts DW, Siraki A, Wallace KB, Veith GD. 2006. A conceptual framework for predicting the toxicity of reactive chemicals: modeling soft electrophilicity. *SAR & QSAR in Environmental Research* 17:413-428.
- [7] Chan K, Poon R, O'Brien PJ. 2008. Application of structure–activity relationships to investigate the molecular mechanisms of hepatocyte toxicity and electrophilic reactivity of α,β -unsaturated aldehydes. *Journal of Applied Toxicology* 28:1027-1039.
- [8] Pearson RG, Songstad J. 1967. Application of the Principle of Hard and Soft Acids and Bases to Organic Chemistry. *Journal of the American Chemical Society* 89:1827-1836.
- [9] 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學位論文.
- [10] 林瑞合. 2001. BOD 瓶之藻類毒性設計. 國立交通大學環境工程研究所碩士學位論文.
- [11] Schultz TW, Netzeva TI, Roberts DW, Cronin MTD. 2005. Structure-Toxicity Relationships for the Effects to *Tetrahymena pyriformis* of Aliphatic, Carbonyl-Containing, α,β -Unsaturated Chemicals. *Chemical Research in Toxicology* 18:330-341.
- [12] McMurry J. 2005. Organic Chemistry 5th ed. 歐亞書局有限公司 學銘圖書有限公司.
- [13] Morrison RT, Boyd RN. 1995. Organic chemistry, sixth ed. 台灣東華書局股份有限公司.
- [14] Solomons. 2000. Organic Chemistry 6th ed. 高立圖書有限公司.
- [15] 朱文聰. 1989. 有機化學精要. 徐式基金會出版.
- [16] Lin J-H, Kao W-C, Tsai K-P, Chen C-Y. 2005. A novel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. *Water Research* 39:1869-1877.
- [17] RojgovPadrtov R, Marsek 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.

- [18] Chen C-Y, Lin K-C. 1997. Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:1337-1344.
- [19] Christensen ER, Chen D, Nyholm N, Kusk KO. 2001. Joint action of chemicals in algal toxicity tests: Influence of response level and dose-response regression model. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:2361-2369.
- [20] Nyholm N, Källqvist T. 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8:689-703.
- [21] Arensberg P, Hemmingsen VH, Nyholm N. 1995. A miniscale algal toxicity test. *Chemosphere* 30:2103-2115.
- [22] Agency USEP. 1996. Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. Algal Toxicity, Tiers I and II.
- [23] Chen C-Y. 1994. Theoretical evaluation of the inhibitory effects of mercury on algal growth at various orthophosphate levels. *Water Research* 28:931-937.
- [24] 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.
- [25] Mazidji CN, Koopman B, Bitton G, Neita D. 1992. Distinction between heavy metal and organic toxicity using EDTA chelation and microbial assays. *Environmental Toxicology and Water Quality* 7:339-353.
- [26] Sorvari J, Sillanp 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.
- [27] Nalecz-Jawecki G, Sawicki J. 1999. Spirotox -A new tool for testing the toxicity of volatile compounds. *Chemosphere* 38:3211-3218.
- [28] 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 39:112-119.
- [29] 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*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:948-967.
- [30] Atkins PW. 1994. Physical chemistry. 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. 1975. Characterization of molecular branching. *Journal of the American Chemical Society* 97:6609-6615.
- [33] Kubinyi H. 1993. QSAR: Hansch analysis and related approaches.
- [34] Schultz TW. 1998. *QSAR in aquatic toxicology : A mechanism of action approach comparing toxic potency to Pimephales promelas, Tetrahymena pyriformis, and Vibrio fischeri.*
- [35] Verhaar HJM, van Leeuwen CJ, Hermens JLM. 1992. Classifying environmental pollutants. *Chemosphere* 25:471-491.
- [36] Wayne Schultz T. 1987. The use of the ionization constant (pKa) in selecting models of toxicity in

- phenols. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 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. *Quantitative Structure-Activity Relationships* 17:131-138.
- [39] Herman DC, Inniss WE, Mayfield CI. 1990. Impact of volatile aromatic hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the freshwater alga Selenastrum capricornutum. *Aquatic Toxicology* 18:87-100.
- [40] Lipnick RL. 1991. Outliers: their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity. *The Science of The Total Environment* 109-110:131-153.
- [41] Yarbrough JW, Schultz TW. 2007. Abiotic Sulfhydryl Reactivity : A Predictor of Aquatic Toxicity for Carbonyl-Containing α,β -Unsaturated Compounds. *Chemical Research in Toxicology* 20:558-562.
- [42] Schultz TW, Cronin MTD. 1999. Response-Surface Analyses for Toxicity to Tetrahymena pyriformis : Reactive Carbonyl-Containing Aliphatic Chemicals. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 39:304-309.
- [43] Schultz TW, Yarbrough JW, Johnson EL. 2005. Structure-activity relationships for reactivity of carbonyl-containing compounds with glutathione. *SAR and QSAR in Environmental Research* 16:313 - 322.
- [44] Bohme A, Thaens D, Schramm F, Paschke A, Schuurmann G. 2010. Thiol Reactivity and Its Impact on the Ciliate Toxicity of α,β -Unsaturated Aldehydes, Ketones, and Esters. *Chemical Research in Toxicology* 23:1905-1912.
- [45] 陳心渝. 2010. 以密閉式藻類毒性誦驗研究 α,β -不飽和酯類-丙烯酸酯類及甲基丙烯酸酯類之定量結構-活性關係 國立交通大學環境工程研究所碩士學位論文.
- [46] 黃聖然. 2010. 以密閉式藻類毒性誦驗研究 α,β -不飽和酮類之定量結構-活性關係 國立交通大學環境工程研究所碩士學位論文.



附錄一、原始數據

實驗毒物：		Tr-2-pentenal			初始細胞密度(cells/mL):15000					
MCV (μm^3):		40.12			Initial pH:		7.48		EDTA(%):	0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	μ_{specific}	μ_{relative}	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.6	8.10	309500	6.50	1.51	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.66	1.82	1.20	19000	-0.62	0.12	0.08	0.92	0.99	1.10	
3.33	1.53	0.22	12900	-1.31	-0.08	-0.05	1.05	1.01	1.20	
1.67	1.37	1.77	17400	0.40	0.07	0.05	0.95	0.99	0.94	
0.83	1.17	2.75	76500	1.58	0.81	0.54	0.46	0.79	0.76	
0.42	1.4	6.89	252400	5.49	1.41	0.93	0.07	0.19	0.16	
0.21	1.52	8.15	293400	6.63	1.49	0.98	0.02	0.05	-0.02	
0.10	1.42	8.26	363100	6.84	1.59	1.05	-0.05	-0.18	-0.05	
Control	1.09	6.62	223600	5.53	1.35	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.66	1.68	0.24	12100	-1.44	-0.11	-0.08	1.08	1.01	1.26	
3.33	1.43	0.81	13400	-0.62	-0.06	-0.04	1.04	1.01	1.11	
1.67	1.38	1.12	20900	-0.26	0.17	0.12	0.88	0.97	1.05	
0.83	1.3	4.77	136400	3.47	1.10	0.82	0.18	0.42	0.37	
0.42	1.38	6.87	262700	5.49	1.43	1.06	-0.06	-0.19	0.01	
0.21	1.34	8.18	341100	6.84	1.56	1.16	-0.16	-0.56	-0.24	
0.10	1.53	8.64	395000	7.11	1.64	1.21	-0.21	-0.82	-0.29	
Control	1.42	7.7	335000	6.28	1.55	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.66	1.93	1.14	15500	-0.79	0.02	0.01	0.99	1.00	1.13	
3.33	1.45	0.21	15500	-1.24	0.02	0.01	0.99	1.00	1.20	
1.67	1.41	1.10	14300	-0.31	-0.02	-0.02	1.02	1.00	1.05	
0.83	1.35	5.12	164700	3.77	1.20	0.77	0.23	0.53	0.40	
0.42	1.22	7.00	288600	5.78	1.48	0.95	0.05	0.15	0.08	
0.21	1.32	7.90	334400	6.58	1.55	1.00	0.00	0.00	-0.05	
0.10	1.23	8.32	347200	7.09	1.57	1.01	-0.01	-0.04	-0.13	
Control	1.37	7.47	289367	6.10	1.47	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.66	1.81	0.86	15533	-0.95	0.01	0.00	0.99	1.00	1.16	
3.33	1.47	0.41	13933	-1.06	-0.04	-0.03	1.02	1.00	1.17	
1.67	1.39	1.33	17533	-0.06	0.07	0.05	0.95	0.99	1.01	
0.83	1.27	4.21	125867	2.94	1.04	0.71	0.28	0.60	0.52	
0.42	1.33	6.92	267900	5.59	1.44	0.98	0.03	0.08	0.08	
0.21	1.39	8.08	322967	6.68	1.53	1.05	-0.04	-0.12	-0.10	
0.10	1.39	8.41	368433	7.01	1.60	1.09	-0.08	-0.29	-0.15	

IR : Inhibition rate

Biomass : Final yield based on cell density

實驗毒物：		Tr-2-hexenal			初始細胞密度(cells/mL):15000					
MCV (μm^3):		41.12		Initial pH:		7.38		EDTA(%):		0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	0.91	5.24	244400	4.33	1.40	1.00	0.00	0.00	0.00	
8.00	1.57	1.85	39900	0.28	0.49	0.35	0.65	0.89	0.94	
4.00	1.3	1.27	29800	-0.03	0.34	0.25	0.75	0.94	1.01	
2.00	1.25	2.08	58900	0.83	0.68	0.49	0.51	0.81	0.81	
1.00	1.22	4.00	185100	2.78	1.26	0.90	0.10	0.26	0.36	
0.50	1.18	5.09	265500	3.91	1.44	1.03	-0.03	-0.09	0.10	
0.25	1.20	5.05	238900	3.85	1.38	0.99	0.01	0.02	0.11	
0.12	0.98	5.37	258900	4.39	1.42	1.02	-0.02	-0.06	-0.01	
Control	0.88	4.77	259100	3.89	1.42	1.00	0.00	0.00	0.00	
8.00	1.8	1.88	45500	0.08	0.55	0.39	0.61	0.88	0.98	
4.00	1.27	1.15	28600	-0.12	0.32	0.23	0.77	0.94	1.03	
2.00	1.18	2.43	50300	1.25	0.60	0.42	0.58	0.86	0.68	
1.00	1.23	4.49	207400	3.26	1.31	0.92	0.08	0.21	0.16	
0.50	1.30	5.01	254100	3.71	1.41	0.99	0.01	0.02	0.05	
0.25	1.19	5.31	279200	4.12	1.46	1.03	-0.03	-0.08	-0.06	
0.12	1.20	5.41	269400	4.21	1.44	1.01	-0.01	-0.04	-0.08	
Control	1.40	5.00	269100	3.6	1.44	1.00	0.00	0.00	0.00	
8.00	1.96	2.07	37100	0.11	0.45	0.31	0.69	0.91	0.97	
4.00	1.35	1.26	25700	-0.09	0.27	0.19	0.81	0.96	1.03	
2.00	1.15	1.6	45700	0.45	0.56	0.39	0.61	0.88	0.88	
1.00	1.08	3.88	181500	2.8	1.25	0.86	0.14	0.34	0.22	
0.50	1.13	4.99	245400	3.86	1.40	0.97	0.03	0.09	-0.07	
0.25	1.18	5.29	254500	4.11	1.42	0.98	0.02	0.06	-0.14	
0.12	1.19	5.3	248400	4.11	1.40	0.97	0.03	0.08	-0.14	
Control	1.06	5.00	257533	3.94	1.42	1.00	0.00	0.00	0.00	
8.00	1.78	1.93	40833	0.16	0.50	0.35	0.65	0.89	0.96	
4.00	1.31	1.23	28033	-0.08	0.31	0.22	0.78	0.95	1.02	
2.00	1.19	2.04	51633	0.84	0.62	0.43	0.57	0.85	0.79	
1.00	1.18	4.12	191333	2.95	1.27	0.90	0.10	0.27	0.25	
0.50	1.20	5.03	255000	3.83	1.42	1.00	0.00	0.01	0.03	
0.25	1.19	5.22	257533	4.03	1.42	1.00	0.00	0.00	-0.02	
0.12	1.12	5.36	258900	4.24	1.42	1.00	0.00	-0.01	-0.08	

