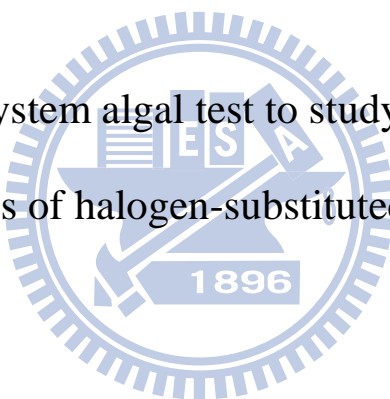


國立交通大學
環境工程研究所
碩士論文

以密閉式藻類毒性試驗研究鹵素取代酯類
之定量結構－活性關係

Using a closed-system algal test to study the structure-activity
relationships of halogen-substituted aliphatic esters



研究生: 洪萱芳
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鹵素取代酯類之定量結構－活性關係

Using a closed-system algal test to study the structure-activity
relationships of halogen-substituted aliphatic esters

學生：洪萱芳

Student : Xuan- Fang Hong

指導教授：陳重元

Adviser : Dr. Chung-Yuan Chen

國立交通大學



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鹵素取代酯類之定量結構－活性關係

學生：洪萱芳

指導教授：陳重元

國立交通大學環境工程研究所

摘要

本研究是以密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗，評估親電性物質－鹵素取代酯類之毒性，探討此類化合物以 S_N2 親核性取代反應與生物分子作用進而對生物體造成毒性之機制，利用化合物與生物分子共價鍵結之反應性參數 RC_{50} 值（穀胱甘肽上之硫醇基之反應性）及親電性參數（ E_{LUMO} 、與鹵素鍵結之碳之部分電荷、鹵素之部分電荷），建立預估毒性能力佳之 QSAR 模式，並探討反應性與生物體毒性之關係。

鹵素取代酯類之藻類毒性趨勢反比於鹵素電負度之大小。化學物 Ethyl fluoroacetate 和 Methyl 3-bromopropionate 之藻類毒性與 S_N2 親核性取代反應無關，Ethyl fluoroacetate 對於藻類生長的抑制應與檸檬酸循環之破壞有關，而 Methyl 3-bromopropionate 之毒理機制較偏向於麻醉性。

在 QSAR 分析方面，以反應性參數 RC_{50} 值去掉不屬於 S_N2 親核性取代反應的化學物和 outlier - Ethyl tribromoacetate，可得到較好的相關性。當鹵素鍵結超過一個的化學物時，利用 RC_{50} 值建立 QSAR 似乎並不適合。

本研究結果之 outlier 為 Ethyl tribromoacetate，查詢文獻，推測可能的原因為空間立體障礙所造成之毒性下降，但是利用反應性參數 RC_{50} 值來描述其毒性，過於理想的模擬情境似乎無法顯示於生物體內空間立體障礙對於化學物之毒性所造成的影響，可能是造成 Ethyl tribromoacetate(13) 為 outlier 的原因。

本次論文最重要之貢獻為-利用電性模擬軟體建立良好的鹵素取代酯類之藻類毒性之定量結構－活性關係，用以取代毒性試驗，減少實驗成本。

Using a closed-system algal test to study the structure-activity relationships of halogen-substituted aliphatic esters

Student : Xuan- Fang Hong

Advisor : Dr.Chung-Yuan Chen

Institute of Environmental Engineering
National Chiao Tung University

Abstract

This study presents the toxicity data of various halogen-substituted aliphatic esters to *Pseudokirchneriella subcapitata*. using a closed algal toxicity testing technique with no headspace. Three different response endpoints, i.e., final yield, growth rate, and the dissolved oxygen production were used to evaluate the toxicity of halogen-substituted aliphatic esters. We also use abiotic thiol reactivity (RC_{50}) to establish the QSAR models.

Halogen- substituted aliphatic esters toxicity mechanism are classified as electrophiles which are for a subgroup of the S_N2 mechanistic domain. Between α -halo-carbonyl-containing compounds the order of reactivity is $I > Br > Cl > F$; but the toxicity of ethyl fluoroacetate (NO.1) is relatively high. The toxicity mechanism of ethyl fluoroacetate (NO.1) could be the inhibition of the Krebs cycle. Ethyl-2,3-di-bromopropionate(NO.14) with two halogens connect with two carbons which make the effect of the carbonyl group separated into a less pronounced overall electrophilicity as compared to ethyl bromoacetate(NO.3). Multi-halogenation at a single-carbon center (halogenated carbon) may sterically hinder their electrophilic reactivity which makes them less toxic than the chemical with only single bromine.

The quantitative structure-activity relationship of halogen-substituted aliphatic esters toxicity with reactivity respect two outliers- Methyl 3-bromopropionate (NO.6) and ethyl tribromoacetate (NO.13). Methyl 3-bromopropionate (NO.6) has relatively high reactivity but low toxicity which seems more like nonpolar narcosis. The steric hindrance of ethyl tribromoacetate (NO.13) could not be presented by the ideal test which using pure glutathione to represent the target in vivo (RC_{50}).

Keywords: *Structure-activity relationships; Halogenated carbonyl chemicals; Abiotic thiol reactivity; Algae; Raphidocelis subcapitata*

誌謝

真的要畢業了，心中難免不捨，

感謝出現在我生命中的每一個人，

謝謝爸爸媽媽對我的栽培，你們對我的愛總是無怨無悔。

謝謝老師對我的指導，讓我的論文得以撥雲見日。

謝謝思宏跟家祥，沒有你們幫我擦屁股，實驗室早就毀了。

謝謝詔茶學姊對我的照顧，總是充當我的伴遊兼司機。

謝謝學弟妹對我的支持，物化的筆記都讓我拿去印。

沒有你們我不會成功，真的很慶幸有你們，以後要常常聯絡喔～

最後我要謝謝我的司機兼老闆，

希昀，謝謝你，有你真的很好。

目 錄

	頁次
摘要	I
目錄	III
表目錄	V
圖目錄	VI
符號說明	VII
第一章 前言	1
1.1 研究緣起	1
1.2 研究目的	2
1.3 研究架構	3
第二章 文獻回顧	4
2.1 酯之介紹	4
2.1.1 基本特性	4
2.1.3 鹵素取代酯類之介紹	4
2.1.2 酯類的應用	5
2.2 定量結構—活性關係 (QSAR)	8
2.2.1 起源	8
2.2.2 分類	8
2.2.3 二維定量構效關係	9
2.2.4 活性參數	9
2.2.5 結構參數	10
2.3 鹵素取代酯類之 QSAR	11
2.3.1 親核試劑之介紹	11
2.3.2 SN2 親核性取代反應之介紹	11
2.3.3 文獻之鹵素取代酯類之 QSAR	13
2.4 藻類毒性試驗	16
2.4.1 月芽藻之介紹	16
2.4.2 藻類生長測定方法	16
2.4.3 藻類毒性試驗方法	17
2.4.4 試驗中之重要參數	19
第三章 基本原理	21
3.1 基本生長動力學	21
3.2 毒性物質之濃度反應關係模式	22
第四章 材料與方法	25
4.1 實驗設備與材料	25

4.2	實驗方法	27
4.3	儀器操作原理、步驟與設定條件	32
4.3.1	TOC (總有機碳分析法)	32
4.3.2	總有機碳分析之標準液配製流程	32
4.4	RC50 反應性參數值實驗	33
4.5	實驗之品保及品管 (QA/QC)	34
4.5.1	確定藻類生長狀況	34
4.5.2	實驗條件之控制	34
4.5.3	儀器的保養	34
第五章	結果與討論	35
5.1	藻類實驗毒性數據	35
5.2	急慢性毒性比 (Acute-Chronic Toxicity Ratio ; ACR)	39
5.3	鹵素取代酯類與基線毒性之比較	41
5.4	密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗與其他物種試驗之比較	44
5.5	QSAR 分析	47
5.5.1	毒性數據與傳統物化參數 LogKow 迴歸分析	47
5.5.2	毒性數據與反應性參數迴歸分析	48
5.5.3	藻類與纖毛蟲物種間關係	52
5.5.4	毒性數據與傳統電性參數迴歸分析	53
5.6	文獻比較	64
5.6.1	Ethyl fluoroacetate 之文獻毒理機制	64
5.6.2	其他同屬 SN2 親核性取代反應之化學物之文獻	65
第六章	結論與建議	67
6.1	結論	67
6.2	建議	68
第七章	參考文獻	69
附錄一	原始數據	73
附錄二	其他迴歸	93
附錄三	統計方法	96
附錄四	參數計算軟體使用方法	102

表 目 錄

	頁次
表 2.1.1 鹵素取代酯類之物化特性	6
表 2.3.1 鹵素取代酯類之相關文獻數據	14
表 4.2.1 月芽藻生長所需之巨量營養鹽成分	29
表 4.2.2 月芽藻生長所需之微量營養鹽成份	29
表 4.2.3 顆粒計數器之操作參數	30
表 5.1.1 鹵素取代酯類之相關毒性數據	36
表 5.2.1 鹵素取代酯類之急慢毒性比值和斜率及截距	40
表 5.3.1 利用基線毒性預測鹵素取代酯類之毒性	42
表 5.4.1 比較鹵素取代酯類之藻類毒性與纖毛蟲毒性	45
表 5.5.2.1 藻類毒性數據與反應性參數迴歸(Eq:5.8~5.10)分析比較	50



圖 目 錄

	頁次
圖 1.3.1 研究架構流程圖	3
圖 2.1.1 酯之結構圖	4
圖 2.1.2 酯化反應	4
圖 2.1.3 鹵素取代酯之基本結構	5
圖 2.2.1 QSAR 之分類	9
圖 2.3.1 雙分子親核取代反應 (SN2)	11
圖 2.3.2 穀胱甘肽之化學結構	12
圖 2.4.1 月芽藻之圖示	16
圖 3.2.1 劑量-反應曲線圖	23
圖 5.3.1 毒性數據與 LogKow 之相關性	43
圖 5.4.1 藻類與纖毛蟲毒性之相關性	46
圖 5.5.2.1 Eq:5.8~5.10 的預測毒性數據 V.S 實驗毒性數據	51
圖 5.5.4.1 Eq: 5.23~5.25 的預測毒性數據 V.S 實驗毒性數據	57
圖 5.5.4.2 Eq: 5.26~5.28 的預測毒性數據 V.S 實驗毒性數據	60
圖 5.5.4.3 Eq: 5.29~5.31 的預測毒性數據 V.S 實驗毒性數據	63

符號說明

ΔDO	: 藻類溶氧變化量
F.Y	: 藻類最終細胞變化量
G.R	: 藻類生長率
EC ₅₀	: 50% Effective Concentration
IGC ₅₀	: 纖毛蟲 (Tetrahymena pyriformis) 之 EC ₅₀
C _X	: 鍵結鹵素碳
E _{LUMO}	: Energy of the Lowest Unoccupied Molecular Orbital
GSH	: Glutathione
k _{ow}	: n-octanol/water partition coefficient
QSAR	: Quantitative Structure—activity Relationships
RC ₅₀	: 50% Reactivity Concentration
H-carbon	: 鹵素鍵結之碳的部分電荷
Halo	: 鹵素的部分電荷
$\Delta Halo$: 鹵素鍵結碳和鹵素的部分電荷差

第一章 前言

1.1 研究緣起

酯類在工業上為一種重要的有機化學品。它們應用於製造出各種產品，包括聚酯纖維，薄膜樹脂，化妝品等。由於其結構的多樣性和變化，其毒性機制十分的複雜[1]。

一般的酯類在毒性分類中分屬於基線毒性，但擁有鹵素取代基之酯類，其毒性分類被歸類為反應性之親電性/前親電性。

鹵素取代酯類會與生物分子進行 S_N2 親核性取代反應，對生物體造成不可逆之影響。此類物質被廣泛使用、並流布於環境當中，但卻缺乏適當之毒性數據。鹵素取代酯類對各物種之毒性數據當中，以纖毛蟲之資料最多[1,2]，但藻類之毒性數據卻十分缺乏，因此建立此類化合物之藻類毒性資料是必要的。

藻類為食物鏈的底層之生產者，當水中之毒性物質對藻類造成毒性傷害時，會由食物鏈生物累積及傳輸作用，進而影響到更大型的生物種，間接破壞整個水體生態系統。

藻類廣泛分布於水體環境中、生長週期短，因此十分適合做為生物活性指標，為毒性測試物種的理想選擇[3]。

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，但對於本研究中之揮發性有機化學物質，可能會因揮發進而低估化學物的毒性。

本次研究之化學物-鹵素取代酯類為高揮發性之有機物，因此利用 Chemostat 連續的方式培養藻類，並取穩定生長、高活性的藻植種於 BOD 瓶中進行實驗，利用藻類生長 48 小時後之溶氧變化量 (ΔDO)、細胞密度做為量測終點 (Endpoint)，藉此了解化學物質對藻類造成的影響與毒性關係。因 BOD 瓶為密閉的系統，故可藉此克服有機物揮發的問題[4,5]。

根據歐盟新化學品政策 REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals)，於歐盟國家每年生產或進口一公噸或一公噸以上的化學品，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。如果沒有依相關規定完成註冊，則無法繼續在歐盟市場流通。但若使用危害評估之現有方法，將使用大量的動物來進行毒性實驗，將會耗

用大量資源及時間，因此建立良好的定量結構活性關係(QSAR, Quantitative Structure—activity Relationships)，來評估較相似結構之化學物之毒性[6,7]，較為人道且有效率。

本研究以單細胞綠藻類之月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)為毒性測試物種、以反應性物質鹵素取代酯類為毒物，於密閉式BOD瓶系統中進行毒性測試。並將此類化合物之物化特性、結構，利用統計軟體與毒性建立關係式—QSAR (Quantitative Structure—activity Relationships)，並探討此類反應性物質對生物體造成毒性之毒性作用機制 (Mechanism of toxic action)。

1.2 研究目的

1. 以BOD瓶進行密閉性藻類毒性實驗，研究鹵素取代酯類，以溶氧變化量及細胞密度作為試驗終點，求得各毒性物質之 EC_{50} 值與濃度反應關係曲線。
2. 將本研究之毒性試驗結果，與其他使用不同物種之文獻毒性數據進行比較；與本實驗室先前所做之麻醉性實驗數據進行比較，證明含鹵素取代基之酯類為親電性物質。
3. 討論鹵素取代酯類之毒性作用機制、毒性試驗結果與化合物物化特性間之關係，找出適當之參數來建立QSAR模式。

1.3 研究架構

實驗自參考資料與文獻收集開始，首先確定欲實驗的化合物，進而蒐集化合物之物化資料、文獻回顧、數據收集，做進一步整理與討論，再依本研究室所建立之實驗及分析方法完成試驗。試驗流程如圖 1.3.1所示。



圖 1.3.1 研究架構流程圖

第二章 文獻回顧

2.1 酯之介紹

2.1.1 基本特性

酯類 (Ester) 之通式為 RCOOR' (圖2.1.1)，是羧酸與醇類在催化劑作用下之產物；過程中，羧酸之氫氧根 ($-\text{OH}$) 被醇之烴氧基 (alkoxy group； $-\text{OR}'$) 所取代 (圖2.1.2)。因此，酯之命名是根據羧酸之 Carboxylate anion (RCOO^-) 與醇之 Alkyl group ($\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$) 而來；以最簡單之甲酸甲酯 (Methyl Formate； H-COO-CH_3) 為例，其為甲酸 (Formic acid； HCOOH) 與甲醇 (Methanol； CH_3OH) 反應之產物

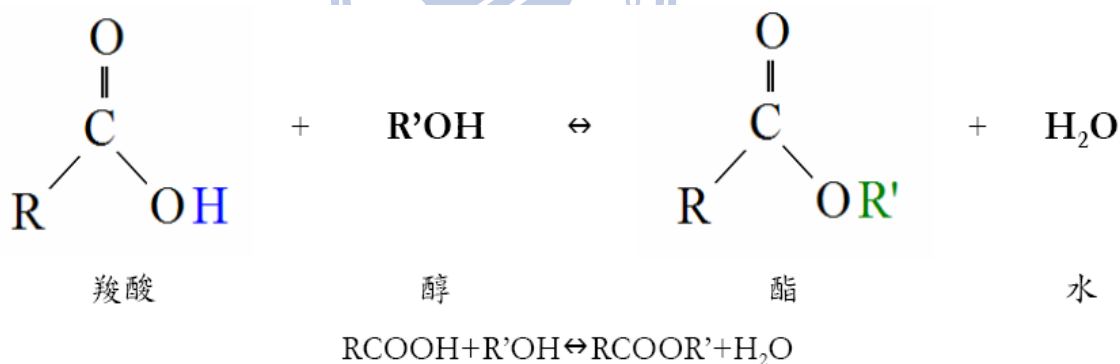


圖2.1.2 酯化反應 (Esterification)

低分子量的羧酸與醇所形成的酯，具有水果香味且高揮發性，常用來作香料及人造調味品。酯為優良之溶劑，難溶於水，比重小於 1，無氫鍵，沸點熔點較同分子量酸低。酯與水會緩慢水解還原成酸和醇。

2.1.2 酯類的應用

1. 用作硝酸纖維素、樹脂、油脂的溶劑，及脫漆劑。
2. 用作溶劑、香精、人造革、試劑等
3. 用作醫藥品的萃取、製造軍用毒氣。

2.1.3 鹵素取代酯類之介紹

鹵素取代酯類為酯類碳上的氫被鹵素所取代，鹵素取代酯類與酯類一樣具高揮發性，為優良之溶劑，難溶於水，比重小於 1，沸點熔點皆低。其基本結構如下圖：

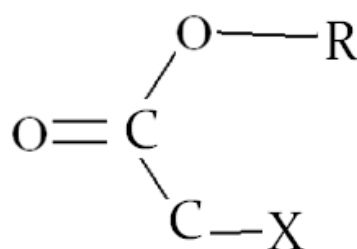


圖 2.1.3 鹵素取代酯之基本結構 (R 為烷基；X 為鹵素)

羰基 (C=O) 之拉電子能力會活化鄰接鍵結鹵素之碳鍵(C_X)，改變其電子雲密度，當電子向羰基靠近，鍵結鹵素之碳鍵便傾向正電性 (親電試劑)。親核試劑為尋找正電性中心的一種試劑，當鹵素取代酯類遇到親核試劑，親核試劑會與鹵素競爭並形成不穩定的一碳五鍵的反應中間體，隨後鹵素離去，完成 S_N2 親核性取代反應。鹵素包含氟、氯、溴、碘、砒[8]。

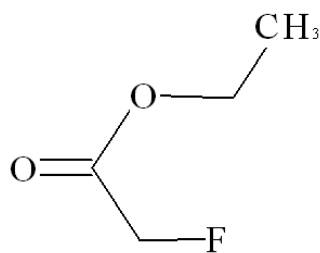
此次實驗所使用的化學物有含單鹵素的酯類，亦有含雙鹵素以上之酯類。下表 2.1.1 為此次實驗所使用之化學物及其物化參數：

表 2.1.1 鹵素取代酯類之物化特性

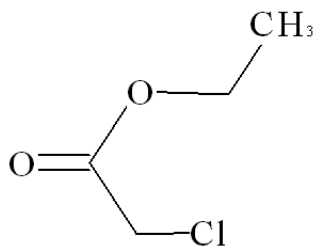
NO.	Chemical	CAS no.	化學式	分子量	Log Kow	溶解度(mg/l)	蒸氣壓(pa)	沸點(°C)
1	Ethyl fluoroacetate	459-72-3	O=C(OCC)CF	106.0	0.80	19832	2090	83.34
2	Ethyl chloroacetate	105-39-5	O=C(OCC)CCl	122.5	0.94	15470	696.0	141.2
3	Ethyl bromoacetate	105-36-2	O=C(OCC)CBr	167.0	1.21	7022.0	224.0	153.7
4	Ethyl iodoacetate	623-48-3	O=C(OCC)CI	214.0	1.62	1523.0	135.0	184.7
5	Methyl bromoacetate	96-32-2	O=C(OC)CBr	152.9	0.72	17990	1220	131.3
6	Methyl 3-bromopropionate	3395-91-3	O=C(OC)CCBr	167.0	1.21	5910.0	450.0	135.7
7	Methyl 2-bromopropionate	5445-17-0	O=C(OC)C(Br)C	167.0	1.13	6829.0	835.0	140.3
8	Ethyl-2-bromopropionate	535-11-5	O=C(OCC)C(Br)C	181.0	1.63	2228.0	335.0	162.3
9	Methyl 2-bromobutyrate	3196-15-4	O=C(OC)C(Br)CC	181.0	1.63	6394.0	229.0	162.3
10	Ethyl-2-di-bromoisobutyrate	600-00-0	O=C(OCC)C(Br)(C)C	195.0	2.08	2938.0	291.0	175.1
11	tert-Butyl bromoacetate	5292-43-3	O=C(OC(C)(C)C)CBr	195.0	2.08	2938.0	1.220	175.1
12	Ethyl dibromoacetate	617-33-4	O=C(OCC)C(Br)Br	245.9	1.48	1364.0	64.80	208.3
13	Ethyl tribromoacetate	599-99-5	BrC(Br)(Br)C(=O)OCC	324.8	2.49	521.00	6.810	260.2
14	Ethyl-2,3-di-bromopropionate	3674-13-3	O=C(OCC)C(Br)CBr	259.9	1.97	1507.0	23.10	227.4

