

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 99-2221-E-009-043-MY3

執行期間：99 年 08 月 01 日至 102 年 10 月 31 日

計畫主持人：陳重元

共同主持人：

計畫參與人員：

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 102 年 11 月 22 日

一、摘要

本研究以月芽藻為試驗物種進行密閉式藻類毒性試驗，以溶氧變化量 (ΔDO)、最終細胞產量 (Final Yield) 及生長率 (Growth Rate) 為反應終點，評估親電性物質— α, β -不飽和醇、 α, β -不飽和酯類 (丙烯酸酯類及甲基丙烯酸酯類) 以及不飽和酮類之毒性，並以穀胱甘肽 (GSH, Glutathione) 為親核試劑，針對反應性化合物 (α, β -unsaturated 物質) 進行反應性試驗，以求得之反應常數 k_{GSH} 、RC50，與 $\log K_{OW}$ 探討對毒性之影響，並建立定量結構—活性關係 (QSAR, Quantitative Structure-Activity Relationship)。

試驗結果中顯示，本研究中以反應終點 Final Yield 最為敏感，與其他試驗物種比較亦如此。由 QSAR 之結果顯示，一級炔丙基醇屬麻醉性物質與辛醇與水係數 ($\log K_{OW}$) 具有良好相關性 ($R^2=0.81\sim 0.92$)，二級炔丙基醇當中去除三個炔基接在一的位置之化合物並且使用 $\log K_{OW}$ 以及 E_{lumo} 值對其毒性做迴歸分析，能得到不錯的迴歸效果 ($R^2=0.85\sim 0.93$)；甲基丙烯酸酯類 (扣除反應性高甲基丙烯酸乙酯) 以 $\log K_{OW}$ 為參數適合度最佳， R^2 為 0.88；丙烯酸酯 (丙烯酸酯類與甲基丙烯酸酯類) 以 $\log K_{OW}$ 與 $\log k_{GSH}$ 為參數適合度最佳， R^2 為 0.91，移除 Outlier ($\log k_{OW}$ 為負值之 2-Hydroxyethyl acrylate) 後之 R^2 略為提升為 0.95； α, β -unsaturated ketones 毒性結果分別以 ΔE 與 $\log K_{OW}$ 同時和 RC50 回歸，逸可得到良好相關性 (R^2 分別為 0.91 與 0.88)。

在歐盟水體生物風險分級標準中，本研究所選用的 57 個化合物有 31 個在分級中屬於對環境具有危害性的化學物質，由此可見，對於這些毒性物質的研究是有其必要性的。另外依照物種相關性的研究結果，另外以藻類毒性與纖毛蟲毒性具有良好相關性 ($R^2=0.736$ for (meth)acrylates; $R^2=0.916$ for α, β -ketones)，故月芽藻可做為纖毛蟲之毒性試驗替代物種。

關鍵字：月芽藻、親電性、 α, β -不飽和化合物、穀胱甘肽、反應性、定量結構—活性關係

Abstract

A closed-system algal toxicity test was applied to evaluate the toxicity of 26 propargylic alcohols, 15 α, β -unsaturated esters (6 acrylates and 9 methacrylates) and 16 α, β -unsaturated ketones to *Pseudokirchneriella subcapitata*. Dissolved oxygen production, final yield and growth rate based on cell density were used as the response endpoints. Reactivity assays employing glutathione (GSH) as a model nucleophile to quantify the electrophilic reactivity of α, β -unsaturated chemicals, in terms of k_{GSH} and RC50, the rate constant of reaction between electrophilic and GSH.

