

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 98 年 5 月 31 日

## 一、摘要

本篇研究利用一系列硝基苯胺類化合物針對月芽藻 (*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( $\Delta$ DO)做為觀測終點，藉由 Probit 模式求出半致死濃度(50% Effect concentration,  $EC_{50}$ )，並對其毒性試驗結果進行結果分析。

在本研究之三種反應終點當中對於硝基苯胺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。其結果顯示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。

根據 OECD 在針對化學物質對於水體生物的影響做毒性等級評估，以  $EC_{50}$  值作為評判標準，本研究中所選擇的化合物有 7 個被分在 harmful，5 個被分在 toxic，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。

針對低影響濃度進行敏感性之比較，其結果： $NOEC > EC_{10} > LOEC$ 。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，水蚤、蝦子、海洋性發光菌、其他藻類、纖毛蟲，敏感性最差者為鱒魚。此外，與其他物種之相關性比較結果亦可發現，與鱒魚(Fathead minnow)之數據有較良好的關係性，可以作為鱒魚的替代物種使用，可以本研究之毒性結果推估其毒性。

**關鍵詞：**月芽藻、硝基苯胺、半影響濃度( $EC_{50}$ )、低影響濃度

## Abstract

The objective of this study is to assess the toxic effect of nitroanilines (nitroaromatic amines) on *Pseudokirchneriella subcapitata* by a closed system test technique. The effects of nitroanilines were evaluated by three kinds of response endpoints, cell density, algal growth rate, and the dissolved oxygen production. Median effective concentrations ( $EC_{50}$ s) were estimated by Probit model with a test duration of 48hr. The results show that meta-substituted nitroanilines were found to be less toxic than ortho- and/or para-substituted ones. In addition, the toxicities of mono-nitroanilines are lower than those of di-nitroanilines.

Based on OECD guideline, nitroanilines in this study are considered as: "harmful":7, "toxic":5 and "very toxic":2 (2,6-dinitroaniline and 3,5-dinitroaniline). The toxicity of nitroanilines reflects the potential effects to aquatic organisms and should be paid attention in the environmental risk assessment.

The results also reveal that the values of the low effect concentration ( $EC_{10}$ , LOEC and NOEC) of the nitroanilines is  $NOEC < EC_{10} < LOEC$ . This demonstrates that the relative sensitivity is  $NOEC > EC_{10} > LOEC$ . Besides, the experiment results ( $EC_{50}$ ) are compared with literature data derived by various toxicity tests. The order of the relative sensitivity is: algae(Final yield) > algae(DO production) > *Daphnia magna* > Microtox > algae(*Scenedesmus obliquus*) ~ shrimp > algae(Growth rate) > algae(*Chlorella pyrenoidosa*) > ciliate(*Tetrahymena pyriformis*) > Fathead minnow. On the other hand, the toxicity of nitroanilines on *Pseudokirchneriella subcapitata* is demonstrated to be interrelated with the toxicity on Fathead minnow. The algae can be used as the interspecies to Fathead minnow.

**Keywords:** *Pseudokirchneriella subcapitata*, Nitroanilines, Median effective concentration ( $EC_{50}$ ), Low-effective concentration

## 二、研究緣起

自十九世紀初葉工業革命以來，全球工業發展迅速，科技也隨之日益發達，為人類帶來空前的物質享受及無盡的財富；然而，位的達到這個目的，環境資源過度的開發利用，以及人類活動所產生的汙染已經對自然環境造成影響，且破壞了地球生態環境。當這些工業或家庭生活製造的污水被排放到自然環境水體中，不但會破壞水體環境，更會因此影響水質並對人體健康與生活品質產生危害。

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，如此一來，生物評估便成為評鑑水中生態污染情形的首要工具；生物評估可依照營養階層分類，由較高階的魚類、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。

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；且藻類實驗具有方便性、簡易性及高度的再現性，以及其所特有的高敏感性和實驗的準確性，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。

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。

[1][2][3][4]

