

一、研究緣起

自工業革命以來，全球工業發展迅速科技日益發達；然而，環境資源過度的開發利用，以及人類活動所產生的汙染對自然環境造成一定程度的影響，且破壞了地球生態環境。工業或家庭生活所製造的污水被排放到自然環境水體中，在這些排放入水體的污染物中，可能包含許多各種不同種類的化學物質，即使是危害毒性很小的化學物質，當其大量的被生物體攝取時，也會因為食物鏈而造成不良或明顯有害的影響，更不用說會造成生物毒性的毒性化學物質。因此，若只單純討論化學物質物理及化學上的特性分析時，我們將無法了解這些化合物或毒化物對生活環境及生物體所造成的衝擊，因此，生物評估便成為評鑑水中生態污染情形的首要工具，藉由不同營養階層分類，從較高階的魚類、蝦類到無脊椎動物、浮游生物，直到食物鏈的最低層生產者藻類，了解這些化學物質對生態環境所造成的危害及影響。

隨著各界對環境之關注程度逐漸上升，對於環境生態毒性研究部份也逐漸受到注意，歐盟在 2006 年提出化學品管理法規 -REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)，依照每年輸入歐洲之化學物質的量進行化學品管理，其報告書內容除了包括化學物質的物化特性及健康危害之外，也針對環境生態毒性部分提出毒性評估之要求，以期達到永續之目的。一般而言，毒化物進入水體後，經過河川的稀釋作用，使濃度不至於造成生物急毒性，因此選用慢毒性試驗結果來規範其排入水體的濃度限制，但慢毒性試驗時間長達半年至一年，若考慮到有一大量未知其毒性的化合物排放至水體，卻需耗時半年至一年才能了解其毒性，等到了了解其毒性之時卻可能已造成無法挽救的傷害，因此在國際上的一些環境組織，如 US EPA、ISO、ASTM 及 OECD 皆有規範一系列生物急毒性試驗，讓我們可以在短期時間內瞭解到化

合物的對於生物所造成的毒性。

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%，；其次為小鰾魚(*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。藻類位於食物鏈的最底部，可說是整個生態食物鏈的靈魂所在，因此藻類的盛衰對於水中其他微生物及高等生物，甚至人類的影響甚大；除此之外，藻類毒性實驗具有方便、簡易、高度再現性以及其所特有的高敏感性和實驗的準確性幾項優點，皆是選擇藻類做為指標微生物研究其對毒化物質之涵容能力之重要因素，也是對於生態保護評估的重要步驟。本次實驗採用的是浮游植物-月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)，屬於綠藻綱(*Chlorophyceae*)其特徵為單細胞、成群體但不糾結、不能移動，一般細胞體積為 $40-60\mu\text{m}^3$ ，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性物質不同忍耐力之影響。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。

本研究中選用三大類工業上常用的芳香族化合物，包括苯甲醛類、硝基苯胺及硝基甲苯化合物。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。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。因此當其排放於自然水體時即會造成水系生態之危害。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，因此對環境生態的危害也更為之明顯。

硝基苯胺類化合物易溶於多數有機溶劑中，為一種重要的有機化工原料，在工業上使用種類十分繁多，此類化合物常被用於製造染料、殺蟲劑、除草劑、染劑、香料、醫藥用藥物以及用於一些高分子聚合物（如：塑膠）的合成，在工業使用及製造時，此類的化學物質毒性很高，若隨著廢水排放至自然水體當中，可能會因此污染水體環境，除此之外，若再經由食物鍊的傳遞及累積，更可能會進一步影響人類健康。且此類化合物大多具有誘發基因突變或致癌性，對於整個生態環境及人體健康都具有一定程度的潛在影響。

硝基苯胺類屬於半揮發性物質，分子量自 138.13~228.12，為黃色或褐色且具臭味的油狀液體或固體，受光或在空氣中色澤會變深，易溶於多數有機溶劑中，為一種重要的有機化工原料，廣泛應用於染料、醫藥、農藥、炸藥、香料、藥品的製造與生產。這一類的化學物質毒性很高，在毒性作用機制分類上，此類物質因苯環上硝基取代基之存在，使此類物質的毒性作用方式主要來自於硝基取代基上的電性作用，而造成其毒性之增加。除此之外，在 Schmitt（2000）等人的研究中指出有一部分的此類物質具有誘導基因突變或致癌性，對於整個生態環境及人體健康都具有極大危害。

全世界登錄的化學物質超過一千萬種，每年估計約有五千種化學物質從實驗室內合成，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，QSAR 以毒物的物理或化學性質或毒物結構來預測毒物對生物的毒性之研究。在 QSARs 模式中，是利用化學物質的物化參數推估毒性，大都以辛醇-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之參數之一，對有機物而言，有機物的 $\log P$ (水-辛醇分配係數) 值為有機物穿越細胞膜而被生物

攝取的重要參考指標之一；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。其他如分子大小、電性、分子解離程度 pK_a 也是重要的參數。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。

QSAR 研究領域過去主要起源於應用化學及生化學研究，在環工領域上 QSAR 的應用為推估當化學物質進入環境中對環境生物的影響及其環境宿命。另一應用則是利用 QSAR 對於新的未知化學物質毒性進行推估。本研究群於 2005 及 2006 年分別對 aldehydes, non-polar narcotics, PAHs, 及 chlorophenols 等毒性物質建立 QSAR 模式並發表研究成果，已有初步成果。

本研究選定的芳香族化合物皆屬於半揮發至揮發性且具致癌性之化學物質，在既有的毒性研究數據及資料庫中十分缺乏，本研究利用藻類毒性試驗方法，探討此類化合物對於藻類之毒性試驗結果及利用相關參數所建構之 QSARs 進行毒性評估分析，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。

二、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。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硝基甲苯及其衍生物，毒性物質濃度單位皆為 mg/L。由於硝基甲苯類大多為難溶於水之有機物，因此在貯備溶液之準備過程中，會以二甲亞砜(DMSO)當為溶劑，將一定量之硝基甲苯加入其中以配製所需之貯備溶液。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)來皆採用分析試藥級以上之化學藥品 (Table 1)。

化學分析

在實驗前皆是利用 HPLC 來做溶液的定量。HPLC 所設定的波長(λ value)為 254 nm，偵測時間 10 min，注入樣品量 $20 \mu\text{L}$ ，流速設為 1.0 mL/min。移動相為 50% 0.1M 醋酸銨溶液:50 % water。

毒性試驗

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 天之細胞數量與 MCV 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。範圍約在：細胞數量 (1.7×10^6 - 1.9×10^6 cells/mL) 及粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形 (MCV 在 39 - $46 \mu\text{m}^3$ 之間) 即可。

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。

從培養母槽（steady state 狀態）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，一組實驗做三重複組；此時須注意各瓶中的營養鹽濃度與初始細胞密度應該相同，本實驗之初始細胞密度設定在 15,000 cells/mL，進行毒性試驗，且另外再量測開始之溶氧值（Initial DO，在此要注意曝氣的時間及狀況，盡量讓初始溶氧降為最低）。

經過 48 hr 的毒性物質曝露後，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

實驗一開始先進行 range finding 的測試，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，當濃度確定後，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，以求得更準確的實驗數據。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，得到各模式的劑量-反應曲線及 EC_{50} 值；NOEC 是使用 Dunnett's test (one-tail) 計算所得。

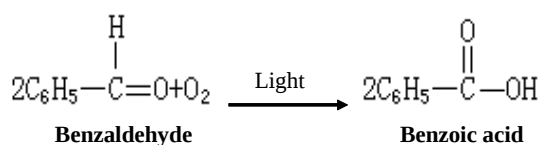
三、結果與討論

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工業上常用的芳香族化合物近行毒性評估試驗。由於本研究選用的三類芳香族化合物皆屬於揮發或半揮發性之物質，在傳統藻類毒性實驗進行過程中，容易因為揮發而造成毒性低估之現象，而本試驗系統屬於密閉式系統，即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。

苯甲醛及其衍生物(Benzaldehydes)

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時，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 EC_{50} 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 EC_{50} 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 Δ 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，針對甲醇進行毒性試驗時亦有相同之情況發生。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. (1998)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。