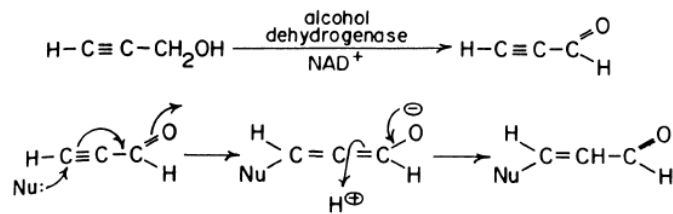
Among all endpoints and other species, final yield was most sensitive to all chemicals in this study. The quantitative structure-activity relationship (QSAR) for primary propargylic alcohols was developed well by 1-octanol/water partition coefficient ($\log K_{OW}$) ($R^2=0.81-0.92$). For the secondary propargylic alcohols, the model has a good fit ($R^2=0.85-0.93$) with the $\log K_{OW}$ and E_{lumo} except three outliers that alkynyl attached to 1-position. The comparison for methacrylates was developed well by $\log K_{OW}$, except highly reactive vinyl methacrylate ($R^2=0.88$). For (meth)acrylates, QSAR was modeled well by $\log K_{OW}$ and $\log k_{GSH}$ ($R^2=0.91$), the predictive power enhanced without outlier, 2-Hydroxyethyl acrylate, which $\log k_{OW}$ value is negative ($R^2=0.95$). ΔE , $\log K_{OW}$ and RC50 values were used as parameters to related to $\log(1/EC50)$ of α, β -unsaturated ketones and the regressions were also good for the above results.

The predictive power R^2 for algal toxicity in this study to predict the toxicity of *Pimephales Tetrahymena pyriformis* were 0.736 for (meth)acrylates and 0.916 for α, β -ketones.

Keywords: α, β -unsaturated alcohols, α, β -unsaturated esters, α, β -unsaturated ketones, *Pseudokirchneriella*, reactivity, glutathione, QSAR

二、研究緣起

目前世界上存有數以千萬計的化學品，其中炔丙基醇為一種有著淡天竺葵 (geranium-like odor) 味道的有機化合物，且應用範圍廣泛。在醫藥業中，炔丙基醇是合成磷霉素鈉，磷霉素鈣，磺胺嘧啶的重要中間體，也用於生產丙烯醛，丙烯醇，維生素 A 等醫藥產品；另外，炔丙基醇也是農藥中主要用合成克顛特 (農藥)，有許多國家每年對於炔丙基醇這一類的物質需求量相當的大，中國每年用在醫藥及農藥行業中炔丙基醇的需求量就在 1200 公噸以上，炔丙基醇也可應用於鋼鐵業中做為抗腐蝕劑及電鍍用添加劑，它也是有機物合成的重要中間體，可用於生產丙烯酸、丙烯醛、維生素 A 等，也可用作除鏽劑，能抑制乙酸、磷酸、硫酸、鹽酸等對鐵銅鎳等金屬的腐蝕；除此之外，炔丙基醇也是重要的除鏽劑，能抑止乙酸、磷酸、硫酸、鹽酸等對鐵、銅、鎳等金屬的腐蝕，被廣泛應用在鋼鐵行業中。除上述之外，炔丙基醇還可應用於石油的開採，也可用作溶劑的穩定劑 (solvent stabilizer)、土壤煙燻劑 (soil fumigant)、除草劑、殺菌劑等，應用十分廣泛。但是文獻中對於這類炔丙基醇類水體生物毒理方面的研究相當少，但近年來此類化學物質運用的範圍越來越廣泛，在商業活動中扮演著重要的角色，因此，對於這類化合物的相關毒性研究也逐漸受到重視，在 2006 年環保署的統計資料發現其用量高達 1268 公噸，而此化合物在 1999 年被列入在第三類的毒性化學物質名單中。就毒性機制分類而言，一、二級炔丙基醇的毒性作用被分類為反應性作用中的前親電性反應。前親電性的物質會因為生物反應 (bioreactivity) 的作用而變成軟親電性 (Bearden and Schultz, 1997)。此類化合物的毒性是因為它會經過一種藉由醇脫氫酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 的酵素使得化合物的結構代謝轉換為 α, β -不飽和之代謝物，此代謝物為 "Michael-type acceptors" (Mekenyan *et al.*, 1993)，之後會經由 Michael reaction 的作用機制被一些生物大分子或是親核基攻擊，如： $-\text{SH}$ ， $-\text{NH}_2$ ， $-\text{NH}$ ， $-\text{OH}$ 基等，如下圖所示 (Lipnick, 1985; Veith *et al.*, 1989)。



