

第二章 文獻回顧

2.1 常用的毒性實驗物種

許多環境中的污染物會隨著時間與空間的改變，而以不同的形式存在於我們生活的周遭，這些千變萬化的污染物與生物體和環境之間複雜的交互作用，若僅利用化學分析的方法，並不能完全表達這些污染物對環境或生物所造成的危害程度。生物的敏感性很高，可以感受到化學物質的劑量遠低於儀器所能偵測的範圍，若能直接觀察污染物對生物體造成的影響，將可以使我們更能了解污染物的危害程度。利用生物測試物質毒性的方法有很多，在文獻上廣為使用的種類如下：

(一)魚類

魚類是最常用來做為水域環境急毒性測試的物種，包括guppy (*Poecilia reticulata*) (Bradbury, 1995)、rainbow trout (Tao et al., 2002)和fathead minnow (*Pimephales promelas*) (Russom et al., 1997)，其中以fathead minnow流經急毒性的測試 (flow-through *Pimephales* acute toxicity)-96h LC₅₀使用最廣泛，為美國環保署所使用的標準方法之一。

(二)Microtox

Microtox 是 1980 年由 Beckman 公司發展的測試方法，其利用 *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) 會行生物發光的特性，當此細菌受到毒物抑制時，其發光能力會減弱，利用在特定時間內發光程度減為一半時的抑制濃度作為判斷化合物毒性的指標 (Sixt et al., 1995)，此種方法廣泛的用在沉積物毒性的分析上 (Walker, 1990)。

(三) 纖毛蟲 (Ciliate)

纖毛蟲 (*Tetrahymena pyriformis*) 是一種單細胞原生動物，常應用於水域毒性的測試，以 IGC_{50} (50% Inhibitory Growth Concentration) 來代表毒性效應。Mekapati and Hansch, (2002) 曾利用纖毛蟲在三至四小時之內，即完成了毒性試驗。Schultz 等其他的工作群曾建立以纖毛蟲為測試物的資料庫，稱之為「TETRATOX」。

(四) 水蚤 (Water flea)

水蚤 (*Daphnia magna*) 常被利用為靜水式生物毒性試驗方法的物種之一，以四十八小時之半致死濃度 (LC_{50})，檢測水樣之急毒性。Ramos et al., (2002) 發現，當水蚤與其他測試物種，包含藻類、二棲類、環節動物、軟體動物等比較之後，水蚤對苯胺類的敏感性，均高於其他測試物種。Kaiser et al., (1991) 的實驗結果亦認為水蚤為敏感性很高的物種。

(五) 植物與藻類

植物較適用於土壤及空氣中毒性的偵測，由於其生長速度及物種分佈的侷限，觀測時間較長，大多應用於長期毒性的偵測；而藻類對於水中毒物則相當敏感，常用來當做急毒性偵測的生物指標。方法為利用偵測葉綠素螢光的方式得知 EC_{50} ，藉以評估水中的毒性概況 (Bringmami and Kuchn, 1980)。Yen et al., (2002) 以 *chlorella* (*chlorella vulgaris*)、*daphnia* (*Daphnia pulex*)、*carp* (*Ciprinus pulex*) 和 *tilapia* (*Tilapia zilli*) 對多種有機物進行毒性試驗，發現綠藻 *chlorella* 對於氯酚類、鹵烷類和 Quinone 類的有機物，其敏感性皆高於其他三種生物。

在水體生物毒性試驗中，藻類由於以下幾種原因，因此廣泛用來做為水體毒性的研究：

- (1)藻類為生態系統中最低階的生產者之一，在食物鏈的過程中將會由於生物濃縮作用 (Bioconcentration)，造成其他高階消費者體內存有濃度甚高的毒性物質。
- (2)在毒性試驗過程中，藻類其生長過程可分成四個階段：遲滯期 (Lag phase)、指數生長期 (Exponential phase)、穩定期 (Stationary phase)、死亡期 (Death phase)。在良好的培養條件之下，可以迅速讓藻類到達指數生長期和穩定期，並且持續一段較長的時間，如此一來便有利於實驗的進行。其他有些生物實驗則必須受到漫長幼年期或生命週期的限制。
- (3)以藻類進行毒性試驗比其他微生物敏感，且不易因生物體內基因多樣性，而有不同的實驗結果。