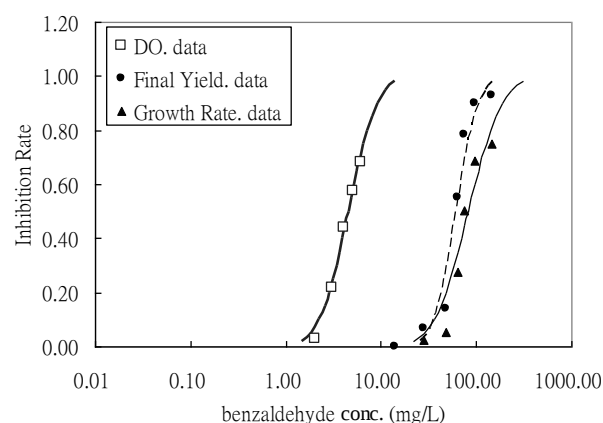


Fig.1 Dose-response Curve of Benzaldehyde

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]利用鱖魚(*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-)接有氫氧基(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(hydroxgen)與苯甲醛之羰基(carbonyl)中之氧產生氫結鍵(hydrogen bonding)。

Netzeva et al.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。

Table1. Physical and chemical characteristics 、EC₅₀s 、EC₁₀s and NOECs of aromatic compounds

Chemicals	CAS No.	M.W.	Log K _{ow}	E _{LUMO} ^a	EC ₅₀ (mg/L)			NOEC(mg/L)	EC ₁₀ (mg/L)	
					ΔDO	Final yield	Growth rate			
Benzaldehyde										
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)	
3-Bromo-4-hydroxybeznaldehyde	2973-78-6	201.02	1.83	-0.691	10.40	6.391*	11.30	<3.990 (FY)	2.684 (FY)	
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-Ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	120-25-2	180.2	1.63	-0.420	13.09	8.453*	17.98	<2.908 (FY)	3.001 (FY)	
3,4-Dimethoxybenzaldehyde	120-14-9	166.17	1.22	-0.456	157.3	64.56*	162.0	18.170 (FY)	11.14 (FY)	
4-Hydroxy-3-methoxybnezaldehyde	121-33-5	152.15	1.21	-0.509	11.46*	38.83	53.84	9.299 (DO)	7.695 (DO)	
Benzaldehyde	100-52-7	106.12	1.48	-0.435	4.563*	60.2	81.76	2.022 (DO)	1.89 (DO)	
4-Nitrobenzaldehyde	555-16-8	151.12	1.56	-1.674	3.308*	3.413	6.017	<1.031 (FY)	1.436 (FY)	
2,4-Dihydroxybnezaldehyde	95-01-2	138.12	1.53	-0.565	14.13	13.65*	18.05	<9.980 (FY)	9.491(FY)	
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)	
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	613-45-6	166.17	1.87	-0.482	16.47	14.26*	19.97	<10.10 (GR)	10.87 (GR)	
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	139-85-5	138.12	1.09	-0.550	3.966*	10.02	24.87	2.404 (DO)	1.982 (DO)	
4-Chlorobenzaldehyde	104-88-1	140.57	2.1	-0.735	15.47	11.69*	18.26	4.930 (FY)	5.978 (FY)	
2,5-Dimethoxybenzaldehyde	93-02-7	166.18	1.91	-0.419	34.48	26.87*	46.60	<11.89 (FY)	12.21 (FY)	
2,5-Dihydroxybenzaldehyde	1194-98-5	138.12	0.54	-0.686	3.349	0.283*	11.14	0.486 (DO)	0.667 (DO)	
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)	
4-(Dimethylamino)benzaldehyde	100-10-7	149.19	1.81	-0.178	27.71	18.96*	32.45	<10.09 (FY)	7.987 (FY)	
4-Bromobenzaldehyde	1122-91-4	185.02	2.6	-0.813	13.93	12.17*	15.75	8.002 (FY)	8.335 (FY)	
5-Hydroxy-2-nitrobnezaldehyde	42454-06-8	167.12	1.63	-1.459	7.009	6.025*	9.900	2.003 (FY)	3.104 (FY)	
4-Ethoxybenzaldehyde	10031-82-0	150.18	2.28	-0.341	14.72	11.88*	22.85	6.950 (FY)	4.658 (FY)	
Anilines										
2-Nitroaniline	88-74-4	138.13	2.02	-1.123	10.320*	28.914	127.55	0.522(DO)	<0.98(DO)	
3-Nitroaniline	99-09-2	138.13	1.47	-1.201	22.286*	42.025	85.933	1.225(DO)	<0.983(DO)	
4-Nitroaniline	100-01-6	138.13	1.47	-1.137	15.121*	22.679	86.305	0.943(DO)	0.49(DO)	
2,4-Dinitroaniline	97-02-9	183.12	1.84	-1.472	4.200	3.41*	27.39	0.13(FY)	<0.16(FY)	
2,6-Dinitroaniline	606-22-4	183.12	1.29	-1.491	0.829	0.481*	0.794	0.121(FY)	0.051(FY)	
3,4-Dinitroaniline	610-41-3	183.12	--	-1.840	3.4124	1.6187*	3.9046	0.277(DO)	0.151(FY)	

Table 1 (continue)

Chemicals	CAS No.	M.W.	Log Kow	E _{LUMO} ^a	EC ₅₀ (mg/L)		Growth rate	NOEC(mg/L)	EC ₁₀ (mg/L)
					ΔDO	Final yield			
3,5-Dinitroaniline	618-87-1	183.12	1.29	-1.581	0.779	0.453*	0.996	0.047(GR)	0.037(FY)
2-Nitro-1,4-benzenediamine	5307-14-2	153.14	0.55	-1.128	2.496*	4.146	32.949	0.093(DO)	<0.20(FY)
4-Nitro-1,2-benzenediamine	99-56-9	153.14	0.55	-1.149	31.119*	41.206	176.71	0.547(DO)	0.247(DO)
4-Nitro-1,3-benzenediamine	5131-58-8	153.14	0.55	-1.148	9.906*	13.983	137.28	0.112(DO)	<0.20(DO)
3-Nitro-o-phenyldiamine	3694-52-8	153.14	1.10	-1.151	14.500	11.480*	72.44	0.63(DO)	0.899(DO)
2-Methyl-5-nitroaniline	99-55-8	152.15	2.02	-1.193	26.162	12.210*	30.004	1.553(FY)	0.50(FY)
4-Methyl-3-nitroaniline	611-05-2	152.15	2.02	-1.239	3.478*	4.392	10.898	0.032(DO)	<0.164(DO)
4-Methyl-2-nitroaniline	89-62-3	152.15	2.57	-1.139	11.15	4.1743*	13.636	0.495(FY)	0.483(FY)
Nitrotoluene									
2-Nitrotoluene	88-72-2	137.14	2.36	-0.903	17.096	11.565	19.596	0.677(DO)	<3.865(DO)
3-Nitrotoluene	99-08-1	137.14	2.36		18.22	14.463	22.982	2.832(GR)	3.83(FY)
4-Nitrotoluene	99-99-0	137.14	2.36	-1.045	7.9776	1.3678	3.6374	0.199(GR)	<0.212(FY)
2,3-Dinitrotoluene	602-01-7	182.14	2.18		1.2326	0.79342	1.3506	0.144(DO)	0.08(DO)
2,4-Dinitrotoluene	121-14-2	182.14	2.18	-1.731	7.6037	2.541	10.129	0.219(FY)	<0.08(FY)
2,5-Dinitrotoluene	619-15-8	182.14	2.18	-2.043	1.1567	0.93521	3.4774	0.035(GR)	0.105(GR)
3,4-Dinitrotoluene	610-39-9	182.14	2.18	-1.796	1.1668	2.1017	9.1255	1.167(DO)	0.085(DO)
3,5-Dinitrotoluene	618-85-9	182.14	2.18	-1.734	3.4023	14.257	56.817	0.163(DO)	0.16(DO)
2,3-dimethylnitrobenzene	83-41-0	151.16	2.91	-0.828	45.311	6.1028	21.222	0.361(FY)	<0.114(FY)
2,4-dimethylnitrobenzene	89-87-2	151.16	2.91	-0.990	62.83	22.949	48.34	2.903(FY)	0.898(FY)
2,5-dimethylnitrobenzene	89-58-7	151.16	2.91	-0.859	11.323	6.3824	15.161	0.773(FY)	0.216(FY)
2,6-dimethylnitrobenzene	81-20-9	151.16	2.91		10.889	6.1091	18.705	0.819(FY)	0.121(FY)
3,4-dimethylnitrobenzene	99-51-4	151.16	2.91	-0.997	12.215	3.865	8.493	0.462(FY)	0.107(FY)
3,5-dimethylnitrobenzene	99-12-7	151.16	2.91		6.4016	1.0466	2.3992	0.193(FY)	0.155(FY)
1,5-dimethyl-2,4-dinitrobenzene	616-72-8	196.16	2.72	-1.739	10.761	4.5637	7.6695	0.607(FY)	<0.149(DO)