所以，此類化合物的反應機制相較於其他一般麻醉性化學物質而言更為複雜，且因其進入生物體與生物體產生生物反應，所以此類化合物對於生物體的危害也相對較大。

α, β -不飽和醇 (α, β -unsaturated alcohols)、 α, β -不飽和酯類—丙烯酸酯類及甲基丙烯酸酯類 (α, β -unsaturated esters—acrylates and methacrylates)，為世界上普遍使用之工業有機化學物質之一，屬於高產量化學物質 (HPV, High Production Volume chemicals) (OECD, 2009)。屬於親電性物質 (electrophile)，其親電性結構特徵：烯基 (C=C) 接於羰基 (C=O) 之上，羰基之拉電子能力活化鄰接之雙鍵，使親核性支鏈於 β -C 上行 Michael addition—親核性加成反應。甲基丙烯酸酯類上之甲基會障礙親核試劑於雙鍵上的加成，因此反應程度會較丙烯酸酯類低 (Schultz *et al.*, 2005; Chan and O'Brien, 2008)。 α, β -不飽和化合物為 Michael 加成反應之接受者，會與富含電子之生物大分子產生反應，對生物體造成不可逆之影響。此類物質被廣泛使用、並流布於環境當中，但卻缺乏適當之毒性數據，因此，以分子結構求得化合物危害影響相關資訊之需求與日俱增 (Schultz *et al.*, 2005; Koleva *et al.*, 2008)。丙烯酸酯對各物種之毒性數據當中，以纖毛蟲、魚類資料最多 (Russom *et al.*, 1988; Karabunarliev *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 2005)，而藻類毒性資料則寥寥無幾 (Cronin *et al.*, 2004)，因此建立此類化合物之藻類毒性資料是必要的。

α, β -不飽和酮 (α, β -unsaturated ketones) 常常被應用於工業製程及生產日常生活用品上然而它也是揮發性有機溶劑的一種，應用於醫藥、油漆、塑料、火藥、樹脂、橡膠、照相軟片等行業在放流水中也常常存在著；酮類與同碳數的醛類相比毒性也較低，但雙酮類例外 (Chen and Hee, 2005)。另外，酮類在自來水消毒程序中也常常被當作臭氧的副產物，或是在不完全氧化與燃燒下的產物，還有被當作代謝產物等 (Chen and Hee,

2005)。α,β-不飽和酮(α,β-unsaturated ketones)屬親電性物質(electrophile)(Russom, 1997)，最常見之毒性作用機制為 Michael-type addition，其在親電性中心有一共價鍵形成，且在分子上不留下離基(Lipnick, 1990)，此作用機制為含羥基具極性且為 α,β-不飽和芳香族化物的主要特性(Schultz and Yarbrough, 2004)，更具體來說，極性 α,β-不飽和芳香族化物被認為經由一個碳負離子中間產物從半胱胺酸之硫氫基加成至乙烯基之β-碳原子上(Cronin *et al.*, 2001)。然而，甲基取代在乙烯基任何一個碳上會導致毒性潛勢降低(Schultz and Yarbrough, 2004)，造成此現象之原因為烷基取代改變電子密度，且抵抗羥基之拉電子基效應並妨礙在烯煙之β-碳原子之加成反應，而親電性交互作用對生物學系統造成非可逆共價改變(Schultz *et al.*, 2007)，這類交互作用包含許多競爭過程尤其在蛋白質中之細胞親核試劑烷基化與芳基化為最常發生之過程(Aptula *et al.*, 2005)。共價鍵之生成為毒性途徑之初始步驟(Schultz *et al.*, 2007)，因此，對這些初始事件多做進一步了解，在引起特殊傷害影響如過量水體毒性之預測化學物潛勢上為重要的關鍵(Russom *et al.*, 1997)。