2.2 藻類毒性試驗

2.2.1 試驗物種簡介

在本實驗中所使用的月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)屬於綠藻 (Chlorophyceae) 其特徵為單細胞、成群體但不糾結、不能移動，一般細胞體積為 40-60 μm^3 。典型的月芽藻體積約為 45 μm^3 且重量介於 10~20 pg/cell之間，因為體型呈半月型，所以稱為月芽藻，具備有取得容易、培養簡單、容易觀察、生長期短、可以大量生長、具有地區代表性等實驗用的藻種需具有的特點，並較其他微生物試驗來的敏感 (Padrtova et al., 1998)。此外，當生長環境中缺少營養鹽或是溫度、光線、pH等環境條件不佳時，藻體會逐漸呈現很明顯的黃綠色，因此當我們在實驗室培養的過程中，由外觀上可以容易的去判斷。若是以顯微鏡觀察其外型，則可發現其細胞外觀變得較為肥厚，半月型彎曲度也逐漸變小。以顆粒計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。

2.2.2 藻類計數方法

在進行藻類毒性試驗時，我們必須要有一個能夠正確的反應出藻類生長情況之方法。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、ATP及DNA等等之參數。目前測量藻類生長質量之方法有下列幾種：(1)顯微鏡計數法 (2)電子顆粒計數法 (3)直接乾重量測法 (4)光學顆粒計數法 (5)分光光度計測葉綠素A法 (6)螢光光度計測葉綠素A法 (7)DNA測定法 (8)ATP測定法 (9) ^{14}C 輻射標定法 (10)溶氧測定法 (Chen and Chao, 2000) 等。

一般藻類毒性試驗之標準方法，例如 U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency, 1996)、OECD (Organization for Economic

Cooperation and Development, 1984)、ISO (International Organization for Standardization, 1987)、ASTM (American Society for Testing and Materials, 1994)、APHA (American Public Health Association, 1995)皆是於試驗終點時，測量藻類的生物質量。而量測生物質量最直接的方法就是量測生物之乾重，但是直接稱重的方法，需要花費較久的時間，所以利用電子顆粒計數器、光學顆粒計數器等之間接量測生物質量的方法逐漸將直接稱重法取代，因為這些方法簡單、快速，所需藻液量亦少，且與生物乾重之間有良好的相關性。

^{14}C 輻射標定法是在進行毒性試驗之前，先將水中之碳以同位素 ^{14}C 取代。在進行藻類毒性試驗時，因藻類會行光合作用而將水中之同位素 ^{14}C 消耗，此時再以輻射標定法量測水中同位素 ^{14}C 之殘餘量，進而計算藻類之生長。Nyholm and Damgaard, (1990)認為在相同的試驗狀況之下，試驗時間為六小時之 ^{14}C 輻射標定法已足夠作為急毒性試驗之判斷，但其敏感度不及於量測生長抑制之方法。利用 ^{14}C 輻射標定法可以簡短試驗時間，並可處理大量的樣本，但此方法不便之處為成本高且需要訓練有素之輻射標定專業人員。

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。Hostetter, (1976)發展出一套量測水中溶氧之藻類試驗方法，試驗時間縮短至二十四小時，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。Mingazzini et al., (1997)利用氣泡式呼吸儀連續監測氧氣之變化量，有效的在 1 小時之中量測出 atrazine 及 DCMU 對 *Raphidocelis subcapitata* 之毒性。

2.2.3 藻類毒性試驗方式

根據藻類培養方式的不同，藻類毒性試驗可分為批次式和連續式這兩種。目前已有的標準藻類毒性試驗方法，大都屬於批次式，如 U.S. EPA 所採用的 "Fresh water algae acute toxicity test"、OECD 所採用的 "Algal growth inhibition test guideline"、ISO 所採用的 "Water quality-algal growth inhibition test"、APHA 所採用的 "Toxicity testing with phyto-plankton"及 ASTM 所採用 "Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae"等。