Log Kow、溶解度、蒸氣壓、沸點以 EPI v4.00 查詢而得。

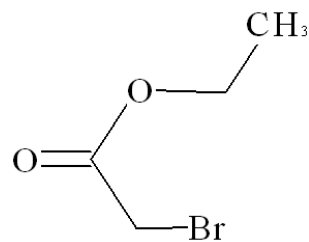
下圖為各鹵素取代酯類的結構式和其 cas number :



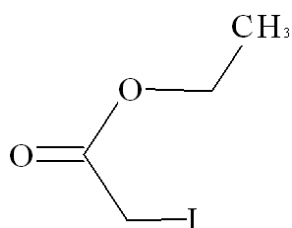
459-72-3



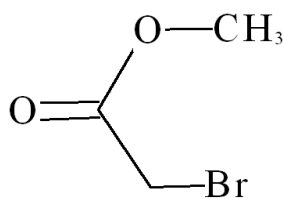
105-39-5



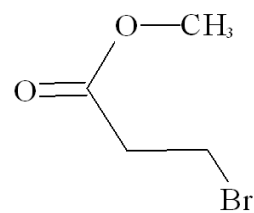
105-36-2



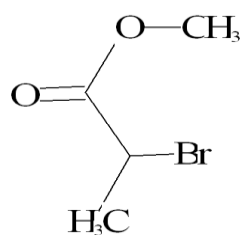
623-48-3



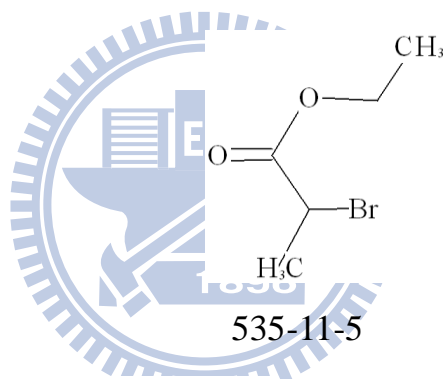
96-32-2



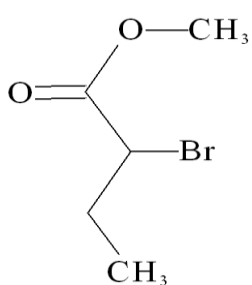
3395-91-3



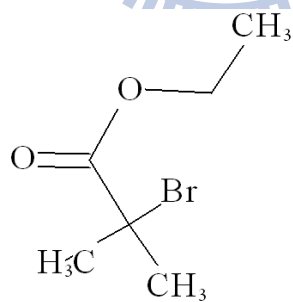
5445-17-0



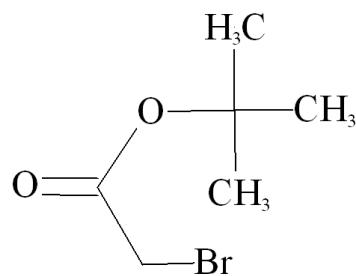
535-11-5



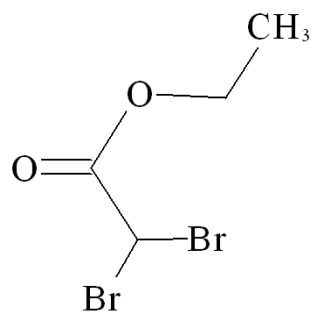
3196-15-4



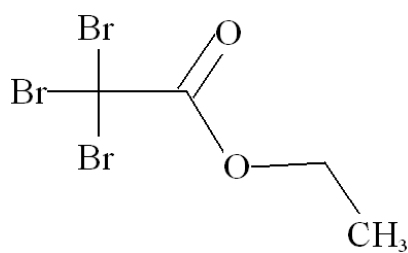
600-00-0



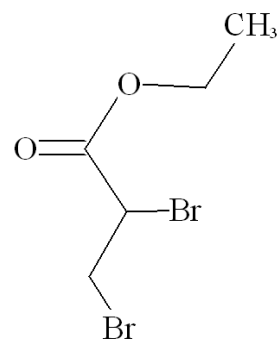
5292-43-3



617-33-4



599-99-5



3674-13-3

2.2 定量結構－活性關係 (QSAR)

2.2.1 起源

QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) 定量化學－結構關係，此概念最早於西元 1868 年由 Crum Brown 與 Frazer 提出，用以定量化學結構與活性之間的關係[9-12]。

定量構效關係(QSAR)是一種藉助分子的理化性質參數或結構參數，以數學和統計學手段定量研究有機小分子與生物大分子相互作用、有機小分子在生物體內吸收、分布、代謝、排泄等生理相關性質的方法。這種方法廣泛應用於藥物、農藥、化學毒劑等生物活性分子的合理設計[13]。

2.2.2 分類

早期QSAR的建立是依據化合物的分類（如同一種類的化合物），但後來發現以化合物毒性作用機制來建立 QSAR 較為適當 [2-4][2-4][2-4][14-16]。

根據Russom毒性機制的分類，如圖 2.2.1所示：分為一般性 (General) 和特異性 (Specific) 兩大類。一般性指化合物並非以特定位置對生物體造成攻擊，而是與生物體之細胞膜進行反應；特異性會作用於細胞的特定位置上而造成功能上的抑制。一般性又稱麻醉性，分為非極性與極性兩類。非極性麻醉性在QSAR分析上，與辛醇與水分配係數 ($\text{Log } k_{ow}$) 呈良好線性關係，其毒性又稱作基線毒性 (Baseline toxicity)。特異性亦稱為反應性，此類有機物除了有麻醉性機制外（分子之疏水結構具麻醉效應），其官能基與生物體內所產生之化學變化為主要之毒性來源，通常此類有機物質的毒性超過基線毒性，比麻醉性有機物還要毒[17]。

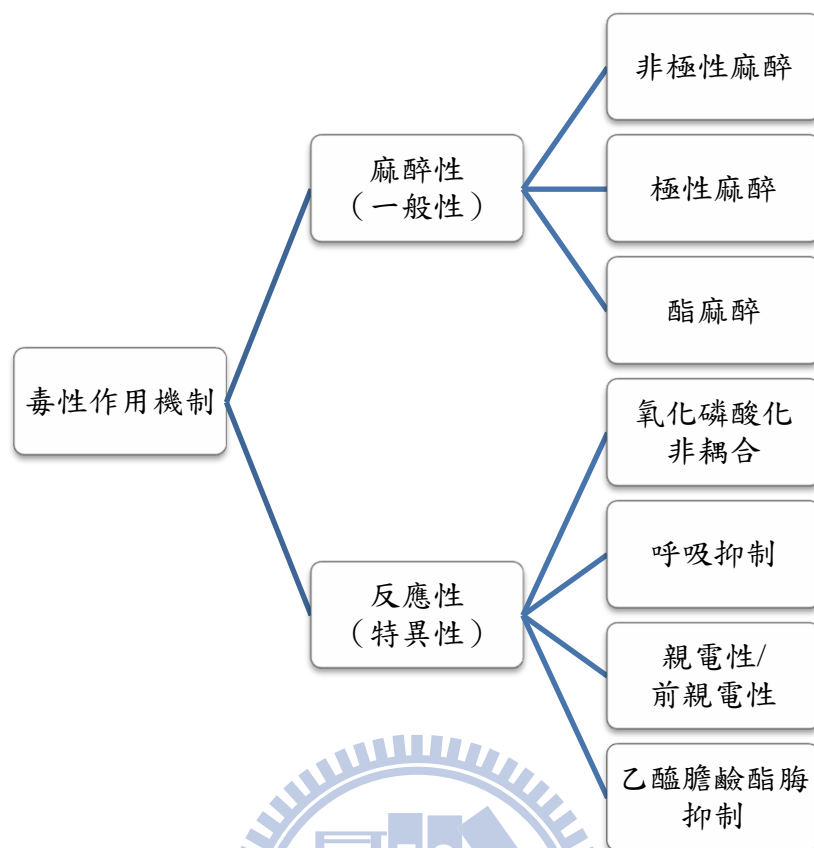


圖 2.2.1 QSAR 之分類[17]

2.2.3 二維定量構效關係

二維定量構效關係方法是將分子整體的結構性質作為參數，對分子生理活性進行回歸分析，建立化學結構與生理活性相關性模型。

2.2.4 活性參數

活性參數是構成二維定量構效關係的要素之一，人們根據研究的體系選擇不同的活性參數，常見的活性參數有：半數有效量、半數有效濃度、半數抑菌濃度、半數致死量、最小抑菌濃度等，所有活性參數均必須採用物質的量（莫爾）作為計量單位，以便消除分子量的影響，從而真實地反應分子水平的生理活性。為了獲得較好的數學模型，活性參數在二維定量構效關係中一般取負對數後進行統計分析。

2.2.5 結構參數

結構參數是構成定量構效關係的另一大要素，常見的結構參數有：疏水參數、電性參數、立體參數、幾何參數、拓撲參數、理化性質參數以及純粹的結構參數等。

- **疏水參數**：化學物在體內吸收和分布的過程與其疏水性密切相關，因而疏水性是影響化學物生理活性的一個重要性質，在二維定量構效關係中採用的疏水參數最常見的是脂水分配係數，其定義為分子在正辛醇與水中分配的比例，對於分子母環上的取代基，脂水分配係數的對數值具有加和性，可以通過簡單的代數計算獲得某一取代結構的疏水參數。
- **電性參數**：二維定量構效關係中的電性參數直接繼承了哈密頓公式和塔夫托公式中的電性參數的定義，用以表徵取代基團對分子整體電子分配的影響。其中， E_{HOMO} 和 E_{LUMO} 是最高佔有分子軌道能量和最低未占分子軌道能量的英文縮寫。 E_{HOMO} 與 E_{LUMO} 之間的能量差稱為能帶隙，有時可以用來衡量一個分子是否容易被激發：帶隙越小，分子越容易被激發。
- **立體參數**：立體參數可以表徵分子內部由於各個基團相互作用對毒性反應產生的影響以及對毒化物和生物大分子結合模式產生的影響，常用的立體參數有塔夫托立體參數、摩爾折射率、范德華半徑等。
- **幾何參數**：幾何參數是與分子構象相關的立體參數，因為這類參數常常在定量構效關係中佔據一定地位，故而將其與立體參數分割考慮，常見的幾何參數有分子表面積、溶劑可及化表面積、分子體積、多維立體參數等。
- **理化性質參數**：偶極矩、分子光譜數據、前線軌道能級、酸鹼解離常數等理化性質參數有時也用做結構參數參予定量構效關係研究[13]。

2.3 鹵素取代酯類之QSAR

鹵素取代酯類之毒性作用機制以 Russom[17]毒性機制的分類屬於反應性中的親電性/前親電性，會與生物體中之親核試劑進行 S_N2 親核性取代反應，因而造成毒性之機制。

2.3.1 親核試劑之介紹

親核試劑為尋找正電性中心的一種試劑，任何具有未共用電子對之負離子或分子即為親核試劑。親核試劑根據軟硬酸鹼理論簡稱 HSAB (Hard-Soft-Acid-Base) 被分為軟親核試劑和硬親核試劑。「軟」是指具有較低電荷密度和較大半徑的粒子，「硬」是指具有較高電荷密度、較小半徑的粒子。在所有其他因素相同時，「軟」的親核試劑與「軟」的親電試劑反應；「硬」的親核試劑與「硬」的親電試劑反應，大體上來說，「硬親硬，軟親軟」生成的化合物較穩定。

大多的生物體中皆含有親核試劑，尤以氨基酸 (-NH₂) 的，羥基 (羧基) (-OH) 的和巰基 (-SH) 為最重要，因為它們常見於許多生物大分子中，如蛋白質、DNA 等等[18]。因此，本次實驗選用穀胱甘肽上的巰基 (軟親核試劑) 作為生物體中親核試劑之代表，用來描述鹵素取代酯類 (軟親電試劑) 的親電性毒性反應過程。

2.3.2 S_N2 親核性取代反應之介紹

在有機及無機化學中，親核取代為取代反應的一種基本型式，其中富含電子的親核試劑 (nucleophile) 攻擊接有離去基 (leaving group) 的原子，此種帶有脫離基為帶正電或帶部分正電的原子或原子團，又稱為親電子試劑

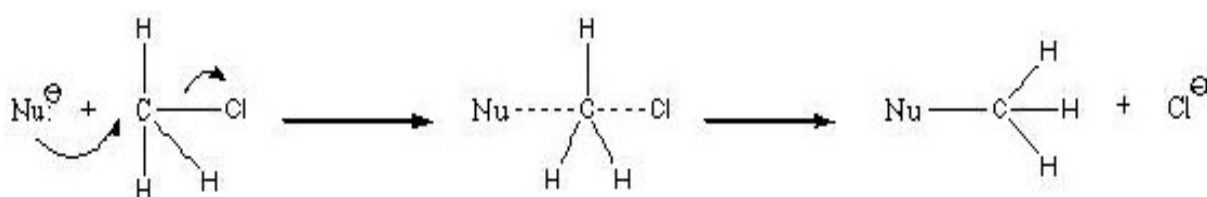


圖 2.3.1 雙分子親核取代反應 (S_N2)

上圖為描素生物體內之親核試劑與鹵素取代酯類中鍵結鹵素之碳所發生的雙分子親核取代反應。Nu 代表親核試劑而 Cl 代表鹵素離去基。

在此反應中，其反應數率同時牽涉到：1. 親核試劑；2. 鹵素離去基。較強親核試劑直接由背面進攻碳原子，並形成不穩定的一碳五鍵的反應中間體，隨後離去基團離去，完成取代反應[8]。

S_N2 屬於二級反應，與兩個反應物的濃度相關：

親核試劑 $[Nu^-]$ 和底物 $[RX]$ 。 $r = k[RX][Nu^-]$ (2.1)

試劑親電親核強度的大小主要取決於試劑電量和極性、中心原子的電子的可極化性、空間位阻等因素[19]。

本次實驗中，以穀胱甘肽 (GSH, glutathione) (圖 2.3.2) 作為一化學反應參數。用來描素化學物質與生物體中的親核試劑的親電性反應。

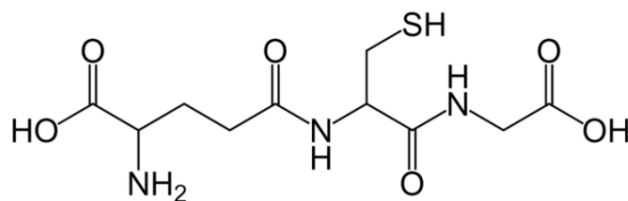


圖 2.3.2 穀胱甘肽之化學結構

穀胱甘肽 (GSH, glutathione) 為麩胺酸 (Glutamate)、半胱胺酸 (Cysteine) 和甘胺酸 (Glycine) 所組成之三肽 (Tripeptide)，存在於真核生物之細胞當中，是細胞內濃度最高的的抗氧化劑，有抗氧化及協助解毒等功能。GSH 中之半胱胺酸具有硫醇基 (Thiol group, $-SH$ 為親核性支鏈)，會與親電性物質 (如鹵素取代酯類) 產生 S_N2 親核性取代反應 (上述之介紹)，進而取代鹵素[20-22]。

因此本次研究參考以前之文獻，利用化合物與穀胱甘肽 (GSH) 之半反應濃度 (RC_{50} , 50% Reactivity Concentration) 用來描述鹵素取代酯類對於生物所造成之毒性反應，應是合理且可行的。

2.3.3 文獻之鹵素取代酯類之 QSAR

據 McFarland (1970)，化學毒性是結合滲透到生物膜和與生物體內互動之二參數來描述。麥克法蘭的數學方式表示如下：

$$\log(\text{toxicity}) - 1 = A(\log \text{uptake}) + B(\log \text{interaction}) + C \quad (2.2)$$

這個等式可以簡單的以 toxicokinetic + toxicodynamic 來表示

Toxicokinetic 用來描述具能力的毒物，到達生物作用位置之行為。該階段包括化學毒物的吸收和代謝活化。

Toxicodynamic 用來描述化學物之生化反應，進而導致細胞產生之生理反應[23]。

因此，鹵素取代酯類於過去之文獻中以疏水性參數 (Log K_{ow}) 作為 Toxicokinetic，以化合物與穀胱甘肽 (GSH) 之反應抑制濃度 (RC_{50} , 50% Reactivity Concentration) 及親電性參數 (E_{LUMO} , Energy of the Lowest Unoccupied Molecular Orbital) 作為 Toxicodynamic，對生物之毒性資料進行迴歸[1,2][5-8][5-8][5-8]。

下表為本次所實驗之化學物之相關文獻(1,2,41)，包含實驗數據及其他物化參數，下表之 RC_{50} 為化學物質與穀胱甘肽 (GSH, glutathione) 之半反應濃度； IGC_{50} 為化學物質對纖毛蟲 (Tetrahymena pyriformis) 之 EC_{50} 。

表 2.3.1 鹵素取代酯類之相關文獻數據

NO	Chemical	CAS no.	RC ₅₀ (mM)	IGC ₅₀ (mM)	E _{LUMO}	其他文獻
1	Ethyl fluoroacetate	459-72-3	NR ^a	>2.5 ^a		
2	Ethyl chloroacetate	105-39-5	3.06 ^a	0.088 ^a		Daphnia magna (48h): EC ₅₀ : 1.6 mg/l Echerichia coli(12h): EC ₅₀ : 107 mg/l
3	Ethyl bromoacetate	105-36-2	0.086 ^a	0.002 ^a		
4	Ethyl iodoacetate	623-48-3	0.029 ^a	0.001 ^a		
5	Methyl bromoacetate	96-32-2	0.067 ^a	0.011 ^a		
6	Methyl 3-bromopropionate	3395-91-3	8.626 ^a	0.094 ^a		
7	Methyl 2-bromopropionate	5445-17-0	1.500 ^a	0.066 ^a		
8	Ethyl- 2-bromopropionate	535-11-5	1.700 ^c	0.088 ^c	-0.10248 ^b	Vibro fisheri (micro tox) 15min EC ₅₀ :28.7mg/l
9	Methyl 2-bromobutyrate	3196-15-4	3.535 ^a	0.095 ^a		Vibro fisheri (micro tox) 15min EC ₅₀ : 21.8mg/l
10	Ethyl- 2-di-bromoisobutyrate	600-00-0	ND	0.708 ^b	-0.10730 ^b	Vibro fisheri (micro tox) 15min EC ₅₀ :10mg/l
11	tert-Butyl bromoacetate	5292-43-3	0.085 ^a	0.004 ^a		
12	Ethyl dibromoacetate	617-33-4	ND	ND		
13	Ethyl tribromoacetate	599-99-5	ND	ND		
14	Ethyl- 2,3-di-bromopropionate	3674-13-3	ND	0.006 ^b	-0.52745 ^b	

^a : Data from Schltz TW. et al., 2007[1]. ; ^b : Data from DeWeese AD et al., 2001[2].