實驗毒物：		Tr-2-heptenal			初始細胞密度(cells/mL):15000					
MCV (μm^3):		39.39			Initial pH:		7.43		EDTA(%):	0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.26	4.83	238000	3.57	1.38	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.52	1.74	1.84	16100	0.1	0.04	0.03	0.97	1.00	0.97	
2.76	1.46	1.74	15500	0.28	0.02	0.01	0.99	1.00	0.92	
1.38	1.31	3.35	69100	2.04	0.76	0.55	0.45	0.76	0.43	
0.69	1.19	4.85	214000	3.66	1.33	0.96	0.04	0.11	-0.03	
0.35	1.36	6.43	254000	5.07	1.41	1.02	-0.02	-0.07	-0.42	
0.17	1.48	5.73	236100	4.25	1.38	1.00	0.00	0.01	-0.19	
0.09	1.42	5.61	226600	4.19	1.36	0.98	0.02	0.05	-0.17	
Control	1.19	5.33	234300	4.14	1.37	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.52	1.77	1.51	14300	-0.26	-0.02	-0.02	1.02	1.00	1.06	
2.76	1.56	1.64	13700	0.08	-0.05	-0.03	1.03	1.01	0.98	
1.38	1.38	3.31	48000	1.93	0.58	0.42	0.58	0.85	0.53	
0.69	1.13	5.78	225500	4.65	1.36	0.99	0.01	0.04	-0.12	
0.35	1.34	6.15	230900	4.81	1.37	0.99	0.01	0.02	-0.16	
0.17	1.33	5.56	200100	4.23	1.30	0.94	0.06	0.16	-0.02	
0.09	1.39	6.23	242200	4.84	1.39	1.01	-0.01	-0.04	-0.17	
Control	1.44	5.44	227700	4	1.36	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.52	1.74	1.60	14200	-0.14	-0.03	-0.02	1.02	1.00	1.04	
2.76	1.52	1.69	15900	0.17	0.03	0.02	0.98	1.00	0.96	
1.38	1.37	3.14	57600	1.77	0.67	0.49	0.51	0.80	0.56	
0.69	1.35	5.78	212600	4.43	1.33	0.97	0.03	0.07	-0.11	
0.35	1.36	5.94	227500	4.58	1.36	1.00	0.00	0.00	-0.15	
0.17	1.24	6.28	247500	5.04	1.40	1.03	-0.03	-0.09	-0.26	
0.09	1.28	6.05	237400	4.77	1.38	1.02	-0.02	-0.05	-0.19	
Control	1.30	5.20	233333	3.90	1.37	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.52	1.75	1.65	14867	-0.10	-0.01	0.00	1.00	1.00	1.03	
2.76	1.51	1.69	15033	0.18	0.00	0.00	1.00	1.00	0.95	
1.38	1.35	3.27	58233	1.91	0.67	0.49	0.51	0.80	0.51	
0.69	1.22	5.47	217367	4.25	1.34	0.97	0.03	0.07	-0.09	
0.35	1.35	6.17	237467	4.82	1.38	1.01	-0.01	-0.02	-0.23	
0.17	1.35	5.86	227900	4.51	1.36	0.99	0.01	0.02	-0.15	
0.09	1.36	5.96	235400	4.60	1.38	1.00	0.00	-0.01	-0.18	

實驗毒物：		Tr-2-octenal			初始細胞密度(cells/mL):15000					
MCV (μm^3):		40.12			Initial pH:		7.45		EDTA(%):	0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.57	5.44	228700	3.87	1.36	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.16	2.08	0.24	46500	-1.84	0.57	0.42	0.58	0.85	1.48	
3.08	1.48	0.60	47000	-0.88	0.57	0.42	0.58	0.85	1.23	
1.54	1.33	1.16	91200	-0.17	0.90	0.66	0.34	0.64	1.04	
0.77	1.29	5.3	201200	4.01	1.30	0.95	0.05	0.13	-0.04	
0.39	1.38	7.13	242200	5.75	1.39	1.02	-0.02	-0.06	-0.49	
0.19	1.57	7.07	248700	5.50	1.40	1.03	-0.03	-0.09	-0.42	
0.10	1.37	6.62	248000	5.25	1.40	1.03	-0.03	-0.09	-0.36	
Control	1.35	5.10	215200	3.75	1.33	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.16	1.99	0.2	34800	-1.79	0.42	0.32	0.68	0.90	1.48	
3.08	1.56	0.21	52200	-1.35	0.62	0.47	0.53	0.81	1.36	
1.54	1.35	1.27	89100	-0.08	0.89	0.67	0.33	0.63	1.02	
0.77	1.34	5.40	169700	4.06	1.21	0.91	0.09	0.23	-0.08	
0.39	1.37	7.09	233900	5.72	1.37	1.03	-0.03	-0.09	-0.53	
0.19	1.38	6.24	228000	4.86	1.36	1.02	-0.02	-0.06	-0.30	
0.10	1.24	6.15	248200	4.91	1.40	1.05	-0.05	-0.16	-0.31	
Control	1.52	5.18	246700	3.66	1.40	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.16	1.94	0.24	37100	-1.70	0.45	0.32	0.68	0.90	1.46	
3.08	1.62	0.26	52200	-1.36	0.62	0.45	0.55	0.84	1.37	
1.54	1.39	1.57	112700	0.18	1.01	0.72	0.28	0.58	0.95	
0.77	1.21	4.90	172600	3.69	1.22	0.87	0.13	0.32	-0.01	
0.39	1.39	7.13	248600	5.74	1.40	1.00	0.00	-0.01	-0.57	
0.19	1.23	6.74	265300	5.51	1.44	1.03	-0.03	-0.08	-0.51	
0.10	1.43	6.40	245200	4.97	1.40	1.00	0.00	0.01	-0.36	
Control	1.48	5.24	230200	3.76	1.36	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.16	2.00	0.23	39467	-1.78	0.48	0.35	0.65	0.89	1.47	
3.08	1.55	0.36	50467	-1.20	0.61	0.44	0.56	0.84	1.32	
1.54	1.36	1.33	97667	-0.02	0.93	0.68	0.31	0.62	1.01	
0.77	1.28	5.20	181167	3.92	1.24	0.91	0.09	0.23	-0.04	
0.39	1.38	7.12	241567	5.74	1.39	1.02	-0.02	-0.05	-0.53	
0.19	1.39	6.68	247333	5.29	1.40	1.03	-0.03	-0.08	-0.41	
0.10	1.35	6.39	247133	5.04	1.40	1.03	-0.03	-0.08	-0.34	

實驗毒物：		Tr-2-nonenal			初始細胞密度(cells/mL):15000					
MCV (μm ³):		41.34			Initial pH:		7.68		EDTA(%):	0%
T(°C):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	μspecific	μrelative	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.20	7.51	276500	6.31	1.46	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.52	1.36	0.25	30100	-1.11	0.35	0.24	0.76	0.94	1.18	
2.76	1.19	0.15	25900	-1.04	0.27	0.19	0.81	0.96	1.16	
1.38	1.01	0.18	23000	-0.83	0.21	0.15	0.85	0.97	1.13	
0.69	1.17	3.87	122700	2.70	1.05	0.72	0.28	0.59	0.57	
0.35	1.04	6.75	220800	5.71	1.34	0.92	0.08	0.21	0.10	
0.17	1.06	7.38	237600	6.32	1.38	0.95	0.05	0.15	0.00	
0.09	1.14	7.33	261600	6.19	1.43	0.98	0.02	0.06	0.02	
Control	1.14	7.81	282200	6.67	1.47	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.52	1.38	0.17	27600	-1.21	0.30	0.21	0.79	0.95	1.18	
2.76	1.12	0.17	24300	-0.95	0.24	0.16	0.84	0.97	1.14	
1.38	0.98	0.18	30100	-0.80	0.35	0.24	0.76	0.94	1.12	
0.69	1.06	4.04	139000	2.98	1.11	0.76	0.24	0.54	0.55	
0.35	1.13	6.86	200400	5.73	1.30	0.88	0.12	0.31	0.14	
0.17	1.25	6.66	206500	5.41	1.31	0.89	0.11	0.28	0.19	
0.09	1.09	7.89	272500	6.8	1.45	0.99	0.01	0.04	-0.02	
Control	1.37	7.7	276500	6.33	1.46	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.52	1.48	0.17	30100	-1.31	0.35	0.24	0.76	0.94	1.21	
2.76	1.13	0.16	37000	-0.97	0.45	0.31	0.69	0.92	1.15	
1.38	1.02	0.18	35300	-0.84	0.43	0.29	0.71	0.92	1.13	
0.69	1.12	3.89	124400	2.77	1.06	0.73	0.27	0.58	0.56	
0.35	1.15	6.68	198900	5.53	1.29	0.89	0.11	0.30	0.13	
0.17	1.04	7.10	227100	6.06	1.36	0.93	0.07	0.19	0.04	
0.09	1.2	7.00	227000	5.80	1.36	0.93	0.07	0.19	0.08	
Control	1.24	7.67	278400	6.44	1.46	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.52	1.41	0.20	29267	-1.21	0.33	0.23	0.77	0.95	1.19	
2.76	1.15	0.16	29067	-0.99	0.32	0.22	0.77	0.95	1.15	
1.38	1.00	0.18	29467	-0.82	0.33	0.23	0.77	0.95	1.13	
0.69	1.12	3.93	128700	2.82	1.07	0.74	0.26	0.57	0.56	
0.35	1.11	6.76	206700	5.66	1.31	0.90	0.10	0.27	0.12	
0.17	1.12	7.05	223733	5.93	1.35	0.92	0.07	0.21	0.08	
0.09	1.14	7.41	253700	6.26	1.41	0.97	0.03	0.09	0.03	