批次式毒性試驗為起初提供藻類足量的生長基質，但在後續的實驗過程中就不再有任何基質的添加，亦無藻類代謝物的流出。在此條件之下，飽合的基質會降低藻類毒性試驗的敏感度，也很難反應出真實水體中的情況；但由於實驗方法操作容易且成本低廉，可同時處理大量的樣品，因而到目前為止仍被廣為始用。若再根據試驗中與外界氣體是否有接觸加以分類，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搖晃與外界空氣接觸，而達到提供碳源的目的，但若考慮揮發性有機物於實驗期間的揮發作用，則在濃度上的控制將變得困難。相反地，密閉式批次實驗並無毒物揮發的問題存在。Brack and Rottler, (1994) 設計了一個間接提供碳源的密閉系統，採用雙層構造的玻璃瓶，將藻液及有機物置於上方，下方則注入 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 緩衝溶液。Kuhn and Pattard, (1990)以*Scenedesmus subspicatus*為測試物種來進行毒性試驗，使用無機碳與有機碳作為藻類生長所需的碳源，並指出密閉的環境在 48 小時之內對藻類不會造成重大的衝擊。Galassi and Vighi, (1981)利用一密閉且等溫的條件之下，可保證水中揮發性物質的濃度不變，因此發展出一套AAPBT的系統來測定揮發性物質的毒性；利用 2 公升的密閉容器中，在其內裝了 100 ml 的待試驗溶液，剩餘的空間將可提供足夠的碳源供應藻類生長；在毒性物

質濃度上，僅利用亨利定律計算出與其上空間之間的平衡濃度，而並非溶液中的真正濃度。Herman et al., (1990)則是利用在密閉的試管中添加 50ml 的試驗溶液以及 0.4% NaHCO₃至營養鹽中以保證可提供足夠的碳源；同時監測在溶液中與上部空間之揮發性物質濃度是否相同，結果並無明顯的差異。Mayer et al., (2000)指出在不含headspace之完全密閉式批次實驗系統，是評估揮發性有機物的較佳實驗方法。

連續式毒性試驗則是控制基質不斷地流入系統中，符合自然水體的真实情況，代謝物也同時流出，使得藻類保持在良好的生長狀態之下。但是由於整個系統之流量不易控制，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 Turbidostat 和 Chemostat 兩種。Turbidostat 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；而 Chemostat 是利用穩定的基質進流率，而達到整個系統細胞密度的穩定。

在本研究中所使用的方法可分為兩大部份：在藻類培養部份是採用「連續式的培養」，之後則是採用「批次式 BOD 瓶毒性試驗」。其各別內容如下所述：

(1)藻類連續式培養方法：

首先將保存在洋菜膠內的月芽藻自冰箱中取出，放置於錐形瓶中活化，待錐形瓶中藻類的數目達最大生長量 80~90%的時後，再置入連續式培養母槽中。藻類生長所需的營養鹽加入量是由蠕動幫浦控制；而為了使藻類達到較佳的敏感性，在(Chen and Lin, 1997)所發展出以 Chemostat 為基礎的連續式藻類培養方法當中，使用四公升的母槽以連續式的方式來培養藻類，並控制每日基質的溢流率為一公升，如此便可使得藻類能夠維持在對數生長期及穩定期有較長的時間；在此同時，即可由母槽中取出藻液進行毒性試驗，並非直接將毒物加入母槽內，故母槽將不被污染；而且亦不會有在一般連續式實驗的方法中，需等待系統回復穩定後才能再進行下一批

實驗的情況發生，此方法將可使得毒性試驗的頻率大幅增加。

(2) 批次式毒性試驗：

Huang, (2000)發展出一套「四十八小時的批次式BOD瓶毒性試驗」，在整個過程中無任何基質的添加，也無藻類代謝物的流出；其特點為操作簡易，節省了大量的成本與時間的耗費，對於實驗數據也有很高的再現性。Hsu, (2002)以此系統進行苯類、甲苯類、氯甲苯類和氯乙烷類等有機物的毒性試驗，與開放式系統的結果相比較後，發現此實驗方法有較佳的敏感度。Kao, (2001)則是發現與傳統上批次試的實驗方法相比較後， EC_{50} 值相差了數十倍，也就是說本系統應在揮發性有機物的毒性試驗上有很好的適用性。

2.2.4 試驗中的重要參數

不論進行任何的科學實驗，不同的操作參數都將影響實驗結果；因此，在進行毒性試驗之前，我們必須對各種參數加以嚴格的控制，同時也應瞭解各參數對於藻類的生長有何影響以及與毒性之間是否有關聯。在本實驗進行的同時，有以下參數列入考慮：