*: the most sensitive endpoint

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

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(G.R)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-)。

在 Table 1 中也列出了利用 Dunnett's test 所得到的 NOEC 值，而 EC₁₀ 則是根據最佳化模式所計算求得。在 NOEC 值的比較方面，三種不同參數有著相同 NOEC 值的毒性物質僅有二種(5-烴-2-硝基苯甲醛、3,4,5-三甲氧基苯甲醛)，其它數據大多數是以生長率和細胞密度的變化量為試驗終點的結果較溶氧產生量要來得敏感，而生長率和細胞密度變化量兩種參數的敏感度則是相似的，在生長率方面僅有四種毒性物質(3-溴-4-烴基苯甲醛、2,4-二烴基苯甲醛、2,4-二甲氧基苯甲醛及 3,4-二烴基苯甲醛)之 NOEC 值小於實驗濃度的最小值，而溶氧產生量和細胞密度變化則有 30% 及 45% 的 NOEC 值較實驗時的最低濃度還要來得低。接著在與 EC₁₀ 的比較之下，以溶氧產生量為參數時的 EC₁₀/NOEC 的比值在 0.6370 至 2.235 之間，其中 EC₁₀/NOEC 值>1 的組數有 13 組，佔了 65%；再以生長率來討論時可以發現到，也是有 14 組的物質 EC₁₀/NOEC 比值>1，約由 0.6970 到 3.385 之間，佔了 70%；但是，若以細胞密度變化量來看的話，卻有 10 組數據的 EC₁₀/NOEC 比值>1，佔了 50%，值約在 0.3660-1.555 之間。當其比值>1 時則是顯示出 NOEC 會比 EC₁₀ 敏感，而造成比值大於 1 的原因可能與毒物濃度設定有關，即較佳的實驗濃度設定可降低分析結果之差異。由此即可看出三種不同參數皆表現出 NOEC 值較 EC₁₀ 值來得敏感，在生物毒性評估中能提

供較好的保護。

為了更進一步了解在低影響濃度間敏感性之差異性，進而將本研究所得之各種低影響濃度(EC₁₀、NOEC、LOEC)進行敏感性之比較。在三種反應終點當中以 EC₁₀ 為低影響濃度中最具敏感性之參數，其次之敏感性參數為 NEC，而最不具敏感性之參數為 LOEC。

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*)及鰱魚(*Fathead minnow*)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、依序為鰱魚、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* (2003)亦在針對烴基苯甲醛類(hydroxybenzaldehydes)進行鰱魚之毒性試驗中，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，由於溶氧產生量受光氧化作用影響，因此採用細胞密度變化量及生長率進行 QSAR 之回歸，其結果為：

$$\text{Log}(1/\text{EC}50)_{\text{FY}} = 0.970\log\text{Kow} + 0.2702 \quad (1)$$

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

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

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

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：

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

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

$$\text{Log}(1/\text{EC50})_{\text{G.R.}} = 0.9152\log\text{Kow} + 0.091 \quad (5)$$

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

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。

苯胺及其衍生物(Anilines)

Table1 列出本研究中所進行的硝基苯胺類化合物毒性試驗基本特性及 EC50 值，由結果顯示，在三個不同實驗終點下，最敏感的為 ΔDO 與 final yield (各佔 50%)，growth rate 則為最不敏感的實驗終點。由各化學物質的 EC50 值可知，而且當取代基的建結位置不同時會產生不同的毒性結果，此 14 個化學物質中，以 DO 為觀測終點時，3,5-dinitroaniline 所顯示的毒性最高 (0.799 mg/L)，4-nitro-1,2-benzenediamine 毒性最低 (31.119 mg/L)；若以 final yield 為觀測終點之結果而言，毒性最高者亦為 3,5-dinitroaniline (0.453 mg/L)，毒性最低者為 3-nitroaniline (42.025 mg/L)；在生長率部分則是在 2,6-dinitroaniline 所觀察到的毒性最高 (0.794 mg/L)，4-nitro-1,2-benzenediamine 毒性最低 (176.71 mg/L)。針對本研究中單一硝基苯胺 (mono-nitroanilines) 的毒性試驗結果可知，當間位接有硝基取代基時，其毒性略較硝基接在鄰位與對位者來得低 (3-nitroaniline < 2-nitroaniline $\approx$ 4-nitroaniline)；除此之外，再本研究中也可發現，在相似結構的硝基苯胺化合物上，若是在同一位置接上胺基時，其

對藻類所產生的影響較在同一位置接上甲基的化合物來得高 (2-nitro-1,4-benzenediamine > 4-methyl-2-nitroaniline; 4-nitro-1,3-benzenediamine > 2-methyl-5-nitroaniline)，造成此結果的原因，有可能是因為與甲基相較，硝基本身是一個強 π 電子接受者，容易搶走苯環上的電子造成苯環上的電子密度降低，而造成較高的毒性。就硝基芳香族而言，苯環上具有較多硝基取代基者，較單一硝基取代基者具活性。[10]

由 Table 1 亦可發現，當苯環上的硝基取代基個數越多時，毒性也會隨著硝基的個數增加。由毒性反應機制的角度而言，Schmitt et al. (2000) 指出含有硝基的芳香族化合物對於水體生物的毒性作用是高於基線毒性的，這與此類化學物質的親電性本質有很大的關係。當硝基取代基存在時，苯環上的碳原子親核性會增加，而增加其反應性，毒性也會相對增加。Russom et al. (1997) 針對 *F. minnow* 所討論的毒性作用機制一文中也提到，大部分的苯胺類在毒性作用機制上是屬於極性麻醉性 (polar narcosis) 的化合物，當苯胺類化合物接上一個硝基 (mono-nitroaniline) 時，其毒性會略高但仍是偏向於極性麻醉性的毒性作用機制，若是苯胺的苯環上帶有超過一個以上得硝基者，其毒性會增強，且作用機制將會由極性麻醉性改變為反應性機制中的氧化磷酸非偶合反應，此毒性作用為破壞細胞體內的磷酸化過程，與原本的極性麻醉性作用方式完全不同，本研究所得的結果亦與其相符。近年來由於環保意識抬頭，世界各組織也針對一些環境生態風險評估方面提出一些規範與評斷標準，根據 OECD 在 1997 年針對化學物質對於水體生物的影響提出毒性等級得評估方案，將化學物質對於水體生物的毒性影響以 EC50 值 (單位 :mg/L) 作為評判標準分為四級：“not harmful” ($\text{EC50} > 100 \text{ mg/L}^{-1}$)；“harmful” ($10 < \text{EC50} \leq 100 \text{ mg/L}^{-1}$)；“toxic” ($1 < \text{EC50} \leq 10 \text{ mg/L}^{-1}$)；及“very toxic” ($\text{EC50} \leq 1 \text{ mg/L}^{-1}$)。[15] 依照此標準區分，本研究中所選擇的化合物有 7 個被分在 harmful，5 個被分在 toxic，而 2,6-dinitroaniline 以及 3,5-dinitroaniline 兩個化合物更是被區分在 very toxic 的等級，其中，被分在有害 (harmful) 的 7 個化學物質都是屬於只含有單