許多親核性物質 nucleophiles 存在於許多生物大分子(如蛋白質及 DNA)中，如胺基(Amino group, -NH₂)、羥基(Hydroxy group, -OH)及硫醇基(Sulfhydryl group or thiol group, -SH)等(Hermens, 1990)，化學物共價鍵結於重要細胞目標上為反應性毒性之分子起始事件(Molecular initiating event)，此反應引起生物效應如蛋白質變質或免疫上之反應，而對生物體造成不可逆之影響(Schultz *et al.*, 2006)。穀胱甘肽(GSH, glutathione)存在於真核生物之細胞當中，是細胞內濃度最高之抗氧化劑，有抗氧化及協助解毒等功能(Fahey *et al.*, 1987; Ahner *et al.*, 2002)，其為含有硫醇基(thiol group, -SH)之 tripeptide，常作為反應性試驗中之親核物質 nucleophile 以定量化合物之親電反應性(Freidig *et al.*, 1999; Böhme *et al.*, 2009)。

藻類為水體生態系統之主要生產者，佔水體環境食物鏈之重要角色—食物鏈最基層。藻類廣泛分布於水體環境中、生長週期短、適合做為工業廢水之生物活性指標，以及對不同種有機化學

物質有不同反應，為毒性測試物種之理想選擇(Xia *et al.*, 2009)。傳統藻類毒性試驗，大多使用批次式且開放性之系統來進行實驗，對於揮發性有機化學物質，會因為部分化學物質揮發，而造成毒性低估，因此利用Chemostat連續之方式培養藻類，使藻類於槽中穩定生長，並取穩定生長之藻於BOD瓶中進行毒性實驗，利用藻類溶氧變化量、細胞密度做為量測終點，了解化學物質對藻類之毒性影響。因BOD瓶為密閉性系統，故可藉此克服有機物揮發之問題(Lin *et al.*, 2005)。

根據歐盟新化學品政策 REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals)，於歐盟國家每年生產或進口一公噸或一公噸以上之化學品，皆須經過人類及環境之危害評估。若使用危害評估所需毒性資料之現有方法，需使用大量動物來進行毒性實驗，將會耗用大量資源及時間，故需增加定量結構活性關係(QSAR, Quantitative Structure - Activity Relationship)的使用，來評估較低產量之化學物質(Papa *et al.*, 2005; Aptula and Roberts, 2006)，以提高評估效率。對於 acrylates 及 methacrylates，有學者以親電性物質(electrophile)與GSH之反應性為參數建立QSARs(Chan and O'Brien, 2008; Böhme *et al.*, 2009; Freidig and Hermens, 2001; Yarbrough and Schultz, 2007)。

本研究以單細胞綠藻類之月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)為毒性測試物種、以反應性物質 α,β-不飽和酯類—acrylates 及 methacrylates 為毒物，於密閉式 BOD 瓶系統中進行毒性測試。並進行化合物與 GSH 之反應性試驗，以與毒性建立統計上之關係(QSARs)，探討此類反應性物質對生物體造成毒性之毒性作用機制(Mechanism of toxic action)。

三、材料與方法

藻類的培養

本實驗採用的則是浮游植物-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 40-60μm³，

且為 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。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 0.1N 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 (Chen and Lin, 1997)。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

測試毒物包含 26 種炔丙基醇類（一級醇 16 種及二級醇 10 種）、15 種 α, β -不飽和酯類（6 種 acrylates 及 9 種 methacrylates）和 16 種 α, β -不飽和酮化合物，廠牌為 Chem, Sigma-Aldrich, Fluka,

Acros, TCI, Alfa aesar, Merck, J.T.Baker 等，純度皆大於 95%，毒性物質濃度單位皆為 mg/L (Table 1)。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