^c : Data from Roberts WD. et al., 2010[41]. ; ND : no data

其他文獻由 Toolbox V1.1 查詢而得。

文獻中利用上表之纖毛蟲 (*Tetrahymena pyriformis*) 之毒性數據和物化參數回歸出以下式子。下式中之 R^2 為用來評判參數與毒性之間的相關性、 R_{pred}^2 為預測能力、 S 為標準偏差、 F 為檢驗值用以比較模式之間統計上的顯著性：

1. 利用化學物滲透到生物體和化學物於生物體內之互動之二參數：

$$\text{Log}(1/\text{IGC}_{50}) = 0.34 \text{Log Kow} - 0.84 E_{\text{LUMO}} - 0.04 \quad (2.3)$$

$$n=16, R^2=0.848, S=0.26, F=33$$

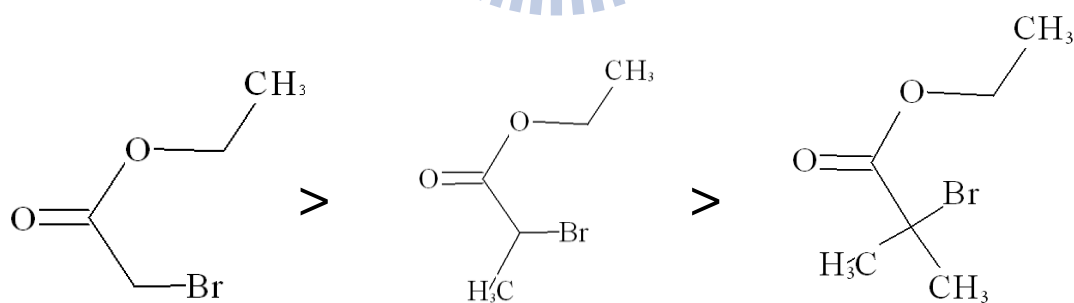
2. 以親電性參數穀胱甘肽之半反應濃度：

$$\text{Log}(1/\text{IGC}_{50}) = 0.848 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) + 1.40 \quad (2.4)$$

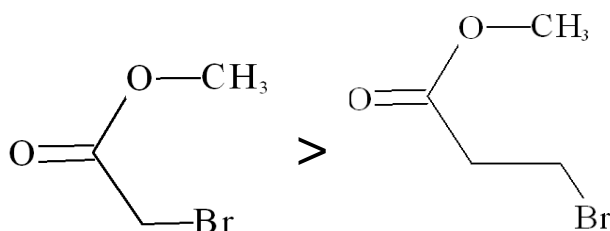
$$n=19, R^2=0.926, R_{\text{pred}}^2=0.905, S=0.25, F=33$$

根據上述雙分子親核取代反應之化學原理與先前之文獻數據，[1,2,8,19]對於化學物的毒性，應有以下預期之驅勢：

- 相似的結構式，若鹵素離去基鍵結在相同位置的碳上，則預期毒性的強弱會因與電負度(Electronegativity)呈反比，而有毒性： $\text{I} > \text{Br} > \text{Cl} > \text{F}$ 的趨勢。
- 相似的結構式，當鹵素所鍵結的碳上也有鍵結其他碳氫鍊，則因空間位阻而預期毒性的強弱會有：



- 相似的結構式，若相同鹵素離去基接在不同位置的碳上，則預期毒性的強弱會有：



2.4 藻類毒性試驗

2.4.1 月芽藻之介紹

本實驗中所使用之月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)，為一種單細胞、成群體但不糾結、不能移動之綠藻 (Chlorophyceae)，一般細胞體積為 $40\text{-}60\ \mu\text{m}^3$ ，如圖2.4.1所示[25]。

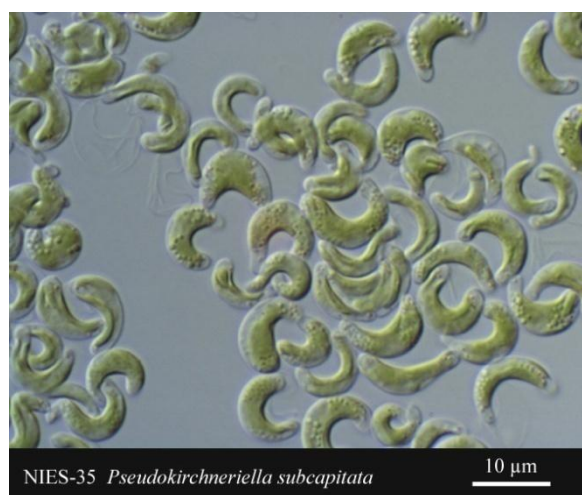


圖 2.4.1 月芽藻之圖示[25]

典型的月芽藻體積約為 $45\ \mu\text{m}^3$ 、重量 $10\text{-}20\ \text{pg}/\text{cell}$ ，為淡水單細胞藻類，因體型呈半月型，故稱月芽藻，其優點有：取得容易、培養簡單、容易觀察、生長期短、可以大量生長、具有地區代表性等實驗用的藻種需具有的特點，並較大部分生物試驗來的敏感[26]。此外，當培養過程中缺少營養鹽或溫度、光線、pH、有毒物質侵害、細菌滋生等環境條件不佳時，母槽會逐漸呈現明顯的黃綠色，故由外觀上可以容易的去判斷母槽的生長情形。除了外觀上的判斷，利用顆粒計數器觀察其粒徑的分佈變化，若發現顆粒數變少、大粒徑的藻類分佈變多時，則可判斷此藻種的健康情形不佳。

2.4.2 藻類生長測定方法

一般藻類生長情況之參數有下列幾種：細胞密度、細胞總體積、乾重、葉綠素、活體內螢光值、營養基濁度、產氧量、碳源攝取量、ATP 及DNA等參數。理想的測定方法應具備以下條件：迅速、精確、高敏感度、低偵

測極限、低成本，適合這些條件之藻類生長質量之方法有下列幾種：(1)顯微鏡計數法 (2)電子顆粒計數法 (3)直接乾重量測法 (4)光學顆粒計數法 (5)分光光度計測葉綠素A 法 (6)螢光光度計測葉綠素A法 (7)DNA 測定法 (8)ATP 測定法 (9)¹⁴C 輻射標定法(10)溶氧測定法等[27]。

藻類毒性試驗之標準方法：United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA)[28]、Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)[29]、International Organization for Standardization (ISO)[30]、American Society for Testing and Materials(ASTM)[31]、American Public Health Association (APHA)[32]皆於試驗終點時，測量藻類的生物質量。量測生物質量最直接的方法為量測生物之乾重，但耗時較久，因此利用電子顆粒計數器之間接量測生物質量的方法，其操作簡單、快速、所需藻液量少，且與生物乾重之間有良好的相關性。溶氧測定法為直接量測水中溶氧之變化，再依此計算出藻類生長之情形，優點為低成本、試驗時間短。Hostetter發展出一套量測水中溶氧之藻類試驗方法，試驗時間縮短至24小時，且在*Raphidocelis subcapitata*的試驗之中發現，當一或多種之營養鹽呈限制性狀態時，藻類之淨光合反應量會與限制性營養鹽呈現線性關係[33]。

2.4.3 藻類毒性試驗方法

根據培養方式的不同，藻類毒性試驗分為批次式和連續式。現有之藻類標準毒性試驗方法，大都屬於批次式，如U.S. EPA所用之"Fresh water algae acutotoxicity test"[28]、OECD所用之"Algal growth inhibition test guideline"[29]、ISO所用之"Water quality-algal growth inhibition test"[30]、APHA所用之 "Toxicity testing with phyto-plankton"[32]及ASTM所用之"Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae"[31]等。

(1) 批次式：

批次式藻類毒性試驗為藻類暴露於毒性物質一段時間，再測其試驗終點，並與無暴露之控制組比較分析。實驗過程中沒有新鮮基質的加入、藻類之代謝物移出，實驗期間藻經歷完整的成長週期，遲滯期(lag phase)、

指數生長期 (exponential phase)、穩定期 (stationary phase) 及死亡期 (death phase)。標準試驗方法可採用 U.S. EPA[9] 所制定之“Fresh Algal Acute Toxicity Test”。

批次式藻類毒性試驗具有技術簡便、成本低、樣品處理量大、實驗數據取得容易等優點，因此經常被採用，但仍然存在許多缺點：

1. 批次式系統中，為確保藻類生長，大多使用高於自然水體甚多的營養鹽濃度，如此將會影響藻類對毒性物質的容忍度，亦會造成 pH 的改變，也無法反應自然水體真實狀況[34]。
2. 批次式培養因無新鮮基質的加入，導致營養鹽濃度隨時間拉長而消耗，使實驗後期逐漸產生營養鹽缺乏之情形，且代謝物累積無法移出，亦會對後續毒性試驗產生影響。
3. 以批次式培養進行毒性試驗，於同實驗室的試驗結果有 20%~32% 的變化量；且在不同實驗室中 EC_{50} 甚至會有更大的變動，顯示批次式實驗結果的差異性大[35]。

(2) 連續式配合批次式試驗：

連續供應新鮮的營養鹽至反應槽中，並持續的將槽中的新陳代謝物排出，故藻類能保持在最佳的生長狀態。因為低濃度的營養鹽不斷注入系統中，所加入之營養鹽與藻類生長產生動力平衡，故此系統也較接近自然水體。但由於連續式藻類毒性試驗系統欲達平衡時，需要一段相當的時間，且每進行完實驗即需重新培養，相當的耗費人力、物力及時間，所以目前尚未有標準的試驗方法建立。

由於在批次式及連續式藻類毒性試驗都各有其缺點存在，因此利用 Chemostat 系統為基礎，使用連續式培養、批次式實驗，為兼具實用性、敏感性及簡便性的藻類毒性試驗法。利用四公升的連續式母槽培養藻類，在培養過程中不斷有低濃度之新鮮基質流入，藻類之代謝物亦可流出，如此就更接近自然水體環境，且使母槽內之藻細胞更為健康。待系統達到穩定後，即可由母槽中取出藻液進行批次式毒性試驗，而不會污染到母槽，並將毒性試驗時間縮短為 48 小時，大大增加試驗的頻率，改善批次式培養中藻類代謝物之累積[36]；對於再現性的研究，發現以溶氧及生長速率為終點參數之下，兩組不同試驗之變異係數接近 10%，改善了過去批次式實驗再現度不佳的結果[37]。

利用連續式的藻類培養方法，配合 BOD 瓶 48 小時的批次式 BOD 瓶藻

類毒性試驗，將藻類、營養基質和試驗毒物加入300 mL的BOD 瓶，蓋子密封（水封）做密閉式毒性試驗，讓藻類與毒性物質接觸48 小時後，由觀測終點量測實驗組與控制組(不加毒物)的抑制情形並進行比較分析。整個實驗過程中沒有新鮮基質的加入，也沒有藻類之代謝物移出，屬於批次式毒性試驗，在操作更加簡單，在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。因此本研究採用”連續式藻液培養配合批次式毒性試驗”之方式。

2.4.4 試驗中之重要參數

(1) pH的控制

自然界中因為光合作用的關係，使一天中之pH變化很大，因此有人主張pH可以不需要控制，讓藻類在合理的pH值範圍內暴露於毒性物質。然而如此很難進行重複性試驗，且用來預測於某特定的pH狀況下之物種濃度影響也有困難。因此標準藻類毒性試驗皆傾向將pH維持固定。

以毒理學的觀念，pH若變化一個單位，可能導致毒性改變10倍以上；pH值控制隨不同的標準方法而有差異，U.S. EPA規定最終pH需在8.5之下[28]；OECD要求pH之最大變動不要超過一個單位[29]；ISO則是要求pH之變動在1.5 個單位之內[30]。若決定試驗在固定pH下進行時，就必須小心地確保pH值之變化為最少。欲減少pH值之改變，有下列幾種方法：(1)使用較低之生物接種量 (2)縮短整個試驗之時間 (3)以空氣或是添加二氧化碳之空氣加以曝氣。

雖然各個國際環境組織對於pH變化皆有控制在一個範圍之內，但在密閉式藻類毒性試驗中，並未刻意對整個系統的pH加以限制，發現在水中溶解性金屬對於藻類的抑制率若高於20%時，系統中pH的濃度變化大部份皆在1.5個單位以下[37]，因此本研究依據藻類最適生長之pH值，將初始值控制為7.5，並不刻意限制系統中pH的變化。

(2) 光照強度

光照的強度會影響藻類行光合作用之速率，因而造成其產氧率之不同。[35]藻類毒性試驗之中，光照的強度依照不同的試驗標準及不同藻種而有些許差異。且需考慮「自身遮蔽」效應（self-shading），此效應會造成距光源較遠處之光照與較近處之光照強度之差異，良好的混合可以減低自身

的遮蔽效應。光照強度應為一常數，並能使藻類呈現指數生長、縮小培養體積及維持充分的混合有助於達到理想狀態。

(3) 溫度

當溫度逐漸增加時，藻類會呈現指數生長，而當達到其最適生長溫度後即迅速下降。本研究採用U.S. EPA建議的24°C環境下來培養藻類及進行實驗，整個培養及試驗過程中，溫度之變化不可大於2°C。

(4) 植種數量與時間

若實驗開始時的植種數量過高，將會造成批次式實驗後期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升高等問題，進而影響毒性試驗結果。生物毒性試驗隨著時間增加，其敏感度提高而C.V.值減少；隨著初始植種密度減少，其敏感度提高但變異係數亦提高[5]。改變初始生物量進行批次試毒性試驗，提高實驗初始生物量時，EC₅₀值也顯著提升[38]。在兼顧兩者的考量下，選定最佳條件為藻類初始植種密度 1.5×10^4 cells/ml。

試驗時間的長短關係到毒性試驗的敏感性和數據結果。過長的試驗時間，會使得BOD瓶內的營養鹽不足，而有藻類有死亡的現象；過長的試驗期間，也會使得毒性的反應消失。一般標準的藻類毒性試驗為96小時，但有鑑於前述之缺點，因此本研究所選定的時間縮短為48小時。

第三章 基本原理

3.1 基本生長動力學

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：

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.1)$$

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、營養鹽或碳源受限，藻類之基本生長模式將由指數型態變成直線型態。在連續式藻類培養中，當系統達到一平衡（Steady State）時：

- 由反應槽中生物質量之平衡可得下列式子：

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX = (\mu - D)X \quad (3.2)$$

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，

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (3.3)$$

由式(3.3)代入式(3.2)，得

$$\mu = D \quad (3.4)$$

得知當反應槽達到平衡穩定狀態時，反應槽內生物之比生長率等於該系統之稀釋率。

- 由反應槽內之基質平衡可得下式：

$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - DS - \mu \left(\frac{X}{Y} \right) \quad (3.5)$$

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，

$$\frac{dS}{dt} = 0 \quad (3.6)$$

由式(3.4)及式(3.6)代入式(3.5)，得

$$X = Y (S_0 - S) \quad (3.7)$$

以式(3.4)代入 Monod equation

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(K_S + S)} \quad (3.7)$$

得

$$S = \frac{K_S D}{(\mu_{\max} - D)} \quad (3.8)$$

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）。

最後由式(3.6)及式(3.8)得

$$X = Y \left[\frac{S_0 - K_S D}{(\mu_{\max} - D)} \right] \quad (3.9)$$

由此式可知當反應槽達平衡穩定狀態時，生物量可由稀釋率及進流基質濃度來控制。

3.2 毒性物質之濃度反應關係模式

以毒理學的角度而言，劑量與反應關係(dose-response relationship) 是探討化學物質對生物體所造成影響之基礎。

所有的物質皆可能有毒，是否為毒性物質最主要差別在所暴露之劑量。當試驗物種受到毒性物質的抑制，造成 50% 抑制的毒物濃度稱為 EC_{50} (50% Effect Concentration)。

而由受影響或死亡的百分率所迴歸出的 S 曲線關係，稱為劑量-反應曲線圖 (Dose-response curve)；這些在於毒性評估方面皆為相當重要。生物

體受毒性物質影響的劑量反應關係如圖3.2.1 所示。

而試驗物種受抑制的百分率，隨著毒性物質濃度成 S 型濃度反應關係曲線，利用數學轉換模式將 S 型曲線轉為直線，以方便求得 EC_{50} 或 EC_{10} ，便稱為濃度反應關係模式。

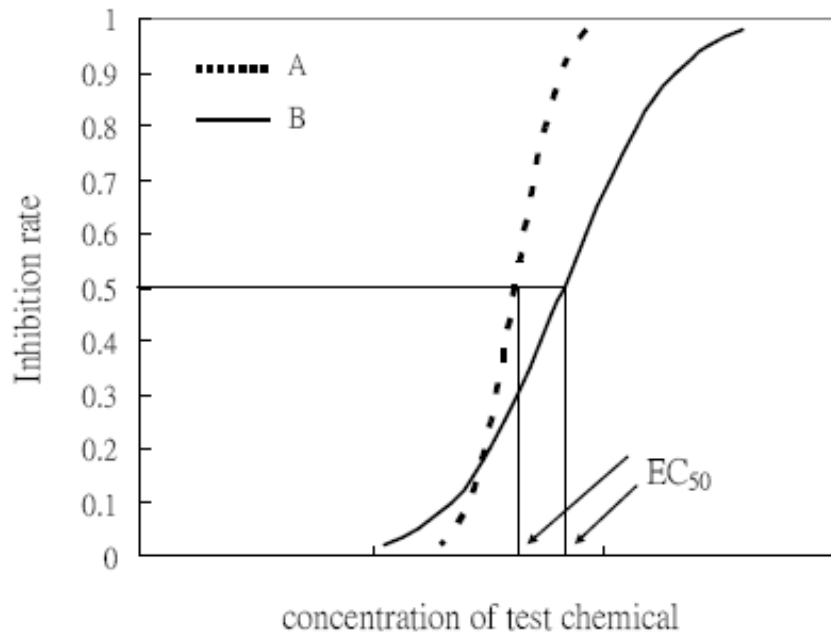


圖 3.2.1 劑量-反應曲線圖

上圖中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，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})。

欲從 S 型曲線求得 EC_{50} 或 EC_{10} 並不容易，因此必須藉由數學關係式將 S 型轉為直線型以便求取。一般常見的毒性物質劑量-反應模式為有三種，包括了：Probit、Weibull及Logit 模式，皆是依據不同的假設發展而成。

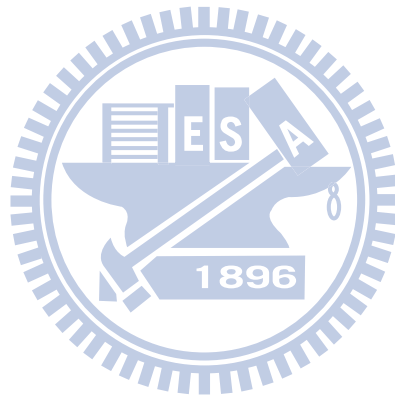
而本次實驗所選用的計算模式 Probit 為一般常見之模式，其假設生物對毒性物質容忍度成對數常態分布 (Log-normal distribution)。因此以常態分佈函數來表示毒物對生物抑制率 P 對毒物濃度 Z 的濃度反應曲線。以 Probit 模式將毒物之 S 型濃度反應曲線轉換成 NED 尺度 (Normal Equivalent Deviation)，其中 50% 抑制率對應至 NED 上時為 0，而 84.1% 則對應為 1，NED 的座標值加上 5 即為 Probit 座標之概率單位 Y 值 ($Y = NED + 5$)，當 $Y = 5$ 時表示一半的測試生物受到毒性物質抑制，此時對應的毒物濃度就

是 EC_{50} 。Probit 單位與反應率與毒性物質劑量間之轉換關係如下：

$$Y = \alpha + \beta \log Z \quad (3.10)$$

$$P = 0.5 \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{Y - 5}{\sqrt{2}} \right) \right] \quad (3.11)$$

其中 Y 為 Probit 單位， α 、 β 為濃度-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。



第四章 材料與方法

4.1 實驗設備與材料

1. 恆溫室：大小約為五坪，溫度控制在 24 ± 1 °C，藻類培養、毒性試驗與四十八小時後的分析，皆於此進行。
2. 無菌操作臺：內設有紫外光殺菌，防止植種過程中受到污染。
3. 純水設備：包括四道濾心過濾（0.5 μm ）、離子交換、蒸餾（Aquatron A4S, Bibly），蒸餾水儲水桶（60 L container, Nalgene）；去離子水製造機（Milli-Q Plus, Millipore, outflow conductivity 18.2 M Ω -cm），水質之電阻值控制在18.2 Mega-ohm (M Ω -cm)。
4. 抽氣泵浦：SINKU KIKO公司，型號ULVACG-5及G-50。用於過濾營養基質及 ISOTON II之用。
5. 電子顆粒計數器：量測藻類細胞數。使用CoulterElectronincs公司之Coulter Counter，型號MULTISIZER II，並以5.06 μm 標準顆粒乳液來校正。本實驗使用100 μm 孔徑之玻璃管，量測之顆粒直徑範圍為2~60 μm 。
6. 光度測定計：使用TOPCON廠牌，型號IM-2D，單位為Lux。
7. pH測定儀：購自Suntex，型號為Model SP-2500。其精確度為 ± 0.01 。
8. 冰箱：使用Whirpool之冰箱，將藻種及營養鹽於4 °C之下保存。
9. 滅菌釜：使用HIRAYAMA公司，型號HA-300M之滅菌釜，最大壓力可達1.9 kg/cm²，容積為0.0521 m³。使用時設定溫度121°C、壓力1.1 kg/cm²滅菌15分鐘。
10. 烘箱：廠牌為Memmet，烘乾玻璃器皿用。使用溫度設為 52 ± 1 °C。
11. 分析天秤：廠牌Precisa 205A，精確度至0.01 mg。
12. 定量吸管：使用SOCOREX之可調式移液器，容量為100~1000 μl 及0.1~5 ml兩種。以及NICHIRO, Nichipet EX, 20~200 μL 、10~100 μL 以及2~20 μL 等3種。
13. 濾膜：使用之濾膜分成兩種，過濾營養基質時使用Gelman Science型號66191、孔徑0.45 μm 之濾膜，過濾Isoton II時使用Gelman Science型號60301、孔徑0.2 μm 之濾膜。