一個硝基取代基的化合物者，這也應證了先前所述當硝基取代基增加毒性也會跟著增加的說法。由 OECD 所提的毒性分級評斷，此類化合物對於水體生物存有一定程度的影響與傷害，而且此類化學物質具有生物累積性、致癌性以及致突變性之特性，若是經由食物鏈之傳遞，勢必對整個生態環境以及人體健康產生影響，因此對此類物質的毒性評估是值得被關注的。

現今世界各組織逐漸開始著重環境風險之評估，因而許多學者都對於生物種的低影響濃度進行研究，為了更進一步了解在不同低影響濃度之間的差異性，進而將本研究之各低影響濃度進行敏感性之比較。Table 1 也列出本研究所得再低影響濃度的實驗結果，由濃度敏感性比較結果可以得知: NOEC 優於 EC10 優於 LOEC，因此在選定做環境風險評估時，使用 NOEC 為環境保護標準之準則較優於 EC10。除此之外，為了評估慢毒性影響，利用 ACR(acute and chronic values, EC50/EC10) 值以急毒性數據來推估慢毒性的影響，本研究三個實驗終點下的 ACR 值範圍為 3-110，平均約 14-30，Roex(2000)的研究指出，ACR 值在各種不同毒性作用機制下會有不同的結果，「極性麻醉性 (9.8±11.8)，反應性 (17.31±26.6)」，對照本研究的結果範圍大多落在極性麻醉性與反應性之間，這可能是因為本研究選用的化學物質作用機制較為複雜，且橫跨不同作用機制所造成的。

毒性試驗所選用的生物種會隨著實驗用基質(營養鹽)成分、試驗時間長短與物種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。

本研究選用的化合物文獻數據較為缺乏，Table 2 以密閉式藻類毒性試驗(Δ DO、Final yield 及 Growth rate)與其他藻類、海洋性發光菌(Microtox)、水蚤(Daphnia magna)、鱖魚(Fathead minnow)、纖毛蟲(Tetrahymena

pyriformis)及蝦子 (Crangon Septemspinosa) 所得試驗結果做比較，結果顯示本研究具有良好的敏感性: algae(Final yield) > algae(DO production) > Daphnia magna > Microtox > algae(Growth rate) > ciliate(Tetrahymena pyriformis) > Fathead minnow。Vaal et al.(1997a,b)在 Daphnia 的毒性試驗中指出，Anilines 在 Daphnia 生物體中有特殊的生化反應存在，因而在水體生物的毒性測試結果中，Daphnia 對於苯胺類化合物的反應較其他生物體來的明顯，由 Table 2 可知，本研究所得結果(以 DO 與 FY 來看) 敏感度大多優於或是近似 Daphnia 之數據，有可能是因為硝基苯胺類化合物揮發性高，且本研究採用的是完全密閉式的實驗系統，可減少毒物之揮發逸散，降低毒性低估之情形。

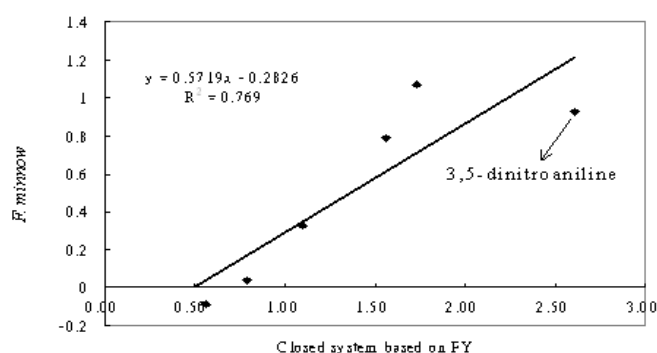


Figure 2 the relationship between $\log(1/EC50)_{FY, \text{nitroaniline}}$ and $\log(1/EC50)_{F.minnow}$

鑒於各種生物毒性試驗所耗費的時間及金錢都不相同，為了節省時間與金錢，“替代物種(interspecies)”的概念逐漸被提出討論，也就是說，當兩個不同物種對毒性物質的相關性很好時，即可利用該物種數據來推估該化合物在另一物種上可能產生的影響程度。結果發現與 Fathead minnow 之數據有較良好的相關性(如 Figure 2)：

$$\log(1/EC50)_{F.minnow} = 0.571 \log(1/EC50)_{FY} - 0.280 \quad (6)$$

$n=6, R^2=0.769, Q^2=0, s=0.273, F=13.30, p=0.022$

由 Fig. 2 可發現一個明顯的 outlier—3,5-dinitroaniline，將此 outlier 去除後，相關性有明顯的上升：

$$\log(1/EC50)_{F.minnow}=0.976 \log(1/EC50)_{FY}-0.689 \quad (7)$$

$$n=6, R^2=0.985, Q^2=0.944, s=0.015, F=194.48, p=0.001$$

由此可知，本研究硝基苯胺類化合物之毒性與 *F. minnow* 的相關性佳，而魚類的毒性試驗所耗費的時間長，所需的實驗空間大且操作複雜，耗費的金錢也較多，而本研究之密閉式藻類毒性試驗方法具有實驗時間短、簡單、省錢等特性，可以作為 *F. minnow* 的替代物種使用，以更簡便之方法及本研究現有之數據推估對於鱒魚之毒性。有文獻指出，硝基芳香族類被認定為對斜生柵藻 (*Scenedesmus obliquus*) 之毒性作用機制偏向於親電性之反應 (Yan et al., 2005)，但是此類化合物作用機制複雜，不同研究對其毒性分類亦有所差異，因此在 QSAR (Quantitative Structure—activity Relationships) 模式之建立遭遇到瓶頸，選用 $\log K_{ow}$ 、 E_{LUMO} 、 E_{HOMO} 、 ΔE 等參數皆無法得到良好的結果，這可能與本研究選定的物質作用機制太複雜有關，或是要挑選更能代表此類化合物特性之參數，才有辦法求出較佳的 QSAR 方程式。

硝基甲苯化合物(Nitrotoluenes)

本研究中亦針對 15 種硝基甲苯化合物進行毒性試驗，由 Table 1 結果顯示，在所測試的 15 種硝基甲苯化合物中，毒性最高者為 3,4-dinitrotoluene，毒性最低者則為 2,3-dimethylnitrotoluene，若以 Zucker(1985) 以化合物對水體生物所造成危害的程度所做的毒性分級來看，其將化學物質的危害依照 the median effective concentration value (EC50 值) 分為五級： $<0.1\text{mg l}^{-1}$, very highly toxic; $0.1-1.0\text{mg l}^{-1}$, highly toxic; $>1.0-10\text{mg l}^{-1}$, moderately toxic; $>10-100\text{mg l}^{-1}$, slightly toxic; $>100\text{mg l}^{-1}$, practically non-toxic，而這些硝基甲苯化合物屬於輕微毒性(slightly toxic)至高毒性(highly toxic)之化學物質(slightly toxic：3 個；moderately toxic：9 個；highly toxic：4 個)，由此可知，此類化合物對水體生物有一定程度的危害。Schmitt et al.(2000)指出，韓有硝基的芳香族化合物會因還原反應使得在苯環上的碳原子親核性增加，其中 nitrobenzene 即為親電性毒性化合物的代表物

質，本研究所選用的硝基甲苯化合物即為此類化合物之衍生物，研究中亦指出，親電性化合物大多具有生物累積性，甚至致癌性及誘導基因突變之特性，一但此類物質在環境水體中存在，再經由食物鏈之傳遞，將會危害到水體環境中較高等的生物，甚至是陸生動物集人體健康。

本研究中利用藻類毒性試驗的三個不同試驗終點(DO、FY 及 GR)來了解此類化合物對藻類所造成的影響程度。由 Table 1 所表示的結果可以發現，在所得的實驗結果中，最敏感的試驗終點為 FY(86.67%)，其次為 DO(13.33%)，最後則為 GR，因此，在後續的討論中則以 FY 為主進行探討。