傳統上利用藻類作為生物指標的監測方法中，大多是批次式開放培養系統作為實驗方法，在這種環境條件下，若試驗化合物具有揮發性，則在試驗期間則可能會因為毒性物質的揮發逸散造成實驗的誤差，進而影響對該物質毒性的判斷；本研究群為了因應此種現象而將試驗方法做了近一步的改善，採用 BOD 瓶製造出密閉環境狀態的毒性試驗方法，對於評估具有揮發性及半揮發性的化學物質有較大的準確性及可信度，利用量測藻類溶氧變化情況 ( $\Delta DO$ )、細胞密度做為試驗終點，了解化學物質對藻類所產生的影響及相對毒性關係。

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，在化學物質種類如此眾多的情形之下，若是藉由實驗針對化合物一一了解其毒性，則極為耗時費力，為了能夠迅速簡單的預估有機物的毒性，故將有機物的物理化學等特性與毒性數據建立統計上的關係，即為 QSAR (Quantitative Structure—activity Relationships)。自 QSAR 發展以來，有機物的毒性大致上可以分為反應性及非反應性，藉由 QSAR 對各種有機物的統計分析，可立即評估毒性物質的毒性作用機制 (Mechanisms of Toxic Action) 以及這一些毒性化學物質可能對環境造成的影響。

硝基苯胺類化合物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，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。

硝基苯胺類是以硝基苯為結構之主體，再另外鍵結胺基而成之化合物（成為硝基苯胺類），分子量自 138.13~228.12，屬於揮發性物質，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，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。

從文獻中可知，許多學者利用各種不同的水體生物針對此類的化學物質作急慢性之研究，包括魚類 (*Fathead minnow*)、水蚤 (*Daphnia*)、海洋發光菌 (*Photobacterium phosphoreum*) 以及綠藻 (*green algae*) 等不同水體生物。<sup>[5-9]</sup> 對於此類化學物質而言，最敏感者為水蚤 (*Daphnia*)，其次為藻類 (*green algae*)，最不敏感者為魚類 (*Fathead minnow*)<sup>[9]</sup>。但此類化合物皆屬於揮發或半揮發性物質，因此很有可能在實驗過程中因逸散造成濃度散失，而在文獻中的藻類毒性試驗，大多採用開放式或具有 headspace 的密閉式試驗方法，因此可能會有揮發散失的情形發生，而降低藻類之敏感度。另外，文獻中也指出，對藻類而言，單一硝基者與疏水性參數相關性佳，但如含兩個硝基以上者，則因作用機制不同而與親電性參數之相關性較好<sup>[10]</sup>

### 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) 是一種廣泛應用於藻類毒性試驗研究之物種，如 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 貯備液分別有 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。

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。<sup>[11]</sup> 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，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<sub>2</sub> 之作用，另外經由曝氣裝置之進流氣體則供應 CO<sub>2</sub> 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±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硝基苯胺類化合物為工業中常用的有機溶劑及原料，此類毒性物質濃度單位皆為 mg/L (Table 1)。由於硝基苯胺類大多為難溶於水之有機物，因此會以水或二甲亞砜 (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。

#### 化學分析

在實驗進行前利用 HPLC 來做貯備溶液的定量。HPLC 所設定的波長 ( $\lambda$  value) 為 254 nm，偵測時間 5 min，注入樣品量 20  $\mu$ L，流速設為 1.0 mL/min。移動相為 50% 醋酸胺溶液:50% 水。

#### 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

( $1.9 \times 10^6$ - $2.2 \times 10^6$  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%  $\text{CO}_2$  的  $\text{N}_2$  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  $\text{CO}_2$  含量，再以 0.1N 的 NaOH 和 HCl 將營養鹽的 pH 值調整至  $7.5 \pm 0.1$ ，完成營養鹽的配製。

Huang et al. (2000)<sup>[11]</sup> 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 ( $\Delta\text{DO}$ )，同時測量瓶中細胞密度以求得藻類生物質量 (Final Yield, FY) 及生長率 (Growth Rate, GR)。

