

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

芳香族化合物之毒性評估及 QSAR 研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2221-E-009-057-MY3

執行期間： 96 年 08 月 01 日至 99 年 07 月 31 日

計畫主持人：陳重元

共同主持人：

計畫參與人員：楊詔棻

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立交通大學 環境工程研究所

中 華 民 國

97 年

5 月

31 日

一、摘要

本篇研究利用 20 種芳香醛(苯甲醛)針對月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 所進行之 48 小時密閉式毒性試驗。實驗所得到之結果，將利用藻細胞的生長情況 (Final yield 及 Growth rate) 以及產氧情況 (ΔDO) 做為觀測終點，藉由 Probit 模式求出半致死濃度 (50% Effect concentration, EC₅₀)，與其物化參數 (包括 log Kow 和 E_{LUMO}) 進行回歸分析，找出毒性方程式。

其結果顯示三種苯甲醛(苯甲醛、香草醛及 3,4-二羥基苯甲醛)會與藻種行歧化作用 (dismutation)。此作用會造成苯甲醛轉化為苯甲酸之過程中行耗氧作用，因而減少溶氧產生量並降低其毒性。而在不同羥基苯甲醛之毒性中，以 5-溴-2-羥基苯甲醛其毒性最高。除了 3-溴-4-羥基苯甲醛之外，其他位於對位 (para-) 之羥基苯甲醛其毒性皆比鄰位 (ortho-) 低。

針對低影響濃度進行敏感性之比較，其結果: NOEC > EC₁₀ > LOEC。在本研究之三種反應終點當中對於苯甲醛類之敏感性最高者為細胞密度變化量，其次為溶氧產生量，而敏感性最差之反應終點為生長率。與其他生物種進行比較可以發現本研究之藻類其敏感性最高、其他依序為鯉魚、水蚤、海洋性發光菌，敏感性最差者為纖毛蟲。

另一方面，由結果亦可發現在羥基苯甲醛中，其毒性易高於其他苯甲醛類。以 logKow 進行 8 種羥基苯甲醛之 QSAR 回歸分析，將 outlier (2,5-dihydroxybenzaldehyde) 去除後再進行迴歸，即可得到較好之 QSAR 模式。

關鍵詞：月芽藻、QSAR、苯甲醛、半影響濃度(EC₅₀)

Abstract

The objective of this study is to assess the toxic effect of benzaldehydes (aromatic aldehydes) on *Pseudokirchneriella subcapitata* by a closed system test technique. The effects of benzaldehydes were evaluated by three kinds of response endpoints, cell density, algal growth rate, and the dissolved oxygen production. Median effective concentrations (EC_{50s}) were estimated by Probit model with a test duration of 48hr. The quantitative structure-activity relationships (QSARs) were established based on the 1-octanol/water partition coefficient (logKow) and an electronic parameters-Lowest unoccupied molecular orbit (E_{LUMO}).

The results show that three benzaldehydes, including benzaldehyde, vanillin and 3,4-dihydroxybenzaldehyde, would translate into benzoic acids with algae because of dismutation. The phenomenon makes the oxygen decreased and causes less toxicity of benzaldehydes. The highest toxicity of hydroxyl- benzaldehydes is 5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde. In addition, the toxicities of para-hydroxy-benzaldehydes is lower than those of ortho-hydroxy- benzaldehydes, except 3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde.

The results also reveal that the values of the low effect concentration (EC₁₀、LOEC and NOEC) of the benzaldehydes is NOEC < EC₁₀ < LOEC. This demonstrates that the relative sensitivity is NOEC > EC₁₀ > LOEC. Besides, the experiment results (EC₅₀) are compared with literature data derived by various toxicity tests. The order of the relative sensitivity is: algae(Final yield) > algae(DO production) > algae(Growth rate) > *Fathead minnow* > *Daphnia magna* > *Microtox* > *Tetrahymena pyriformis*.