實驗毒物：		Tr-2-decenal			初始細胞密度(cells/mL):15000					
MCV (μm^3):		42.55			Initial pH:		7.63		EDTA(%):	0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.16	5.68	257000	4.52	1.42	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.08	1.99	0.39	49900	-1.60	0.60	0.42	0.58	0.86	1.35	
3.04	1.65	0.29	40300	-1.36	0.49	0.35	0.65	0.90	1.30	
1.52	1.42	0.72	61400	-0.7	0.70	0.50	0.50	0.81	1.15	
0.76	1.48	4.73	179400	3.25	1.24	0.87	0.13	0.32	0.28	
0.38	1.45	7.12	286200	5.67	1.47	1.04	-0.04	-0.12	-0.25	
0.19	1.41	7.94	314100	6.53	1.52	1.07	-0.07	-0.24	-0.44	
0.10	1.41	8.18	351600	6.77	1.58	1.11	-0.11	-0.39	-0.50	
Control	1.24	7.54	365200	6.30	1.60	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.08	2.06	0.30	77900	-1.76	0.82	0.52	0.48	0.82	1.28	
3.04	1.57	0.30	55900	-1.27	0.66	0.41	0.59	0.88	1.20	
1.52	1.63	1.29	76800	-0.34	0.82	0.51	0.49	0.82	1.05	
0.76	1.38	4.43	188100	3.05	1.26	0.79	0.21	0.51	0.52	
0.38	1.21	7.31	314300	6.10	1.52	0.95	0.05	0.15	0.03	
0.19	1.37	8.11	350900	6.74	1.58	0.99	0.01	0.04	-0.07	
0.10	1.30	8.14	350800	6.84	1.58	0.99	0.01	0.04	-0.09	
Control	1.21	6.88	311900	5.67	1.52	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.08	2.43	0.31	74200	-2.12	0.80	0.53	0.47	0.80	1.37	
3.04	1.72	0.30	45500	-1.42	0.55	0.37	0.63	0.90	1.25	
1.52	1.60	1.23	63500	-0.37	0.72	0.48	0.52	0.84	1.07	
0.76	1.52	4.84	205400	3.32	1.31	0.86	0.14	0.36	0.41	
0.38	1.34	7.66	330700	6.32	1.55	1.02	-0.02	-0.06	-0.11	
0.19	1.32	8.06	316100	6.74	1.52	1.00	0.00	-0.01	-0.19	
0.10	1.23	7.93	357500	6.70	1.59	1.04	-0.04	-0.15	-0.18	
Control	1.20	6.70	311367	5.50	1.51	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.08	2.16	0.33	67333	-1.83	0.74	0.49	0.50	0.82	1.33	
3.04	1.65	0.30	47233	-1.35	0.57	0.38	0.62	0.89	1.25	
1.52	1.55	1.08	67233	-0.47	0.75	0.49	0.51	0.82	1.09	
0.76	1.46	4.67	190967	3.21	1.27	0.84	0.16	0.41	0.42	
0.38	1.33	7.36	310400	6.03	1.51	1.00	0.00	0.00	-0.10	
0.19	1.37	8.04	327033	6.67	1.54	1.02	-0.02	-0.05	-0.21	
0.10	1.31	8.08	353300	6.77	1.58	1.05	-0.04	-0.14	-0.23	

實驗毒物：		2,4-hexadienal			初始細胞密度(cells/mL):15000					
MCV (μm^3):		44.56			Initial pH:		7.59		EDTA(%):	0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.15	8.61	407300	7.46	1.65	1.00	0.00	0.00	0.00	
4.59	1.54	1.81	22700	0.27	0.21	0.13	0.87	0.98	0.96	
2.29	1.18	1.81	20800	0.63	0.16	0.10	0.90	0.99	0.92	
1.15	1.16	1.88	40200	0.72	0.49	0.30	0.70	0.94	0.90	
0.57	1.22	3.40	87200	2.18	0.88	0.53	0.47	0.82	0.71	
0.29	1.21	5.81	216400	4.60	1.33	0.81	0.19	0.49	0.38	
0.14	1.23	8.12	302100	6.89	1.50	0.91	0.09	0.27	0.08	
0.07	1.35	8.68	362800	7.33	1.59	0.96	0.04	0.11	0.02	
Control	1.22	8.3	397300	7.08	1.64	1.00	0.00	0.00	0.00	
4.59	1.44	1.73	26500	0.29	0.28	0.17	0.83	0.97	0.96	
2.29	1.26	1.81	20800	0.55	0.16	0.10	0.90	0.98	0.92	
1.15	1.25	1.95	23200	0.70	0.22	0.13	0.87	0.98	0.90	
0.57	1.28	3.20	73000	1.92	0.79	0.48	0.52	0.85	0.73	
0.29	1.23	5.67	225300	4.44	1.35	0.83	0.17	0.45	0.37	
0.14	1.25	8.17	344800	6.92	1.57	0.96	0.04	0.14	0.02	
0.07	1.31	8.52	347300	7.21	1.57	0.96	0.04	0.13	-0.02	
Control	1.29	8.22	399400	6.93	1.64	1.00	0.00	0.00	0.00	
4.59	1.48	2.02	25700	0.54	0.27	0.16	0.84	0.97	0.92	
2.29	1.20	1.97	21300	0.77	0.18	0.11	0.89	0.98	0.89	
1.15	1.28	2.16	30200	0.88	0.35	0.21	0.79	0.96	0.87	
0.57	1.18	3.25	95200	2.07	0.92	0.56	0.44	0.79	0.70	
0.29	1.22	5.09	194600	3.87	1.28	0.78	0.22	0.53	0.44	
0.14	1.33	8.26	305100	6.93	1.51	0.92	0.08	0.25	0.00	
0.07	1.22	8.95	380800	7.73	1.62	0.99	0.01	0.05	-0.12	
Control	1.22	8.38	401333	7.16	1.64	1.00	0.00	0.00	0.00	
4.59	1.49	1.85	24967	0.37	0.25	0.15	0.84	0.97	0.95	
2.29	1.21	1.86	20967	0.65	0.17	0.10	0.90	0.98	0.91	
1.15	1.23	2.00	31200	0.77	0.35	0.21	0.78	0.96	0.89	
0.57	1.23	3.28	85133	2.06	0.87	0.53	0.47	0.82	0.71	
0.29	1.22	5.52	212100	4.30	1.32	0.81	0.19	0.49	0.40	
0.14	1.27	8.18	317333	6.91	1.53	0.93	0.07	0.22	0.03	
0.07	1.29	8.72	363633	7.42	1.59	0.97	0.03	0.10	-0.04	

實驗毒物：		Tr, tr-2,4-heptadienal				初始細胞密度(cells/mL) : 15000				
MCV (μm^3) :		42.61		Initial pH :		7.67		EDTA(%) :		0%
T($^{\circ}\text{C}$) :		24		Test duration :		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.64	6.69	246000	5.05	1.40	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.24	1.70	2.33	32700	0.63	0.39	0.28	0.72	0.92	0.88	
3.12	1.49	2.67	68400	1.18	0.76	0.54	0.46	0.77	0.77	
1.56	1.24	3.50	105100	2.26	0.97	0.70	0.30	0.61	0.55	
0.78	1.26	5.44	192200	4.18	1.28	0.91	0.09	0.23	0.17	
0.39	1.23	5.63	208300	4.4	1.32	0.94	0.06	0.16	0.13	
0.20	1.33	8.24	295700	6.91	1.49	1.07	-0.07	-0.22	-0.37	
0.10	1.31	8.52	294100	7.21	1.49	1.06	-0.06	-0.21	-0.43	
Control	1.19	7.13	268800	5.94	1.44	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.24	1.72	2.11	35100	0.39	0.43	0.29	0.71	0.92	0.93	
3.12	1.42	2.18	63700	0.76	0.72	0.50	0.50	0.81	0.87	
1.56	1.18	4.43	161400	3.25	1.19	0.82	0.18	0.42	0.45	
0.78	1.25	5.55	207000	4.30	1.31	0.91	0.09	0.24	0.28	
0.39	1.26	6.39	232800	5.13	1.37	0.95	0.05	0.14	0.14	
0.20	1.28	7.73	251800	6.45	1.41	0.98	0.02	0.07	-0.09	
0.10	1.23	8.14	292500	6.91	1.49	1.03	-0.03	-0.09	-0.16	
Control	1.7	7.36	280300	5.66	1.46	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.24	1.93	2.51	28400	0.58	0.32	0.22	0.78	0.95	0.90	
3.12	1.47	3.15	55100	1.68	0.65	0.44	0.56	0.85	0.70	
1.56	1.22	4.14	162100	2.92	1.19	0.81	0.19	0.45	0.48	
0.78	1.33	5.58	220600	4.25	1.34	0.92	0.08	0.23	0.25	
0.39	1.34	6.55	240900	5.21	1.39	0.95	0.05	0.15	0.08	
0.20	1.30	8.03	258500	6.73	1.42	0.97	0.03	0.08	-0.19	
0.10	1.61	8.17	272500	6.56	1.45	0.99	0.01	0.03	-0.16	
Control	1.51	7.06	265033	5.55	1.44	1.00	0.00	0.00	0.00	
6.24	1.78	2.32	32067	0.53	0.38	0.26	0.74	0.93	0.90	
3.12	1.46	2.67	62400	1.21	0.71	0.50	0.50	0.81	0.78	
1.56	1.21	4.02	142867	2.81	1.12	0.78	0.22	0.49	0.49	
0.78	1.28	5.52	206600	4.24	1.31	0.91	0.09	0.23	0.24	
0.39	1.28	6.19	227333	4.91	1.36	0.95	0.05	0.15	0.11	
0.20	1.30	8.00	268667	6.70	1.44	1.01	0.00	-0.01	-0.21	
0.10	1.38	8.28	286367	6.89	1.47	1.03	-0.03	-0.09	-0.24	