## 數據分析

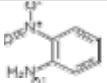
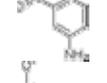
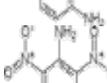
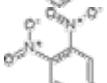
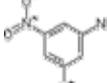
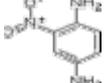
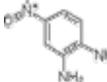
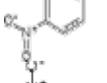
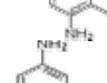
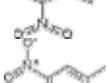
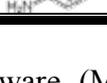
實驗開始前先進行 range finding 測試，濃度範圍須至少橫跨 3 個 order，再逐步縮小至確定的試驗濃度值，確定濃度後，至少進行 2 次的藻類密閉式毒性試驗，當實驗結果的差距在 10% 內才算完成實驗。將實驗所測出之各參數值 (如淨生長細胞數及淨產氧量) 與對應之有機物濃度帶入模式 (probit) 中計算，可得到化合物的劑量-反應曲線及  $\text{EC}_{50}$  值；NOEC 是使用 Dunnett's test (one-tail) 計算所得。

## 四、結果與討論

本研究是利用 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硝基苯胺類化合物進行藻類毒性試驗，分別在實驗前後測溶氧量及細胞密度，作為反應終點；利用求得之數據，計算溶氧變化量 ( $\Delta\text{DO}$ )、最終產率 (Final Yield)、生長率 (growth rate) 作為實驗參數，求得毒性物質之  $\text{EC}_{50}$  值及劑量反應曲線。為由於硝基苯胺類化合物屬於揮發或半揮發性，本試驗進行過程屬於密閉式系統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。

Table 1 所表示的是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  $\text{EC}_{50}$  值，由結果顯示，在三個不同實驗終點下，最敏感的為  $\Delta\text{DO}$  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  $\text{EC}_{50}$  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  $\pi$  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。

Table1. Physical and chemical characteristics of anilines

Chemicals	CAS No.	MW	logK <sub>ow</sub>	E <sub>HOMO</sub>	E <sub>LUMO</sub>	ΔE	Structure	EC50 (mg/L)		
								DO	FY	GR
2-Nitroaniline	88-74-4	138.13	2.02	-9.362	-1.123	8.239		10.320*	28.914	127.55
3-Nitroaniline	99-09-2	138.13	1.47	-9.260	-1.201	8.059		22.286*	42.025	85.933
4-Nitroaniline	100-01-6	138.13	1.47	-9.343	-1.137	8.206		15.121*	22.679	86.305
2,4-Dinitroaniline	97-02-9	183.12	1.84	-9.597	-1.472	8.125		4.200	3.41*	27.39
2,6-Dinitroaniline	606-22-4	183.12	1.29	-9.587	-1.491	8.096		0.829	0.481*	0.794
3,4-Dinitroaniline	610-41-3	183.12	--	-9.542	-1.840	7.702		3.4124	1.6187*	3.9046
3,5-Dinitroaniline	618-87-1	183.12	1.29	-9.463	-1.581	7.882		0.779	0.453*	0.996
2-Nitro-1,4-benzenediamine	5307-14-2	153.14	0.55	-8.922	-1.128	7.794		2.496*	4.146	32.949
4-Nitro-1,2-benzenediamine	99-56-9	153.14	0.55	-8.891	-1.149	7.742		31.119*	41.206	176.71
4-Nitro-1,3-benzenediamine	5131-58-8	153.14	0.55	-9.253	-1.148	8.105		9.906*	13.983	137.28
3-Nitro-o-phenylenediamine	3694-52-8	153.14	1.10	-8.875	-1.151	7.724		14.500	11.480*	72.44
2-Methyl-5-nitroaniline	99-55-8	152.15	2.02	-9.184	-1.193	7.991		26.162	12.210*	30.004
4-Methyl-3-nitroaniline	611-05-2	152.15	2.02	-9.348	-1.239	8.109		3.478*	4.392	10.898
4-Methyl-2-nitroaniline	89-62-3	152.15	2.57	-9.247	-1.139	8.108		11.15	4.1743*	13.636

\*: the most sensitive endpoint

a: E<sub>LUMO</sub>、E<sub>LUMO</sub> and ΔE data from Chemoffice version 5.0 software (MOPAC program, AM1 Hamiltonian)