On the other hand, the toxicity of hydroxy-benzaldehydes is demonstrated to be higher than those of other benzaldehydes, and the QSAR of the hydroxy-benzaldehydes, except 2,5-dihydroxybenzaldehyde, with a single parameter (logKow) is established. [log(1/EC50)_{GR} = 0.8457X - 0.3496, n=7, R²=0.9152]

Keywords: *Pseudokirchneriella subcapitata*, QSAR, Benzaldehyde, Median effective concentration (EC50)

二、研究緣起

隨著環保意識抬頭，人類對於都市及工業等各種的污水對環境污染所造成的危害，已經開始有一定程度的了解與關切，對於這些影響，大部份是著重在污染水體中的生物需氧量、化學需氧量，或是其他可藉由儀器分析而得到的數據，至於這些污染物對於整個生態系統的影響，已逐漸成為現在人類所關注的環境保護議題之一。

苯甲醛及其衍生物 (benzaldehyde derivatives)，被廣泛用於合成農藥之藥劑或是合成中所產生之中間物。除此之外，水處理程序中之消毒處理或含苯類之物質經不當燃燒和氧化不完全時皆有可能會產生苯甲醛及其衍生物。因此當其排放於自然水體時即會造成水系生態之危害，若是要了解該類毒物之環境行為及生態所產生的影響，必須進行生物毒性試驗，以了解造成毒性之方式進而加以控制，使其減低對生態所產生之危害。

醛類化合物能對人體造成傷害，如為氣體時會對眼睛、皮膚產生刺激性的傷害。若為水體中之化學物質時，則會對身體組織產生致毒性及致突變性，更進一步會使體內組織產生病變，如腫瘤、癌症^{[1][2]}。此外，由於此類化合物為生物親電性 (bioreactive electrophiles) 物質，此一親電性毒性作用機制會使的該物質毒性皆比麻醉性物質擁有更高之毒性^[3]，因此對環境生態的危害也更為之明顯。

美國的生物毒性試驗中，水蚤(*Daphnia*)是最普遍的毒性試驗生物，約佔 48%，其次為小鱂魚(*Fathead minnow*)，約佔 26%，其中藻類也是一種被廣泛用於毒性試驗之物種之一。藻類屬於食物鏈的最底層，當水中之毒性物質對藻類造成毒性傷害時，經由食物鏈的傳遞，同時也會影響整個生態系統。本次實驗採用的則是浮游植物 - 月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)，屬於綠藻綱(*Chlorophceae*)，其特徵為單細胞、成群體但不糾結、不能移動，一般細胞體積為 $40\text{-}60\mu\text{m}^3$ ，其優點為簡單、快速、便宜且敏感皆高於其他試驗物種之

外，藻類繁衍迅速，生命週期短暫，不會受到試驗期間幼年或是老年對毒物質不同忍耐力之影響^[4]。由上述之各項優點皆可說明以藻類作為毒性測試物種是十分適合的。

對於許多複雜甚至未知化學物種的研究，由於時間及空間的考量，或是數據缺乏，我們可能無法針對所有的化學物質去分析它們的毒性，因此環境毒物學則引用醫學、製藥工業經常使用的定量-結構反應關係 (Quantitative Structure-Activity Relationships ; QSARs) 來預測單一有機化學物質之毒性影響及可能造成毒性原因，由於 QSARs 可以簡單而迅速的推估出同類有機物質之毒性，不僅節省許多經費，亦省下許多的時間以及人力。

Hansch et al.^[5]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 QSARs 模式中，是利用化學物質的物化參數推估毒性，大多以辛醇-水係數(The logarithm of 1-octanol/ water partition coefficient ; log K_{ow} or log P)做為參數，而 Xiaodong et al. 指出 log K_{ow} 為說明物質疏水性(hydrophobicity)之特性，而疏水性即是植物毒性研究中最重要的參數之一；除此之外，因應化學物質本身之特性，最低分子軌域能量 (lowest unoccupied molecular orbital; E_{LUMO}) 是最常用的電子參數之一，當分子之間以形成電荷轉移方式相互作用時， E_{LUMO} 則可做為分子接受電子能力的量度。

本研究利用藻類毒性試驗方法，利用實驗結果及相關參數所建構之 QSARs 進行生物反應性有機毒物(苯甲醛及其衍生物)之毒性分析，探討不同結構及作用機制下所可能發生之毒性效應及特性。

三、材料與方法

藻類的培養

本 實 驗 所 選 用 的 藻 種 為

Pseudokirchneriella subcapitata，月芽藻，是一種於現今廣用於藻類生物試驗研究之物種。像是 US EPA、ISO、OECD 及 APHA 等單位之藻類毒性試驗法，皆以此物種為標準試驗種之一。實驗藻種購自於 University of Texas, Austin，採用 U.S. EPA “The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test: Experimental design, Application, and Data interpretation protocol. EPA-600/9-78-018.” 所使用的營養鹽組成，再以此營養鹽為基礎，對其組成加以研究而用於連續式母槽與光合抑制藻類毒性試驗中。其中營養鹽貯備液中，EDTA 分別有 100%、10% 及 0% 三種。100% 是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時使用 10%，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。接著以 0.1 N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養鹽之 pH 值調至 7.50 ± 0.10 並立即以 $0.45\mu\text{m}$ 的濾膜加以過濾。