實驗前會把毒物貯備液 (Stock Solution) 先經由總有機碳分析儀 TOC (Multi N/C 3100, Analytik Jena, Germany) 定量毒物濃度，並且將實驗所測出之各參數值（如淨生長細胞數等）與對應之有機物濃度帶入模式 (Probit) 中計算，得到其劑量-反應曲線及 EC_{50} 值；並且由圖中求得生長曲線之斜率，作為後續討論之用。

密閉式藻類毒性試驗

測試物種為月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*, UTEX 1648)，並使用 Lin *et al.* (2005) 發表之試驗方法。以連續式培養方式培養，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。營養基質參考 U.S. EPA 之標準方法 (USEPA, 1996)，EDTA 濃度為 10%、稀釋率 0.3 /day、空氣曝氣為 400 mL/min，溫度及光照強度為 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 及 $4300 \pm 10\%$ lux。

本研究室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，取連續式培養槽中達穩定態 (Steady state) 之藻液進行實驗，毒性試驗之稀釋水參考 U.S. EPA 建議配製，唯此處無添加 EDTA，以含 0.5% CO_2 的 N_2 氣體對稀釋水曝氣，降低水中的溶氧值並提高 CO_2 含量，並調整 pH 至 7.5 ± 0.1 。以顆粒計數器 (Culter

Electronics, Luton, UK)量測藻類之細胞密度，取適量藻液、稀釋水及毒物加入 300 mL 之 BOD 瓶，瓶中注滿液體並進行水封以確保系統無 headspace 及密閉性，使瓶中之初始細胞密度為 1.5×10^4 cells/ml。每組實驗含 1 控制組(無毒性物質)及 5~7 個毒物濃度之處理組，並進行三重複，BOD 瓶置於震盪頻率為 100rpm 之 orbital shaker (Ferstek, Model S103; Medclub, Hsinchu, Taiwan)，於溫度及光照強度為 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 及 $4300 \pm 10\%$ lux 下進行 48 h 之試驗。本實驗採以溶氧變化(ΔDO)、細胞密度最終產率(FY)及生長速率(GR)為反應終點，求得各毒性物質對月芽藻的毒性反應。

化學反應性試驗 Reactivity assay with GSH

求得化合物與 GSH 反應之 RC_{50} (50% Reactivity Concentration)參考 Schultz *et al.*(2005)發表之方法、並以此方法為主，另參考 Freidig *et al.*(1999)發表方法之試驗時間、溫度及添加抗氧化劑求得 k_{GSH} 。配置 9.38 g/L 之 monobasic potassium phosphate 與 9.98 g/L 之 Anhydrous di-sodium hydrogen phosphate 之混合液，並調 pH 至 7.4，存放於室溫下。以 buffer 配置毒物、GSH 儲備液及指示劑。溶 0.042 g reduced-GSH 於 100mL 之 buffer 中，得濃度為 1.375 mM 之 GSH 儲備液，於每日實驗進行前現配，於 k_{GSH} 實驗中額外添加抗氧化劑 sodium-EDTA，GSH 儲備液中抗氧化劑濃度為 50 μM 。以 buffer 配置 1.98 g/100 mL 之 DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))指示劑，並以 NaOH 調 pH 至 7.4，顏色呈深橘色，存放於 4°C ，使用前須先取出退至室溫。

RC_{50} 實驗(參考 Schultz 等人於 2005 年所發表之方法)：將計算好加藥量之毒物(親電試劑 electrophile)、1 mL 之 GSH 儲備液 (GSH 最終濃度為 0.1375 mM) 分別加入定量瓶中定量至 10 mL，蓋上蓋子混合均勻後，倒入容積為 20 mL 之樣品瓶中存放，並開始計時 (室溫下進行)。每組實驗取五或六個濃度、加上一控制組 (只有緩衝液與 GSH) 及空白 (只有緩衝液)，每組試驗進行二重複。計時 2 小時後，加入 0.2 mL 之 DTNB 指示劑，溫和混合溶液，並於波長 412 nm