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。<sup>[10]</sup>

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”(EC50 > 100 mg/L<sup>-1</sup>)；“harmful”(10 < EC50 ≤ 100 mg/L<sup>-1</sup>)；“toxic”(1 < EC50 ≤ 10 mg/L<sup>-1</sup>)；及“very toxic”(EC50 ≤ 1mg/L<sup>-1</sup>)。<sup>[15]</sup> 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。Table2 所列出為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 及 LOEC。除此之外，為了評估慢毒性影響，利用 ACR acute and chronic values) 值以急毒性數據來推估慢毒性的影響，以

Table 2 結果顯示，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，Table3 以密閉式藻類毒性試驗(△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(Scenedesmus obloquue) ~ shrimp > algae(Growth rate) > algae(Chlorella pyrenoidosa) > 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 3 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。

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 1):

Table 2 Low effect concentration of nitroanilines

Chemicals	EC10 (mg/L)			NOEC (mg/L)			LOEC (mg/L)			ACR		
	DO	FY	GR	DO	FY	GR	DO	FY	GR	DO	FY	GR
2-Nitroaniline	0.522	2.486	8.918	<0.98	<0.98	2.95	0.980	0.980	8.850	19.77	11.63	14.30
3-Nitroaniline	1.225	10.3	23.547	<0.983	6.144	15.36	0.983	15.360	38.400	18.19	4.08	3.65
4-Nitroaniline	0.943	2.424	9.033	0.49	0.49	0.49	1.229	1.229	1.229	16.04	9.36	9.55
2,4-Dinitroaniline	0.35	0.13	0.52	0.49	<0.16	0.49	1.480	0.490	1.480	12.00	26.23	52.67
2,6-Dinitroaniline	0.129	0.121	0.251	0.051	0.051	0.15	0.150	0.150	0.460	6.43	3.98	3.16
3,4-Dinitroaniline	0.277	0.339	0.294	1.355	0.151	0.151	4.064	0.452	0.452	12.31	4.77	13.30
3,5-Dinitroaniline	0.154	0.058	0.047	0.11	0.037	0.11	0.329	0.110	0.329	5.06	7.81	21.19
2-Nitro-1,4-Benzenediamine	0.093	0.164	0.632	0.2	<0.20	0.6	0.600	0.200	1.790	26.84	25.28	52.13
4-Nitro-1,2-Benzenediamine	0.547	2.268	11.706	0.247	0.74	2.22	0.740	2.220	6.670	56.89	18.17	15.10
4-Nitro-1,3-Benzenediamine	0.112	0.360	2.0603	<0.20	<0.20	0.2	0.200	0.200	0.590	88.45	38.95	66.63
3-Nitro-o-phentlendiamine	0.63	0.69	2.27	0.899	0.899	0.899	2.697	2.697	2.697	23.02	16.64	31.91
2-methyl-5nitroaniline (2-Amino-4-nitrotoluene)	2.678	1.553	3.867	0.5	0.5	4.5	1.500	1.500	13.500	9.77	7.86	7.76
4-methyl-3-nitroaniline (3-Amino-6-nitrotoluene)	0.032	0.321	1.156	<0.164	<0.164	<0.164	0.164	0.164	0.164	108.69	13.68	9.43
4-methyl-2-nitroaniline (4-Amono-3-nitrotoluene)	1.063	0.495	1.150	0.483	0.483	0.483	1.450	1.450	1.450	10.49	8.44	11.856
							<b>Mean</b>			29.57	14.06	22.33

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

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

由 Fig. 1 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：

$$\log(1/EC50)_{F.minnow} = 0.976 \log(1/EC50)_{FY} - 0.689, \quad (2)$$

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

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

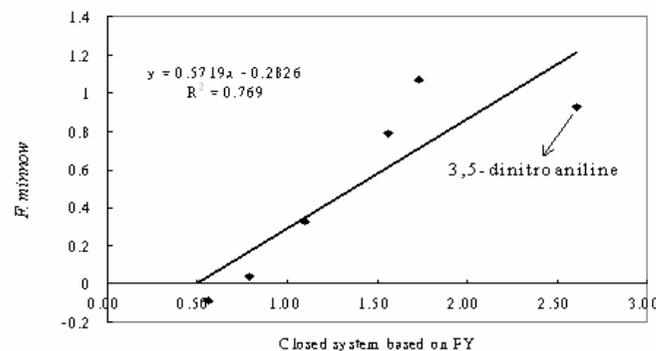


Figure 1 the relationship between  $\log(1/EC50)_{FY}$  and  $\log(1/EC50)_{F.minnow}$