先將欲移植的藻類由 4°C 的冰箱中取出，進行批次式培養數天，以活化藻細胞，使其達到對數生長期。接著依比例再將達對數生長期的藻液和培養基植入 4 L 之連續式培養槽中^[6]。將連續式培養槽培養於 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 之恆溫室中，槽底放置磁石攪拌器，轉動的磁石可讓藻液達均勻混合，有避免藻類沉澱及供應少量 CO_2 之作用，另外經由曝氣裝置之進流氣體則供應 CO_2 及均勻混合之作用。連續式白冷光從培養槽一邊照射，讓培養槽中段之光照強度介於 $4300 \pm 10\%$ lux 之間。

而後，當培養槽的藻類數達到相當的數量（約最大可能藻類數之 80-90%），即以蠕動幫浦進流營養液。由於培養槽體積固定（母槽設有溢流口），故可直接由流量控制所需之稀釋率（約為 0.25/d），亦即控制培養槽內藻類之生長率。

製劑與藥品

本實驗採用的試驗毒物為工業中常見的有機苯甲醛及衍生物，毒性物質濃度單位皆為 mg/L (Table 1)。由於苯甲醛類大多為難溶於水之有機物，因此會以二甲亞砜 (DMSO) 當作貯備溶液之溶劑。本研究所使

用的化學製劑(包括實驗毒物以及藻類營養鹽配製)來皆採用 G.R. 級以上之化學藥品。HPLC 的分析是使用 Acetonitrile (99.97 % HPLC grade)。

化學分析

在實驗進行前利用 COD 分析儀及 HPLC 來做貯備溶液的定量。HPLC 所設定的波長(λ value)為 300 nm，偵測時間 20 min，注入樣品量 $20\mu\text{L}$ ，流速設為 1.5 mL/min。移動相為 60 % acetonitrile:40% water。

毒性試驗

在藻類培養的過程中，經由每天更換新鮮的進流基質，並量測槽中細胞數量、溢流率、及觀察粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形（細胞平均體積，MCV），以判定連續式培養槽是否達到穩定狀態。以連續 3 天之細胞數量 (1.7×10^6 - 1.9×10^6 cells/mL) 與 MCV (在 39 - $46\mu\text{m}^3$ 之間) 等參數皆在控制的範圍且粒徑分析儀中藻類細胞之分佈為一常態分佈，即可認定為系統達到穩定狀態。

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% CO_2 的 N_2 氣體 (流量為 600 mL/min) 對營養鹽進行曝氣，降低水中的溶氧值並提高其 CO_2 含量，再以 0.1N 的 NaOH 和 HCl 將營養鹽的 pH 值調整至 7.5 ± 0.1 ，完成營養鹽的配製。

Chen and Huang^[6] 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」，從 steady state 狀態下的培養母槽取出之藻液與上述之營養鹽混合成所需濃度，接下來再加入不同之毒物濃度（含一組控制組及六組處理組）的試驗瓶，每組實驗做三重複；初始細胞密度設定在 15,000 cells/mL，並在實驗進行前量測初始之溶氧值 (Initial DO，需注意曝氣的時間及狀況，盡量降低初始溶氧)。

經過 48 hr 試驗時間後，量測各加入不同毒物濃度後的試驗瓶之溶氧值 (Final DO)，扣除

起始之溶氧值得淨溶氧值 (ΔDO)，同時測量瓶中細胞密度以求得藻類生長率。

數據分析

實驗開始前先進行range finding測試，濃度範圍須至少橫跨3個order，再逐步縮小至確定的試驗濃度值，確定濃度後，至少進行2次的藻類密閉式毒性試驗，當實驗結果的差距在10%內才算完成實驗。將實驗所測出之各參數值（如淨生長細胞數及淨產氧量）與對應之有機物濃度帶入模式（probit）中計算，可得到化合物的劑量-反應曲線及EC₅₀值；NOEC是使用Dunnett's test (one-tail) 計算所得。