下測其吸光值。各濃度親電試劑所測得之吸光值以控制組為基準計算 GSH 衰減率。

k_{GSH} 實驗 (添加抗氧化劑、反應時間及溫度，參考 Freidig 等人於 1999 年所發表之方法)：GSH 初始濃度 0.1375 mM，於 20°C 下進行，acrylates 及 methacrylates 之分別計時 1 及 24 小時後，加入 0.2 mL 之 DTNB 指示劑，溫和混合溶液，每組試驗需二重複，並於波長 412 nm 下測其吸光值，吸光值以 GSH 檢量線 ($r^2 > 0.995$) 轉換成 GSH 之濃度，代入式(1)及式(2)： $C_{\text{GSH},0}$ 、 $C_{\text{GSH},t}$ 分別為 GSH 於 0 及 t 分鐘後之濃度，單位皆為 M，由每單位時間 GSH 濃度之減少得擬一階常數 $k_{\text{GSH,obs}}$ ，此擬一階常數除以初始 electrophile 之濃度 (過量 electrophile，單位為 M)，得反應速率常數 k_{GSH} ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)。

$$k_{\text{GSH,obs}} = \frac{\ln C_{\text{GSH},0} - \ln C_{\text{GSH},t}}{t} \quad (1)$$

$$k_{\text{GSH}} = \frac{k_{\text{GSH,obs}}}{C_{\text{E},0}} \quad (2)$$

數據分析

分子參數 (Descriptor) 中，log K_{ow} 引用自 EPI suite v.4.0 (KOWWIN v1.67 之估計值)；其餘量子化學參數以 MOPAC 2009 之 AM1 Hamiltonian 之方法計算 (Table 1)。毒性物質之 EC_{10} 、 EC_{50} 及 RC_{50} 與濃度—反應關係曲線之斜率與截距以 Probit 模式分析，NOEC (No Observed Effect Concentration) 以 Dunnett's test (單尾檢定) 觀察控制組與處理組間出現顯著差異之濃度而求得。以 Minitab v.15 進行多重線性迴歸，建立 QSAR 模式。 R^2 為確定係數用來評判參數與毒性之間的相關性、 Q^2 為模式之預測能力，由 leave-one-out 方法求得、s 為均方誤差、F 為 Fisher's criterion 用以比較模式之間統計上的顯著性。

四、結果與討論

本研究選用 26 種炔丙基醇類 (一級醇 16 種及二級醇 10 種)、15 種 α,β -不飽和酯類 (6 種 acrylates 及 9 種 methacrylates) 和 16 種 α,β -不飽

Table 1 50%- effects toxicity, low-concentration-effects toxicity and descriptors of chemicals