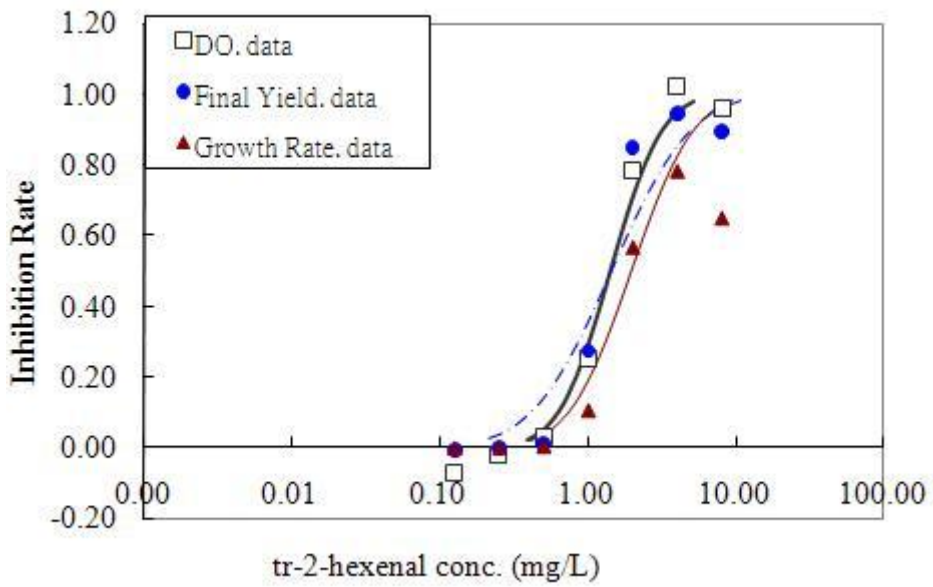
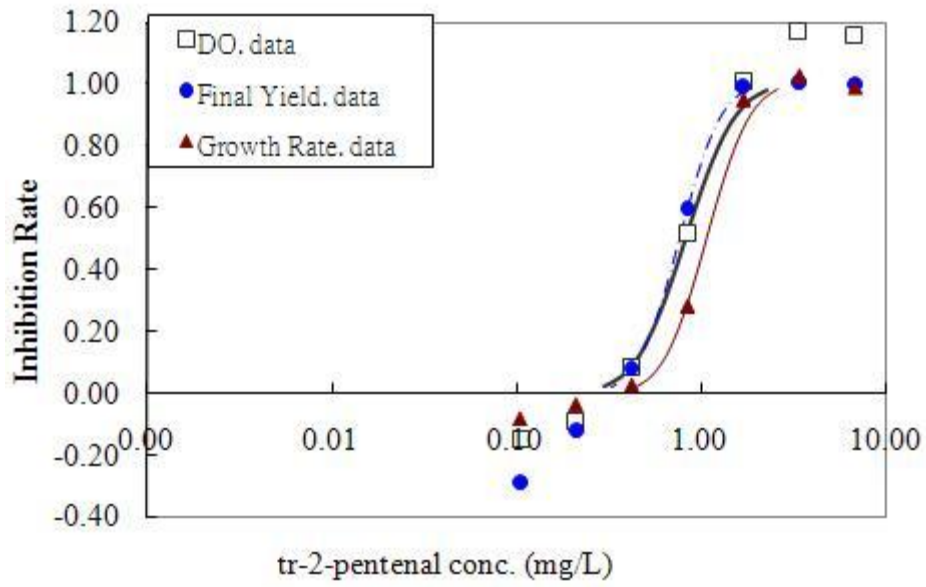
實驗毒物：		Tr, tr-2,4-nonadienal				初始細胞密度(cells/mL):15000				
MCV (μm^3):		42.44		Initial pH:		7.48		EDTA(%):		0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.35	6.26	278900	4.91	1.46	1.00	0.00	0.00	0.00	
4.70	1.75	1.95	27400	0.20	0.30	0.21	0.79	0.95	0.96	
2.35	1.41	0.25	38000	-1.16	0.46	0.32	0.68	0.91	1.24	
1.18	1.20	2.11	25300	0.91	0.26	0.18	0.82	0.96	0.81	
0.59	1.08	0.76	60000	-0.32	0.69	0.47	0.53	0.83	1.07	
0.29	1.10	4.13	216100	3.03	1.33	0.91	0.09	0.24	0.38	
0.15	1.17	5.69	257600	4.52	1.42	0.97	0.03	0.08	0.08	
0.07	1.21	5.74	239200	4.53	1.38	0.95	0.05	0.15	0.08	
Control	1.11	5.92	291300	4.81	1.48	1.00	0.00	0.00	0.00	
4.70	1.75	0.19	30800	-1.56	0.36	0.24	0.76	0.94	1.32	
2.35	1.53	0.18	28700	-1.35	0.32	0.22	0.78	0.95	1.28	
1.18	1.14	0.18	35000	-0.96	0.42	0.29	0.71	0.93	1.20	
0.59	1.11	2.07	57200	0.96	0.67	0.45	0.55	0.85	0.80	
0.29	1.18	4.02	207400	2.84	1.31	0.89	0.11	0.30	0.41	
0.15	1.15	5.71	246900	4.56	1.40	0.94	0.06	0.16	0.05	
0.07	1.17	5.43	205000	4.26	1.31	0.88	0.12	0.31	0.11	
Control	1.20	5.43	280000	4.23	1.46	1.00	0.00	0.00	0.00	
4.70	1.75	1.74	37000	-0.01	0.45	0.31	0.69	0.92	1.00	
2.35	1.42	2.02	38900	0.60	0.48	0.33	0.67	0.91	0.86	
1.18	1.10	0.17	33000	-0.93	0.39	0.27	0.73	0.93	1.22	
0.59	1.17	0.77	66200	-0.4	0.74	0.51	0.49	0.81	1.09	
0.29	1.18	3.88	192500	2.70	1.28	0.87	0.13	0.33	0.36	
0.15	1.22	2.88	250000	1.66	1.41	0.96	0.04	0.11	0.61	
0.07	0.99	5.73	270200	4.74	1.45	0.99	0.01	0.04	-0.12	
Control	1.22	5.87	283400	4.65	1.47	1.00	0.00	0.00	0.00	
4.70	1.75	1.29	31733	-0.46	0.37	0.25	0.75	0.94	1.10	
2.35	1.45	0.82	35200	-0.64	0.42	0.29	0.71	0.92	1.14	
1.18	1.15	0.82	31100	-0.33	0.36	0.24	0.75	0.94	1.07	
0.59	1.12	1.20	61133	0.08	0.70	0.48	0.52	0.83	0.98	
0.29	1.15	4.01	205333	2.86	1.31	0.89	0.11	0.29	0.39	
0.15	1.18	4.76	251500	3.58	1.41	0.96	0.04	0.12	0.23	
0.07	1.12	5.63	238133	4.51	1.38	0.94	0.06	0.17	0.03	

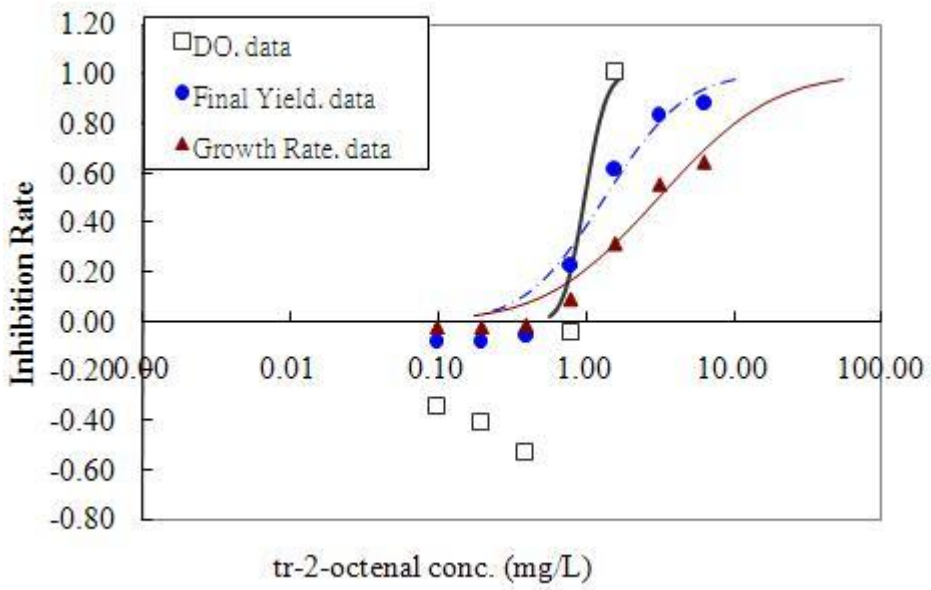
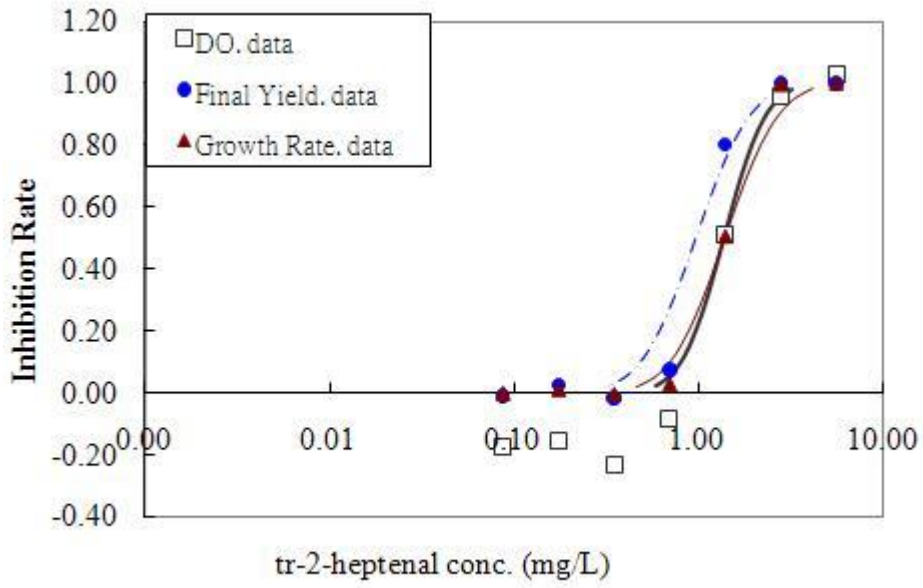
實驗毒物：		Tr-2,cis-6-nonadienal				初始細胞密度(cells/mL):15000				
MCV (μm^3):		39.98		Initial pH:		7.51		EDTA(%):		0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.29	6.67	351200	5.38	1.58	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.40	1.84	1.78	34200	-0.06	0.41	0.26	0.74	0.94	1.01	
2.70	1.44	0.51	40000	-0.93	0.49	0.31	0.69	0.93	1.17	
1.35	1.26	1.21	71800	-0.05	0.78	0.50	0.50	0.83	1.01	
0.68	1.34	5.03	217800	3.69	1.34	0.85	0.15	0.40	0.31	
0.34	1.37	5.90	267300	4.53	1.44	0.91	0.09	0.25	0.16	
0.17	1.27	6.26	296100	4.99	1.49	0.95	0.05	0.16	0.07	
0.08	1.38	6.5	324200	5.12	1.54	0.97	0.03	0.08	0.05	
Control	1.12	6.44	342600	5.32	1.56	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.40	2.01	1.70	36300	-0.31	0.44	0.28	0.72	0.93	1.06	
2.70	1.48	0.17	39200	-1.31	0.48	0.31	0.69	0.93	1.25	
1.35	1.37	1.56	89400	0.19	0.89	0.57	0.43	0.77	0.96	
0.68	1.34	5.01	199900	3.67	1.29	0.83	0.17	0.44	0.31	
0.34	1.19	5.55	246200	4.36	1.40	0.89	0.11	0.29	0.18	
0.17	1.19	6.63	358400	5.44	1.59	1.01	-0.01	-0.05	-0.02	
0.08	1.53	6.75	322800	5.22	1.53	0.98	0.02	0.06	0.02	
Control	1.75	6.77	319900	5.02	1.53	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.40	1.92	1.08	51800	-0.84	0.62	0.41	0.59	0.88	1.17	
2.70	1.55	0.91	36300	-0.64	0.44	0.29	0.71	0.93	1.13	
1.35	1.25	1.01	76200	-0.24	0.81	0.53	0.47	0.80	1.05	
0.68	1.30	4.04	171100	2.74	1.22	0.80	0.20	0.49	0.45	
0.34	1.27	6.29	293300	5.02	1.49	0.97	0.03	0.09	0.00	
0.17	1.26	6.66	345200	5.4	1.57	1.02	-0.02	-0.08	-0.08	
0.08	1.29	6.6	341700	5.31	1.56	1.02	-0.02	-0.07	-0.06	
Control	1.39	6.63	337900	5.24	1.56	1.00	0.00	0.00	0.00	
5.40	1.92	1.52	40767	-0.40	0.49	0.32	0.68	0.92	1.08	
2.70	1.49	0.53	38500	-0.96	0.47	0.30	0.70	0.93	1.18	
1.35	1.29	1.26	79133	-0.03	0.83	0.53	0.47	0.80	1.01	
0.68	1.33	4.69	196267	3.37	1.28	0.82	0.17	0.44	0.36	
0.34	1.28	5.91	268933	4.64	1.44	0.93	0.07	0.21	0.12	
0.17	1.24	6.52	333233	5.28	1.55	1.00	0.00	0.01	-0.01	
0.08	1.40	6.62	329567	5.22	1.54	0.99	0.01	0.03	0.00	