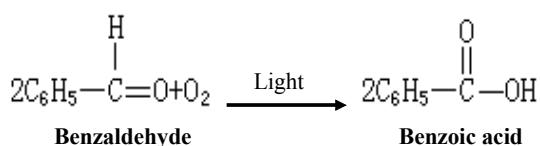
四、結果與討論

本研究為利用 48 小時之批次式 BOD 瓶藻類毒性試驗方法針對 20 種工業及製藥業所添加之中間物-苯甲醛及其衍生物。由於苯甲醛類屬於揮發或半揮發性，而本試驗系統屬於密閉式便可克服這些有機毒物在試驗時間 48 小時內因揮發而導致濃度改變，進而降低藻類毒性試驗之敏感性。此外，stock solution 也應利用 BOD 瓶在無 headspace 之情況下配製，以避免在配製的過程當中減少毒性物質之揮發。

針對藻類對不同苯甲醛類之敏感度而言，可發現到當苯甲醛之取代基及鍵結位置不同时，其毒性之相關性亦有非常明顯之變化。以溶氧(DO)為觀測終點時，其EC₅₀值由1.457mg/L(5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde)至157.3 mg/L(3,4-dimethoxybenzaldehyde)，最終生物量(Final Yield)之EC₅₀值變化為1.209 mg/L(5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde)至64.56mg/L(3,4-dimethoxybenzaldehyde)，而生長率(Growth rate)則為1.654mg/L(5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde)至162.1mg/L(3,4-dimethoxybenzaldehyde)。由上述之關係可以看出，5-溴-2-烴基苯甲醛對於藻類之毒性最高，而3,4-二甲氧基苯甲醛對於藻類之毒性則為最低。

此外，本研究之結果發現於三種苯甲醛類(苯甲醛、香草醛及 3,4-二烴基苯甲醛)之 $\triangle DO$ 為觀測終點時，其敏感性皆明顯比觀測終點為

Final yield及Growth rate具有較高之特性，其中苯甲醛之情況最為明顯(Fig.1)。此情形在早期之密閉式藻類毒性研究中^[7]，針對甲醇進行毒性試驗時亦有相同之情況發生。根據Fan et al.^[8]利用小綠藻(*Chlorella pyrenoidosa*)針對苯甲醛進行毒性試驗，其結果發現苯甲醛在進行毒性試驗之過程中會行歧化作用(dismutation)。此外，由於醛因在其羰基碳原子上含有一個氫原子，比酮容易被氧化。因此當苯甲醛在有光的照射下容易被氧化成苯甲酸：



由上述之反應式可以發現到苯甲醛會與氧反應而形成苯甲酸，也因此使得在密閉式藻類毒性試驗中其溶氧產生量無法提高之主要因素。Zhao et al.^[9]在利用水蚤(*Daphnia*)對苯甲酸進行毒性試驗，其結果發現苯甲酸之毒性作用機制應為非極性麻醉性(non-polar narcosis)，因此當苯甲醛經反應形成苯甲酸後，其毒性也因而降低，使得藻類細胞之生長較不受到苯甲醛毒性之影響。

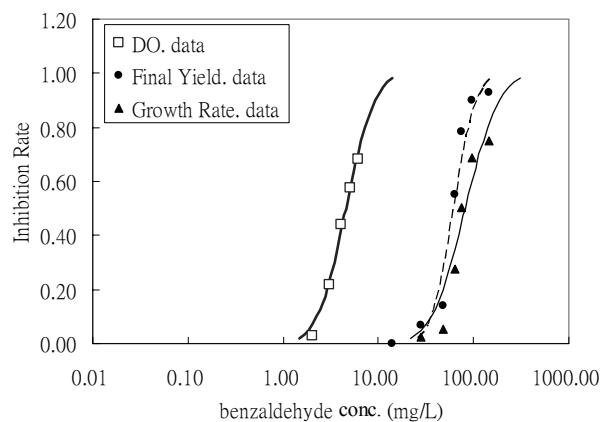


Fig.1 Dose-response Curve of Benzaldehyde

早期的毒理學研究中即指出當化學物質之取代基或取代位置不同時，其毒性之差異亦有相當大之變化。Walker et al.^[10]利用鱈魚(*Fathead minnow*)針對苯甲醛類進行毒性試驗，其結果發現苯甲醛若於鄰位(ortho-)接有氯

Table1. Physical and chemical characteristics、EC₅₀s、EC₁₀s and NOECs of benzaldehydes