Lang et al.(1996)對鯉魚毒性研究中指出，就硝基芳香族而言，在苯環上具有較多硝基取代基者較單一硝基取代基者更具有活性，也就代表其毒性會越高。由 Table 1 可以發現，具有兩個硝基取代基的硝基甲苯毒性，大致上是高於只含有單一個硝基取代基的硝基甲苯化合物，此結果與鯉魚毒性文獻之結果相符合。另外，由 Table 1 也可發現，對於單一硝基的甲苯同分異構物而言，間位硝基甲苯(3-nitrotoluene)的毒性較鄰位(2-nitrotoluene)與對位硝基甲苯(4-nitrotoluene)來得低一些。

為了能夠使得水體生態環境得到較佳的保護，本研究也對於低影響濃度的影響做初步的評估，利用毒性試驗結果所得的 EC10 及 NOEC 值來評估硝基甲苯類化合物在低濃度存在情況下對藻類所造成的影響。以 Table 1 中 FY 的試驗結果來看，NOEC 與 EC10 相較之下 NOEC 為較敏感之試驗終點(佔 73.33%)，也就是說，在環境風險評估中，以低影響濃度做為評估該化學物質對水體環境之危害時，NOEC 比 EC10 更能對水體環境提供更好的保護。除此之外，在毒性作用機制分類上，Roex(2000)指出，ACR 值在各種不同毒性作用機制下會有不同的結果(極性麻醉性： 9.8 ± 11.8 ；反應性： 17.31 ± 26.6)，而本研究對於硝基甲苯化合物的毒性結果 ACR 值範圍落在 2.84~99.59(包含三種不同試驗終點

Table 2 Comparison of algal toxicity test results with other species

Chemicals	Algae (BOD bottle)(48hr)			Daphnia	Microtox	T.pyriformis	F.minnow
	Δ DO	F.Y.	G.R.	48hr	15min	40hr	96hr
	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/IGC ₅₀)	Log(1/LC ₅₀)
Benzaldehydes							
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	0.8710	1.152	0.8650	0.603 ^a	0.618 ^b	0.0150 ^c	0.242 ^d
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	1.286	1.498	1.250	0.282 ^a	1.096 ^b	-	-
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	0.9540	1.047	0.749	0.211 ^a	-0.478 ^b	-	-
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	1.140	1.329	1.001	0.195 ^a	-	-	-
3,4-dimethoxybenzaldehyde	0.0240	0.4110	0.0110	0.151 ^a	0.030 ^b	-	-
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	1.123	0.5930	0.4510	0.499	0.180 ^b	-0.030 ^c	0.426 ^d
Benzaldehyde	1.367	0.2460	0.1130	0.344	1.035 ^b	-0.196 ^c	1.145 ^d
4-Nitrobenzaldehyde	1.660	1.646	1.400	-	-	0.203 ^c	1.180 ^d
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	0.990	1.005	0.8840	-	-	0.515 ^c	1.023 ^d
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	1.656	1.830	1.455	-	-	-	1.227 ^d
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	1.004	1.066	0.9200	-	-	-0.056 ^c	0.917 ^d
3,4-dihydroxybenzaldehyde	1.542	1.139	0.7450	0.668 ^a	0.600 ^b	0.107 ^c	-
4-Chlorobenzaldehyde	0.9590	1.080	0.8860	-	0.780 ^b	0.400 ^c	1.810 ^d
2,5-dimethoxybenzaldehyde	0.6830	0.7910	0.5520	0.972 ^a	-0.237 ^b	-	-
2,5-dihydroxybenzaldehyde	1.610	1.417	1.093	0.821 ^a	0.535 ^b	0.277 ^c	-
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	2.13	2.221	2.085	1.745 ^a	1.544 ^b	1.107 ^c	2.189 ^d
4-(dimethylamino)benzaldehyde	0.7310	0.8960	0.6630	-	1.876 ^b	0.231 ^c	0.510 ^d
4-bromobenzaldehyde	1.123	1.182	1.070	-	0.778 ^b	0.587 ^c	-
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	1.377	1.443	1.227	-	-	0.329 ^c	0.600 ^d
4-ethoxybenzaldehyde	1.009	1.102	0.8180	-	1.169 ^b	0.073 ^c	0.728 ^d
Nitroanilines							
2-nitroaniline	1.13	0.68	0.04	1.12 ^e	0.71 ^f	0.08 ^g	-
3-nitroaniline	0.79	0.52	0.21	0.82 ^e	0.21 ^f	0.03 ^g	-

Table 2 (continue)

Chemicals	Algae (BOD bottle)(48hr)			Daphnia	Microtox	T.pyriformis	F.minnow
	Δ DO	F.Y.	G.R.	48hr	15min	40hr	96hr
	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/IGC ₅₀)	Log(1/LC ₅₀)
4-nitroaniline	0.96	0.79	0.20	0.87 ^e	0.97 ^f	-	0.04 ^g
2,4-dinitroaniline	1.64	1.73	0.83	1.28 ^e	0.71 ^f	0.53 ^g	1.07 ^g
2,6-dinitroaniline	2.34	2.58	2.36	-	0.21 ^f	-	-
3,5-dinitroaniline	2.37	2.61	2.26	1.12 ^e	0.97 ^f	-	0.93 ^g
2-methyl-5-nitroaniline	0.77	1.10	0.71	0.83 ^h	0.71 ^f	-	0.33 ^h
4-methyl-2-nitroaniline	1.14	1.56	1.05	-	0.21 ^f	0.36 ^h	0.79 ^h
Nitrotoluenes							
2-Nitrotoluene	0.90 ⁱ	1.07 ⁱ	0.84 ⁱ	0.93 ⁱ	0.57 ⁱ	0.91 ⁱ	0.12 ⁱ
3-Nitrotoluene	0.88 ⁱ	0.98 ⁱ	0.78 ⁱ	1.27 ⁱ	0.73 ⁱ	0.74 ⁱ	0.24 ⁱ
4-Nitrotoluene	1.24 ⁱ	2.00 ⁱ	1.58 ⁱ	1.50 ⁱ	0.76 ⁱ	0.90 ⁱ	0.41 ⁱ
2,3-Dinitrotoluene	2.17 ⁱ	2.36 ⁱ	2.13 ⁱ	1.59 ⁱ	2.03 ⁱ	-	-
2,4-Dinitrotoluene	1.38 ⁱ	1.86 ⁱ	1.25 ⁱ	0.84 ⁱ	0.87 ⁱ	0.45 ⁱ	0.75 ⁱ
2,5-Dinitrotoluene	2.20 ⁱ	2.29 ⁱ	1.72 ⁱ	1.73 ⁱ	2.15 ⁱ	-	-
3,4-Dinitrotoluene	2.19 ⁱ	1.94 ⁱ	1.30 ⁱ	1.77 ⁱ	2.08 ⁱ	-	1.52 ⁱ
3,5-Dinitrotoluene	1.73 ⁱ	1.11 ⁱ	0.51 ⁱ	0.61 ⁱ	0.91 ⁱ	-	-
2,3-dimethylnitrobenzene	0.52 ⁱ	1.39 ⁱ	0.85 ⁱ	1.56 ⁱ	-	-	0.56 ⁱ
2,6-dimethylnitrobenzene	1.14 ⁱ	1.39 ⁱ	0.91 ⁱ	-	-	-	0.30 ⁱ
3,4-dimethylnitrobenzene	1.09 ⁱ	1.59 ⁱ	1.25 ⁱ	0.98 ⁱ	-	-	-

DO: Dissolved Oxygen; F.Y.: Final Yield; G.R.: Growth Rate

The units of EC₅₀, LC₅₀, IC₅₀ are mmol/L; -: no data

a: Lijun Jin et al. (1998); b: Lijun Jin et al. (1999); c: Netzeva T.I. and Schultz T.W. (2005); d: Russom C.L. et al. (1997); e: Zhao et al. (1997); f: Yuan, X. et al. (1997); g: Bearden and Schultz (1997); h: Ecotox database from USEPA; i: Database from OECD (Q)SAR Application Toolbox

的實驗結果),表示此類化合物的作用機制也是介於麻醉性物質與反應性物質之間,這與本研究選定的此類化合物結構有直接的關係,本研究選定的硝基甲苯類的化合物都是屬於其結構在苯環上只有硝基與甲基兩種