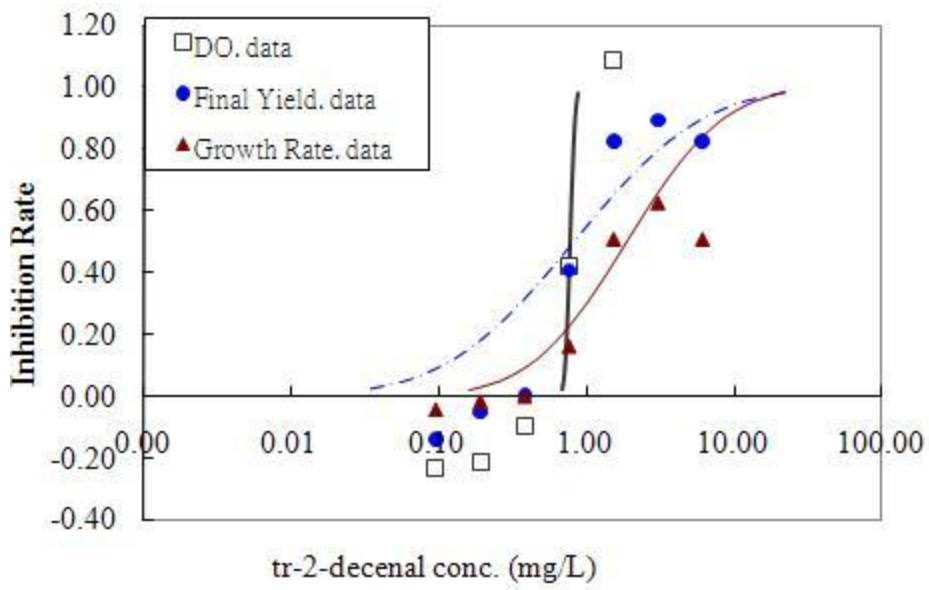
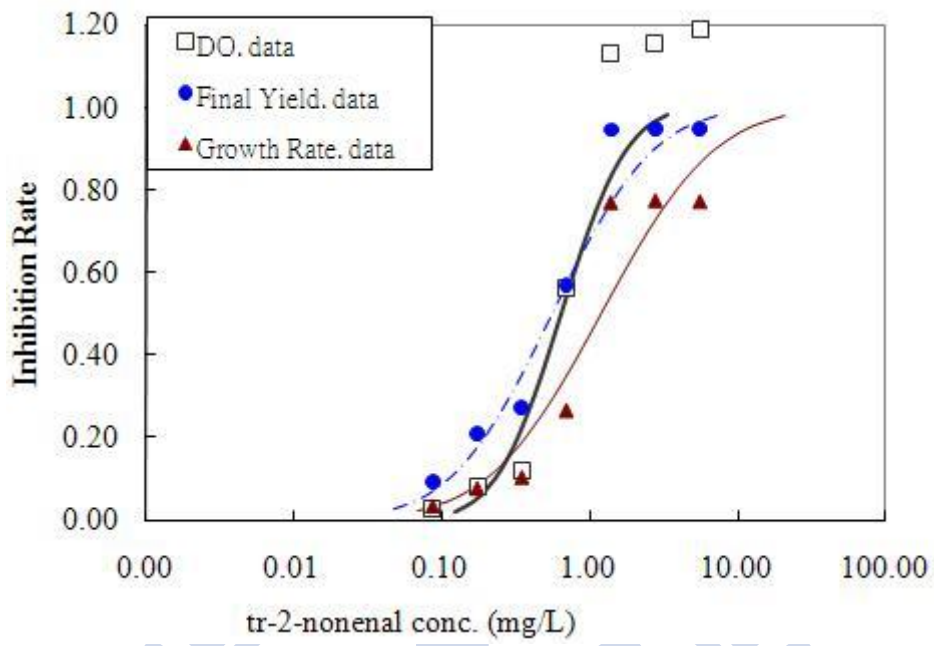
實驗毒物：		4-methyl-2-pentenal				初始細胞密度(cells/mL):15000				
MCV (μm^3):		42.31		Initial pH:		7.55		EDTA(%):		0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.25	7.59	310400	6.34	1.51	1.00	0.00	0.00	0.00	
8.60	1.90	2.47	20200	0.57	0.15	0.10	0.90	0.98	0.91	
4.30	1.41	2.31	30100	0.90	0.35	0.23	0.77	0.95	0.86	
2.15	1.25	4.24	123300	2.99	1.05	0.70	0.30	0.63	0.53	
1.08	1.19	7.80	270800	6.61	1.45	0.95	0.05	0.13	-0.04	
0.54	1.21	8.59	285500	7.38	1.47	0.97	0.03	0.08	-0.16	
0.27	1.34	8.8	304000	7.46	1.50	0.99	0.01	0.02	-0.18	
0.13	1.63	8.45	336500	6.82	1.56	1.03	-0.03	-0.09	-0.08	
Control	1.39	7.77	323200	6.38	1.54	1.00	0.00	0.00	0.00	
8.60	1.73	2.23	13700	0.50	-0.05	-0.03	1.03	1.00	0.92	
4.30	1.42	2.83	29100	1.41	0.33	0.22	0.78	0.95	0.78	
2.15	1.25	4.67	106600	3.42	0.98	0.64	0.36	0.70	0.46	
1.08	1.25	8.42	277800	7.17	1.46	0.95	0.05	0.15	-0.12	
0.54	1.37	8.73	274400	7.36	1.45	0.95	0.05	0.16	-0.15	
0.27	1.26	8.55	305200	7.29	1.51	0.98	0.02	0.06	-0.14	
0.13	1.34	8.87	362800	7.53	1.59	1.04	-0.04	-0.13	-0.18	
Control	1.27	7.31	304500	6.04	1.51	1.00	0.00	0.00	0.00	
8.60	1.72	2.11	10100	0.39	-0.20	-0.13	1.13	1.02	0.94	
4.30	1.31	2.57	31400	1.26	0.37	0.25	0.75	0.94	0.79	
2.15	1.25	4.06	93800	2.81	0.92	0.61	0.39	0.73	0.53	
1.08	1.18	7.99	262100	6.81	1.43	0.95	0.05	0.15	-0.13	
0.54	1.39	8.70	288200	7.31	1.48	0.98	0.02	0.06	-0.21	
0.27	1.21	8.14	305200	6.93	1.51	1.00	0.00	0.00	-0.15	
0.13	1.22	8.14	342100	6.92	1.56	1.04	-0.04	-0.13	-0.15	
Control	1.30	7.56	312700	6.25	1.52	1.00	0.00	0.00	0.00	
8.60	1.78	2.27	14667	0.49	-0.03	-0.02	1.01	1.00	0.92	
4.30	1.38	2.57	30200	1.19	0.35	0.23	0.77	0.95	0.81	
2.15	1.25	4.32	107900	3.07	0.98	0.65	0.35	0.69	0.51	
1.08	1.21	8.07	270233	6.86	1.45	0.95	0.05	0.14	-0.10	
0.54	1.32	8.67	282700	7.35	1.47	0.97	0.03	0.10	-0.18	
0.27	1.27	8.50	304800	7.23	1.51	0.99	0.01	0.03	-0.16	
0.13	1.40	8.49	347133	7.09	1.57	1.03	-0.03	-0.12	-0.13	