ID	chemicals	CAS No.	M.W.	Log Kow	E _{LUMO} ^a	EC ₅₀ (mg/L)			NOEC(mg/L)	EC ₁₀ (mg/L)
						ΔDO	Final yield	Growth rate		
1	3-Ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	121-32-4	166.17	1.58	-0.498	22.34	11.72*	22.68	4.570 (FY)	3.939 (FY)
2	3-Bromo-4-hydroxybenzaldehyde	2973-78-6	201.02	1.83	-0.691	10.40	6.391*	11.30	<3.990 (FY)	2.684 (FY)
3	3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde	86-81-7	196.21	1.39	-0.563	21.79	17.59*	35.00	8.240 (FY)	5.109 (FY)
4	4-Ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	120-25-2	180.2	1.63	-0.420	13.09	8.453*	17.98	<2.908 (FY)	3.001 (FY)
5	3,4-Dimethoxybenzaldehyde	120-14-9	166.17	1.22	-0.456	157.3	64.56*	162.0	18.170 (FY)	11.14 (FY)
6	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	121-33-5	152.15	1.21	-0.509	11.46*	38.83	53.84	9.299 (DO)	7.695 (DO)
7	Benzaldehyde	100-52-7	106.12	1.48	-0.435	4.563*	60.2	81.76	2.022 (DO)	1.89 (DO)
8	4-Nitrobenzaldehyde	555-16-8	151.12	1.56	-1.674	3.308*	3.413	6.017	<1.031 (FY)	1.436 (FY)
9	2,4-Dihydroxybenzaldehyde	95-01-2	138.12	1.53	-0.565	14.13	13.65*	18.05	<9.980 (FY)	9.491(FY)
10	2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	387-45-1	158.55	2.56	-0.876	3.497	2.346*	5.562	<0.9590 (FY)	0.886 (FY)
11	2,4-Dimethoxybenzaldehyde	613-45-6	166.17	1.87	-0.482	16.47	14.26*	19.97	<10.10 (GR)	10.87 (GR)
12	3,4-Dihydroxybenzaldehyde	139-85-5	138.12	1.09	-0.550	3.966*	10.02	24.87	2.404 (DO)	1.982 (DO)
13	4-Chlorobenzaldehyde	104-88-1	140.57	2.1	-0.735	15.47	11.69*	18.26	4.930 (FY)	5.978 (FY)
14	2,5-Dimethoxybenzaldehyde	93-02-7	166.18	1.91	-0.419	34.48	26.87*	46.60	<11.89 (FY)	12.21 (FY)
15	2,5-Dihydroxybenzaldehyde	1194-98-5	138.12	0.54	-0.686	3.349	0.283*	11.14	0.486 (DO)	0.667 (DO)
16	5-Bromo-2-hydroxybenzaldehyde	1761-61-1	201.02	2.9	-0.818	1.457	1.208*	1.653	0.710 (FY)	0.713 (FY)
17	4-(Dimethylamino)benzaldehyde	100-10-7	149.19	1.81	-0.178	27.71	18.96*	32.45	<10.09 (FY)	7.987 (FY)
18	4-Bromobenzaldehyde	1122-91-4	185.02	2.6	-0.813	13.93	12.17*	15.75	8.002 (FY)	8.335 (FY)
19	5-Hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	42454-06-8	167.12	1.63	-1.459	7.009	6.025*	9.900	2.003 (FY)	3.104 (FY)
20	4-Ethoxybenzaldehyde	10031-82-0	150.18	2.28	-0.341	14.72	11.88*	22.85	6.950 (FY)	4.658 (FY)

*: the most sensitive endpoint

a: E_{LUMO} data from Chemoffice version 5.0 software (MOPAC program, AM1 Hamiltonian)

氧基(hydroxy)時，該物質之毒性遠高於苯甲醛、對位(para-)氫氧基苯甲醛及烷基類苯甲醛(alkoxybenzaldehydes)。而使得鄰位氫氧基苯甲醛之毒性較高之因素可能為於鄰位氫氧基之氫原子(hydroxogen)與苯甲醛之羰基(carbonyl)中之氧產生氫結鍵(hydrogen bonding)。