- **批次式培養藻類**

14. 批次式培養裝置：培養裝置為自行裝配，長、寬、高為135×110×135 cm，頂面裝有120 cm 長之白色螢光燈管八支。迴轉式振盪儀(EIRSTEK, model: S103)，搖動速度可大於100 rpm。
15. 批次式培養器皿：批次式培養藻時所使用之容器為125 ml之三角錐瓶。
16. 紗布：藻類培養時，使用消毒紗布覆蓋在三角錐瓶瓶口，防止異物進入。

- **連續式培養藻類**

17. 連續式培養母槽：連續式培養之母槽體積5公升，直徑為18 cm 之玻璃容器。於體積4公升處開口做為溢流口，並且於體積2公升處開一口做為取樣之用。母槽上方亦有兩開口，分別為營養基質流入口及空氣進流口。
18. 基質儲存瓶：容量約為5公升，直徑為25公分大小的血清瓶。用來存放培養母槽之連續入流基質；使用前需以蒸餾水清洗及已滅菌釜滅菌。
19. 蠕動泵浦：EYELA公司，型號MP-1000，用以控制供應母槽之流量。
20. 泵浦管：廠牌Materflex，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。
21. 曝氣泵浦：使用之曝氣泵浦為一般水族使用之曝氣幫浦。
22. 浮子流量計：量測曝氣流量，本實驗將曝器量控制在400 mL/min。
23. 空氣洗滌器：去除曝氣氣體中的雜質，並濕潤氣體，增加氣體之溶解。
24. 電磁攪拌器：放置於連續式培養母槽之下方，使藻液與進流之營養基質、空氣混合均勻，避免藻類之沉澱。

- **BOD瓶毒性試驗**

25. BOD瓶：為毒性試驗時使用之玻璃器皿。使用體積300 mL，直徑8 cm，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，使整個系統為一個封閉式系統。
26. 溶氧測定儀：美國YSI公司出品之微電腦溶氧測定儀，Model YSI5100，附有Model 5010溶氧測定探頭(BOD Probe)，其探頭部分裝有電動攪拌器，可以對樣品進行攪拌。溶氧量測定範圍為0.0~60.0 mg/L，精確度為±0.1%。

27. 氣體鋼瓶：購於洽隆，含0.5% CO₂、99.5% N₂之高壓氣體鋼瓶，氣體體積為6 m³。用於降低營養基質中之溶氧值，並確保能提供足夠之碳源。
28. 曝氣桶：使用體積10公升之純水桶。開口處嵌入一矽膠塞，一頭接氣體鋼瓶，一頭接沸石並伸入桶底部曝氣，於桶開口處附近開一小洞以平衡壓力，曝氣完成後關緊桶蓋以減少外界空氣之進入。
29. 毒物選定：純度皆至少96%以上。
30. 總有機碳分析儀：購自台灣耶拿公司，型號Multi N/C 3100，用以定量配置好之毒物儲備液濃度。

4.2 實驗方法

- 藻類毒性試驗：
以生長率與產氧率為參數之密閉式BOD瓶試驗。

(一) 試驗藻種：

本實驗所選用的藻種為月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)，為廣用於藻類毒性試驗之物種，如：US-EPA、ISO、OECD及APHA等單位皆以此物種做為毒性試驗物種之一。實驗藻種於購自University of Texas, Austin (UTEX)，藻種保存於4 °C之冰箱。

(二) 培養基：

本研究採用U.S. EPA “The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test: Experimental design, Application, and Data interpretation protocol. EPA-600/9-78-018.”所使用的營養鹽組成，再以此為基礎，對其組成加以修改而用於連續式母槽與藻類毒性試驗中。U.S. EPA營養鹽的配製方法如下：將下列(1)~(7)的貯備液 (stock solution) 各加1 mL至900 mL的去離子水中，再定量至1 L。接著以0.1 N當量濃度之NaOH及HCl將營養鹽之pH值調至7.50 ± 0.10，並立即以孔徑為0.45 μm的濾膜過濾。

以下為營養鹽之配置：

- (1)硝酸鈉貯備液：溶解12.750 g NaNO₃於500 mL去離子水。
- (2)氯化鎂貯備液：溶解6.082 g MgCl₂ · 6H₂O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7.350 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。

微營養鹽貯備液中，EDTA分別有100%及0%二種。100%使用於活化藻類時及連續式母槽中培養藻類時，進行實驗時則使用不含EDTA之貯備液。最後配成的營養鹽其巨量及微量營養素濃度列於表4.2.1及表4.2.2。表中之”結果濃度”表示各元素於水溶液中之實際濃度。營養鹽以孔徑0.45 μm 的濾膜過濾滅菌，並保存於4 $^\circ\text{C}$ 冰箱，以免產生光化學反應。

(三) 連續式培養藻類之控制條件：

(1)溫度：控制溫度在 24 ± 1 $^\circ\text{C}$ 。

(2)光度：利用白冷光從系統的一方平行連續照射，使培養槽及試驗瓶中間

段之光度在 $4300 \pm 10\%$ lux ($64.5 \pm 10 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$)。

(3)曝氣：以 400 mL/min之空氣流速曝氣培養母槽。

(4)溢流率：母槽溢流率控制在1140~1260 mL/day
(稀釋率為0.3 /day)。

以上各個參數皆要每天量測，來確保實驗的穩定度。

表 4.2.1 月芽藻生長所需之巨量營養鹽成分

化合物	濃度(mg/L)	元素	各元素實際濃度 (mg/L)
NaNO ₃	25.5	N	4.2
NaHCO ₃	15.0	C	2.14
		Na	11.0
K ₂ HPO ₄	1.04	P	0.186
		K	0.649
MgSO ₄ · 7H ₂ O	14.7	S	1.91
MgCl ₂	5.7	Mg	2.9
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4.41	Ca	1.20

表 4.2.2 月芽藻生長所需之微量營養鹽成份

化合物	濃度(μg/L)	元素	各元素實際濃度(μg/L)
H ₃ BO ₃	186	B	32.5
MnCl ₂	264	Mn	115
ZnCl ₂	3.27	Zn	1.57
CoCl ₂	0.780	Co	0.354
CuCl ₂	0.009	Cu	0.04
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7.26	Mo	2.88
FeCl ₃	96.0	Fe	30.0
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	300		

(四) 玻璃器皿之清洗：

以不含磷之清潔劑清洗後再用自來水沖洗數次，再泡至10%鹽酸溶液至少1小時，最後再以自來水沖洗約5、6次、蒸餾水清洗3、4次後置於烘箱中烘乾（溫度保持於 52 ± 1 °C）。使用前以鋁箔紙封住開口，置於壓力 1.1 kg/cm^2 、溫度 121 °C條件下之滅菌釜中滅菌15分鐘。

(五) ISOTON II 溶液的配製：

加1 g NaCl於100 mL之超純水中完全混合，並以孔徑 $0.2 \mu\text{m}$ 濾紙過濾即得Isoton II溶液。作為電子顆粒計數器之導電溶液。

(六) 電子顆粒計數法及操作原理：

計數器內有一根玻璃管，操作中需浸入含有Isoton II稀釋樣品之燒杯中。玻璃管近底端之側面鑲有紅寶石的精準小圓孔，藉以吸取水樣。玻璃管內外各有一電極片通以直流電，水樣之顆粒經過圓孔時，會暫時性地干擾電流，形成某特定量的電阻。而電阻量化透過示波器的波峰顯示，其高度正比於顆粒的大小，且脈衝數即是顆粒的數目，直接由電子計數器記錄顯示。電子顆粒計數器主要條件設定如下表4.2.3。本實驗採用孔徑 $50 \mu\text{m}$ 之毛細玻璃管，量測粒徑上限為 $2.622 \mu\text{m}$ 至 $60 \mu\text{m}$ 。量測時，取1 mL藻液以Isoton II定量至50 mL，將之倒入燒杯，置於顆粒計數器內量測。以顯示之讀數值扣除空白顆粒數之數值（Isoton II之背景值）。

$$\text{藻液顆粒數 (cells/mL)} = (\text{扣除空白值後之三次讀值平均值} / 0.5 \text{ mL}) \times 50$$

表 4.2.3 顆粒計數器之操作參數

項目	數值
滿刻度電流量 (Full scale)	10 mA
極性 (Polarity)	+
電流 (Currents, I)	100
粒度下限 (Diameter Lower Threshold, Tl)	$2.177 \mu\text{m}$
粒度上限 (Diameter Lower Threshold, Tu)	$6.975 \mu\text{m}$
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
分析量	$500 \mu\text{L}$

(七) 實驗步驟：

(1) 藻類培養：

將欲移植的藻類由4 °C冰箱中取出，進行批次式培養數天，以活化藻細胞，使其達到對數生長期。接著依比例再將達對數生長期的藻液和培養基植入4 L之連續式培養槽中。

將連續式培養槽培養於 24 ± 1 °C之恆溫室中，槽底放置磁石攪拌器，使藻液均勻混合、避免藻類沉澱及少量供應CO₂，另外曝氣裝置有供應CO₂及均勻混合之作用。連續式白冷光從培養槽一邊照射，讓培養槽中段之光照強度介於 $4300 \pm 10\%$ Lux之間。

培養槽的藻數達到相當數量，即以蠕動泵浦進流營養基質。由於培養槽體積固定（母槽設有溢流口），故可直接由流量控制所需之稀釋率（約為0.3/d），亦即控制培養槽內藻類之生長率。每日更換進流基質，並量測槽中細胞數量、溢流率、觀察粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形及細胞平均體積（Mean cell volume, MCV），以判定連續式培養槽是否達到穩定狀態。以連續3天之細胞數量為 $2.8 \times 10^6 \sim 3.2 \times 10^6$ cells/mL、MCV為 $39 \sim 46 \mu\text{m}^3$ 的範圍，且分析儀中藻細胞分佈為常態分佈，即認定系統達到穩定狀態。

(2) 稀釋水配置：

毒性試驗的營養鹽參考U.S. EPA建議配製，適當地修正濃度作為本試驗的營養鹽；以含0.5%CO₂的N₂氣體（流量為600 mL/min）對營養鹽進行曝氣，降低水中的溶氧值並提高CO₂含量，再以0.1 N的NaOH及HCl調整營養鹽之pH至 7.5 ± 0.1 ，即完成稀釋水的配製。

(3) 毒物添加

從達穩態（Steady state）之培養母槽取出藻液，計算各BOD瓶所需加的藻液量，使各瓶初始細胞密度皆為 1.5×10^4 cells/ml，將藻液及稀釋水加入BOD瓶，再加入毒物，一組實驗做七個濃度、三重複（含一組控制組及七組處理組），量測初始溶氧值（Initial DO）。

(4) 實驗終點

經過48 hr毒性物質曝露後，量測含不同毒物濃度之BOD瓶的溶氧值（Final DO），扣除起始溶氧值得淨溶氧值（ ΔDO ），並以顆粒計

數器測量瓶中細胞密度，扣除初始細胞密度 1.5×10^4 cells/ml，以求得藻類生長率。經由Probit模式分析，求出毒性物質之 EC_{50} 值與濃度－反應關係曲線。

4.3 儀器操作原理、步驟與設定條件

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

4.3.1 TOC (總有機碳分析法)

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

4.3.2 總有機碳分析之標準液配製流程

- (1) 總碳 (TC) 標準儲存液以 1000mg/L 為例： 秤取 2.1254g KHP 鄰苯二甲酸氫鉀 (Potassium Hydrogenphthalate) →以超純水 (電導度 $> 18\Omega$) 溶解並定量至1000mL。
- (2) 總無機碳 (TIC) 標準儲存液以 1000mg/L 為例：
秤取 4.41625g 碳酸鈉 (Sodium Carbonate, Na_2CO_3) 以及 3.5g 碳酸氫鈉 (Sodium Hydrogen Carbonate, $NaHCO_3$) 混合後→以超純水 (電導度 $> 18\Omega$) 溶解並定量至1000mL。

(3) TC/TIC混合儲存液，分別取上述已配製好的TC及TIC標準儲液各500mL混合即可。

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

4.4 RC₅₀反應性參數值實驗

實驗步驟 (參考 Schultz 於 2005 年發表 paper)[43]：

- (1) 配製磷酸緩衝溶液(buffer)：將 9.38 g KH₂PO₄ 與 9.38 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，一為加入 GSH，另一為只有磷酸緩衝溶液(不含 GSH)做空白用。
- (6) 分別依照其六個濃度範圍隨後從所配製毒化物之 Stock solutions 由濃度低到高依序加入磷酸緩衝溶液，再者由高濃度到低濃度依序加入 1 ml 的 GSH 溶液定量至小玻璃瓶 (10 ml) 使 SH 最終濃度為 0.1375 mM。
- (7) 配製 DTNB 顯色劑，取 1.98 g 之 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 ml，並於波長 412 nm 下利用分光光度計測其吸收值，將其記錄與 control 組作比較，利用 probit model 分析。

4.5 實驗之品保及品管 (QA/QC)

4.5.1 確定藻類生長狀況

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。

4.5.2 實驗條件之控制

每天檢查控制恆溫室之溫度是否維持在 $24\pm 10^{\circ}\text{C}$ ；光度是否維持在為 $4300\text{Lux}\pm 10\%$ 內；迴轉式振盪儀搖動速度是否為100 rpm。

4.5.3 儀器的保養：

各儀器之耗材皆要定時更換，並定時請廠商進行維修及校正。實驗進行前，儀器皆要預開、暖機，並校正。



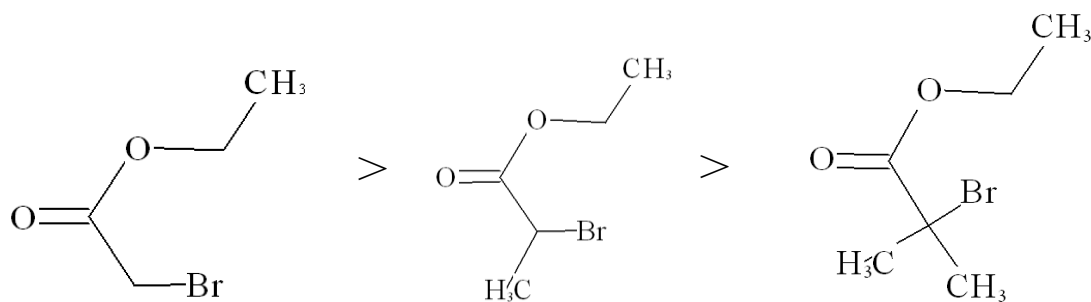
第五章 結果與討論

5.1 藻類實驗毒性數據

針對 14 種鹵素取代酯類（其中 11 種為鍵結一個鹵素的酯類，3 種為鍵結兩個以上鹵素之酯類）利用連續式培養，植種於 BOD 瓶進行 48 小時之藻類批次試毒性試驗，反應終點分別為：溶氧變化量(ΔD_0)、最終細胞變化量(Final Yield)及生長率(Growth Rate)；實驗結果計算 EC_{50} 值並繪製劑量-反應曲線並與其中不同結構及不同取代基所造成毒性作進一步討論。

根據前述雙分子親核取代反應之化學原理，檢視化學物的毒性與結構之相關驅勢，可觀察出以下：

1. 比較 Ethyl fluoroacetate(1)、Ethyl chloroacetate(2)、Ethyl bromoacetate(3) 和 Ethyl iodoacetate(4) 之毒性，參考文獻[1]，纖毛蟲之毒性隨著鹵素電負度的減少而增加，電負度： $F > Cl > Br > I$ ，毒性：Ethyl iodoacetate(4) $>$ Ethyl bromoacetate(3) $>$ Ethyl chloroacetate(2) $>$ Ethyl fluoroacetate(1)。但在月芽藻的部分，排除掉 Ethyl fluoroacetate(1)，其餘皆符合電負度反比於毒性之關係，即毒性：Ethyl iodoacetate(4) $>$ Ethyl bromoacetate(3) $>$ Ethyl chloroacetate(2)，電負度： $Cl > Br > I$ 。在藻類毒性中，Ethyl fluoroacetate(1) 的毒性相當高，但其與穀胱甘肽 (GSH) (RC_{50} , 50% Reactivity Concentration) 幾乎不反應（於 50000ppm 下無抑制），推測其高毒性應不來至於其親電性，此化學物應屬於不同毒理機制，將於 5.6 節進行更詳細的說明。
2. 當相同鹵素鍵結之碳上接上其他碳氫鍊，則因空間位阻使得毒性有以下之關係：



Ethyl bromoacetate(3) Ethyl-2-bromopropionate(8) Ethyl-2-di-bromoisobutyrate(10)

由此推斷，隨著鹵素被碳氫鍊包圍的程度越大，空間位阻越大，毒性越小。

表 5.1.1 鹵素取代酯類之相關毒性數據

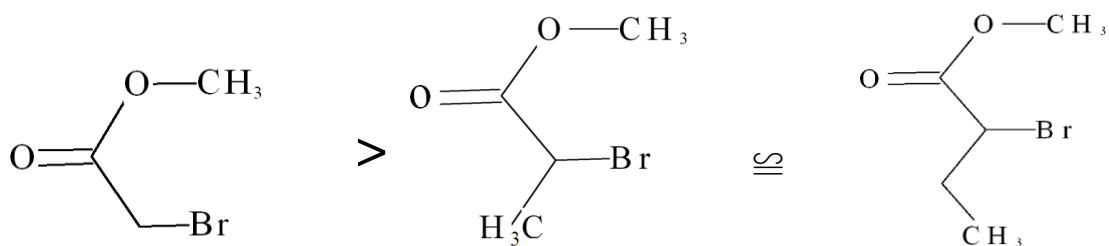
NO	Chemical	化學式	Log Kow	文獻 RC ₅₀ (mM)	文獻 IGC ₅₀ (mM)	RC ₅₀ (mM)	△DO (mM)	FY (mM)	GR(mM)
1	Ethyl fluoroacetate	O=C(OCC)CF	0.80	NR ^a	>2.5 ^a	NR	2.28E-04	5.10E-05	7.61E-04
2	Ethyl chloroacetate	O=C(OCC)CCl	0.94	3.060 ^a	0.088 ^a	1.891	5.15E-04	6.25E-04	5.86E-04
3	Ethyl bromoacetate	O=C(OCC)CBr	1.21	0.086 ^a	0.002 ^a	0.062	3.00E-05	2.10E-05	4.30E-05
4	Ethyl iodoacetate	O=C(OCC)CI	1.62	0.029 ^a	0.001 ^a	0.059	1.50E-05	1.30E-05	2.10E-05
5	Methyl bromoacetate	O=C(OC)CBr	0.72	0.067 ^a	0.011 ^a	0.066	4.60E-05	3.80E-05	5.70E-05
6	Methyl 3-bromopropionate	O=C(OC)CCBr	1.21	8.626 ^a	0.094 ^a	6.786	7.36E-01	4.11E-01	7.40E-01
7	Methyl 2-bromopropionate	O=C(OC)C(Br)C	1.13	1.500 ^a	0.066 ^a	1.290	1.81E-03	2.26E-03	7.90E-03
8	Ethyl-2-bromopropionate	O=C(OCC)C(Br)C	1.63	1.700 ^c	0.088 ^c	1.693	1.08E-03	5.70E-04	1.39E-03
9	Methyl 2-bromobutyrate	O=C(OC)C(Br)CC	1.63	3.535 ^a	0.095 ^a	4.778	1.13E-02	9.32E-03	1.27E-02
10	Ethyl-2-di-bromoisobutyrate	O=C(OCC)C(Br)(C)C	2.08	ND	0.708 ^b	128.1	7.38E-02	1.06E-01	1.83E-01
11	Tert-Butyl bromoacetate	O=C(OC(C)(C)C)CBr	2.08	0.085 ^a	0.004 ^a	0.109	1.05E-04	8.50E-05	1.45E-04
12	Ethyl dibromoacetate	O=C(OCC)C(Br)Br	1.48	ND	ND	0.943	4.23E-04	4.55E-04	6.89E-04
13	Ethyl tribromoacetate	BrC(Br)(Br)C(=O)OCC	2.49	ND	ND	0.032	6.40E-04	7.45E-04	1.98E-03
14	Ethyl-2,3-di-bromopropionate	O=C(OCC)C(Br)CBr	1.97	ND	0.006 ^b	0.053	6.27E-04	3.74E-04	7.74E-04

^a : Data from TW.Schltz et al., 2007[1].; ^b : Data from DeWeese AD et al[2]., 2001. ^c : Data from David W. Roberts et al., 2010[41]

上表單位皆以莫爾濃度(mM)表示； NR 表不反應； ND：no data；溶氧變化量(△DO)、最終細胞變化量(FY)及生長率(GR)