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(Nyholm and Källqvist, 1989)。藻類毒性試驗之中，光照的強度依照不同的試驗標準及不同藻種而有些許的差異。在實驗室培養藻類時必須要考慮「自身遮蔽」效應 (self-shading)，此效應會造成距光源較遠處之光照與較近處之光照強度之差異，良好的混合可以減低自身的遮蔽效應並使光照有更好的利用效率。光照強度在良好的培養條件之下，應為一常數並能使藻類呈現指數生長、縮小培養體積及維持充分的混合有助於達到理想狀態。

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。

pH：

在自然界中因為光合作用的關係導致 pH 值於一天中會有很大的變化。若在實驗系統中對 pH 不加以控制的話，將很難進行重複性試驗，而且用來預測在某特定的 pH 值狀況下之物種濃度影響也有困難。因此標準藻類毒性試驗皆傾向其 pH 值維持在固定。固定 pH 值之毒性試驗其 pH 值隨不同的標準方法而有差異，U.S. EPA 規定最終 pH 值需在 8.5 之下，OECD 則要求 pH 值之最大變動不要超過一個單位；ISO 則是要求 pH 值之變動在 1.5 個單位之內。從毒理學的觀點，pH 值若變化一單位，化學物種濃度隨之改變，極可能導致毒性有十倍之變化。若決定試驗在一固定 pH 值下進行時，就必須小心地確保 pH 值之變化為最少。欲減少 pH 值之改變，大致的方法有下列幾種：(1)使用較低之生物接種量 (2)縮短整個試驗之時間 (3)保持良好的通風 (4)以空氣或是添加二氧化碳之空氣加以曝氣。Lin et al. (2005)在密閉式藻類毒性試驗中，並未刻意對整個系統的 pH 加以限制，發現在水中溶解性金屬對於藻類的抑制率若高於 20%時，系統中 pH 的濃度變化大部份皆在 1.5 個單位以下，因此認為在藻類毒性試驗中，不需限制系統中 pH 的變化。

植種藻液初始密度與試驗時間：

對批次式實驗而言，若實驗開始時的植種數量過高，將會造成實驗後期由於藻類細胞大量增加造成代謝物累積及水中碳源耗盡，而導致 pH 值升高等問題，進而影響毒性試驗結果之精確度。Lin, (2001)針對不同試驗時

間和不同初始植種密度進行敏感度和變異性的分析，發現生物毒性試驗隨著時間增加，其敏感度提高而C.V.值減少；而隨著初始植種密度減少，其敏感度提高但C.V.值亦提高。在兼顧兩者的考量下，選定最佳化條件為藻類初始植種密度 1.5×10^4 cells/ml。

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

培養基質：

Turbak et al., (1986)指出測試時使用之培養基對於藻類毒性試驗之影響極大，其主要之影響因數有pH、硬度、螯合劑、氮、磷及一些陽離子。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，如ISO於培養基中加入 78 $\mu\text{g/L}$ 的EDTA螯合劑。但是，因為螯合劑的加入會影響毒性試驗之結果，尤其是進行重金屬對藻類之毒性影響試驗時(Sorvari and Sillanpää, 1996)，因此，1996年U.S. EPA建議在培養藻液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，則不加入任何之螯合劑。Lin, (2001)以初始細胞密度為 10^5 cells/ml，毒性物質為重金屬鋅，毒性試驗時間為十二小時，分別對營養基質中EDTA含量為 0 (0% EDTA) 及 300 $\mu\text{g/l}$ (100% EDTA) 進行毒性試驗。結果正如預期中，加入EDTA會因為其和重金屬之螯合作用而降低重金屬對藻類之影響，進而降低了敏感度，因此本研究於試驗時亦不加EDTA。Lin et al. (2005)在密閉式藻類毒性試驗中，若將營養基質成份之一的 NaHCO_3 由 15 mg/L增為 300 mg/L，對於酚的毒性試驗結果而言，敏感度將降低。