Netzeva et al.^[11]則利用纖毛蟲(*Tetrahymena*)針對苯甲醛類進行毒性試驗，其結果也發現到ortho-苯甲醛之毒性皆高於meta-, para-苯甲醛。而造成鄰位苯甲醛類其毒性較高之因素，主要為此毒物會經由生物轉化作用(biotransformation)形成相似醌(quinone)之結構物，而此結構物由於有著比苯甲醛更高之生物親電性反應，也因此使其毒性比其他同分異構物有著較高之毒性。

比較本研究中不同烴基苯甲醛之毒性值，可以看出5-溴-2-烴基其毒性最毒，以反應終點為最終產率(F.yield)及生長率(GR)而言，其毒性與苯甲醛大約相差50及80倍左右。此外，除了3-溴-4-烴基苯甲醛之外，其他位於對位(para-)之烴基苯甲醛其毒性皆比鄰位(ortho-)低。針對鄰位之烴基苯甲醛而言，也可發現到毒性最高之物質為5-溴-2-烴基苯甲醛，由此即可得知取代基若含有溴(bromo-)時，其烴基苯甲醛之毒性也會因而提高。

對位之烴基苯甲醛(No.5, 6, 7)其毒性也因其取代基之不同也有不同之變化，當其取代位置為間位且取代基為溴(bromo-)時，毒性最高，其次則為取代基為乙氧基(ethoxy-)，毒性最低的則為取代基為甲氧基(methoxy-)。

為了更進一步了解在低影響濃度間敏感性之差異性，進而將本研究之各低影響濃度進行敏感性之比較。結果顯示，EC₁₀為低影響濃度中最具敏感性之參數，而最不具敏感性之參數為LOEC。

由於NOEC之敏感性比EC₁₀要來的高，藉由整體的低影響濃度敏感性比較結果可以得知：NOEC > EC₁₀ > LOEC。而在密閉式藻類毒性試驗針對其他種類之毒物，在三種低影響濃度之敏感性進行分析所得之結果：NOEC ≈ EC₁₀ >

LOEC。由此結果可以發現到針對苯甲醛所得到的低影響濃度之敏感性，和其他種類之毒物於低影響濃度之結果相似。由於其他種類之毒物包括有非極性、極性及反應性之毒性作用機制。因此，在密閉式藻類毒性試驗當中，對於大多數之毒性化學物質於四種低影響濃度之敏感性比較，所得之結果為NOEC為最具敏感性之反應終點。

毒性試驗所選用的生物種會隨著基質(media)、試驗期間之長短與敏感性的因素而有所不同。也就是同一毒性物質以不同的生物種試驗時會呈現不同的敏感度，即使同一生物種試驗也會因試驗方法而導致敏感度變異。

Table2 為以密閉式藻類毒性試驗(△DO、Final yield 及Growth rate)與水蚤(*Daphnia magna*)、海洋性發光菌(*Microtox*)、纖毛蟲(*Tetrahymena pyriformis*)及鱈魚(*Fathead minnow*)所得之實驗結果^{[12][7][11][13]}。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苯甲醛類之敏感性最高者為細胞密度變化量，而敏感性最低者為生長率。進一步探討藻類與其他生物種之敏感性比較可以發現本研究(藻類)其敏感性最高、依序為鱈魚、水蚤、海洋性發光菌，敏感性最差者為纖毛蟲。而本研究之藻類其敏感性為最高之主要因素為避免了苯甲醛類之揮發，因而提高了其敏感性。

在QSAR的研究部分，毒性數據與其他參數值之間的相關性並不佳，R²大多小於0.3，除了無法建立良好的QSAR之外，也不足應用於其他相同毒性機制的毒物上。這可能是因本實驗所選擇的毒性物質並非為同類型之物質，因此在化學結構上的分類卻跨越了其他毒性作用機制，使其毒性差異性太大，因而造成無法找出良好的相關性。

Walker J.D et.al^[10]亦在針對烴基苯甲醛類(hydroxybenzaldehydes)進行鱈魚之毒性試驗中，指出此類之物質對於logKow較有其相關性。故本研究嘗試針對8種烴基苯甲醛利用logKow進行QSAR之回歸分析，由於溶氧產生量受歧化作用(dismutation)之影響，因此採用細胞密度變化量及生長率進行QSAR之回歸，