但如果所鍵結的碳氫鍊不以包圍之形式鍵結於鹵素鍵結之碳上，則空

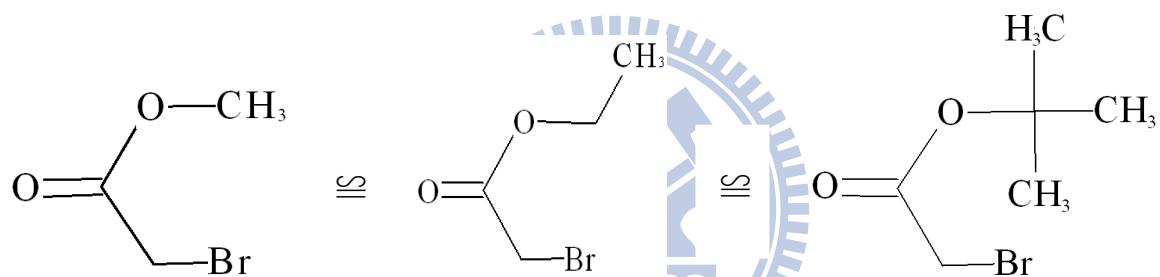
間位阻對於毒性的影響則較有限：



Methyl bromoacetate(5) Methyl 2-bromopropionate(7) Methyl 2-bromobutyrate(9)

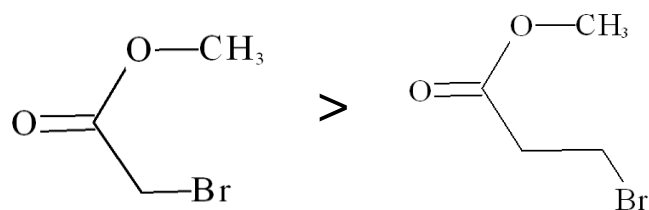
以上可以得知連接一個甲基或連接一個乙基對於空間位阻的影響相似，兩者間的毒性數據相近。

3.當碳氫鍊鍵結位置位於鹵素鍵結之碳的另一邊，空間位阻的影響並不明顯，三者藻類毒性相似：



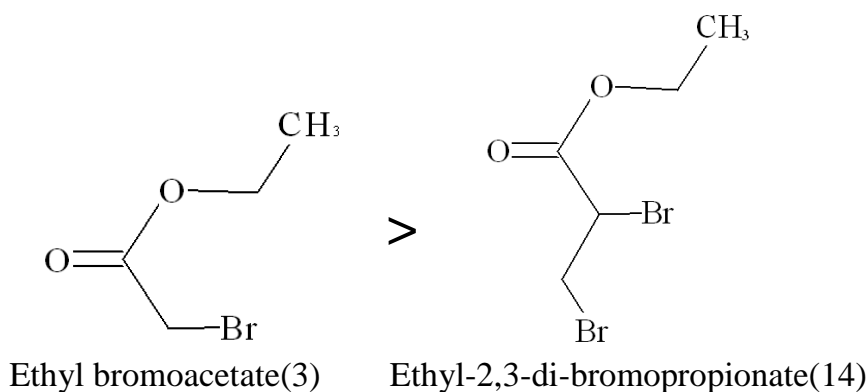
Methyl bromoacetate(5) Ethyl bromoacetate(3) Tert-Butyl bromoacetate(11)

4.當鹵素所連接的碳較遠離拉電子基，羰基（拉電子基）對於鍵結鹵素之碳的電子雲密度的影響會下降，使得毒性下降：



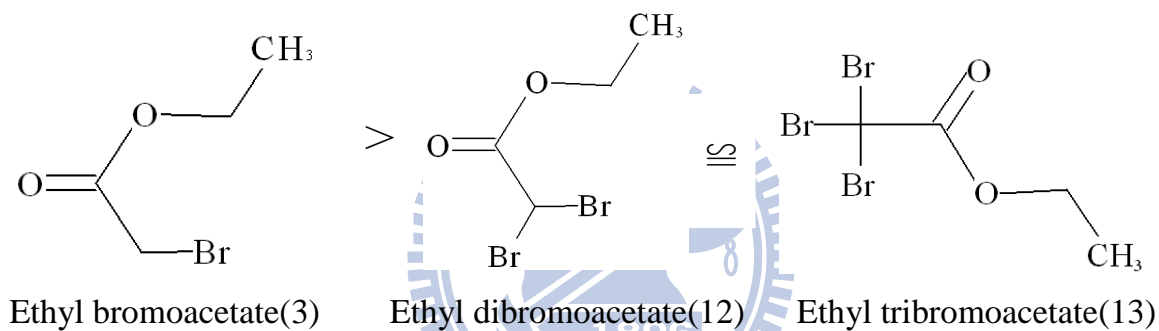
Methyl bromoacetate(5) Methyl 3-bromopropionate(6)

5. 當鹵素數目增加成兩個時，毒性下降：



羰基（拉電子基）對於鹵素鍵結之碳的電子雲影響被兩組鹵素-碳所稀釋，使得 S_N2 親核性取代反應相對較弱，毒性因此下降[45]。

3. 當鹵素數目增加成二至三個時，在毒性上的影響較無規則：



推測原因為鹵素將碳包圍，碳被大量電子圍繞，使其對親核試劑的吸引力減弱，親核試劑不易與其發生 S_N2 親核性取代反應，毒性因此下降[42]。

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

在毒性試驗中，由於慢毒性試驗比急毒性試驗需要更多的時間、物資及人力。因此，現今大多利用外插法(extrapolation)得知毒物之毒性影響並更進一步得知達到環境品質之標準。而固定的外插因子通常採用 10、100 或 1000 應用到可獲得的 EC_{50} 或 LC_{50} 以求得最大可接受的危害等級。而急慢毒性比值(Acute -chronic toxicity ratio)即是經由此而發展出來的。

$ACR = \text{Acute toxicity} / \text{Chronic toxicity}$ 之比值，由表 5.2.1 可知，以 EC_{10} 計算出之結果，ACR 值大約都介於 2~7 之間。比較三個不同的終點，化學物彼此之間的 ACR 的比值趨勢大致上是很接近的，除了 Ethyl fluoroacetate(1)之外，以 ΔDO 為反應終點時，主要以 Methyl 2-bromopropionate(7)、Ethyl-2-bromopropionate(8)值較高，以 Final yield 為反應終點時，主要以 Methyl 2-bromopropionate(7)、Ethyl chloroacetate(2)值較高，以 Growth rate 為反應終點時，主要以 Methyl 2-bromopropionate(7)、Ethyl bromoacetate(3)值較為偏高。Ethyl fluoroacetate(1)ACR 值很大，可能原因為實驗過程的毒化物濃度選取不夠嚴謹，選用的濃度造成的毒性皆高，所以無法模擬出合適之 EC_{10} 。

在本研究中，以 ΔDO 為反應終點去掉 Ethyl fluoroacetate(1)後之 ACR 平均值為 5.06。以 Final yield 為反應終點去掉 Ethyl fluoroacetate(1)後之 ACR 平均值為 4.31。以 Growth rate 為反應終點去掉 Ethyl fluoroacetate(1)後之 ACR 平均值為 6.48。若將各化學物之三個終點之 ACR 值，皆取最大值，去掉 Ethyl fluoroacetate(1)後所得之藻類毒性 ACR 平均值 7.61。在不考慮 Ethyl fluoroacetate(1)的情況下，若以 ACR 平均值作為用來評估化學物之慢毒性，選用 7.61 為較保險的。若以較嚴謹的立場來評估慢毒性，在不考慮 Ethyl fluoroacetate(1)的情況下，ACR 值以 15 最為保險，95%的化學物的 ACR 值在 15 以下。

表 5.2.1 鹵素取代酯類之急慢毒性比值和斜率及截距

NO	Chemical	Δ DO (mM)			FY (mM)			GR(mM)		
		ACR (EC ₅₀ /EC ₁₀)	斜率 (α)	截距 (β)	ACR (EC ₅₀ /EC ₁₀)	斜率 (α)	截距 (β)	ACR (EC ₅₀ /EC ₁₀)	斜率 (α)	截距 (β)
1	Ethyl fluoroacetate	32.1	0.85	6.37	37.5	0.81	6.84	59.4	0.72	5.78
2	Ethyl chloroacetate	4.70	1.90	7.28	9.87	1.29	6.44	4.19	2.06	7.35
3	Ethyl bromoacetate	3.70	2.23	10.1	4.24	2.04	10.0	6.79	1.54	8.30
4	Ethyl iodoacetate	3.84	2.18	10.5	3.68	2.27	10.8	10.4	1.26	7.95
5	Methyl bromoacetate	3.74	2.33	9.83	2.50	3.21	12.2	3.68	2.26	9.66
6	Methyl 3-bromopropionate	3.66	2.28	0.24	2.58	3.10	0.712	3.57	2.31	0.15
7	Methyl 2-bromopropionate	16.0	1.06	5.10	7.45	1.47	5.62	9.80	1.30	4.84
8	Ethyl-2-bromopropionate	6.46	1.64	6.17	5.80	1.68	6.65	21.0	0.96	5.58
9	Methyl 2-bromobutyrate	4.42	1.99	4.38	3.21	2.54	4.42	2.53	3.19	3.85
10	Ethyl-2-di-bromoisobutyrate	3.52	2.34	2.19	2.68	2.90	1.18	2.82	2.85	0.58
11	tert-Butyl bromoacetate	3.50	2.35	8.97	2.80	2.82	10.0	3.39	2.41	8.74
12	Ethyl dibromoacetate	5.14	1.80	6.77	2.93	2.74	7.60	6.57	1.57	6.20
13	Ethyl tribromoacetate	4.86	1.87	6.27	5.02	1.83	6.13	5.98	1.65	5.32
14	Ethyl-2,3-di-bromopropionate	2.25	1.79	6.41	3.28	2.48	7.51	3.58	2.31	6.61

上表單位皆以莫爾濃度(mM)。

灰底為各化學物之最大 ACR 值

5.3 鹵素取代酯類與基線毒性之比較

本研究室過去做了一系列有關非極性麻醉毒性化合物的研究並與 Log Kow 值迴歸同樣依三個不同的反應終點 Δ DO, Final Yield, Growth rate 建立有關月芽藻的基線毒性(baseline toxicity)關係分別以 Eq(1)、Eq(2)、Eq(3)表示[39-40]：

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \Delta\text{DO}}) = 0.978 \text{ Log Kow} - 1.83 \quad (5.1)$$

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

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{FY}}) = 0.9 \text{ Log Kow} - 1.4 \quad (5.2)$$

$$n = 48, R^2 = 0.87, Q^2 = 0.866, S = 0.49, F = 303.7$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{GR}}) = 0.974 \text{ Log Kow} - 1.95 \quad (5.3)$$

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

本節希望利用此基線毒性預測鹵素取代酯類之毒性，進而判斷毒性作用機制。表 5.3.1 為比較利用基線毒性所預測之結果與實際毒性之殘差。

因鹵素取代酯類屬於反應性毒物的毒性作用機制，所以理論上毒性應比基線毒性高，大部分結果跟預期相符，但 Methyl 3-bromopropionate(6)、Ethyl-2-di-bromoisobutyrate(10)的毒性卻十分接近基線毒性。若比較其 RC_{50} 值，Ethyl-2-di-bromoisobutyrate(10)大約為 128.1(mM)，Methyl 3-bromopropionate(6)為 6.786(mM)，為此次實驗 14 個毒化物中，反應性屬於較不顯著的。更詳細的論述於 5.5.2 節進行更詳細的討論

表 5.3.1 利用基線毒性預測鹵素取代酯類之毒性

NO	Chemical	Log Kow	Log(1/EC _{50, ΔDO})			Log(1/EC _{50, FY})			Log(1/EC _{50, GR})		
			Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual
1	Ethyl fluoroacetate	0.80	3.6418	-1.0540	4.6958	4.2909	-0.6800	4.9709	3.1188	-1.1708	4.2896
2	Ethyl chloroacetate	0.94	3.2880	-0.9182	4.2062	3.2043	-0.5540	3.7583	3.2323	-1.0344	4.2667
3	Ethyl bromoacetate	1.21	4.5247	-0.7436	5.2683	4.6794	-0.3920	5.0714	4.3694	-0.8591	5.2285
4	Ethyl iodoacetate	1.62	4.8374	-0.2586	5.0960	4.8904	0.0580	4.8324	4.6735	-0.3721	5.0456
5	Methyl bromoacetate	0.72	4.3407	-1.1316	5.4723	4.4148	-0.7520	5.1668	4.2455	-1.2487	5.4942
6	Methyl 3-bromopropionate	1.21	0.1330	-0.6563	0.7893	0.3857	-0.3110	0.6967	0.1306	-0.7715	0.9020
7	Methyl 2-bromopropionate	1.13	2.7420	-0.7339	3.4759	2.6458	-0.3830	3.0288	2.1021	-0.8494	2.9515
8	Ethyl-2-bromopropionate	1.63	2.9682	-0.3847	3.3529	3.2442	-0.0590	3.3032	2.8569	-0.4987	3.3556
9	Methyl 2-bromobutyrate	1.63	1.9453	-0.2489	2.1942	2.0307	0.0670	1.9637	1.8950	-0.3624	2.2574
10	Ethyl-2-di-bromoisobutyrate	2.08	1.1318	0.1876	0.9442	0.9760	0.4720	0.5040	0.7375	0.0759	0.6616
11	tert-Butyl bromoacetate	2.08	3.9801	0.1876	3.7925	4.0701	0.4720	3.5981	3.8388	0.0759	3.7629
12	Ethyl dibromoacetate	1.48	3.3737	-0.3944	3.7681	3.3420	-0.0680	3.4100	3.1616	-0.5085	3.6700
13	Ethyl tribromoacetate	2.49	3.1936	0.5853	2.6083	3.1277	0.8410	2.2867	2.7039	0.4753	2.2286
14	Ethyl-2,3-di-bromopropionate	1.97	3.2028	0.0809	3.1219	3.4273	0.3730	3.0543	3.1114	-0.0312	3.1426

EC₅₀ 單位皆為莫爾濃度(mM)。

Obse. : Log(1/EC₅₀)_{observed} Pred. : Log(1/EC₅₀)_{predicted}

Residual =Log(1/EC₅₀)_{Observed}- Log(1/EC₅₀)_{Predicted}

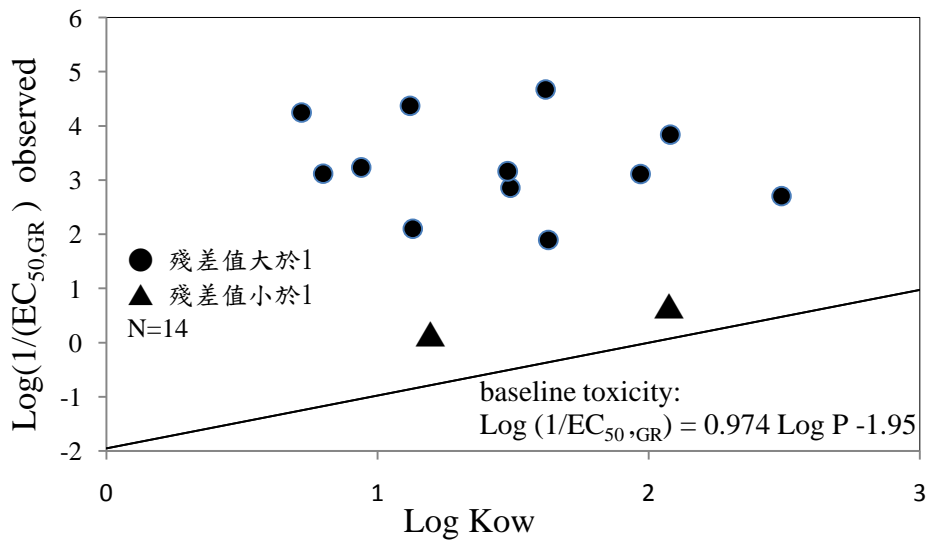
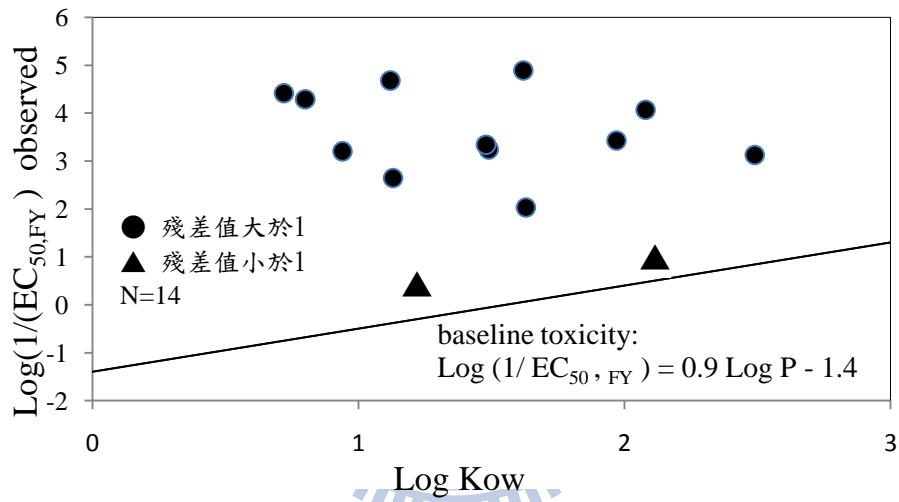
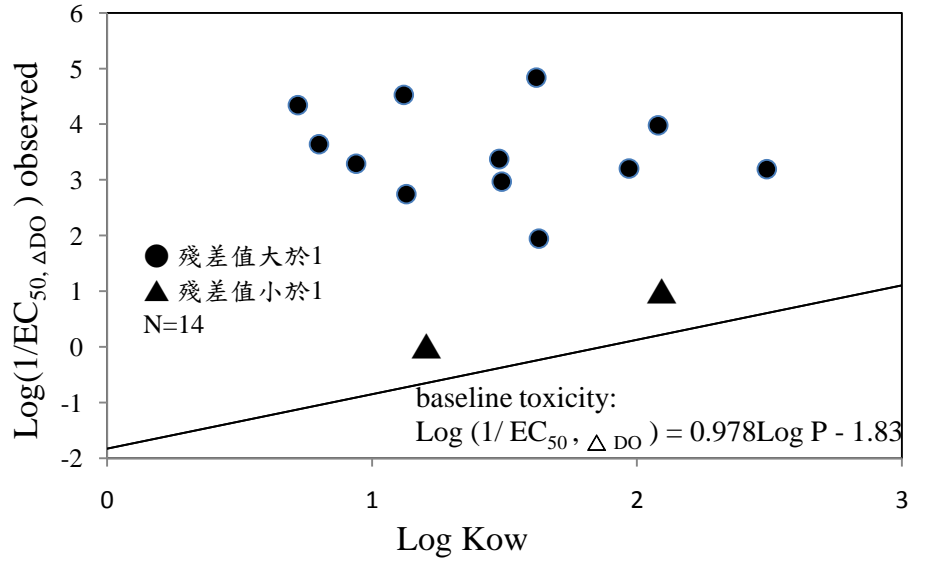


圖 5.3.1 毒性數據與 LogKow 之相關性

5.4 密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗與其他物種試驗之比較

Cronin et al[44]認為當毒物屬於相同的毒性機制可利用物種間迴歸結果來了解彼此的相關性，並可由迴歸的結果推估其他物種的敏感度，也因此基於以上論點本節將討論本密閉式藻類試驗法與其他方法的相關性。

藻類在水體環境中為主要之生產者，受到危害後會直接或間接影響到其他更高階之生物物種，對於水體環境的保護具有一定之重要性。表 5.4.1 為以密閉式藻類毒性試驗(Δ DO、Final yield 及 Growth rate)與纖毛蟲 (*Tetrahymena pyriformis*)所得之實驗結果。針對密閉式藻類毒性試驗而言，可以發現到三種反應終點當中對於鹵素取代酯類之敏感性最高者大致上為最終細胞變化量(F.Y)，其次為溶氧產生量(Δ DO)，而敏感性最差之反應終點為生長率(G.R.)。進一步探討藻類與其他生物物種之敏感性比較可以發現藻類的敏感性比纖毛蟲高，順序為藻類最終細胞變化量(F.Y) $>$ 藻類溶氧產生量(Δ DO) $>$ 藻類生長率(G.R.) $>$ 纖毛蟲。

藻類相較於纖毛蟲具有較高的敏感度，由於其利用 BOD 瓶水封阻止揮發性的鹵素取代酯類逸散，為密閉式的毒性試驗，而纖毛蟲試驗為開放式的，於此有可能低估纖毛蟲的實際毒性。

圖 5.4.1 為藻類在不同反應終點與纖毛蟲之相關性比較，其與纖毛蟲之相關係數(R^2)，以 Δ DO、F.Y、G.R.順序排列，分別為 0.663、0.711、0.693，可知藻類跟纖毛蟲物種間具有一定程度的相關性，於圖中可以觀察到一明顯 outlier- Methyl 3-bromopropionate(6)，將於 5.5.3 節更詳細的討論。

表 5.4.1 比較鹵素取代酯類之藻類毒性與纖毛蟲毒性

NO	Chemical	T.pyriformis(40hr)	Algae (BOD bottle)(48hr)		
		Log(1/IGC ₅₀)	Log(1/EC _{50, ΔDO})	Log(1/EC _{50, FY})	Log(1/EC _{50, GR})
1	Ethyl fluoroacetate	> -0.3979 ^a	3.6418	4.2909	3.1188
2	Ethyl chloroacetate	1.0555 ^a	3.2880	3.2043	3.2323
3	Ethyl bromoacetate	2.6777 ^a	4.5247	4.6794	4.3694
4	Ethyl iodoacetate	2.9208 ^a	4.8374	4.8904	4.6735
5	Methyl bromoacetate	1.9586 ^a	4.3407	4.4148	4.2455
6	Methyl 3-bromopropionate	1.0268 ^a	0.1330	0.3857	0.1306
7	Methyl 2-bromopropionate	1.1804 ^a	2.7420	2.6458	2.1021
8	Ethyl-2-bromopropionate	1.0555 ^c	2.9682	3.2442	2.8569
9	Methyl 2-bromobutyrate	1.0222 ^a	1.9453	2.0307	1.8950
10	Ethyl-2-di-bromoisobutyrate	0.1502 ^b	1.1318	0.9760	0.7375
11	tert-Butyl bromoacetate	2.4089 ^a	3.9801	4.0701	3.8388
12	Ethyl dibromoacetate	ND	3.3737	3.3420	3.1616
13	Ethyl tribromoacetate	ND	3.1936	3.1277	2.7039
14	Ethyl-2,3-di-bromopropionate	2.2076 ^b	3.2028	3.4273	3.1114

^a : Data from TW.Schlitz et al., 2007[1]. ; ^b : Data from DeWeese AD et al., 2001[2].; ^c : Data from David W. Roberts et al., 2010[41].