Chemical	log k _{ow}	E _{LUMO} (eV)	E _{HOMO} (eV)	EC ₅₀			EC ₁₀	NOEC	RC ₅₀	log k _{GSH}
				DO	FY	GR	FY	FY		
Primary propargylic alcohols										
2-propyn-1-ol	-0.4	1.7		25.15	28.9	55.8	8.74	2.56	-	-
2-butyne-1-ol	0.4	1.6		49.84	47.2	67.5	18.62	<5.16	-	-
2-butyne-1,4-diol	-0.7	1.4		1141	464.2	1214	104.4	<55.67	-	-
2-pentyne-1-ol	0.9	1.6		76.2	42.5	109.5	9.2	2.41	-	-
2-hexyne-1-ol	1.4	1.6		68.12	32.2	86.5	5.47	2.43	-	-
2-heptyne-1-ol	2.0	1.6		62.91	38.4	285.2	2.1	<4.99	-	-
2-octyne-1-ol	2.5	1.6		25.07	24.4	78.6	1.52	<2.49	-	-
2-nonyne-1-ol	3.0	1.6		9.7	7.8	21.3	1.68	<0.53	-	-
2-decyne-1-ol	3.5	1.6		1.7	1.4	3.6	0.3	<0.25	-	-
Primary homopropargylic alcohols										
3-butyne-1-ol	-0.2	1.8		367.8	262.3	2263	16.71	9.22	-	-
3-pentyne-1-ol	0.3	1.7		142.1	158.5	492.1	11.39	<12.8	-	-
3-hexyne-1-ol	0.9	1.7		77.78	37.8	89.7	10.01	<6.17	-	-
3-heptyne-1-ol	1.4	1.7		171.5	83.6	525.2	5.16	3.82	-	-
3-octyne-1-ol	1.9	1.7		71.66	40.8	140.5	4.19	1.24	-	-
3-nonyne-1-ol	2.5	1.7		21.42	10.1	16.8	3.7	<1.36	-	-
3-decyne-1-ol	3.0	1.7		5.88	4.8	10.1	1.31	<0.51	-	-
Secondary propargylic alcohols										
1-hexyne-3-ol	1.2	1.7		2.71	1.7	5.9	0.28	<0.48	-	-
1-pentyne-3-ol	0.7	1.7		0.74	0.5	1.0	0.11	0.06	-	-
3-butyne-2-ol	0.1	1.8		8.27	3.6	40.4	0.12	0.20	-	-
3-hexyne-2,5-diol	-0.1	1.4		6.09	1.4	9.5	0.08	0.05	-	-
4-heptyne-2-ol	1.2	2.0		93.83	64.1	218.7	8.55	<12.25	-	-
4-heptyne-3-ol	1.7	1.7		85.74	40.9	96.0	11.31	9.56	-	-
4-hexyne-3-ol	1.2	1.7		19.28	8.0	23.3	1.65	1.48	-	-
3-hexyne-2-ol	1.2	1.7		16.26	5.8	21.9	0.90	<1.24	-	-
2-methyl-5-octyne-4-ol	2.7	1.6		37.92	17.7	40.0	3.12	3.92	-	-
5-methyl-1-hexyne-3-ol	1.6	1.7		5.58	3.2	14.0	0.20	0.08	-	-
Acrylate										
Methyl-acrylate	0.73	0.177		5.62	4.05	6.53	1.54	1.00	35.21	1.11E06
Ethyl-acrylate	1.22	0.199		7.13	1.81	6.02	0.221	<0.712	39.35	1.55E06
Propargyl-acrylate	0.94	0.266		0.98	0.647	0.916	0.288	0.146	12.99	5.65E06
Isobutyl-acrylate	2.13	0.320		2.51	0.759	2.52	0.110	<0.232	40.25	1.90E06
Hexyl-acrylate	3.18	0.204		0.183	0.0942	0.582	0.00561	0.0103	53.59	2.48E06
2-Hydroxy-ethyl-acrylate	-0.25	0.134		2.40	0.883	2.79	0.120	0.0917	35.18	3.59E06
Methacrylate										

Methyl-methacrylate	1.28	0.222		486	256	521	60.1	31.3	0.70	5.13E03
Ethyl-methacrylate	1.77	0.243		158	101	173	28.9	18.9	-	6.27E03
Vinyl-methacrylate	1.63	0.125		4.90	3.25	7.68	0.876	0.376	0.019	1.51E05
Allyl-methacrylate	2.12	0.216		62.4	13.2	33.1	2.31	2.40	-	1.20E04
Butyl-methacrylate	2.75	0.248		11.0	11.4	16.0	6.12	<7.11	-	3.60E04
Isobutyl-methacrylate	2.67	0.244		23.2	23.5	30.9	14.9	10.7	-	3.24E04
2-Ethoxy-ethyl-methacrylate	1.49	0.254		240	203	373	82.8	80.0	-	1.59E04
Tetrahydrofurfuryl-methacrylate	1.80	0.299		230	168	316	53.9	52.5	-	1.66E04
Benzyl-methacrylate	2.98	0.191		3.39	3.64	5.15	2.01	2.37	-	6.47E04