Table 2 Comparison of algal toxicity test results with other species

Unit : mmol/L

Chemicals	Algae (BOD bottle)(48hr)			Daphnia*	Microtox@	T.pyriformis#	F.minnow&
	△DO	F.Y.	G.R.	48hr	15min	40hr	96hr
	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/IGC ₅₀)	Log(1/LC ₅₀)				
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	0.8710[3]	1.152[1]	0.8650[2]	0.6030[5]	0.6180[4]	0.0150[7]	0.2420[6]
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	1.286[2]	1.498[1]	1.250[3]	0.2820[5]	1.096[4]	-	-
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	0.9540[2]	1.047[1]	0.749[3]	0.2110[4]	-0.478[5]	-	-
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	1.140[2]	1.329[1]	1.001[3]	0.1950[4]	-	-	-
3,4-dimethoxybenzaldehyde	0.0240[4]	0.4110[1]	0.0110[5]	0.1510[2]	0.0300[3]	-	-
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	1.123	0.5930[2]	0.4510[4]	0.4990[3]	0.1800[6]	-0.030[7]	0.4260[5]
Benzaldehyde	1.367	0.2460[6]	0.1130[5]	0.3440[4]	1.035[3]	-0.1960[7]	1.145[2]
4-Nitrobenzaldehyde	1.660[1]	1.646[2]	1.400[3]	-	-	0.2030[5]	1.180[4]
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	0.990[2]	1.005[2]	0.8840[4]	-	-	0.5150[5]	1.023[1]
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	1.656[2]	1.830[1]	1.455[3]	-	-	-	1.227[4]
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	1.004[2]	1.066[1]	0.9200[3]	-	-	-0.0560[5]	0.9170[4]
3,4-dihydroxybenzaldehyde	1.542	1.139[2]	0.7450[3]	0.6680[4]	0.6000[5]	0.1070[6]	-
4-Chlorobenzaldehyde	0.9590[3]	1.080[2]	0.8860[4]	-	0.7800[5]	0.4000[6]	1.810[1]
2,5-dimethoxybenzaldehyde	0.6830[3]	0.7910[2]	0.5520[4]	0.9720[1]	-0.2370[5]	-	-
2,5-dihydroxybenzaldehyde	1.610[1]	1.417[2]	1.093[3]	0.8210[4]	0.5350[5]	0.2770[6]	-
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	2.13[3]	2.221[1]	2.085[4]	1.745[5]	1.5436[6]	1.107[7]	2.189[2]
4-(dimethylamino)benzaldehyde	0.7310[3]	0.8960[2]	0.6630[4]	-	1.876[1]	0.2310[6]	0.5100[5]
4-bromobenzaldehyde	1.123[2]	1.182[1]	1.070[3]	-	0.7780[4]	0.5870[5]	-
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	1.377[2]	1.443[1]	1.227[3]	-	-	0.3290[5]	0.600[4]
4-ethoxybenzaldehyde	1.009[3]	1.102[2]	0.8180[4]	-	1.169[1]	0.0730[6]	0.7280[5]
Ave.Ranking	2.353[2]	1.700[1]	3.500[3]	3.730[5]	4.070[6]	5.930[7]	3.580[4]

*: Data from Lijum Jin^[12], @: Data from Lijum Jin^[7], #: Data from Schultz T.W^[11], &: Data from Russom C.L^[13]

[]: ranking value; F.Y.: Final Yield; G.R: Growth Rate

其結果為：

$$\text{Log}(1/\text{EC50})_{\text{FY}} = 0.970 \text{logKow} + 0.2702 \quad (1)$$

$$N=8, R^2=0.449, S=0.379, F=4.893$$

$$\text{Log}(1/\text{EC50})_{\text{GR}} = 1.069 \text{logKow} + 0.389 \quad (2)$$

$$N=8, R^2=0.581, S=0.34, F=8.308$$

在 QSAR 分析中，可以發現有一個 outlier (2,5-dihydroxybenzaldehyde)，若將此點去除後再進行迴歸即可得到較好之 QSAR 模式：

$$\text{Log}(1/\text{EC50})_{\text{FY}} = 0.817 \text{logKow} + 0.2365 \quad (4)$$

$$N=7, R^2=0.817, S=0.215, F=22.3, Q^2=0.673$$

$$\text{Log}(1/\text{EC50})_{\text{GR}} = 0.9152 \text{logKow} + 0.091 \quad (5)$$

$$N=7, R^2=0.915, S=0.16, F=54.03, Q^2=0.851$$

由 Eq(3)、Eq(4)即可說明煙基苯甲醛對於 logKow 是具有其相關性，而本研究所選定之 20 種苯甲醛並非為同類型之物質。

五、結論

本研究為針對 20 種苯甲醛進行密閉式之藻類毒性試驗，三種苯甲醛(苯甲醛、香草醛及 3,4-二煙基苯甲醛)之 Δ DO 為觀測終點時，其敏感性皆明顯比觀測終點為 Final yield 及 Grwoth rate 具有較高之特性，而造成此情形之因素為藻種會與苯甲醛行歧化作用(dismutation)。此作用會造成苯甲醛轉化為苯甲酸之過程中行耗氧作用，因而減少溶氧產生量並降低其毒性。