為了解 HCO_3^- 對於毒性試驗之影響，Lin, (2001)進行兩組試驗：一組初

始細胞密度為 10^5 cells/ml，毒性試驗時間為十二小時，毒性物質為重金屬鋅及鎘的條件下，分別進行營養基質採用原U.S. EPA營養基質 (HCO_3^- 濃度為 10 mg/l)及加入兩倍 HCO_3^- 之營養基質進行藻類毒性試驗，試驗終點為溶氧變化量；另一組初始細胞密度為 1.5×10^4 cells/ml，毒性試驗時間為四十八小時，毒性物質為重金屬鋅及有機物質酚。試驗結果發現， HCO_3^- 加倍後對毒性試驗敏感度之影響並沒有一定之趨勢，而且並不會對其毒性反應造成太大之影響。



2.3 有機物結構對毒性的影響

由於碳原子通常有四條共價鍵 (四對共用電子)，使得碳原子可以有許多方式，例如以直鏈狀、支鏈狀或是環狀的形式，藉由共價鍵與其他的分子連接在一起，形成各種化合物；若這些化合物有相同的分子式，則稱之為異構物 (Isomers)。雖然異構物具有相同的分子式，但他們彼此之間在物理或化學的特性上，常有極大的差異，也因此而造成在毒性上亦有所不同。

Ramos et al., (2002)發現若有取代基在苯胺類的 *ortho* 位置上，對於水蚤而，言其毒性是低於取代基在其他位置上。Yen et al., (2002)以烷類對水蚤進行毒性試驗時，發現鹵素原子若連接在烷類的一號位置上，所造成的毒性是高於相鹵素原子接在二號或三號位置上；就鹵烷類而言，亦發現以下三種現象：(1)支鏈狀分子的毒性高於直鏈狀分子的毒性 (2)分子越大，毒性越大 (3)若鹵烷類的碳原子數目小於五個，則帶有溴原子取代基的鹵烷類毒性高於帶有氯取代基的鹵烷類毒性；若碳原子數目大於五個，則情況相反。對於帶有氯取代基的酚而言，並以水蚤和金魚做為毒性試驗受測物種，他們發現所造的毒性與酚所接的氯原子數目毫無關連性，只發現含有單一氯原子的酚類與含有五個氯原子的酚類，毒性分別是最低與最高。對於硝基苯類而言，若在 *para* 位置上有其他取代基，並以水蚤及鯉魚進行毒性試驗時，其毒性是極高的。Ensley et al., (1997)發現以氯酚類對浮萍進行毒性試驗時，氯酚類的毒性會與苯環上所接氯原子的數目成正比。Dearden et al., (1995)發現在 2-和 3-位置有其他取代基的硝基苯，對於纖毛蟲的毒性，主要是由於疏水性及電子參數的影響。McKarns et al., (1997)發現烷醇類的毒性與所含的碳原子數目有關，碳原子數越多的烷醇類，毒性越高。

2.4 定量結構-活性關係 (QSAR)

早在西元 1930~1960 年期間，就有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 Relationships (QSARs)，並且開始廣泛地應用在環境毒理學上的研究。Hansch et al., (1963)指出，分子對生物體造成的活性，主要與分子本身的物理和化學性質有關。簡單來說，QSAR 就是以一種物質的化學或物理性參數，來建立一個模式，可用來描述並預測此物種與這些參數之間的毒性關係。

在環境毒理學中，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，因此有效的 QSAR 是我們所期待能夠得到的，為了使 QSAR 讓我們能對預測毒性有所幫助，有三項條件是必備的：

(1)QSAR 所使用的各種參數當中，應在極小的偏差範圍之內必須能夠很準確地預測出毒性，這樣才能夠更真實地去預測化學物質在真實環境中的毒性影響。

(2)QSAR 的建立只能針對某些種類的化學物質及其衍生物，去預測它們的毒性，而並非以一種模式就可以包含各種型式的化學物質。舉例來說，如果我們期待能夠得到 QSAR 去預測十三種含氯取代基的苯類化合物的話，我們就必須針對至少七種以上的含氯取代基的苯類化合物去做毒性實驗，如此一來，我們才能從這 QSAR 當中去預測其他含氯取代基苯類化合物的毒性。

(3)無論是從文獻中查閱，或是經由實驗而得到的結果，在 QSAR 當中所使用的一些化學或物理性的參數，都必須能夠容易獲得。例如有些物質對水的溶解度有限，我們將很難對此物質溶解在水中以進行毒性測試，因