EC₅₀ 單位皆為莫爾濃度(mM)。 ND : no data

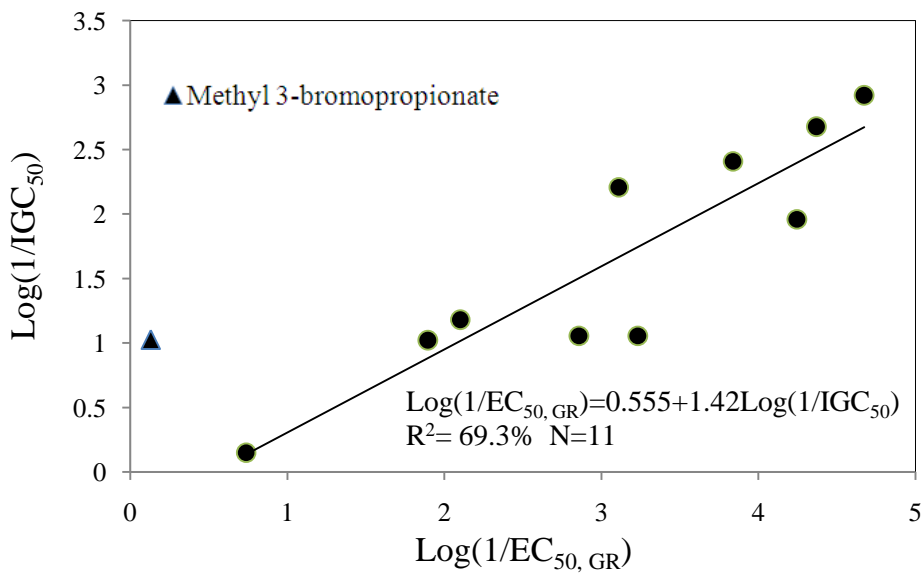
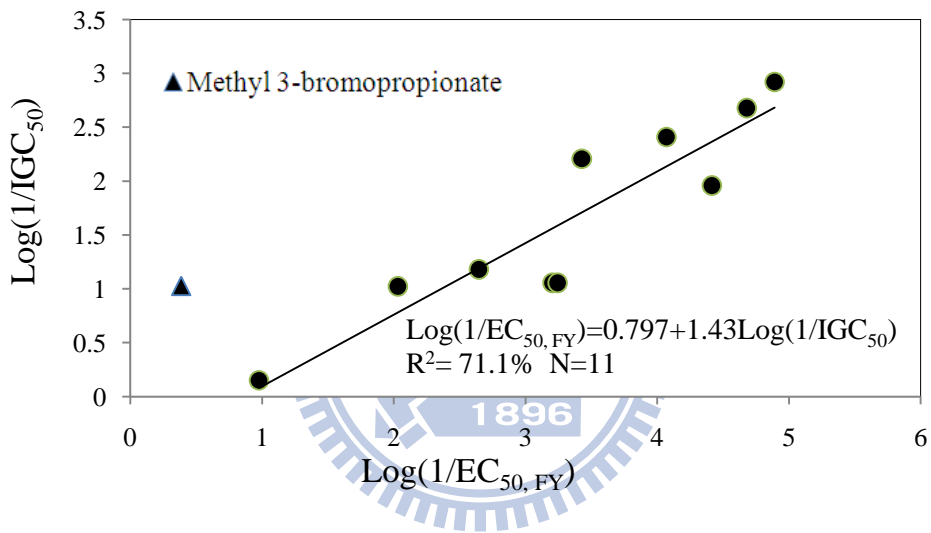
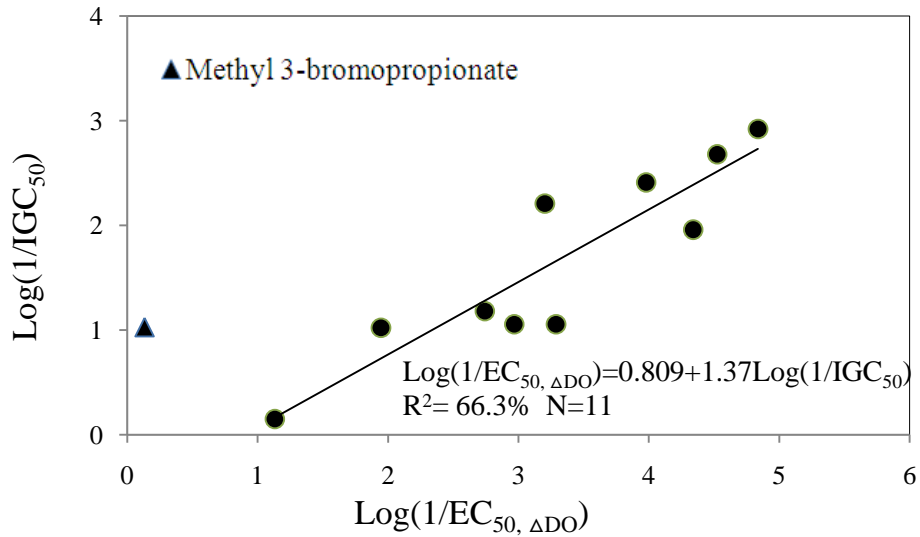


圖 5.4.1 藻類與纖毛蟲毒性之相關性

5.5 QSAR 分析

5.5.1 毒性數據與傳統物化參數 Log Kow 迴歸分析

本研究試驗毒物鹵素取代酯類為親電性物質之反應性有機物，此種有機物的毒性一般來說比非反應性物質(麻醉性物質)來的毒，而麻醉性物質的毒性與辛醇-水係數 (n-Octanol/Water Partition Coefficient, Log Kow) 有良好的關係，因此本研究毒性試驗數據會先以 Log Kow 觀察其相關性，若相關性不佳，就進一步證實本研究試驗毒物為反應性有機物的毒性作用機制，由 Eq(4)、Eq(5)、Eq(6)可看出其相關係數(R_{adj}^2)為 0.02~0.05 顯示與 Log Kow 相關性不佳，而此結果也與文獻相符[1,2,41]。

$$\text{Log}(1/EC_{50, \Delta DO}) = 3.67 - 0.391 \text{ Log Kow} \quad (5.4)$$

$$n = 14, R^2 = 0.026, R_{pred}^2 = 0.00, S = 1.33, F = 0.32$$

$$\text{Log}(1/EC_{50, FY}) = 3.98 - 0.532 \text{ Log Kow} \quad (5.5)$$

$$n = 14, R^2 = 0.052, R_{pred}^2 = 0.00, S = 1.36, F = 0.57$$

$$\text{Log}(1/EC_{50, GR}) = 3.51 - 0.430 \text{ Log Kow} \quad (5.6)$$

$$n = 14, R^2 = 0.034, R_{pred}^2 = 0.00, S = 1.34, F = 0.38$$

針對模式之適合度而言，在統計迴歸分析中，模式通常採用迴歸係數之平方(R^2 ，代表模式所解釋之相關性)，標準偏差(S)及檢驗值(F)等來評判。而模式之穩健性(準確性)一般採用交叉驗證法(Cross Validation)來進行檢驗。本研究是使用逐一剔除法，而 R_{pred}^2 即為經由交叉驗證法之後的迴歸係數平方值。

5.5.2 毒性數據與反應性參數迴歸分析

本研究試驗毒物鹵素取代酯類為親電性物質之反應性有機物，利用親核性物質-穀胱甘肽 (GSH, glutathione) 作為一化學參數，用來描述化學物質與生物體中的親核試劑的親電性反應。針對 14 種鹵素取代酯類 (其中 11 種為鍵結一個鹵素的酯類，3 種為鍵結兩個以上鹵素之酯類) 所完成的反應性參數 RC_{50} ，僅 Ethyl fluoroacetate(1) 與穀胱甘肽幾乎不反應 ($RC_{50} > 50000\text{ppm}$)，其餘 13 種化學物皆有 RC_{50} 之實驗數據。若將 RC_{50} 之實驗數據與文獻[1,41]比較，發現此親核性反應實驗屬於一再現性良好的實驗：

$$\begin{aligned} \text{Log}(1/RC_{50}) &= 0.0195 + 0.916\text{Log}(1/RC_{50})_{\text{ref}} & (5.7) \\ n &= 9, R^2 = 0.973, R_{\text{pred}}^2 = 0.953, S = 0.28, F = 255 \end{aligned}$$

利用反應性參數 RC_{50} 值與 13 種鹵素取代酯類建立定量結構-活性關係：(去除 Ethyl fluoroacetate(1))

$$\begin{aligned} \text{Log}(1/EC_{50, \Delta DO}) &= 2.81 + 0.995\text{Log}(1/RC_{50}) & (5.8) \\ n &= 13, R^2 = 0.644, R_{\text{pred}}^2 = 0.487, S = 0.84, F = 19.9 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Log}(1/EC_{50, \text{FY}}) &= 2.86 + 1.03 \text{Log}(1/RC_{50}) & (5.9) \\ n &= 13, R^2 = 0.681, R_{\text{pred}}^2 = 0.547, S = 0.76, F = 23.5 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Log}(1/EC_{50, \text{GR}}) &= 2.61 + 1.00 \text{Log}(1/RC_{50}) & (5.10) \\ n &= 13, R^2 = 0.637, R_{\text{pred}}^2 = 0.490, S = 0.86, F = 19.3 \end{aligned}$$

從表 5.5.1.1 顯示 13 個毒化物中，利用上述的回歸式，只有兩個化學物之實際毒性與推測出的毒性數據殘差值大於 1：

Methyl 3-bromopropionate(6)、Ethyl tribromoacetate(13)。

去掉這兩個 outlier，再進行迴歸：

$$\begin{aligned} \text{Log}(1/EC_{50, \Delta DO}) &= 3.09 + 0.945\text{Log}(1/RC_{50}) & (5.11) \\ n &= 11, R^2 = 0.819, R_{\text{pred}}^2 = 0.736, S = 0.50, F = 40.8 \end{aligned}$$

$$\text{Log}(1/EC_{50, \text{FY}}) = 3.13 + 1.02\text{Log}(1/RC_{50}) \quad (5.12)$$

$$n = 11, R^2 = 0.857, R_{\text{pred}}^2 = 0.794, S = 0.466, F = 54.1$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50,\text{GR}}) = 2.89 + 1.01 \text{Log}(1/\text{RC}_{50}) \quad (5.13)$$

$$n = 11, R^2 = 0.818, R_{\text{pred}}^2 = 0.743, S = 0.53, F = 40.4$$

Ethyl-2-di-bromoisobutyrate(10)的反應性差 (RC_{50} :128.1(mM))，其毒性和 RC_{50} 值呈現良好的相關性，實驗與預測之殘差值不超過 1。但其於 5.3 節中，利用藻類之基線毒性所預測之毒性數據與實際值殘差值亦十分接近，顯示其微弱的親電性與毒性反應呈現良好的相關性，表現出與基線毒性相似之結果。

於 5.3 節，利用藻類的基線毒性所預測出的 Methyl 3-bromopropionate(6) 的毒性數據與實際值殘差值小於 1，又比較利用 RC_{50} 值所建立的 QSAR 預測出的毒性數據與實際值殘差值絕對值大於 1，因此推測與其毒性較為相關的應是 Log Kow 而非親電性參數 RC_{50} 值，其毒理機制可能不屬於 $\text{S}_{\text{N}}2$ 親核性取代反應，較傾向於麻醉性。

Ethyl tribromoacetate(13)於 RC_{50} 反應性參數值實驗中，所得之 RC_{50} 值較低，反應性較強，但是於利用 RC_{50} 值所建立的 QSAR 推測出的毒性數據卻高估實際毒性，因此推測利用 RC_{50} 值來推估其毒性似乎並不恰當，將於 5.6 節比較相關文獻數據，來推測可能的原因。

表 5.5.2.1 藻類毒性數據與反應性參數迴歸(Eq:5.8~5.10)分析比較

NO	Chemical	Log(1/RC ₅₀)	Log(1/EC _{50,ΔDO})			Log(1/EC _{50,FY})			Log(1/EC _{50,GR})		
			Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual
1	Ethyl fluoroacetate	NR	3.6418	ND	ND	4.2909	ND	ND	3.1188	ND	ND
2	Ethyl chloroacetate	-0.2767	3.2880	2.5347	0.7534	3.2043	2.5750	0.6293	3.2323	2.3333	0.8990
3	Ethyl bromoacetate	1.2059	4.5247	4.0099	0.5147	4.6794	4.1021	0.5773	4.3694	3.8159	0.5534
4	Ethyl iodoacetate	1.2233	4.8374	4.0272	0.8102	4.8904	4.1200	0.7704	4.6735	3.8333	0.8401
5	Methyl bromoacetate	1.1758	4.3407	3.9799	0.3608	4.4148	4.0711	0.3438	4.2455	3.7858	0.4597
6	Methyl 3-bromopropionate	-0.8317	0.1330	1.9825	-1.8495	0.3857	2.0034	-1.6177	0.1306	1.7783	-1.6478
7	Methyl 2-bromopropionate	-0.1106	2.7420	2.6999	0.0421	2.6458	2.7460	-0.1001	2.1021	2.4993	-0.3972
8	Ethyl-2-bromopropionate	-0.2289	2.9682	2.5823	0.3860	3.2442	2.6242	0.6200	2.8569	2.3811	0.4758
9	Methyl 2-bromobutyrate	-0.6793	1.9453	2.1341	-0.1889	2.0307	2.1604	-0.1297	1.8950	1.9307	-0.0357
10	Ethyl-2-di-bromoisobutyrate	-2.1078	1.1318	0.7128	0.4190	0.9760	0.6890	0.2870	0.7375	0.5022	0.2353
11	tert-Butyl bromoacetate	0.9619	3.9801	3.7671	0.2130	4.0701	3.8507	0.2194	3.8388	3.5719	0.2669
12	Ethyl dibromoacetate	0.0253	3.3737	2.8351	0.5385	3.3420	2.8860	0.4559	3.1616	2.6353	0.5263
13	Ethyl tribromoacetate	1.4880	3.1936	4.2905	-1.0970	3.1277	4.3926	-1.2649	2.7039	4.0980	-1.3941
14	Ethyl-2,3-di-bromopropionate	1.2687	3.2028	4.0724	-0.8696	3.4273	4.1668	-0.7395	3.1114	3.8787	-0.7673

ND : no data ; NR 表不反應 ; EC₅₀ 單位皆為莫爾濃度(mM)。

Obse. : Log(1/EC₅₀)_{observed} ; Pred. : Log(1/EC₅₀)_{predicted}

Residual =Log(1/EC₅₀)_{Observed}- Log(1/EC₅₀)_{Predicted}

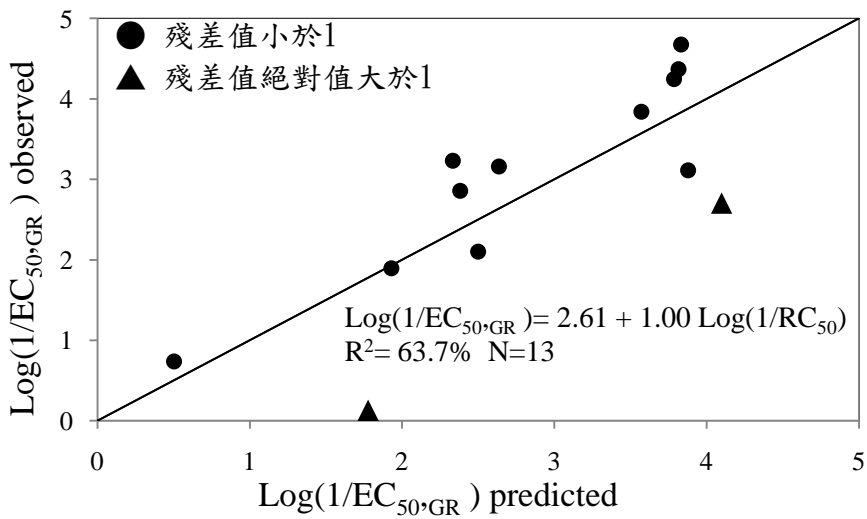
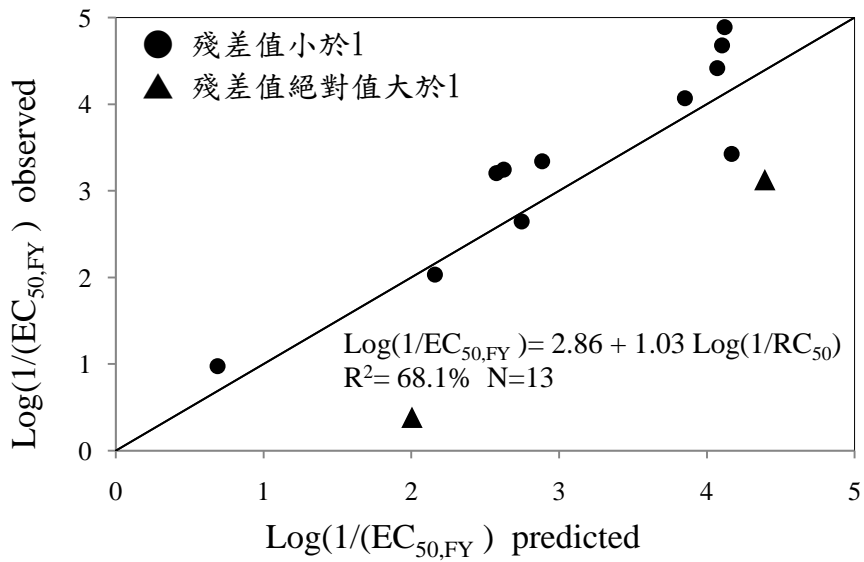
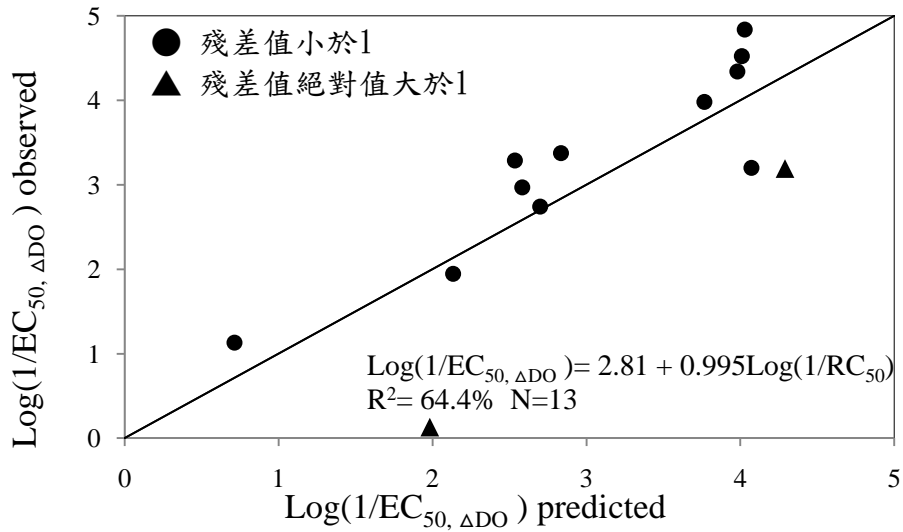