在不同煙基苯甲醛之毒性中，以 5-溴-2-煙基苯甲醛毒性最高，除了 3-溴-4-煙基苯甲醛之外，其他位於對位(para-)之煙基苯甲醛其毒性皆比鄰位(ortho-)低。而 3-溴-4-煙基苯甲醛有較高之毒性為取代基若含有溴(bromo-)時，其煙基苯甲醛之毒性也會因而提高。

在本研究之結果與其他生物種進行毒性比較，可以發現本研究(藻類)其敏感性最高、依序為鱈魚、水蚤、海洋性發光菌，敏感性最差者為纖毛蟲。毒性數據與其他參數值之間的 QSAR 相關性並不佳，這可能是因本實驗所選擇的毒性物質並非為同類型之物質，因此在化

學結構上的分類卻跨越了其他毒性作用機制，使其毒性差異性太大，因而造成無法找出良好的相關性。針對 8 種煙基苯甲醛利用 logKow 進行 QSAR 之回歸分析，可以發現有一個 outlier (2,5-dihydroxybenzaldehyde)，若將此點去除後再進行迴歸即可得到較好之 QSAR 模式($R^2=0.817$, based on FY; $R^2=0.915$, based on GR)。

六、參考文獻

1. Bailey, R. A., Clark, H.M., Krause, S., Strong, R. L., 1978. "Atmospheric chemistry" Chemistry of the Environment. Academic Press. New York.
2. Sitting, M., 1974. "Aldehydes" Pollution Detection and Monitoring Handbook. Noyes Data Corp. Park Ridge. New Jersey.
3. Hermens, J. L. M., 1990. Electrophiles and acute toxicity to fish. Environ. Health. Persp. 87, 219-225.
4. Padrtova, R. R., Marsalek, B., Holoubek, I., 1998. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery. Chemosphere. 37, 495-507.
5. Hansch, C., Muir, R., Fujita, T., Peyton, P., Maloney, P., Geiger, F., Streich, M., 1963. The correlation of biological activity of plant growth regulators and chloromycetin derivates with Hammett constants and partition coefficients. J. Am. Chem. Soc. 85, 2817-2824.
6. Chen, C. Y., Lin, K. C., 1997. Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1337-1344.
7. Hsieh, S. H., Hsu, C. H., Tasi, D. Y., Chen, C. Y., 2006. Quantitative structure-activity relationships for toxicity of nonpolar narcotic chemicals to *Pseudokirchneriella subcapitata*. Environ. Toxicol. Chem., 25 (11) 2920-2926.

8. **Fan, C. S., Stauffer J. F., Umbreit W. W., 2006.** An experimental separation of oxygen liberation from carbon dioxide fixation in photosynthesis by chlorella. *J. Gen. Physiol.* 27, 15-28.
9. **Zhao, Y. H., Ji, G. D., Cronin, M. T. D., Dearden, J. C., 1998.** QSAR study of the toxicity of benzoic acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and carp. *Sci. Total Environ.* 216, 205-215.
10. **Walker, J. D., Jaworska, J., Comber, M. H. I., Schultz, T. W., Dearden, J. C., 2003.** Guidelines for developing and using quantitative structure-activity relationships. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1653-1665.
11. **Netzeva, T. I., Schultz, T. W., 2005.** QSARs for the aquatic toxicity of aromatic aldehydes from *Tetrahymena* data. *Chemosphere.* 61, 1632-1643.
12. **Lijun, J., Jiayin, D., Pan, G., Liansheng, W., Zhongbo, W., 1998.** Quantitative structure-toxicity relationships for benzaldehydes to *Daphnia magna*. *Chemosphere.* 37(1), 79-85.
13. **Russom, C. L., Bradbury, S. P., Broderius, S. J., Hammermeister, D. E., Drummond, R. A., 1997.** Predicting modes of toxic action from chemical structure : acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (5), 948-967.