此將不把溶解度當做 QSAR 分析中的參數。

Hansch et al., (1963)認為化學分子主要會影響生物活性的因素有：(1) 疏水性特性 (2) 電子特性 (3) 空間特性，因此他假設以下方程式，表示化學分子對生物體所造成的毒性： $\log(1/EC_{50}) = a\pi + b\sigma + cE_s + d$ ，c的單位為莫耳濃度， π 、 σ 、 E_s 分別各表示與疏水性、電子和空間相關的參數。

McFarland, (1970)認為化學物質的毒性可以表示成下列兩個因素的結合：(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。以數學式可表示如下：

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

(Karabunnarliev et al. 2000)認為不同類的麻醉性有機物毒性可用以下的模式預測： $\log(1/\text{endpoint}) = b + c(\log K_{ow}) + d(E_{lum})$ 。Heath, (1995)認為許多物化作用機制會影響化學物質穿透細胞膜，例如分子量、分子表面電荷、分子體積、分子在水中的濃度。要建立一個好的QSAR，必須要同時考慮親油性、電子的和空間的三種作用：

(1) 親油性參數 (Hydrophobic parameter)

這方面的參數包括溶解度、辛醇-水分配係數等，其中又以辛醇-水分配係數最常被用到，一般表示成 $\log P$ 或 $\log K_{ow}$ ，儘管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離是與化學物質的疏水性有直接關係。Russom et al., (1997)指出擁有越高 $\log P$ 的物質會增加物質在水中與生物相 (Biophases)的平衡時間，因而增加其 LC_{50} ratio ($24h LC_{50} / 96h LC_{50}$)。現今已有很多方法可以利用電腦軟體幫助我們預測化合物的 $\log P$ ，但由於彼此之間的預測起始點不同，因此導致有不同的結果，由其是對於一些溶解度低的化學物質，預測的結果常

會與實驗所得的結果有偏差 (Nirmalakhandan et al., 1997)。

(2) 電子參數 (Electronic parameter)

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)、Hammett 取代基常數 (Hammett sigma substituent constant) 和還原位能 (Reduction potential) 等。根據 (Atkins, 1994) 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) 空間參數 (Steric parameter)

這類型的參數包括總表面積 (Total surface area)、總分子體積 (Total molecular volume) 和 Taft 取代基常數 (E_s) 等。Di Marizo and Saenz, (2004) 認為分子體積越大的化學物質，其毒性越高，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 (Molecular connectivity indices, MCIs)

最早是由 Randic, (1975) 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) 線性溶劑合能關係 (Linear Solvation Energy Relationship, LSER)

利用溶質-溶劑作用力 (Solute-solvent interaction) 當作化合物參數，以四個分子的性質表示為：內在分子體積 (Intrinsic molecular volume)、溶劑作

用參數 (Solvatochromic parameter)、極性或極性能力量度(Measure of polarity polarizability), 而其缺點為分子特性不易找到, 使參數求取有困難。

Ren, (2002)利用了四種水溶性參數 (Solute descriptor), 去區分有機物的毒性作用機制, Feng et al., (1996)和Gunatilleka and Poole, (1999)亦曾利用這些參數去預測有機物毒性對水中生物的影響, 這四種參數分別為: R代表超額莫耳分率 (Excess molar refraction)、 π_H 代表溶液的極性 (Solute's dipolarity/dipolarizability)、 $\sum\alpha^H$ 代表溶液的有效氫鍵酸度 (Solute's effective or summation hydrogen-bond acidity)、 $\sum\beta^H$ 代表溶液的有效氫鍵鹼度 (Solute's effective or summation hydrogen-bond basicity)。

Calamari et al., (1983)利用 *Onchorhynchus mykiss*和 *Danio rerio*兩種淡水魚類進行氯苯類的毒行試驗, 在進行QSAR分析時, 發現若以氯苯類的 nonpower narcosis power (NP), 也就是 $\log[(\text{Molecular weight}) \times K_{ow}]$ 去預測毒性, 其效果會優於僅利用 $\log K_{ow}$ 去預測。



2.5 QSAR 在環境毒理學上的應用

QSAR 是評估有機化合物急毒性的工具之一，最初在發展 QSAR 時是建立在將化合物分類的基礎上，就是一個 QSAR 的模型只能建立一系列相同或相類似化合物的毒性。Schultz et al., (1998)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。