Table 3 Comparison of algal toxicity test results with other species

chemicals	Log(1/EC50, LC50, IC50) (mmole/L) <sup>a</sup>									
	Closed bottle test			Algae		Microtox <sup>d</sup>	Daphnia <sup>e</sup>	Fathead minnow <sup>f</sup>	Ciliate <sup>f</sup>	Shrimp <sup>g</sup>
	DO	FY	GR	<i>Scenedesmus obloquue</i> <sup>b</sup>	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> <sup>c</sup>	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Pimephales promelas</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	<i>Crangon septemspinosa</i>
2-nitroaniline	1.13*	0.68	0.04	0.33		0.71	1.12		0.08	
3-nitroaniline	0.79	0.52	0.21	0.48	0.38	0.21	0.82*		0.03	
4-nitroaniline	0.96	0.79	0.20	0.40		0.97*	0.87	0.04		
2,4-dinitroaniline	1.64	1.73*	0.83	1.68			1.28	1.07	0.53	
2,6-dinitroaniline	2.34	2.58*	2.36							1.16
3,5-dinitroaniline	2.37	2.61*	2.26				1.12	0.93		1.2
2-methyl-5-nitroaniline	0.77	1.10*	0.71				0.83 <sup>g</sup>	0.33 <sup>g</sup>		
4-methyl-2-nitroaniline	1.14	1.56*	1.05					0.79 <sup>g</sup>	0.36 <sup>g</sup>	

\* : the most sensitivity

-: no data; a: The units of EC50, LC50, IC50 are mmol/L; b: Lu, G.H. et al. (2001); c: Ramos et al. (1999); d: Yuan, X. et al. (1997); e: Zhao et al. (1997); f: Bearden and Schultz (1997); g: Ecotox database from USEPA

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 logKow、ELUMO、EHOMO、 $\Delta E$  等參數皆無法得到良好的結果，這可能與本研究所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。

## 五、結論

本研究為針對一系列的硝基芳香族化合物進行密閉式之藻類毒性試驗，結果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。

就低影響濃度結果而言，NOEC 的敏感度優於 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 及 LOEC。藉由 ACR 值與文獻中不同毒性作用機制之 ACR 值做比較，本研究所選用的化合物，其毒性作用機制較為複雜，其毒性應是界於極性麻醉性與反應性之間，與

苯環上硝基取代基的存在有很大的關係。

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)敏感性最高，其他依序為水蚤、蝦子、海洋性發光菌、其他藻類、纖毛蟲，敏感性最差者為鱒魚。此外，與其他物種比較之結果亦可發現，本研究所得結果與鱒魚毒性數據有較佳的相關性，而與其他物化參數值之間的 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所導致的結果。

## 六、參考文獻

1. United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA), 1996. Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. Algal Toxicity, Tiers I and II.
2. International Organization for Standardization (ISO), 1987. Water quality-Algal growth inhibition test. Draft International Standard ISO/DIS 8692. Geneva, Switzerland.
3. American Society for Testing and Materials (ASTM), 1994. Standard Guide for Conducting Static 96h Toxicity Tests with Microalgae. Annual Book of ASTM Standards. ASTM E1218-90. Philadelphia, PA.
4. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 1984. Guideline for testing chemicals. No. 201. Alga growth inhibition test. Paris, France.
5. 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
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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
13. 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.
14. Russom C. L., Bradbury S. P., Broderius S. J. (1997). Prediction modes of toxic from chemical structure: acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (5), 948-967.
15. 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

16. 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
17. 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.
18. 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.