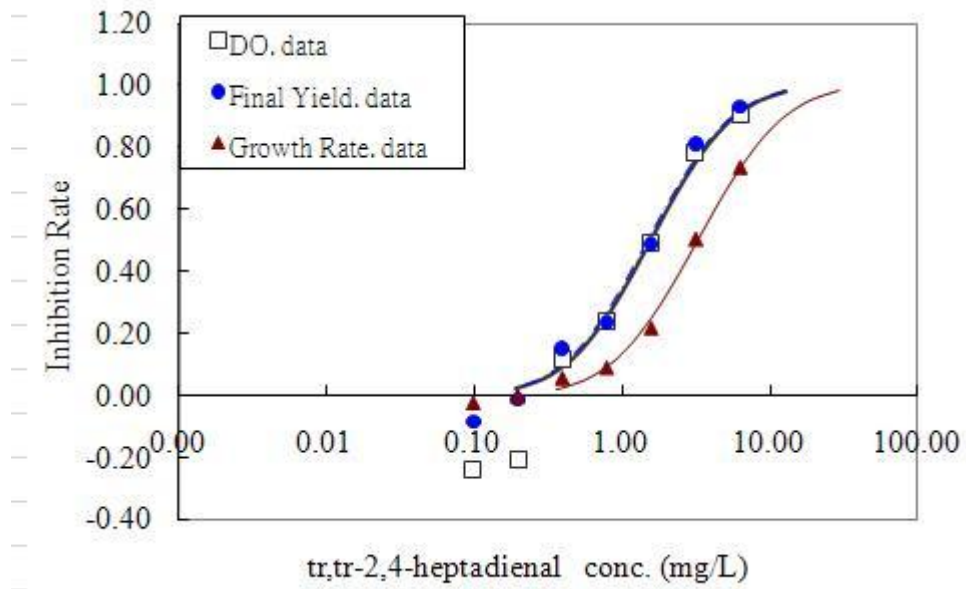
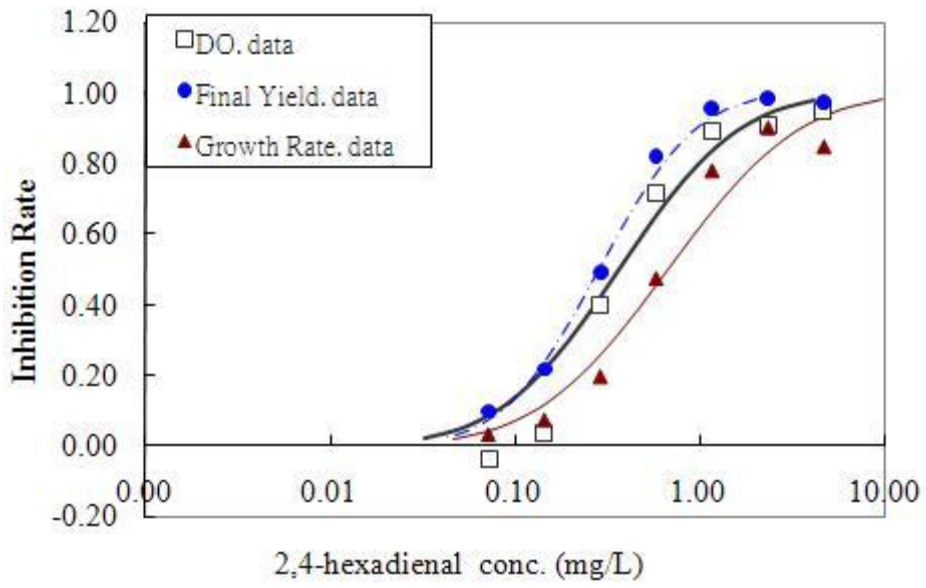
實驗毒物：		Tr-2-methyl-2-butenal				初始細胞密度(cells/mL):15000				
MCV (μm^3):		40.12		Initial pH:		7.58		EDTA(%):		0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.56	8.73	278300	7.17	1.46	1.00	0.00	0.00	0.00	
68.00	2.14	0.31	21600	-1.83	0.18	0.12	0.88	0.97	1.26	
34.00	1.52	1.65	93600	0.13	0.92	0.63	0.37	0.70	0.98	
17.00	1.49	5.56	216800	4.07	1.34	0.91	0.09	0.23	0.43	
8.50	1.29	6.12	261600	4.83	1.43	0.98	0.02	0.06	0.33	
4.25	1.36	7.93	282500	6.57	1.47	1.01	-0.01	-0.02	0.08	
2.13	1.49	9.10	286300	7.61	1.47	1.01	-0.01	-0.03	-0.06	
1.06	1.64	8.75	261300	7.11	1.43	0.98	0.02	0.06	0.01	
Control	1.73	9.52	271300	7.79	1.45	1.00	0.00	0.00	0.00	
68.00	2.44	1.91	28400	-0.53	0.32	0.22	0.78	0.95	1.07	
34.00	1.46	2.29	104000	0.83	0.97	0.67	0.33	0.65	0.89	
17.00	1.43	5.45	217600	4.02	1.34	0.92	0.08	0.21	0.48	
8.50	1.39	7.28	261800	5.89	1.43	0.99	0.01	0.04	0.24	
4.25	1.41	8.36	280800	6.95	1.46	1.01	-0.01	-0.04	0.11	
2.13	1.30	8.52	298500	7.22	1.50	1.03	-0.03	-0.11	0.07	
1.06	1.39	8.49	288600	7.10	1.48	1.02	-0.02	-0.07	0.09	
Control	1.77	8.76	260200	6.99	1.43	1.00	0.00	0.00	0.00	
68.00	2.39	1.58	28800	-0.81	0.33	0.23	0.77	0.94	1.12	
34.00	1.57	2.98	101500	1.41	0.96	0.67	0.33	0.65	0.80	
17.00	1.40	5.73	218200	4.33	1.34	0.94	0.06	0.17	0.38	
8.50	1.40	6.87	266700	5.47	1.44	1.01	-0.01	-0.03	0.22	
4.25	1.40	7.67	280800	6.27	1.46	1.03	-0.03	-0.08	0.10	
2.13	1.31	8.45	290700	7.14	1.48	1.04	-0.04	-0.12	-0.02	
1.06	1.34	9.44	299100	8.1	1.50	1.05	-0.05	-0.16	-0.16	
Control	1.69	9.00	269933	7.32	1.44	1.00	0.00	0.00	0.00	
68.00	2.32	1.27	26267	-1.06	0.28	0.19	0.81	0.96	1.14	
34.00	1.52	2.31	99700	0.79	0.95	0.66	0.34	0.67	0.89	
17.00	1.44	5.58	217533	4.14	1.34	0.93	0.07	0.21	0.43	
8.50	1.36	6.76	263367	5.40	1.43	0.99	0.01	0.03	0.26	
4.25	1.39	7.99	281367	6.60	1.47	1.01	-0.01	-0.04	0.10	
2.13	1.37	8.69	291833	7.32	1.48	1.03	-0.03	-0.09	0.00	
1.06	1.46	8.89	283000	7.44	1.47	1.02	-0.02	-0.05	-0.02	

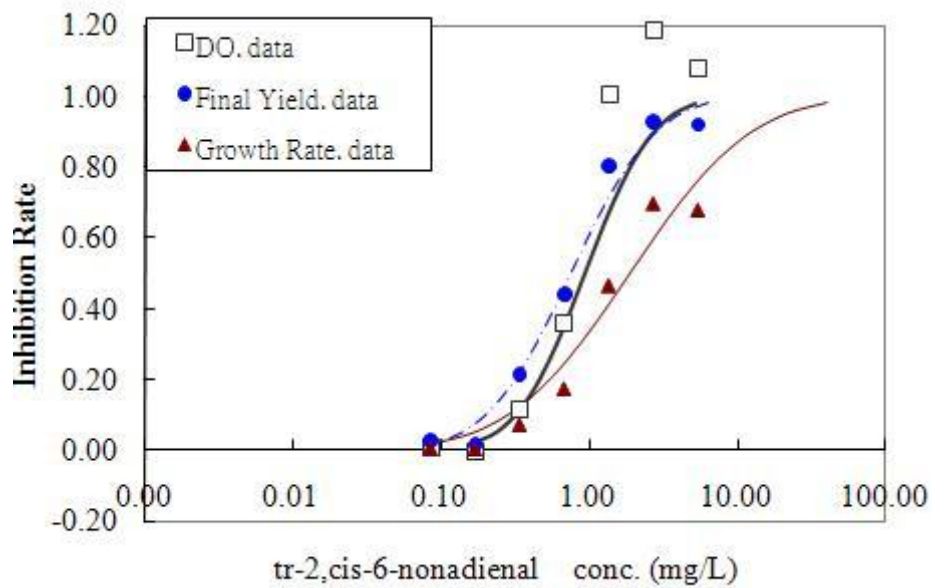
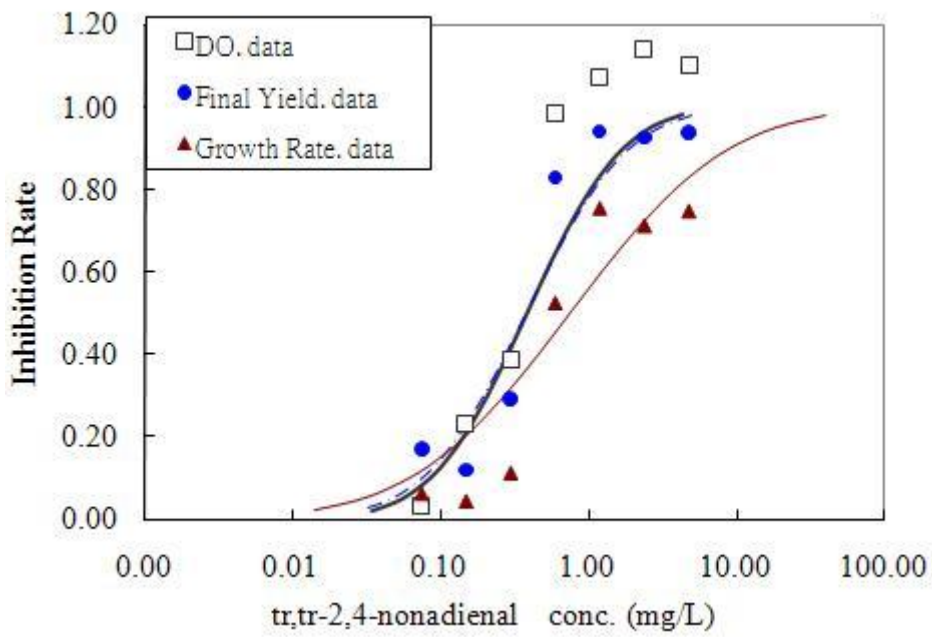
實驗毒物：		2-methyl-2-pentenal		初始細胞密度(cells/mL):15000						
MCV (μm^3):		39.87		Initial pH:		7.63		EDTA(%):		0%
T($^{\circ}\text{C}$):		24		Test duration:		48-h				
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	$\mu\text{specific}$	$\mu\text{relative}$	IR	IR	IR	
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L			(growth rate)	(Biomass)	(DO)	
Control	1.04	5.84	333000	4.80	1.55	1.00	0.00	0.00	0.00	
68.00	1.58	2.56	27200	0.98	0.30	0.19	0.81	0.96	0.80	
34.00	1.22	2.26	39300	1.04	0.48	0.31	0.69	0.92	0.78	
17.00	1.27	3.89	124900	2.62	1.06	0.68	0.32	0.65	0.45	
8.50	1.20	6.78	257900	5.58	1.42	0.92	0.08	0.24	-0.16	
4.25	1.06	8.06	327600	7.00	1.54	0.99	0.01	0.02	-0.46	
2.13	1.12	7.94	346100	6.82	1.57	1.01	-0.01	-0.04	-0.42	
1.06	1.05	7.26	304800	6.21	1.51	0.97	0.03	0.09	-0.29	
Control	1.13	7.94	332200	6.81	1.55	1.00	0.00	0.00	0.00	
68.00	1.55	2.88	36500	1.33	0.44	0.29	0.71	0.93	0.80	
34.00	1.34	2.62	42300	1.28	0.52	0.33	0.67	0.91	0.81	
17.00	1.14	3.99	142000	2.85	1.12	0.73	0.27	0.60	0.58	
8.50	1.13	6.12	249800	4.99	1.41	0.91	0.09	0.26	0.27	
4.25	1.16	7.26	332000	6.10	1.55	1.00	0.00	0.00	0.10	
2.13	1.26	8.19	314700	6.93	1.52	0.98	0.02	0.06	-0.02	
1.06	1.02	8.59	367700	7.57	1.60	1.03	-0.03	-0.11	-0.11	
Control	0.87	7.86	348400	6.99	1.57	1.00	0.00	0.00	0.00	
68.00	1.66	2.23	29800	0.57	0.34	0.22	0.78	0.96	0.92	
34.00	1.28	2.92	36900	1.64	0.45	0.29	0.71	0.93	0.77	
17.00	1.04	3.20	108800	2.16	0.99	0.63	0.37	0.72	0.69	
8.50	1.19	5.88	224700	4.69	1.35	0.86	0.14	0.37	0.33	
4.25	1.12	7.14	295100	6.02	1.49	0.95	0.05	0.16	0.14	
2.13	1.34	8.32	332700	6.98	1.55	0.99	0.01	0.05	0.00	
1.06	1.11	8.70	355300	7.59	1.58	1.01	-0.01	-0.02	-0.09	
Control	1.01	7.21	337867	6.20	1.56	1.00	0.00	0.00	0.00	
68.00	1.60	2.56	31167	0.96	0.36	0.23	0.77	0.95	0.85	
34.00	1.28	2.60	39500	1.32	0.48	0.31	0.69	0.92	0.79	
17.00	1.15	3.69	125233	2.54	1.06	0.68	0.32	0.66	0.59	
8.50	1.17	6.26	244133	5.09	1.39	0.90	0.10	0.29	0.18	
4.25	1.11	7.49	318233	6.37	1.53	0.98	0.02	0.06	-0.03	
2.13	1.24	8.15	331167	6.91	1.55	0.99	0.01	0.02	-0.11	
1.06	1.06	8.18	342600	7.12	1.56	1.00	0.00	-0.01	-0.15	