Russom et al., (1997)將有機物分成圖 2.1 的毒性機制，可分為一般的 (General)和特異的 (Specific)兩大類型。一般性毒物是指麻醉作用在細胞膜非特定的位置上；而特異性毒物有又可稱為反應性毒物，它會作用在細胞的特定位置上或抑制特定的反應。決定化合物毒性機制的方法有很多，包括對鱒魚的劑量-反應評估及行為評估、混合毒性測試 (Broderius et al., 1995)、魚類瞬時毒性症狀 (Mckim et al., 1987)。

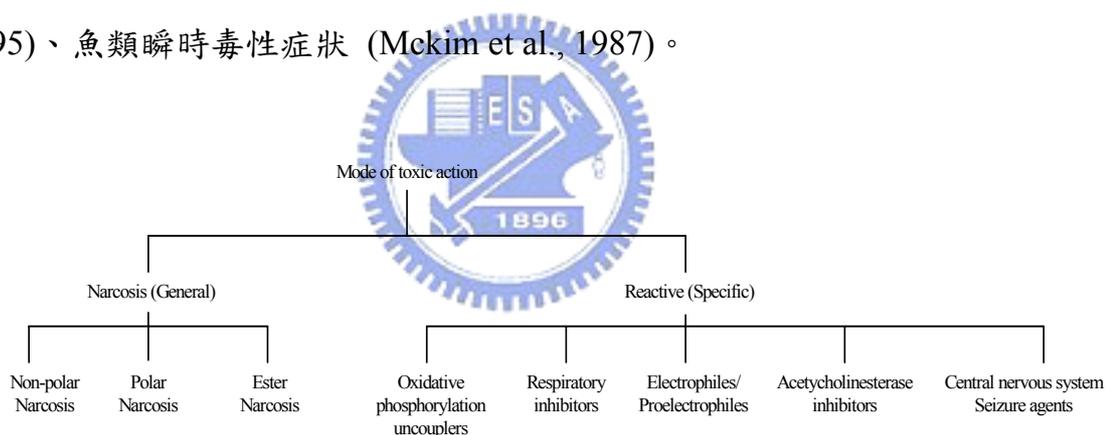


圖 2.1 毒性機制分類圖

Hermens, (1989)(in OECD, 1995)和 Verhaar et al., (1992)則有不同的分類方法，只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, (1991)對於在進行 QSAR 分析時，常會遇到的 outliers，歸納出表 2.1 中各種不同的毒性機制。

表 2.1 QSAR 分析中的 outliers 毒性機制分類表

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

Di Marizo and Saenz, (2004)認為麻醉性物質的作用機制是非特定性的，不會和生物體內特定的受器產生作用；也就是說，某化學物質會誘發麻醉效應的潛能，主要是決定在化學物質的疏水性。若無法得知某有機物的毒性作用機制，則這種有機物的毒性先會被判斷與他的疏水性質有關。Ferguson's principle 則說明了麻醉性物質，作用機制的速率限制步驟，是決定於毒物達到作用位置上所需的時間。

非極性麻醉物質的毒性大小可以和辛醇-水分配系數得到很好的線性關係，因此Schultz et al., (1998)將非極性麻醉物質所造成的毒性，與log K_{ow} 所得的回歸關係定義為基線毒性 (Baseline toxicity)，認為其毒性低於極性麻醉性的物質；另一方面，Dearden et al., (2000)則認為若化合物僅有分散力與誘導偶極力，則被定義為非極性麻醉效應，例如酮類、醇類與醚類化合物，這一類的物質會改變細胞膜的功能與結構。

Verhaar et al., (1992)認為極性與非極性麻醉效應的差異在於氫鍵鍵結

提供酸性的強弱不同；另一方面，Veith and Broderious, (1990)認為：若化合物屬於極性麻醉效應，則其存在有較強的極化能力與氫鍵結的能力。

Schultz et al., (1996)認為 Respiratory uncoupling 會造成粒腺體中電子梯度的短路，因而阻礙了 ATP 的合成，但細胞的呼吸並不受影響；而 Respiratory inhibition 則會毒化細胞中的檸檬酸循環，而阻礙了細胞的呼吸。