圖 5.5.2.1 Eq:5.8~5.10 的預測毒性數據 V.S 實驗毒性數據

5.5.3 藻類與纖毛蟲物種間關係

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

$$\begin{aligned}\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \Delta\text{DO}}) &= 0.809 + 1.37 \text{Log}(1/\text{IGC}_{50}) & (5.14) \\ n &= 11, R^2 = 0.663, R_{\text{pred}}^2 = 0.552, S = 0.897, F = 17.7\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{FY}}) &= 0.797 + 1.43 \text{Log}(1/\text{IGC}_{50}) & (5.15) \\ n &= 11, R^2 = 0.711, R_{\text{pred}}^2 = 0.616, S = 0.835, F = 22.1\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{GR}}) &= 0.555 + 1.42 \text{Log}(1/\text{IGC}_{50}) & (5.16) \\ n &= 11, R^2 = 0.693, R_{\text{pred}}^2 = 0.593, S = 0.869, F = 22.1\end{aligned}$$

去掉圖 5.4.1 中的 outlier- Methyl 3-bromopropionate(6)，再進行迴歸：

$$\begin{aligned}\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \Delta\text{DO}}) &= 1.32 + 1.19 \text{Log}(1/\text{IGC}_{50}) & (5.17) \\ n &= 10, R^2 = 0.821, R_{\text{pred}}^2 = 0.739, S = 0.527, F = 36.6\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{FY}}) &= 1.26 + 1.26 \text{Log}(1/\text{IGC}_{50}) & (5.18) \\ n &= 10, R^2 = 0.839, R_{\text{pred}}^2 = 0.755, S = 0.526, F = 41.6\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{GR}}) &= 1.02 + 1.25 \text{Log}(1/\text{IGC}_{50}) & (5.19) \\ n &= 10, R^2 = 0.809, R_{\text{pred}}^2 = 0.716, S = 0.580, F = 33.8\end{aligned}$$

於上式觀察到當去掉 Methyl 3-bromopropionate(6)後， R^2 明顯提升。於 5.5.2 節中，Methyl 3-bromopropionate (6) 在藻類毒性試驗中，其毒理機制被重新分類為麻醉性，但在文獻[1]纖毛蟲的毒性機制中，Methyl 3-bromopropionate(6)之毒理機制被歸類為親電性反應，因此使得兩種物種之間的相關性降低，這也象徵著相同的化學物於不同物種中，可能會有不一樣的毒理機制，所以應用物種間的 QSAR 時，應謹慎小心。

5.5.4 毒性數據與傳統電性參數回歸分析

本次所選定的傳統電性參數利用 CS Chem3D Pro 計算軟體、Theory 選用 PM3 模擬而得，選用的電性參數有： E_{LUMO} 、H-carbon 部分電荷、Halo 部分電荷、 Δ Halo 部分電荷。電性參數間的相關性及意義列於表 5.5.4.1。

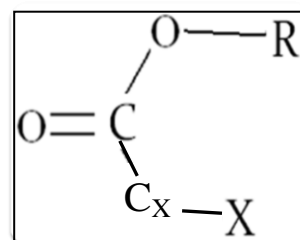
表 5.5.4.1 參數間的相關性

R-Sq	Log Kow	RC ₅₀	E_{LUMO}	H-carbon 部分電荷	Halo 部分電荷	Δ Halo 部分電荷
Log Kow	-	0.4%	45.3%	0.1%	0.6%	1.2%
RC ₅₀	-	-	18.2%	73.1%	10.7%	71.4%
E_{LUMO}	-	-	-	2.8%	1.2%	0.2%
H-carbon 部分電荷	-	-	-	-	5.2%	86.3%
Halo 部分電荷	-	-	-	-	-	32.7%
Δ Halo 部分電荷	-	-	-	-	-	-

※H-carbon 部分電荷：鹵素所鍵結之碳的部分電荷(C_X)

※Halo 部分電荷：鹵素的部分電荷(X)

※ Δ Halo 部分電荷：H-carbon 部分電荷-Halo 部分電荷



※ S_N2 親核性取代反應的反應過程是親核試劑取代鹵素，因此利用 Δ Halo 部分電荷參數描述碳和鹵素間的部分電荷電位差可以量化親核試劑取代的難易，進而推估毒性。

具有高相關性之參數不得同時使用於同一回歸式中，由上表得知 RC₅₀ 與 H-carbon 部分電荷、 Δ Halo 部分電荷有高相關性，H-carbon 部分電荷和 Δ Halo 部分電荷亦有高相關性，皆不得同時使用於回歸中。

表 5.5.4.2 化學物的模擬電性參數值

NO	Chemical	E _{LUMO}	H-carbon 部分電荷	Halo 部分電荷	ΔHalo 部分電荷
1	Ethyl fluoroacetate	0.141	-0.1137	-0.1371	0.0234
2	Ethyl chloroacetate	0.194	-0.2922	-0.0243	-0.2679
3	Ethyl bromoacetate	-0.525	-0.308	-0.0388	-0.2692
4	Ethyl iodoacetate	-1.15	-0.2709	-0.07	-0.2009
5	Methyl bromoacetate	-0.538	-0.3079	-0.0382	-0.2697
6	Methyl 3-bromopropionate	-0.37	-0.2257	-0.1087	-0.117
7	Methyl 2-bromopropionate	-0.48	-0.205	-0.049	-0.156
8	Ethyl-2-bromopropionate	-0.468	-0.205	-0.0496	-0.1554
9	Methyl 2-bromobutyrate	-0.848	-0.2126	-0.0397	-0.1729
10	Ethyl-2-di-bromoisobutyrate	-0.442	-0.1053	-0.0437	-0.0616
11	tert-Butyl bromoacetate	-0.538	-0.3167	-0.0339	-0.2828
12	Ethyl dibromoacetate	-1.335	-0.2916	X	X
13	Ethyl tribromoacetate	-1.75	-0.2765	X	X
14	Ethyl-2,3-di-bromopropionate	-1.091	X	X	X

※電性參數值由 CS Chem3D Pro 計算軟體、Theory 選用 PM3 模擬而得

※灰底的化學物其毒性機制不屬於 S_N2 親核性取代反應

※由於鍵節超過一個鹵素化學物所以無法明確確定進行 S_N2 親核性取代反應的過程，所以以“X”表示。

以下為僅利用傳統電性參數與藻類毒性進行回歸之回歸式：

利用 ΔHalo 部分電荷與 E_{LUMO} 與藻類毒性進行回歸：

去掉含有兩個鹵素以上之化學物（由於 ΔHalo 部分電荷無明確之值）：

Ethyl dibromoacetate(12)、Ethyl tribromoacetate(13)、Ethyl-2,3-di-bromopropionate(14)

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \Delta\text{DO}}) = 1.73 - 7.39\Delta\text{Halo} - 0.06\text{E}_{\text{LUMO}} \quad (5.20)$$

$$n = 11, R^2 = 0.242, R_{\text{pred}}^2 = 0.00, S = 1.438, F = 1.28$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{FY}}) = 2.07 - 6.40\Delta\text{Halo} + 0.05 \text{E}_{\text{LUMO}} \quad (5.21)$$

$$n = 11, R^2 = 0.167, R_{\text{pred}}^2 = 0.00, S = 1.548, F = 0.80$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50,\text{GR}}) = 1.29 - 8.57\Delta\text{Halo} - 0.09 E_{\text{LUMO}} \quad (5.22)$$

$$n = 11, R^2 = 0.324, R_{\text{pred}}^2 = 0.00, S = 1.367, F = 1.92$$

去掉毒性與親核性取代反應無相關性之化學物：

Ethyl fluoroacetate(1)、Methyl 3-bromopropionate(6)

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50,\Delta\text{DO}}) = -0.314 - 14.3\Delta\text{Halo} - 1.31 E_{\text{LUMO}} \quad (5.23)$$

$$n = 9, R^2 = 0.766, R_{\text{pred}}^2 = 0.511, S = 0.695, F = 9.82$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50,\text{FY}}) = -0.499 - 15.1\Delta\text{Halo} - 1.46 E_{\text{LUMO}} \quad (5.24)$$

$$n = 9, R^2 = 0.775, R_{\text{pred}}^2 = 0.553, S = 0.717, F = 10.31$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50,\text{GR}}) = -0.844 - 15.8\Delta\text{Halo} - 1.37 E_{\text{LUMO}} \quad (5.25)$$

$$n = 9, R^2 = 0.810, R_{\text{pred}}^2 = 0.589, S = 0.667, F = 12.79$$

觀察 Eq:23~25 發現當碳和鹵素間的部分電荷差越小，毒性就越大；Elumo 越低，毒性就越大。

去掉不屬於 $S_{\text{N}}2$ 親核性取代反應的化學物之後， R^2 值有顯著的提升。再次證明 Ethyl fluoroacetate(1)、Methyl 3-bromopropionate(6)與其他鹵素取代酯類分屬於不同的毒理機制。

表 5.5.4.3 顯示，Methyl 2-bromobutyrate(9)的殘差值大於 1，但其在前面的 5.4 節、5.5.2 節、5.5.3 與其他同屬於 $S_{\text{N}}2$ 親核性取代反應的鹵素取代酯類無不同之處，此次應可視為例外。

表 5.5.4.3 藻類毒性數據與傳統電性參數迴歸(Eq:5.23~5.25)分析比較

NO	Chemical	Log(1/EC _{50, ΔDO})			Log(1/EC _{50, FY})			Log(1/EC _{50, GR})		
		Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual
1	Ethyl fluoroacetate	3.6418	X	X	4.2909	X	X	3.1188	X	X
2	Ethyl chloroacetate	3.2880	3.2358	0.0522	3.2043	3.2631	-0.0587	3.2323	3.1230	0.1092
3	Ethyl bromoacetate	4.5247	4.1963	0.3283	4.6794	4.3324	0.3469	4.3694	4.1286	0.2408
4	Ethyl iodoacetate	4.8374	4.0384	0.7990	4.8904	4.2136	0.6768	4.6735	3.9057	0.7678
5	Methyl bromoacetate	4.3407	4.2205	0.1202	4.4148	4.3590	0.0559	4.2455	4.1543	0.0912
6	Methyl 3-bromopropionate	0.1330	X	X	0.3857	X	X	0.1306	X	X
7	Methyl 2-bromopropionate	2.7420	2.5186	0.2234	2.6458	2.5574	0.0884	2.1021	2.2784	-0.1763
8	Ethyl-2-bromopropionate	2.9682	2.4943	0.4739	3.2442	2.5308	0.7134	2.8569	2.2525	0.6044
9	Methyl 2-bromobutyrate	1.9453	3.2424	-1.2971	2.0307	3.3499	-1.3192	1.8950	3.0496	-1.1546
10	Ethyl-2-di-bromoisobutyrate	1.1318	1.1189	0.0129	0.9760	1.0765	-0.1005	0.7375	0.7348	0.0027
11	tert-Butyl bromoacetate	3.9801	4.4078	-0.4278	4.0701	4.5568	-0.4866	3.8388	4.3613	-0.5225
12	Ethyl dibromoacetate	3.3737	X	X	3.3420	X	X	3.1616	X	X
13	Ethyl tribromoacetate	3.1936	X	X	3.1277	X	X	2.7039	X	X
14	Ethyl-2,3-di-bromopropionate	3.2028	X	X	3.4273	X	X	3.1114	X	X

X：表未列入回歸； EC₅₀ 單位皆為莫爾濃度(mM)。

Obse. : Log(1/EC₅₀)_{observed} ; Pred. : Log(1/EC₅₀)_{predicted}

Residual =Log(1/EC₅₀)_{Observed}- Log(1/EC₅₀)_{Predicted}

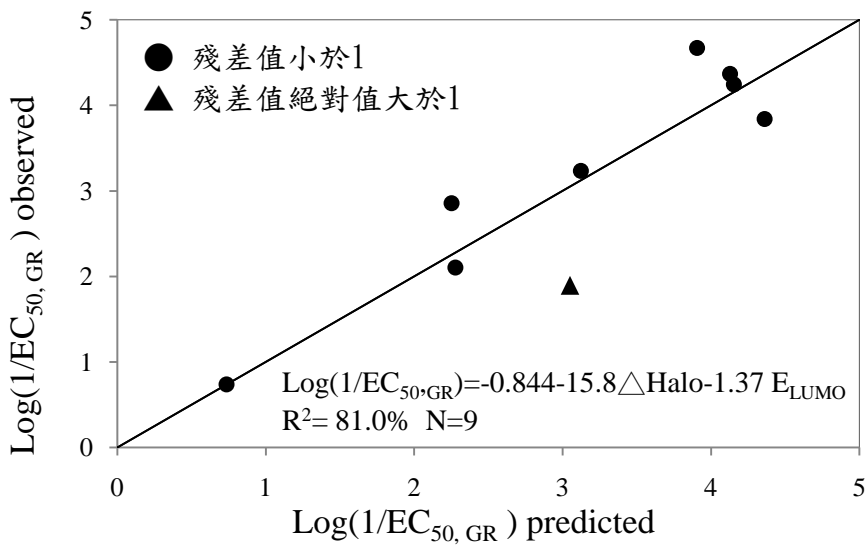
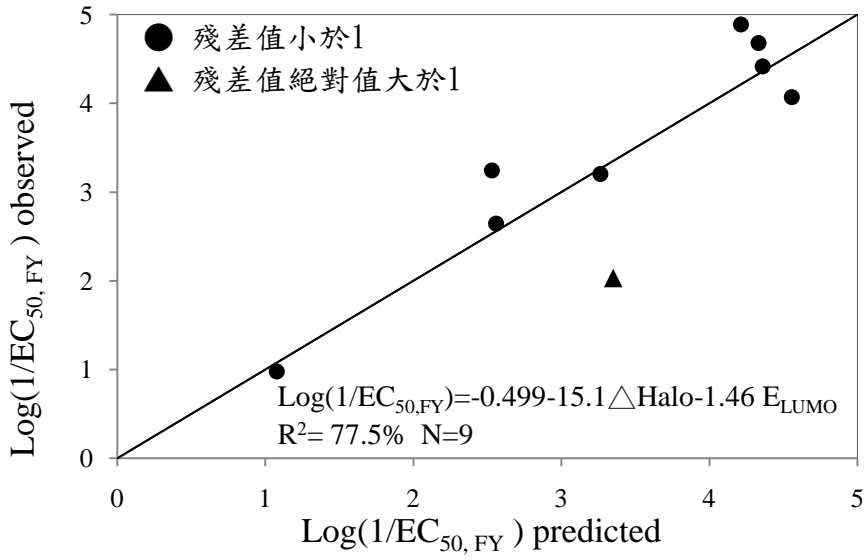
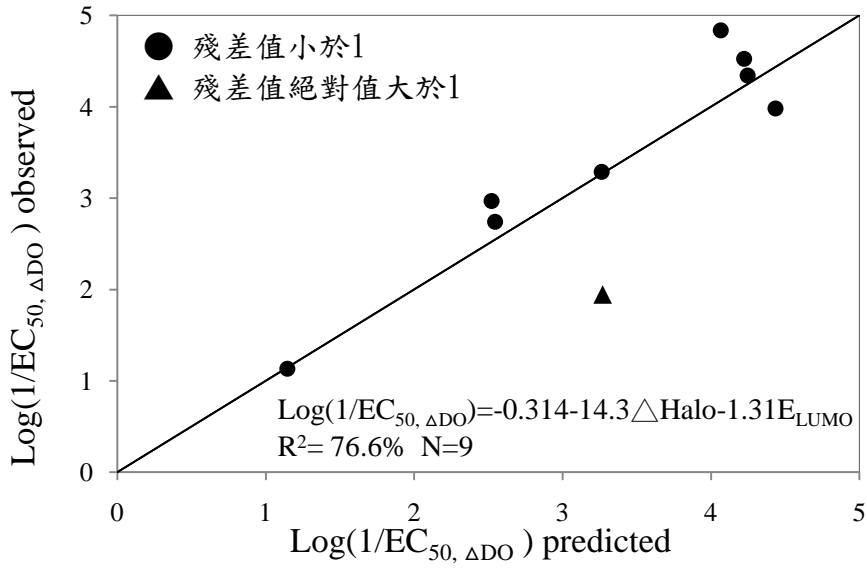


圖 5.5.4.1 Eq: 5.23~5.25 的預測毒性數據 V.S 實驗毒性數據

若將 H-carbon 部分電荷和 Halo 部分電荷直接使用，與藻類實驗毒性進行回歸：

去掉含有兩個鹵素以上之化學物（由於無法確定 Halo 部分電荷之值）：

Ethyl dibromoacetate(12)、Ethyl tribromoacetate(13)、Ethyl-2,3-di-bromopropionate(14)

去掉毒性與親核性取代反應無相關性之化學物：

Ethyl fluoroacetate(1)、Methyl 3-bromopropionate(6)

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \Delta\text{DO}}) = -2.89 - 17.5 \text{ H-carbon} - 43.3 \text{ Halo} \quad (5.26)$$

$$n = 9, R^2 = 0.948, R_{\text{pred}}^2 = 0.876, S = 0.328, F = 54.65$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{FY}}) = -3.18 - 18.4 \text{ H-carbon} - 46.2 \text{ Halo} \quad (5.27)$$

$$n = 9, R^2 = 0.946, R_{\text{pred}}^2 = 0.869, S = 0.352, F = 52.3$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{GR}}) = -3.31 - 18.9 \text{ H-carbon} - 41.0 \text{ Halo} \quad (5.28)$$

$$n = 9, R^2 = 0.950, R_{\text{pred}}^2 = 0.889, S = 0.342, F = 56.92$$

觀察上式可以發現鹵素所鍵結之碳的部分電荷越小，毒性越大；鹵素的部分電荷越小，毒性越大。

表 5.5.4.4 藻類毒性數據與傳統電性參數迴歸(Eq:5.26~5.28)分析比較

NO	Chemical	Log(1/EC _{50, ΔDO})			Log(1/EC _{50, FY})			Log(1/EC _{50, GR})		
		Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual
1	Ethyl fluoroacetate	3.6418	X	X	4.2909	X	X	3.1188	X	X
2	Ethyl chloroacetate	3.2880	3.2757	0.0124	3.2043	3.2511	-0.0468	3.2323	3.2089	0.0234
3	Ethyl bromoacetate	4.5247	4.1800	0.3446	4.6794	4.1711	0.5083	4.3694	4.1020	0.2674
4	Ethyl iodoacetate	4.8374	4.8818	-0.0443	4.8904	4.8426	0.0478	4.6735	4.6800	-0.0065
5	Methyl bromoacetate	4.3407	4.1523	0.1883	4.4148	4.1432	0.2716	4.2455	4.0755	0.1700
6	Methyl 3-bromopropionate	0.1330	X	X	0.3857	X	X	0.1306	X	X
7	Methyl 2-bromopropionate	2.7420	2.8192	-0.0772	2.6458	2.7186	-0.0728	2.1021	2.5735	-0.4714
8	Ethyl-2-bromopropionate	2.9682	2.8452	0.1230	3.2442	2.7446	0.4996	2.8569	2.5981	0.2588
9	Methyl 2-bromobutyrate	1.9453	2.5495	-0.6043	2.0307	2.4548	-0.4241	1.8950	2.3358	-0.4408
10	Ethyl-2-di-bromoisobutyrate	1.1318	0.8450	0.2868	0.9760	0.6541	0.3219	0.7375	0.4719	0.2657
11	tert-Butyl bromoacetate	3.9801	4.1201	-0.1401	4.0701	4.1185	-0.0484	3.8388	4.0655	-0.2267
12	Ethyl dibromoacetate	3.3737	X	X	3.3420	X	X	3.1616	X	X
13	Ethyl tribromoacetate	3.1936	X	X	3.1277	X	X	2.7039	X	X
14	Ethyl-2,3-di-bromopropionate	3.2028	X	X	3.4273	X	X	3.1114	X	X