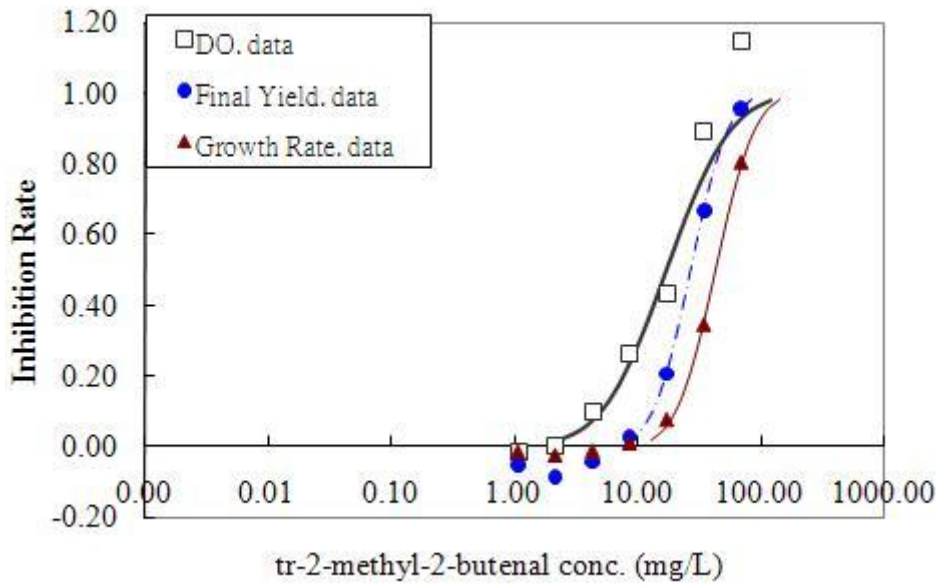
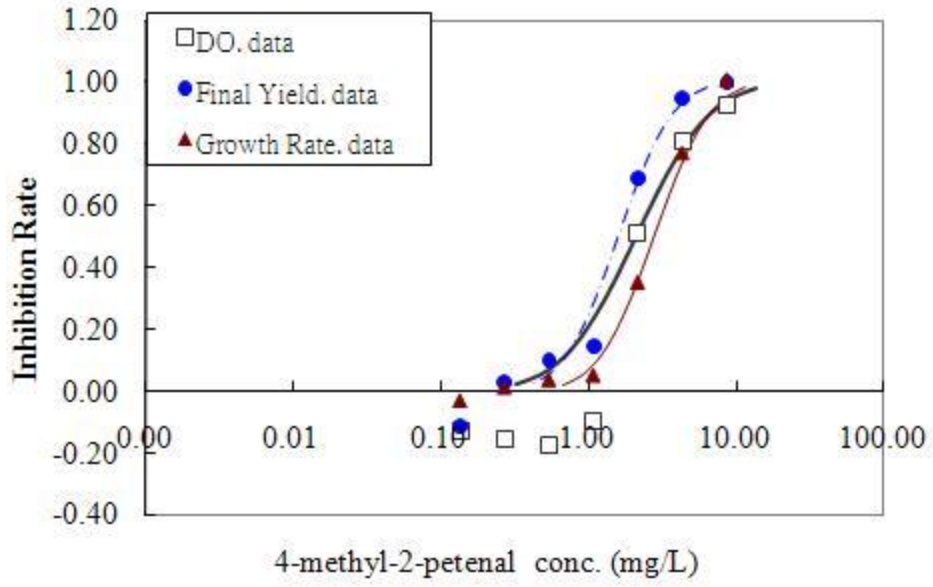


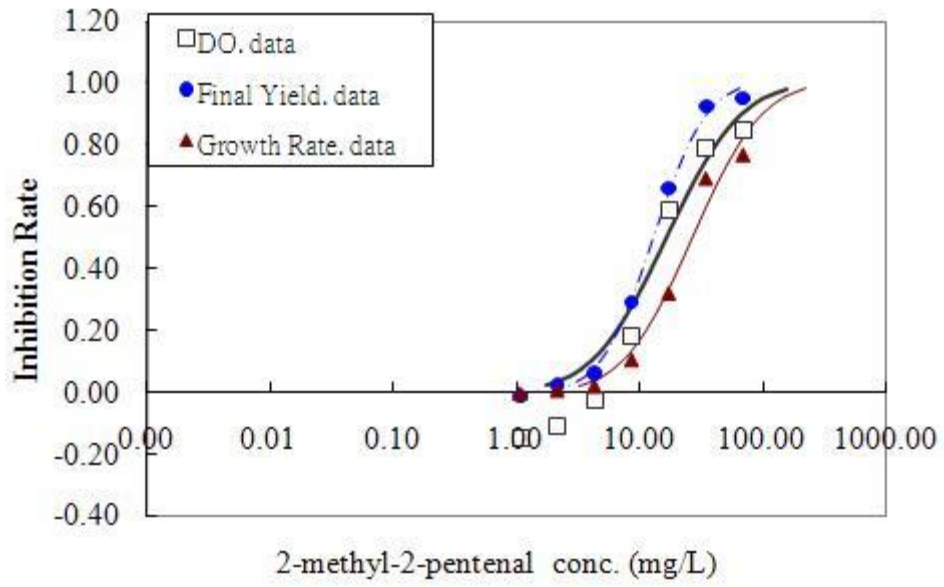














(一)一般迴歸分析法

- 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 chemical	C2-T CAS No.	C3 log(KC50)=1 (Bo)	C4 log(KC50)=1 (Do)	C5 log(KC50)=1 (Go)	C6 HEAT OF FORMATION(H)	C7 TOTAL ENERGY	C8 ELECTRONIC ENER
1	3-hexyn-2-one	1679-36-3	2.84614	2.66899	2.50574	102.686	-1196.22	-12.0
2	3-buten-2-one	1423-60-5	3.92993	3.71908	3.68689	*	*	-14.0
3	3-methyl-3-penten-2-one	565-62-8	0.22726	0.22507	0.13384	-147.401	-1226.13	-15.0
4	5-hexen-2-one	109-49-9	0.12229	-0.12012	-0.26393	-165.873	-1226.32	-14.0
5	3-hepten-2-one	1119-44-4	1.64351	1.47747	1.52992	-192.423	-1382.13	-16.0
6	4-methyl-3-penten-2-one	141-79-7	-0.16658	-0.26506	-0.33749	226.371	-1222.25	-15.0
7	4-hexen-3-one	2497-21-4	1.55122	1.46075	1.36781	-170.489	-1226.36	-14.0
8	3-nonen-2-one	14309-57-0	2.6681	2.4706	0.94605	-248.552	-1693.79	-21.0
9	3-penten-2-one	625-33-2	3.02611	2.84133	1.32295	-138.732	-1070.50	-12.0
10	3-buten-2-one	78-94-4	-0.25573	-0.37984	-0.53549	-97.193	-914.53	-10.0
11	5-methyl-5-hexene-2-one	3240-09-3	1.82642	1.48654	1.48900	-187.180	-1382.08	-17.0
12	3-octene-2-one	1669-44-9	1.21408	0.94348	0.97387	-221.505	-1537.97	-19.0
13	2-cyclopenten-1-one	930-30-3	0.25730	0.24466	-0.00021	-73.702	-1042.51	-12.0
14	6-methyl-5-heptene-2-one	110-93-0	-0.13042	-0.20387	-0.30940	-215.986	-1537.91	-20.0
15	2-methyl-2-cyclopenten-1-one	1120-73-6	-0.54162	-0.62666	-0.68577	-76.412	-1198.08	-14.0
16	3-methyl-2-cyclopenten-1-one	2758-18-1	*	*	*	-109.961	-1198.43	-14.0
17	Methyl ethyl ketone*	78-93-3	*	*	*	-242.296	-943.34	-10.0

4. 一般迴歸分析，選擇 Stat→Regression

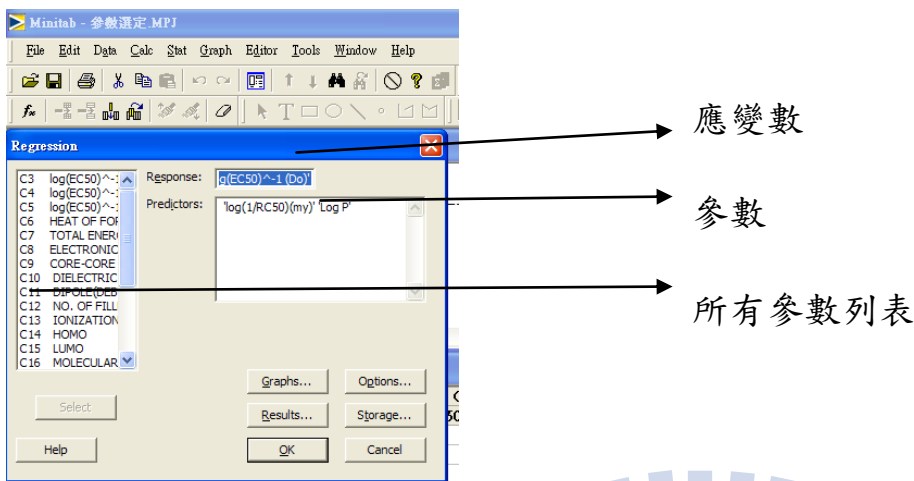
Stat

- Basic Statistics
- Regression
- ANOVA
- DOE
- Control Charts
- Quality Tools
- Reliability/Survival
- Multivariate
- Time Series
- Tables
- Nonparametrics
- EDA
- Power and Sample Size