取代基之存在,如同先前所提,硝基本身是強拉電子的取代基作用方式,會使的苯環上碳原子的親核性增加而增加該化合物毒性,但若是與甲基同時存在時,文獻中指出,當硝基與甲基在苯環上以鄰位的方式同時存在時,其毒性則會比在其他位置的來的低,這樣的結果可能來自於硝基與甲基電性上的相互制衡,以及因兩個取代基同時存在時所造成的空間位阻所造成的影響結果。

本研究也藉由文獻數據之蒐集了解硝基甲苯化合物對水體生物所造成之影響,在此類化合物的水體毒性研究大多著重在發光菌、無脊椎動物(如水蚤、纖毛蟲)及魚類,對於藻類的數據則是相對之下十分缺乏,由 Table 2 中所整理的文獻數據與本研究所得的毒性結果比較,本研究的 FY 終點下所得敏感性最高,敏感性最低者為 F.minnow,比較結果如下:

algae(Final yield) > algae(DO production) > Microtox > *Daphnia magna* > algae(Grwoth rate)) > ciliate(*Tetrahymena pyriformis*)> Fathead minnow

此結果顯示,除了物種本身的敏感度之外,因為此類化合物劇有半揮發至揮發性的特性,且本研究採用本研究群所開發的密閉式藻類毒性試驗方法進行實驗,減少在試驗過程中所造成的濃度損失及最後毒性低估的情形產生,故可在做水體環境風險評估時提供更高的評估標準。

此外,在物種相關性上,本研究也發現對硝基甲苯類而言,本研究知結果與 *Daphnia*、Microtox 及纖毛蟲之毒性結果並無明顯的相關性,但可以發現本研究之結果與 F. minnow 的實驗結果有一定程度之相關性,Figure 2 為本研究 FY 試驗終點實驗結果與 F. minnow 相關圖,所得的相關方程式 R^2 值可達 0.758,所以當此兩物種在這類化合物毒性數據缺乏時,可以利用此相關性初步評估其毒性。

本研究也嘗試利用物化參數球出適合此類化合物的 QSAR 模式,此次毒性數據與其他參數值

之間的相關性並不佳,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(橫跨麻醉性與反應性化合物),使其毒性差異性太大,因而造成無法找出良好的相關性。

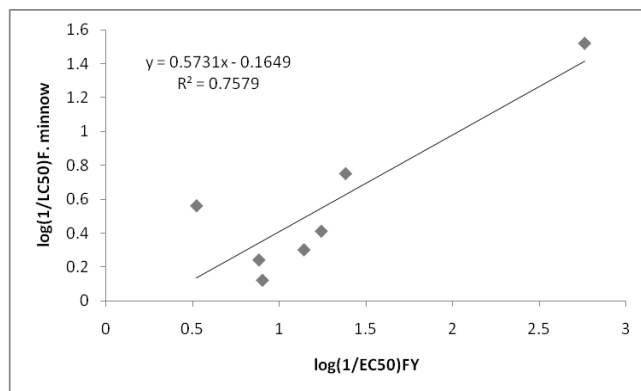


Figure 3 the relationship between $\log(1/EC50)_{FY}$, nitrotoluene and $\log(1/EC50)_{F.minnow}$

四、結論

綜合本研究三年之試驗及研究結果,針對 50 種有機芳香族化合物(包含 20 種苯甲醛、15 種苯胺及 15 種硝基甲苯)進行密閉式之藻類毒性試驗,此三類芳香族化合物之毒性介於輕度毒性至高毒性之化學物質,且發現在三種不同實驗終點下,最敏感的反應終點為細胞密度變化量及溶氧產生量,而敏感性最差之反應終點為生長率;另外,就同分異構物的觀點而言,苯環上的硝基位於間位者,毒性較位於鄰位及對位者來得低,顯示苯環上的取代基在不同位置時毒性也會不同。除此之外,苯環上具有較多硝基取代基者,較單一硝基取代基者具活性,相對的毒性也會隨之提高。

除此之外,藉由求得的低影響濃度 EC_{10} 及 NOEC、了解芳香族化合物在低濃度條件下對於藻類的毒性影響,以此低濃度毒性數據結果的敏感性而言,NOEC 敏感性最高, EC_{10} 則較低,就風險評估之考量而言,NOEC 值比其他兩種數值能提供對環境水體生物更佳的保護標準。

將本研究之結果與其他生物種進行毒性綜合比較,可以發現本研究(藻類)其敏感性最高,敏感性最差者為纖毛蟲。在這 50 個芳香族

化合物試驗結果，與其他物種的相關性並不佳，以苯胺類及硝基甲苯個別與 *F. minnow* 的毒性數據做相關性回歸，可發現兩者之間有一定程度之相關，所以我們嘗試將所有含有硝基的芳香族化合物之毒性數據與 *F. minnow* 的文獻數據做回歸，可得到：

$$\text{Log}(1/\text{LC50})_{F.\text{minnow}} = 0.641\text{log}(1/\text{EC50})_{FY} - 0.508, \\ n=14, R^2=0.652 \quad (8)$$

故，可以發現本研究對含有硝基的芳香族化合物的實驗結果，與魚類試驗之結果有不錯的相關性。

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。唯一較佳的 QSAR 模式為針對 8 種烴基苯甲醛利用 logKow 進行 QSAR 之回歸分析所得的結果，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)。

五、參考文獻

- American Society for Testing and Materials (ASTM), Standard Guide for Conducting Static 96h Toxicity Tests with Microalgae. Annual Book of ASTM Standards. ASTM E1218-90. Philadelphia, PA. 1994.
- Arensberg, P., Hemmingsen, V.H., Nyholm, N., 1995. A miniscale algal toxicity test. *Chemosphere*. 30, 2103-2115.
- Atkins, P.W., 1994. Physical chemistry. Oxford University Press. 497.
- Bailey, R.A., Clark, H.M., Krause, S., Strong, R.L., 1978. "Atmospheric chemistry" Chemistry of the Environment. Academic Press. New York.
- Bearden A.P and Schultz T.W. (1997) Structure-activity relationships for Pimephales and Tetrahymena: A mechanism of action approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(6), 1311-1317.
- Brack, W., Rottlern, H., 1994. Toxicity testing of highly volatile chemicals with green algae. *ESPR*. 4, 223-228.
- Brown, W.H., 1997. Introduction to Organic Chemistry, Saunders College Publishing. Harcourt Brace & company. FL. USA.
- Blum, D.J.W., Speece, R.E., 1991. A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *J. WPCF*. 63, 198-207.
- Chen, C.Y., 1994. Theoretical evaluation of the inhibitory effects of mercury on algal growth at various orthophosphate levels. *Water Research*. 28, 931-937.
- Chen, C.Y., Chao, M.R., 2000. No-observed-effect concentrations in batch and continuous algal toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1589-1596.
- Chen, C.Y., Lin, K.C., 1997. Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environmental Toxicology Chemistry*. 16, 1337-1344.
- Christensen, E.R., Chen, C.Y., 1985. A general noninteractive multiple toxicity model including Probit, Logit, and Weibull transformations. *Biometrics*. 41, 711-725.
- Christensen, E.R., Chen, D., Nyholm, N., Kusk, O., 2001. Joint action of chemicals in algal toxicity tests: influence of response level and dose – response regression model. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2361-2369.
- Corrigendum to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and

- repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union L 396 of 30 December 2006*.
15. Dearden J.C., 2002. Prediction of environmental toxicity and fate using quantitative structure-activity relationships(QSARs). *J. Braz. Chem. Soc.* 13, 754-762.
 16. Dearden, J.C., Cronin, M.T.D., Schultz, T.M., 1995. QSAR study of the toxicity of nitrobenzenes of *Tetrahymena pyriformis*. *Quant. Struct-Act Relat.* 14, 427-432.
 17. Dearden, J.C., Cronin, M.T.D., Zhao, Y.H., 2000. QSAR Studies of Compounds Acting by Polar and Non-polar Narcosis: an Examination of the Role of Polarisability and Hydrogen Bonding. *Quant. Struct. Act. Relat.* 19, 3-9.
 18. Di Marizo W.D., Galassi, S., Todeschini, R., Consolaro, S., 2001. Traditional versus WHIM molecular descriptors in QSAR approaches applied to fish toxicity studies. *Chemosphere.* 44, 401-406.
 19. Di, M.W., Saenz, M.E., 2004. Quantitative structure-activity relationship for aromatic hydrocarbons on freshwater fish. *Ecotox. Environ. Safe.* 59, 256-262.
 20. Dimitrov, S., Koleva, Y., Schultz, T.W., Walker, J.D., Mekenyan, O., 2004. Interspecies quantitative structure-activity relationship model for aldehydes: aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2), 463-470.
 21. Ensley, H.E., Sharma, H.A., Barber, J.T., Polito, M.A., 1997. *Metabolism of chlorinated phenols by Lemna gibba, Duckweed*. In E.L. Kruger, T.A. Anderson, and J.R. Coats (eds.), *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, American Chemical Society. Washington. DC.238-253.
 22. Escher, B.I., Schwarzenbach, R.P., 2002. Mechanistic studies on baseline toxicity and uncoupling of organic compounds as a basis for modeling effective membrane concentration in aquatic organisms. *Aquatic Science.* 64, 20-35.
 23. European Commission. 1992. Council Directive 92/32/EEC of 5 June 1992 amending for the seventh time Council Directive 67/548/EEC. *Official Journal of European Communities L152*. Brussels, Belgium
 24. Fan, C.S., Stauffer J.F., Umbreit W.W., 2006. An experimental separation of oxygen liberation from carbon dioxide fixation in photosynthesis by chlorella. *The Journal of General Physiology.* 27, 15-28.
 25. Franks, N.B., Lieb W.R., 1990. Mechanisms of general anesthesia. *Environ. Health Perspectives.* 87, 199-205.
 26. Fessenden, R.J., Fessenden, J.S., Logue, M.W., 1998. Organic Chemistry. 6th edition Brooks/Cole Publishing Company. A Division of International Thomson Publishing Inc. ISBN 0-534-35199-9. CA. USA.
 27. Galassi, S., Vighi, M., 1981. Testing toxicity of volatile substances with algae. *Chemosphere.* 10, 1123-1126.
 28. Glendon, D., Sinks., Schultz T.W., 2001. Correlation of *Tetrahymena* and *Pimephales* toxicity: evaluation of 100 additional compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (4), 917-921.
 29. Halling-Sørensen, B., Nyholm, N., Baun, A., 1996. Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with CO₂ enriched headspace. *Chemosphere.* 32, 1513 – 1526.
 30. Hansch, C., Maloney, P.P., Fujita, T., Muir, R.M., 1962. Correlation of the biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition

coefficients. *Nature*. 194, 178-180.

31. Herman, D.C., Inniss, W.E., Mayfield, C.I., 1990. Impact of volatile aromatic hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the freshwater alga *Selenastrum Capricornutum*. *Aquatic. Toxicology*. 18, 87-100.
32. Henschler, D., Schleder, E., 1986. Structure-activity relationships of α,β -unsaturated carbonylic compounds. IARC. 70, 197-205.
33. Hermens, J.L.M., 1990. Electrophiles and acute toxicity to fish. *Environ. Health. Persp.* 87, 219-225.
34. Huang, H.J., 2000. Experimental design of the algal toxicity test based on photosynthetic response. A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
35. International Organization for Standardization (ISO), 1987. Water quality- Algal growth inhibition test. Draft International Standard ISO/DIS 8692. Geneva, Switzerland.
36. International Organization for Standardization (ISO), Water quality- Algal growth inhibition test. Draft International Standard ISO/DIS 8692. Geneva, Switzerland. 1987.
37. Jawecki, G.N., Sawicki, J., 1999. Spirotox-A new tool for testing the toxicity of volatile compounds. *Chemosphere*. 38, 3211-3218.
38. Kaiser, K.L.E., Esterby, S.R., 1991. Regression and cluster analysis of the acute toxicity of 267 chemicals to six species of biota and octanol/water partition coefficient. *Sci. Total. Environ.* 109 (110), 499-514.
39. Karabunarliev, S., Mekenyan, O.G., Karcher, W., Russom, C.L., Bradbury, S.P., 1996. Quantum-chemical descriptors for estimating the acute toxicity of electrophiles to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). An analysis based on molecular mechanisms. *Quant. Struct-Act Relat.* 15, 302-310.
40. Kenaga, E.E., 1982. Predictability of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 347-358.
41. Kim, H.K., Kim, J.R., Ahn, Y.J., 2004. Acaricidal activity of cinnamaldehyde and its congeners against *Tyrophagus Putrescentiae*. *Journal of Stored Products Research* 40, 56-63.
42. Kishino, T., Kobayashi, K., 1996. Acute toxicity and structure-activity relationships of chlorophenols in fish. *Wat. Res.* 30, 387-392.
43. Kononen, D.W., Gorski, R.A., 1997. A method for evaluating the toxicity of industrial solvent mixture. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 968-976.
44. Koga, M., Akiyama, T., Glaze, W.H., 1991. Analysis of ozonation by-products produced in drinking water treatment. *Toxicol. and Health.* 7, 423-432.
45. Kuhn, R., Pattard, M., 1990. Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. *Wat. Res.* 24, 31-38.
46. Kubinyi, H., 1993. QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches. VCH Publishers. New York. NY(USA). pp.4-49.
47. Kuhn, R., Pattard, M., Pernak, K., Winter, A., 1989. Results of the Harmful Effects of Selected Water Pollutants (Anilines, Phenols, Aliphatic Compounds) to *Daphnia magna*. *Water. Res.* 23, 495-499.
48. Lang P. Z., Ma X. F., Lu G. H., Wang Y. and Bian Y. 1996. QSAR for the acute toxicity of nitroaromatics to the carps (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 32(8), 1547-1552
49. Länge, R., Hutchinson, T.H., Scholz, N., Solbé, J., 1998, Analysis of the ECETOC

- aquatic toxicity(EAT) database II – Comparison of acute to chronic ratios for various aquatic organism and chemical substances. 36,115-127
50. 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.
51. Lijun, J., Yan, G., Jiayin, D., Linansheng, W., Zhongbo, W., Zheng, Z., 1999. Toxicity of substituted benzaldehydes to *Photobacterium Phosphoreum* and quantitative structure-activity relationship. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 69, 149-156.
52. Lin, J.H., 2001. Experimental design of the algal toxicity test based on BOD bottle. A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
53. Lin, J.H., Kao, W.C., Tsai, K.P., Chen, C.Y., 2005. Anovel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. *Water Res.* 39, 1869-1877.
54. Lipick, R.L., 1991. Outliers: their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity. *Sci. Total. Environ.* 109 (110), 131-153.
55. Lipnick, R.L., Watson, K.R., Strausz, K.A., 1987. A QSAR study of the acute toxicity of some industrial organic chemicals to goldfish, Narcosis, electrophile and proelectrophile mechanisms. *Xenobiotica*. 17, 1011-1025.
56. Lu, G.H., Yan X., Zhao. Y.H. 2001. QSAR study on the toxicity of substituted benzenes to the algae (*Scenedesmus obliquus*). *Chemosphere* 44, 437-440
57. Manaha, S.E., 1990. Environmental Chemistry (4th End). Lewis. Boca. Ration. FL. 414-416.
58. Mazidji, C.N., Koopman, B., Bitton, G., Neita, D., 1992. Distinction between heavy metal and organic toxicity using EDTA chelation and microbial assays. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* 7, 339-353.
59. Mayer, P., Nyholm, N., Verbruggen, E.M.J., Hermens, J.L.M., Tolls, J., 2000. Algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2551–2556.
60. Mayer, F.L., Krause, G.F., Buckler, D.R., Ellersieck, M.R., 1994. Predicting chronic lethality of chemicals to fishes from acute toxicity test data: concepts and linear regression analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 13,671-678.
61. McFarland, J.W., 1970. On the parabolic relationship between drug potency and hydrophobicity. *J. Med. Chem.* 13, 1092-1196.
62. Mckarns, J.W., Hansch, C., Caldwell, W.S., Morgan, W.T., Moore, S.K., Doolittle, D.J., 1997. Correlation between hydrophobicity of Short-chain aliphatic alcohols and their ability to alter plasma membrane integrity. *Fund. Appl. Toxicol.* 36, 62-70.
63. Millington, L.A., Goulding, K.H., Adams, N., 1988. The influence of growth medium composition on the toxicity of chemicals to algae. *Water Research.* 22, 1593-1597.
64. Morales, P., Andersson, M., Lewan, L., Sterner, O., 1992. Structure-activity relationships for unsaturated dialdehydes. 6. The mutagenic activity of 11 compounds in the V78/HGPRT assay. *Mutat. Res.* 268, 315-21.
65. Netzeva, T.I., Schultz, T.W., 2005. QSARs for the aquatic toxicity of aromatic aldehydes from *Tetrahymena* data. *Chemosphere*. 61, 1632-1643.
66. Newman, M.C., McIntosh, A.W., 1991. *Metal Ecotoxicology*. pp.1-26. Lewis, Michigan.