Mekenyan and Veith, (1994)將 Electrophilic 或 Uncleophilic 定義為化合物與生物系統形成共價鍵結，而不需與特定的接收者作用，其他反應性的毒物則會和反應中心產生不可逆的鍵結，因而產生抑制作用。

Lipnick et al., (1987)認為極性與非極性麻醉效應，可利用超額毒性 (Excess toxicity, T_e)來分辨，當 $T_e > 2$ 時其作用的機制屬於非極性麻醉效應；而若 $T_e < 2$ 時其作用機制則屬於極性麻醉效應。Schultz, (1987)認為酚類的 pKa 大於 8 時，定義為極性麻醉效應，而 pKa 小於 6.5 時，定義為磷酸呼吸的未偶合。



2.6 Surrogate 在環境毒理學上的應用

一般而言，我們會選擇某一種生物來進行毒性試驗，例如藻類、魚類或是細菌等，並且以毒性物質造成生物體的半致死濃度，來當作它的毒性指標；在此同時，我們感興趣的是，某一毒性物質對 A 生物體所造成的毒性影響，是否在 B 生物體上也同樣觀察得到。因此我們會選擇其他的生物體，來進行同樣的毒性測試，進而觀察生物體之間的毒性劑量反應是否接近，以及其敏感性。而這種所選擇的生物體，即稱為替代實驗物種 (Surrogate)，這種觀念很早就被用來預測藥物對人體的劑量反應影響。

由前述可知，環境毒理學發展至今日，已有許多的毒性試驗標準檢測方法，但這些使用標準物種進行實驗的缺點，主要在於難以準確地預測其他地區不存在的物種毒性影響，因此標準檢測方法將受限於地區的代表物種。由此可知，若藉由其他的替代實驗物種，去預測毒物對不同生物體可能造成的影響，對於環境影響評估的準確度將會提升。

Blum and Speece, (1990)認為具代表性的 surrogate 應該符合以下條件：
(1)不管在人造或是天然的環境當中，它的反應終點應該是會被保護 (2)反應終點必須要很清楚 (3)此種生物必須容易培養 (4)它對相類似的毒性物質的反應，都應該在我們所預料當中。舉例來說，若已知待測的毒物難溶於水，那就應該選擇生活環境不是在水中的生物來進行實驗，如此一來才能準確地觀察出毒性物濃度與其所造成的毒性關係，在此種情形之下，就不可用生存在水中的魚類來進行毒性實驗，因為將無法準確得知此毒物在水體中真正的濃度。

選擇了適當的 surrogates 進行實驗之後，我們將可以從結果中發現彼此之間的相關性，Blum and Speece, (1990)認為應該有以下兩點要求：

(1)此相關性必須建立在兩種的實驗物種上。例如：經由實驗證明硝化菌比好氧異營菌對於毒性物質較敏感一個等級。因此我們可以說如果能夠在

環境中保護硝化菌免於受到毒性物的影響，將同時也可以保護到好氧異營菌。

(2)對於實驗物種所接觸到的毒性物質範圍必須要明確的說明。例如：好氧異營菌與甲烷菌，除了對含氯的烷基化合物之外，皆有良好的相關性。

他們針對了非反應性的物種進行了一系列的實驗，他們發現fathead minnow和Microtox兩者的log IC₅₀具有很好的線性關係 $R^2=0.83$ ，同時aerobic和methanogens兩者的log IC₅₀相關性亦高達 $R^2=0.93$ 。

Dimitrov et al., (2004)以醛類對魚類及纖毛蟲進行毒性試驗，除了五點outliers之外，其他的醛類在兩物種之間具有很好的相關性。Di Marizo and Saenz, (2004)認為以麻醉性有機物所得到的毒性試驗結果，在不同測試物種之間的差異，會隨著有機物log K_{ow}的升高，而使得差異消失，藉著這種概念，在進行環境影響評估的時後，我們便可允許一些外來的不確定性因子存在，並使得標準毒性試驗方法亦變得可行。Di Marizo et al., (2001)的研究結果發現，*B. iberingii*和*P. promelas*這兩種魚類對一系列苯衍生物的毒性反應，當苯衍生物的log K_{ow}小於4的時後，*B. iberingii*的敏感性是高於*P. promelas*。