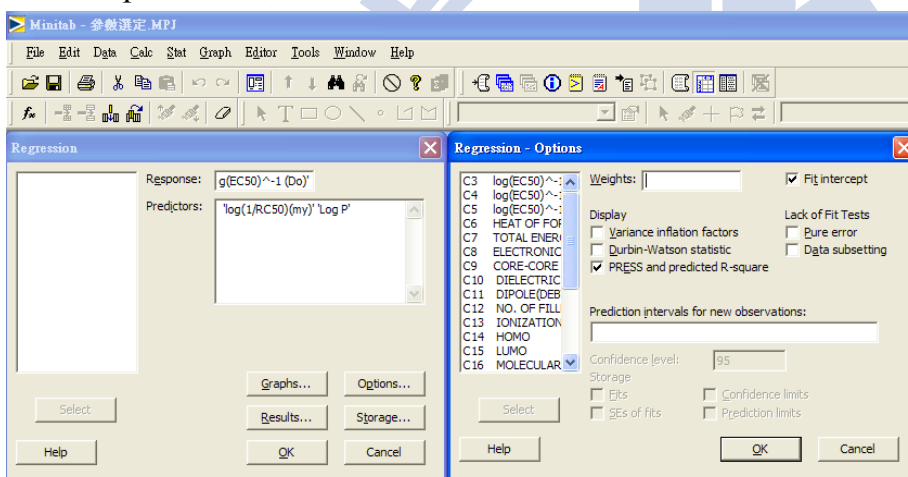
Regression

- Regression...
- Stepwise...
- Best Subsets...
- Fitted Line Plot...
- Partial Least Squares...
- Binary Logistic Regression...
- Ordinal Logistic Regression...
- Nominal Logistic Regression...

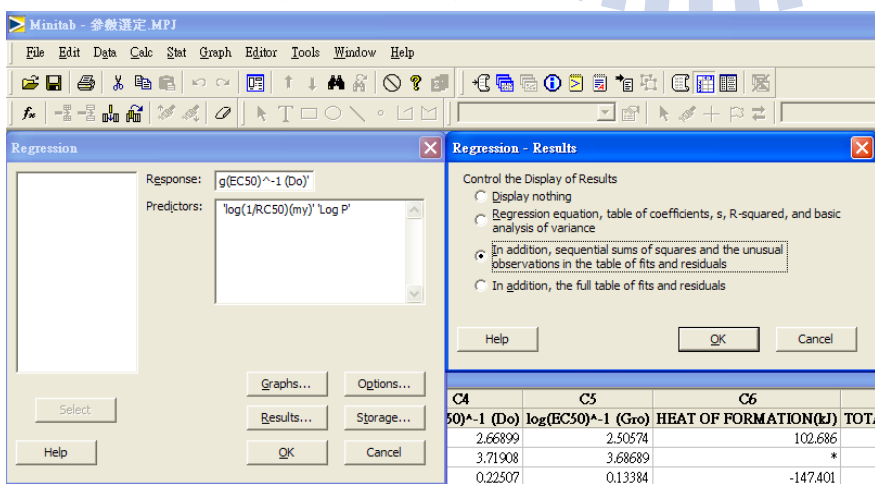
5. 挑選應變數與參數



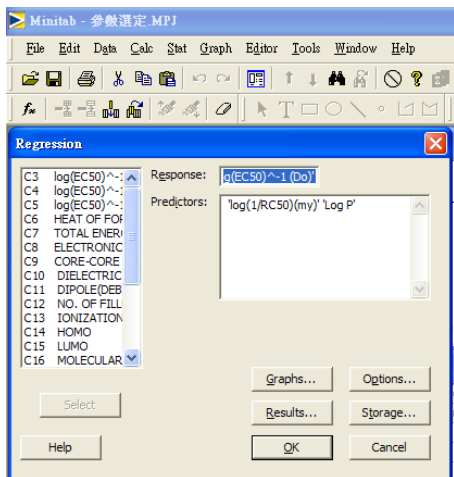
6. 點選 options → 勾選其圖片勾選處 → 點 OK



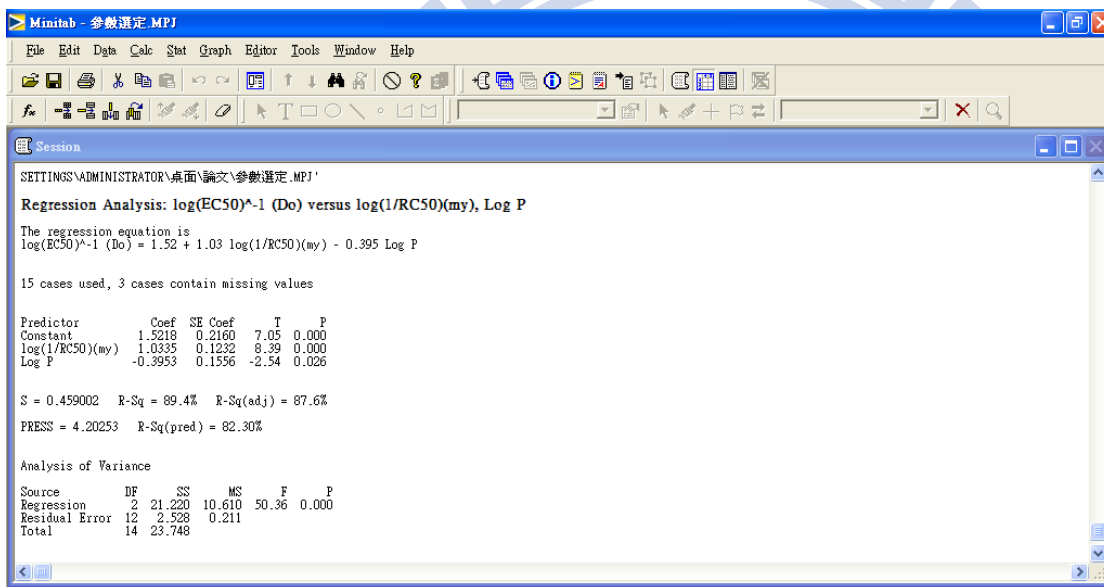
7. 點選 Results → 勾選其圖片勾選處 → 點 OK



8. 回畫面之後→點選 OK

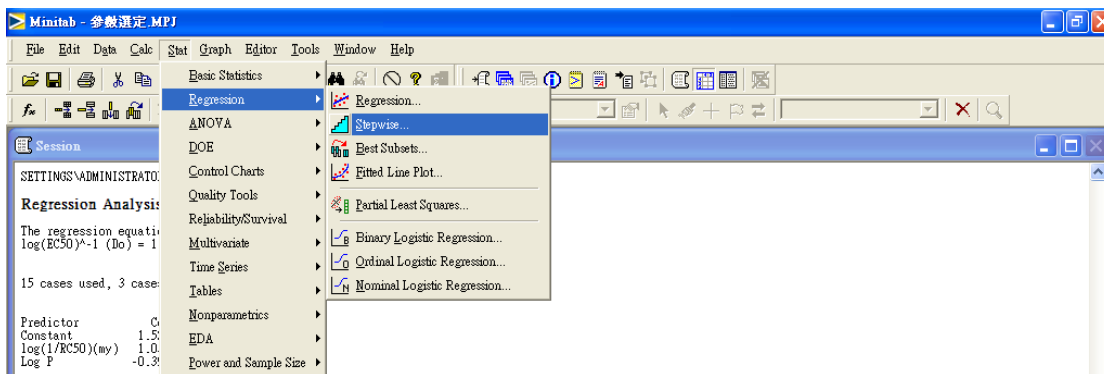


9. 結果如下

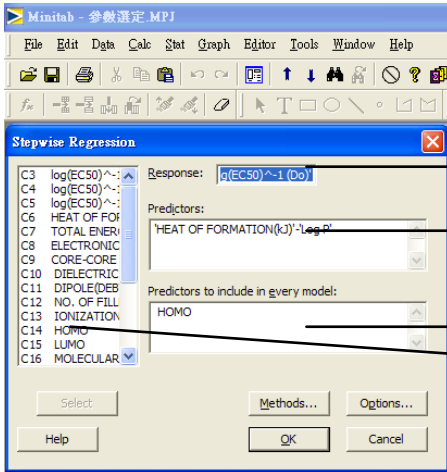


(二) 逐步迴歸分析法適用挑選參數

1. 逐步迴歸分析選擇 Stat→Regression→Stepwise



2. 挑選應變數與參數

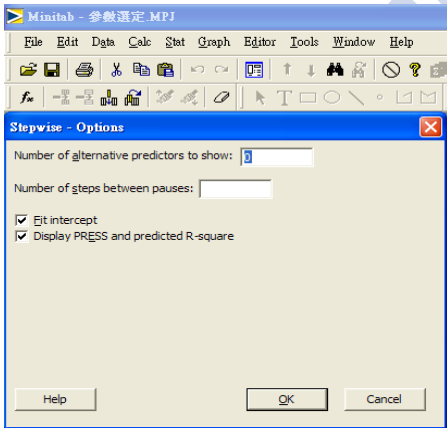


應變數(毒性數據)

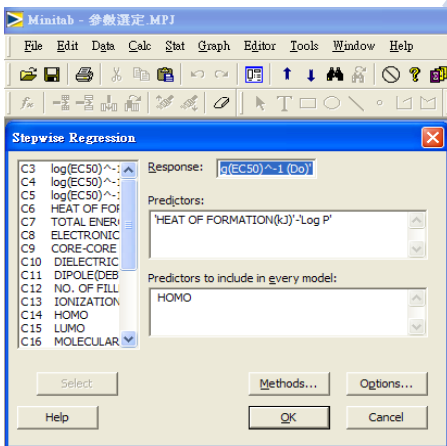
選擇參數選列

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

Minitab - 參數選定.MPJ

File Edit Data Calc Stat Graph Editor Tools Window Help

Session

Stepwise Regression: $\log(\text{EC50})^{-1}$ versus HEAT OF FORM, TOTAL ENERGY, ...

Alpha-to-Enter: 0.15 Alpha-to-Remove: 0.15

Response is $\log(\text{EC50})^{-1}$ (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
$\log(1/\text{RC50})(\text{my})$		0.56	0.66	0.77
T-Value		3.47	4.40	5.01
P-Value		0.005	0.001	0.001
Q3-apha			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。