67. Nirmalakhandan, N., Peace, J., Egemen, E., M.Mohsin, S.B., Hall, E., 1996. Estimating toxicity of mixtures of organic chemicals to activated sludge using surrogate test cultures. *Wat. Sci. Tech.* 34, 87-92.
68. Nirmalakhandan, N., Egemen, E., Trevizo, C., Xu, S., 1998. Structure and property-activity relationship models for prediction of microbial toxicity of organic chemicals to activated sludge. *Ecotox. Environ. Safe.* 39, 112-119.
69. Nyholm, N., Damgaard, B.M., 1990. A comparison of the algal growth inhibition toxicity test method with the short term ¹⁴C-assimilation test. *Chemosphere.* 21, 671-679.
70. Nyholm, N., Kälqvist, T., 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 689-703.
71. Okumura, Y., Koyama, J., Takaku, H., Satoh, H., 2001. Influence of Organic Solvents on the Growth of Marine Microalgae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 123-128.
72. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guideline for testing chemicals. No. 201. Alga growth inhibition test. Paris, France. 1984.
73. 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.
74. Persoone, G., Janssen, C.R., 1994. Field validation of predictions based on laboratory toxicity tests. In Hill IR, Heimbach F, Leeuwangh P, Matthiessen P, eds, *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 379-397.
75. Prakash, J., Nirmalakhandan, N., Sun, B., Peace, J., 1996. Toxicity of binary mixtures of organic chemicals to microorganisms. *Wat. Res.* 30, 1459-1463.
76. Que-Hee, S.S., 1993. *Biological Monitoring: An introduction* (Edn). Van Nostrand Reinhold. New York .
77. Ramos, E.U., Vaal, M.A., Hermens, J.L.M., 2002. Interspecies sensitivity in the aquatic toxicity of aromatic amines. *Environ. Toxicol. Pharm.* 11, 149-158.
78. Ramos E.U., Vaes W.H.J., Mayer P., Hermens J.L.M. 1999. Algal growth inhibition of *Chlorella pyrenoidosa* by polar narcotic pollutants: toxic cell concentrations and QSAR modeling. *Aquatic Toxicology* 46, 1-10.
79. Randic, M., 1975. On characterization of molecular branching. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 6609-6615.
80. Roex, E.W.M., Van Gestel C.A.M., Van Wezel A.P., Van Straalen N.M., 2000. Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rate in relation to toxicant mode of action. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 685-693
81. 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.
82. Seward, J.R., Hamblen, E.L., Schultz, T.W., 2002. Regression comparisons of *Tetrahymena pyriformis* and *Poecilia reticulata* toxicity. *Chemosphere.* 47, 93-101.
83. Sitting, M., 1974. "Aldehydes" *Pollution Detection and Monitoring Handbook*. Noyes Data Corp. Park Ridge. New Jersey.
84. Sixt, S., Altschuh, J., Bruggemann, R., 1995. Quantitative structure-toxicity relationship for 80 chlorinated compounds using quantum chemical descriptors. *Chemosphere.* 60, 2397-2414.

85. Sorvari, J., Sillanpaa, M., 1996. Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and DTPA acute toxicity determined by *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 33, 1119-1127.
86. Speece, R.E., 1988. Structure-activity relationships : Quantitative techniques for predicting the behavior of chemicals in the ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 22, 606-615.
87. Sterner, O., Carter, R.E., Nilsson, L.M., 1987. Structure-activity relationships for unsaturated dialdehydes. 1. the mutagenic activity of 18 compounds in the *Salmonella/microsome* assay. *Mutat. Res.* 188, 169-74.
88. Schmitt, H., Altenburger, R., Jastorff, B. and Schüürmann G. 2000. Quantitative Structure-Activity Analysis of the Algae Toxicity of Nitroaromatic Compounds. *Chemical Research in Toxicology* 13, 441-450.
89. Schultz, T.W., 1987. The use of ionization constant(pKa) in selecting models of toxicity in phenols. *Ecotox. Environ. Safety.* 14, 178-183.
90. Schultz, T.W., Sinks, G.D., Bearden, A.P., 1998. QSAR in aquatic toxicology : A mechanism of action approach comparing toxic potency to *Pimephales promelas*, *Tetrahymena pyriformis*, and *Vibrio fischeri*. In : Devillers J, editor. Comparative QSAR. New York : Taylor & Francis. 51-109.
91. Schultz, T.W., Bearden, A.P., Jaworska, J.S., 1996. A novel QSAR approach for estimating toxicity of phenols. *SAR QSAR Environ. Res.* 5, 99-112.
92. United States Environmental Protection Agency(U.S. EPA). 1996. Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. Algal Toxicity, Tiers I and II.
93. Vaal M., Wal J. T., Hermens J . Hoekstra J. (1997a). Pattern analysis of the variation in the sensitivity of aquatic species to toxicants. *Chemosphere*, 35, 1291–1309.
94. Vaal M., Wal J. T., Hermens J . Hoekstra J. (1997b). Variation in the sensitivity of aquatic species in relation to the classification of environmental pollutants. *Chemosphere*, 35, 1311–1327.
95. Verhaar, H.J.M., Van leeuwen C.J., Hermens J.L.M., 1992. Classifying Environmental Pollutants 1: Structure-activity relationships for predication of aquatic toxicity. *Chemosphere*. 25, 471-491.
96. 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 1653-1665.
97. Wang, X., Cheng, S., Wang, L., Han, S., 2001. Quantitative Structure-Activity Relationships: Comparative inhibition of nitrogen-containing aromatics on germination of *Cucumis Sativus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 913-916.
98. Willford, W.A., 1968. Toxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) to fish. *Bur Sport Fish Wildl Invest Fish Control*. 20, 3-8.
99. Yan, X.F., Xiao, H.M., Gong, X.D., Ju, X.H. 2005. Quantitative structure–activity relationships of nitroaromatics toxicity to the algae (*Scenedesmus obliquus*). *Chemosphere* 59, 467–471.
100. Yen, J.H., Lin, K.H., Wang, Y.S., 2002. Acute Lethal Toxicity of Environmental Pollutants to Aquatic Organisms. *Ecotox. Safe.* 52, 113-116.
101. Yuan, X., Lu, G., Lang, P. 1997. QSAR Study for the Toxicity of Nitrobenzenes to River Bacteria and *Photobacterium phosphoreum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 123-127.
102. 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. *The Science of the Total Environment*. 216, 205-215.
103. Zhao, Y.H., Yuan, X., Ji, G.D., Sheng, L.X. 1997. Quantitative Structure-Activity Relationship of Nitroaromatic compounds to four aquatic organisms. *Chemosphere* **34**(8), 1837-1844.
104. Zhao, Y.T., Cronin, M.T., Dearden, J.C., 1998. Quantitative structure- activity relationships of chemicals acting by non-polar narcosis-theoretical considerations. *Quant. Struct. Act. Relat.* 17, 131-138.
105. 林國清，1997，連續式藻類毒性試驗之實驗設計及效能評估，國立交通大學土木工程研究所，博士論文。