X：表未列入回歸； EC₅₀ 單位皆為莫爾濃度(mM)。

Obse. : Log(1/EC₅₀)_{observed} ; Pred. : Log(1/EC₅₀)_{predicted}

Residual =Log(1/EC₅₀)_{Observed}- Log(1/EC₅₀)_{Predicted}

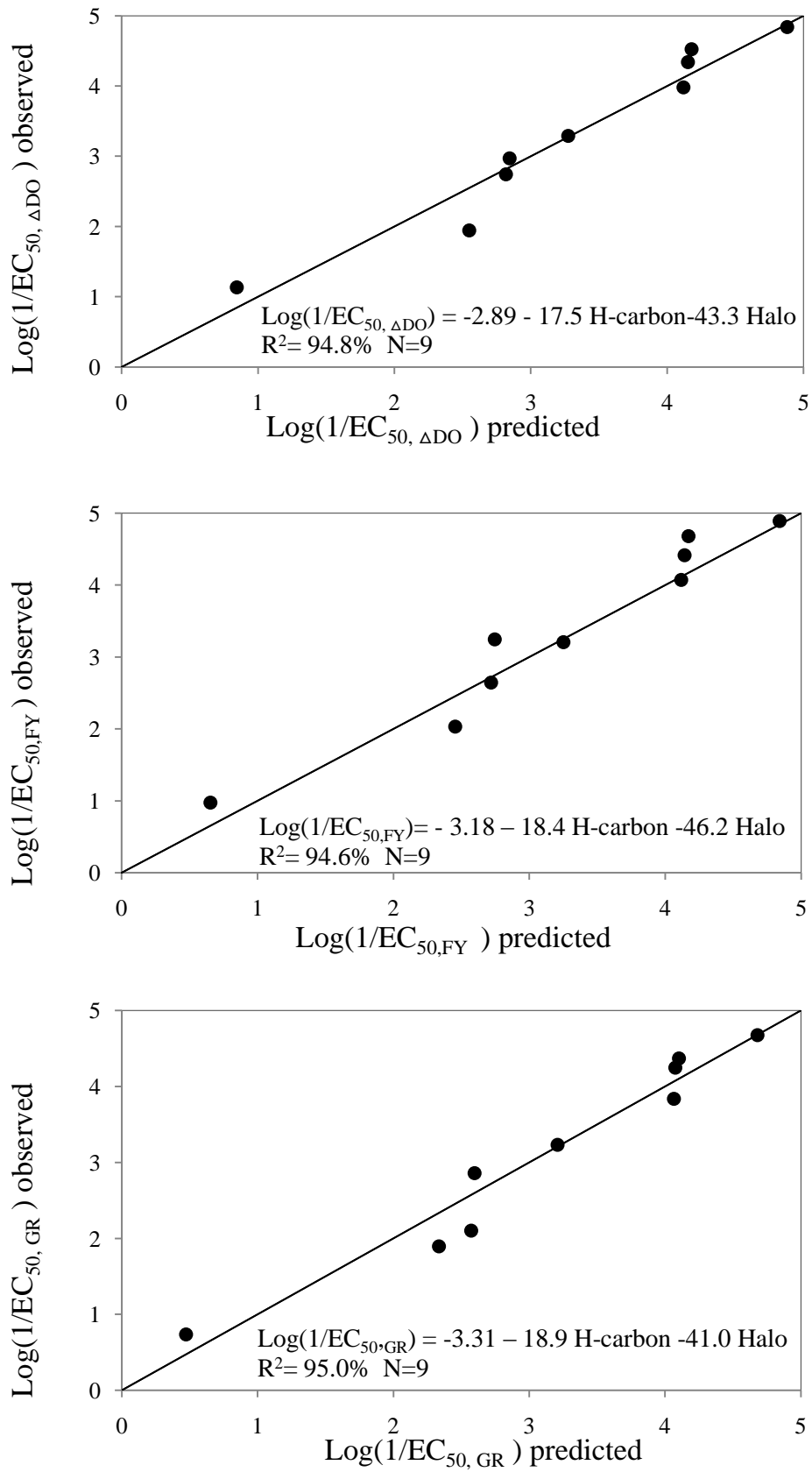


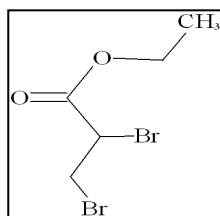
圖 5.5.4.2 Eq: 5.26~5.28 的預測毒性數據 V.S 實驗毒性數據

試著控制變數，將鹵素皆統一為鍵結溴的化學物，僅利用 H-carbon 部分電荷與毒性數據進行回歸：

去掉鍵結鹵素不屬於溴的化學物：

Ethyl fluoroacetate(1)、Ethyl chloroacetate(2)、Ethyl iodoacetate(4)

去掉無法確定作用於哪一個鍵結鹵素之碳的化學物：



Ethyl-2,3-di-bromopropionate(14)

去掉毒性與親核性取代反應無相關性之化學物：

Methyl 3-bromopropionate(6)

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \Delta\text{DO}}) = -0.449 - 14.5 \text{ H-carbon} \quad (5.29)$$

$$n = 9, R^2 = 0.856, R_{\text{pred}}^2 = 0.791, S = 0.449, F = 41.48$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{FY}}) = -0.588 - 15.2 \text{ H-carbon} \quad (5.30)$$

$$n = 9, R^2 = 0.831, R_{\text{pred}}^2 = 0.758, S = 0.516, F = 34.53$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50, \text{GR}}) = -0.961 - 15.5 \text{ H-carbon} \quad (5.31)$$

$$n = 9, R^2 = 0.852, R_{\text{pred}}^2 = 0.785, S = 0.489, F = 40.17$$

觀察上式可以發現鹵素所鍵結之碳的部分電荷越小，毒性越大。由此推測，若將鹵素統一，無論鍵結幾個鹵素（所有鹵素需鍵結在同一個碳上），應用鍵結鹵素碳的部分電荷，應可和毒性數據得到良好的相關性。

表 5.5.4.5 藻類毒性數據與傳統電性參數迴歸(Eq:5.29~5.31)分析比較

Chemical	Log(1/EC _{50, ΔDO})			Log(1/EC _{50, FY})			Log(1/EC _{50, GR})		
	Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual	Obse.	Pred.	Residual
Ethyl fluoroacetate	3.6418	X	X	4.2909	X	X	3.1188	X	X
Ethyl chloroacetate	3.2880	X	X	3.2043	X	X	3.2323	X	X
Ethyl bromoacetate	4.5247	4.0170	0.5077	4.6794	4.0936	0.5858	4.3694	3.8130	0.5564
Ethyl iodoacetate	4.8374	X	X	4.8904	X	X	4.6735	X	X
Methyl bromoacetate	4.3407	4.0156	0.3251	4.4148	4.0921	0.3228	4.2455	3.8115	0.4340
Methyl 3-bromopropionate	0.1330	X	X	0.3857	X	X	0.1306	X	X
Methyl 2-bromopropionate	2.7420	2.5235	0.2185	2.6458	2.5280	0.1178	2.1021	2.2165	-0.1144
Ethyl-2-bromopropionate	2.9682	2.5235	0.4447	3.2442	2.5280	0.7162	2.8569	2.2165	0.6404
Methyl 2-bromobutyrate	1.9453	2.6337	-0.6884	2.0307	2.6435	-0.6129	1.8950	2.3343	-0.4393
Ethyl-2-di-bromoisobutyrate	1.1318	1.0779	0.0540	0.9760	1.0126	-0.0366	0.7375	0.6712	0.0664
tert-Butyl bromoacetate	3.9801	4.1432	-0.1631	4.0701	4.2258	-0.1557	3.8388	3.9479	-0.1090
Ethyl dibromoacetate	3.3737	3.7792	-0.4055	3.3420	3.8443	-0.5024	3.1616	3.5588	-0.3972
Ethyl tribromoacetate	3.1936	3.5603	-0.3667	3.1277	3.6148	-0.4871	2.7039	3.3248	-0.6209
Ethyl-2,3-di-bromopropionate	3.2028	X	X	3.4273	X	X	3.1114	X	X

X：表未列入回歸；EC₅₀單位皆為莫爾濃度(mM)。

Obse. : Log(1/EC₅₀)_{observed} ; Pred. : Log(1/EC₅₀)_{predicted}

Residual =Log(1/EC₅₀)_{Observed}- Log(1/EC₅₀)_{Predicted}

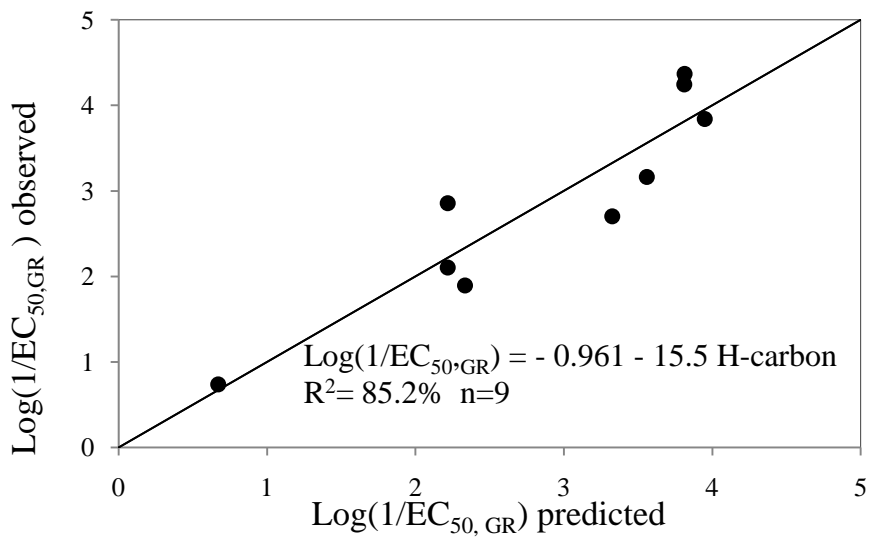
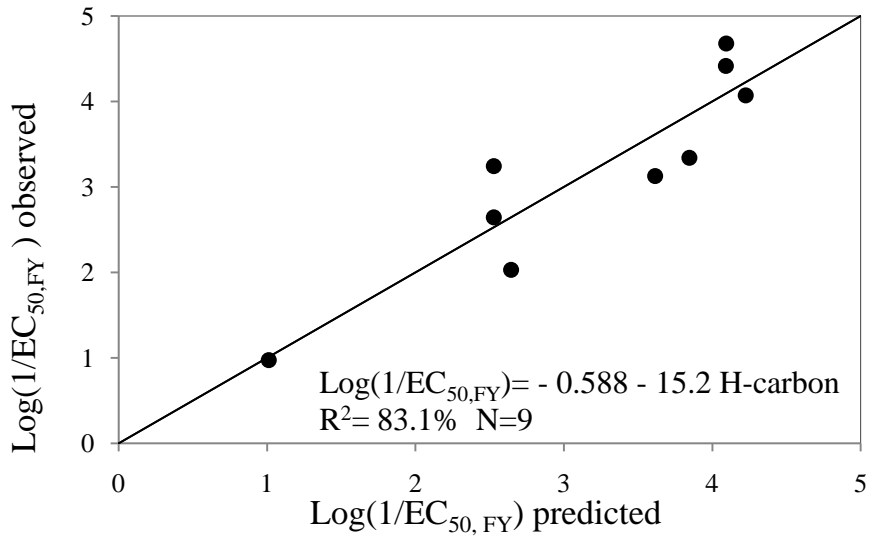
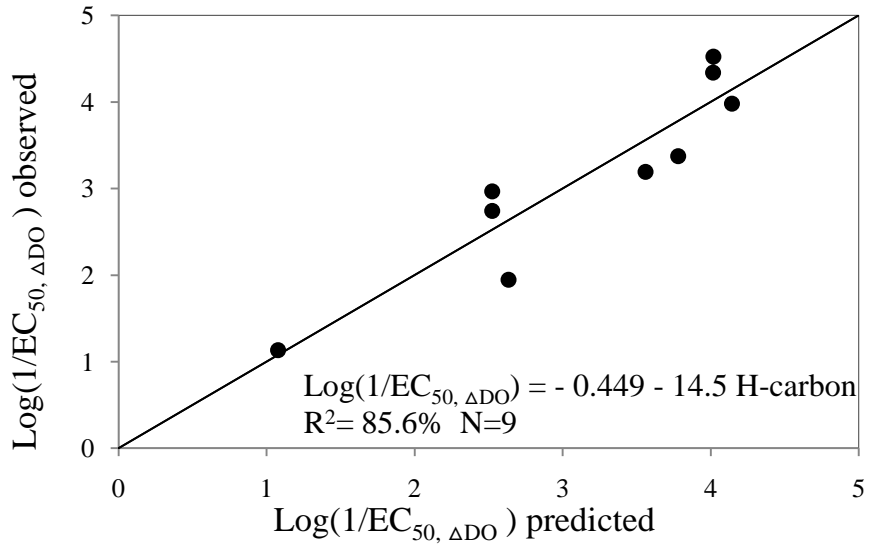


圖 5.5.4.3 Eq: 5.29~5.31 的預測毒性數據 V.S 實驗毒性數據

5.6 文獻比較

5.6.1 Ethyl fluoroacetate 之文獻毒理機制

本次研究觀察到，Ethyl fluoroacetate(1)之毒理機制不屬於非極性麻醉性，亦不屬於軟親電性(因其不與穀胱甘肽反應)。查詢文獻，文獻[46]指出，Sodium fluoroacetate 會抑制月芽藻的檸檬酸循環進而造成毒性。

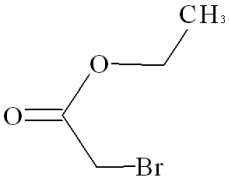
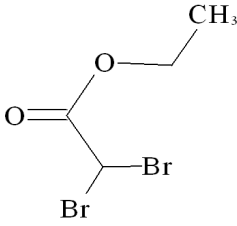
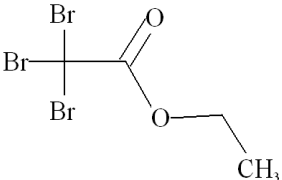
Sodium fluoroacetate 是一種常見的殺蟲劑、殺鼠劑以及除草劑，可由天然的植物中提煉[47]。任何細胞體內都會進行檸檬酸循環，檸檬酸循環是三大營養素（糖類、脂類、胺基酸）的最終代謝通路，生成 ATP，並提供生物體能量。本次實驗所觀察到 Ethyl fluoroacetate(1)之高毒性推測應與檸檬酸循環之破壞有關。

查詢文獻，Sodium fluoroacetate 對於不同物種所呈現的毒性反應不同，對哺乳類及昆蟲有強烈的毒性[47]，造成神經毒性，肌肉抽蓄或心跳異常；會抑制植物的光合作用[48]，對於多細胞植物的傷害較少（浮萍 (*Lemna gibba* G3) NOEC：300 mg/L.) [46]，除了單細胞藻類之外，其對於藍綠藻的毒性也很強，Sodium fluoroacetate 會改變其酯雙層結構且抑制其乙炔還原機制，進而影響其固氮作用[49]。

5.6.2 其他同屬 S_N2 親核性取代反應之化學物之文獻

根據 S_N2 親核性取代反應，當親核試劑遇到鹵素取代酯類，親核試劑會與鹵素競爭並取代鹵素，因此實驗一開始，假設擁有較多鹵素的化學物，可以與較多的親核試劑置換，推測其親核性反應較強，毒性較高。表 5.6.1 為比較相同結構式，鍵結不同數目的鹵素的化學物的毒性及反應性。

表 5.6.1 鍵結不同數目之鹵素取代酯類之相關資料：

Chemical	化學式	ΔDO (mM)	FY (mM)	GR (mM)	H-carbon 部分電荷	RC ₅₀ (mM)
Ethyl bromoacetate		3.00E-05	2.10E-05	4.30E-05	-0.308	0.062
Ethyl dibromoacetate		4.23E-04	4.55E-04	6.89E-04	-0.2916	0.943
Ethyl tribromoacetate		6.40E-04	7.45E-04	1.98E-03	-0.2765	0.032

H-carbon 部分電荷：CS Chem3D Pro 計算軟體、Theory- PM3

比較親核性反應強弱：

Ethyl tribromoacetate > Ethyl bromoacetate > Ethyl dibromoacetate

比較藻類毒性：

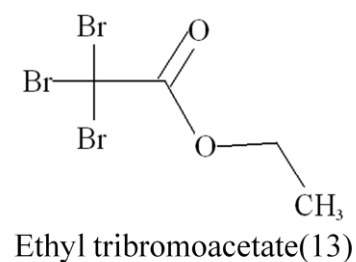
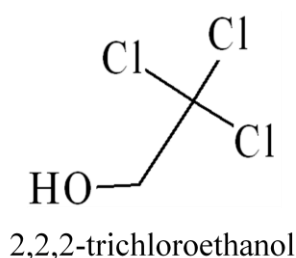
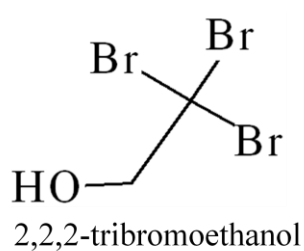
Ethyl bromoacetate > Ethyl dibromoacetate > Ethyl tribromoacetate

比較傳統電性參數- H-carbon 部分電荷：

Ethyl tribromoacetate > Ethyl dibromoacetate > Ethyl bromoacetate

觀察毒性與 RC₅₀ 值的關係，觀察到含有三個鹵素的化學物，雖然其親核性反應最強 (RC₅₀ 值最低)，但其毒性卻是最弱的，與一開始的假設不符。另外，觀察毒性與 H-carbon 部分電荷的關係，發現毒性與 H-carbon 部分電荷呈現良好的反比關係，即 H-carbon 越小，毒性越強。

比較文獻[42]，查詢同屬於 S_N2 親核性取代反應的化學物之毒性數據物種為蠶毛蟲，文獻中提到，2,2,2-trichloroethanol 和 2,2,2-tribromoethanol 的實際毒性比預測毒性還來的低，又此二者與 Ethyl tribromoacetate(13)結構相似（結構圖為下），其解釋為由於碳被鹵素包圍，造成空間立體障礙，大量的電子雲使得親核試劑不易與碳鍵結， S_N2 親核性取代反應不易發生，毒性因此下降，本次實驗之化學物 Ethyl tribromoacetate(13)之毒性應也會受到空間立體障礙之影響。



值得一提的是，利用反應性參數 RC_{50} 值來描述親電性化學物於生物體內之作用似乎無法顯示空間立體障礙對於 Ethyl tribromoacetate(13)之毒性所造成的影響，所以 Ethyl tribromoacetate(13)才會同時擁有高反應性卻相對較低的毒性。由於反應性 RC_{50} 之實驗為利用相當純化之穀胱甘肽作為模擬生物體中的親核物 (ex. 蛋白質、DNA)，過於理想的模擬情境可能是造成 Ethyl tribromoacetate(13)為 outlier 的原因。

第六章 結論與建議

6.1 結論

以下為針對 14 種鹵素取代酯類(其中 11 種為鍵結一個鹵素之酯類，3 種為鍵結兩個以上鹵素之酯類)進行藻類毒性試驗所得之結論：

1. 鹵素取代酯類之藻類毒性趨勢可利用其化學結構來進行解釋。
2. 鹵素電負度之大小反比於其毒性。
3. Ethyl fluoroacetate(1)之藻類毒性應不屬於 S_N2 親核性取代反應，其可能的毒理機制為化學物破壞藻類之檸檬酸循環。
4. Methyl 3-bromopropionate(6)利用基線毒性所預測之毒性數據與實際值相差不到一個數量級，推測其毒性機制較傾向麻醉性與親電性呈現較差之相關性。
5. 在 QSAR 分析方面：
 - (1) 以反應性參數 RC_{50} 值可得到較好的回歸，去除毒理機制與 S_N2 親核性取代反應無相關性之 Ethyl fluoroacetate(1)、Methyl 3-bromopropionate(6)以及 outlier-Ethyl tribromoacetate(13)，方程式之相關性及預測能力明顯提升。
 - (a) Methyl 3-bromopropionate(6)的反應性相對其毒性比較強，顯示決定其毒性能力的強弱應與其親電性無關。
 - (b) Ethyl tribromoacetate(13)於文獻中提到當鹵素鍵結之碳被三個鹵素包圍，會產生所謂的空間立體障礙造成毒性下降，但於過於理想之 RC_{50} 實驗環境中似乎無法顯現此現象，可能是其為 outlier 的原因。
 - (2) 利用傳統電性參數-鍵結鹵素之碳的部分電荷、鹵素的部分電荷以及 E_{LUMO} 可以建立良好的之定量結構-活性關係：
 - (a) 鍵結鹵素之碳和鹵素間的部分電荷差越小($\Delta Halo$)，毒性就越大。
 - (b) E_{LUMO} 越小，毒性就越大。
 - (c) 鍵結鹵素之碳的部分電荷越小(H-carbon)，毒性就越大。
 - (d) 鹵素的部分電荷(Halo)越小，毒性越大。
6. Ethyl-2-di-bromoisobutyrate(10)的反應性差 ($RC_{50}:128.1(mM)$)，其毒性與 RC_{50} 值以及基線毒性皆呈現良好的相關性，顯示其毒性與其微弱的親電性呈現良好之相關性，顯現出與基線毒性相似之結果。
7. 本研究之重要性為-

- (1)建立鹵素取代酯類之藻類毒性數據。
- (2)利用反應性參數及傳統電性參數建立良好之 QSAR，利於以後對於其他鹵素取代酯類之毒性評估，減少實驗之人力、時間以及成本。

6.2 建議

1. 反應性參數 RC_{50} 值在預測擁有兩個鹵素以上的鹵素取代酯類之毒性似乎並不適當，可觀察其他同屬於 S_N2 親核性取代反應且擁有兩個鹵素以上之化學物之 RC_{50} 值，瞭解是否皆有相似之結果。
2. 本次實驗多選擇鹵素為溴之鹵素取代酯類，應可建立其他鹵素之鹵素取代酯類的相關毒理資訊，觀察是否與鹵素為溴之鹵素取代酯類有相似的特性。