Ketone

3-Butyn-2-one	-0.52	-	-	0.013	0.008	0.014	0.003	0.003	0.059	-
3-Hexyn-2-one	0.17	-	-	0.21	0.14	0.30	0.03	0.05	0.089	-
2-Cyclopenten-1-one	0.71	0.132	-10.424	9.35	5.02	8.72	1.55	1.38	0.55	-
2-Methyl-2-cyclopenten-1-one	1.26	0.091	-9.871	153.7	129.8	196	64.95	38.22	8.77	-
3-Methyl-2-cyclopenten-1-one	1.26	0.144	-10.117	406.9	334.6	466.3	162.96	124.2	19.12	-
3-Penten-2-one	0.52	0.120	-10.408	5.18	2.73	4.00	0.84	1.27	0.52	-
3-Methyl-3-penten-2-one	1.37	0.159	-9.972	58.45	58.16	72.11	35.73	28.05	4.84	-
4-Methyl-3-penten-2-one	1.37	0.160	-10.044	180.7	144.0	213.5	64.89	25.26	20.99	-
4-Hexene-3-one	1.31	0.269	-10.311	3.40	2.76	4.21	1.16	0.77	0.158	-
5-Hexen-2-one	1.10	0.920	-10.227	129.4	74.06	180.2	13.48	23.29	28.78	-
5-Methyl-5-hexen-2-one	1.65	0.988	-9.919	269.0	202.1	384.9	60.87	99.71	36.24	-
3-Heptene-2-one	1.80	0.131	-10.399	3.74	2.55	3.31	1.05	0.98	0.294	-
6-Methyl-5-hepten-2-one	2.06	0.917	-9.590	71.85	69.79	126.3	16.57	44.00	-	-
3-Buten-2-one	0.41	0.103	-10.568	0.10	0.07	0.09	0.04	0.04	0.076	-
3-Octene-2-one	2.29	0.137	-10.388	4.12	1.88	4.09	0.47	0.68	0.26	-
3-Nonene-2-one	2.79	0.133	-10.383	1.00	6.03	15.88	1.18	1.96	0.291	-

EC₅₀、NOEC、EC₁₀ Unit: mg/L; log K_{GSH} Unit; (mg/L)⁻¹min⁻¹; -: no data

和酮化合物進行密閉式藻類毒性試驗。Table 1 中列出本研究中所選用的化合物物化特性及其毒性試驗結果(包含 EC₅₀ 及 NOEC 等)。可由 Table 1 所列毒性試驗結果發現,在三個反應終點中,以 Final Yield 最敏感,依序為 DO 及 Growth Rate,因此,後續的討論皆以 Final Yield 為反應終點的毒性結果為主。

就炔丙基醇的結果而言,一級醇中毒性最高者為 2-decyn-1-ol(1.35mg/L),毒性最低者則為 2-butyne-1,4-diol(464.21),由實驗結果也發現 Primary propargylic alcohols 的毒性大於 Primary homopropargylic alcohols,其毒性大小

以同為同分異構物的化合物來看毒性相差約 1.2~3.7 倍,毒性最高的為 2-decyn-1-ol,毒性最低的為帶有 2 個氫氧基的 2-butyne-1,4-diol,而毒性的高低分佈由結果來看和其碳數的多寡疏水性的參數(Log Kow)及溶解度的高低有關,以毒性最高的 2-decyn-1-ol 來看,是本次實驗中具最高碳數(10 個碳)、最具疏水性(log Kow=3.54)且溶解度最低(S=559.3 mg/L)的化合物;然而,在本次實驗的化合物中,2-propyne-1-ol 在 16 個測試化合物中,碳數最低(3 個碳)、分子量最低(56.06 g/mole)且疏水性參數為負值(Kow=-0.38),但由其毒性試驗結果來看其毒性並非為最低的,反而還具有相對較高的毒性,由此結果看來也可以發現,此項

化合物的代謝過程中經由ADH及 NAD^+ 作用產生的炔丙基醛類 (propargyl aldehyde)，而此 α -unsaturated aldehyde 為 Michael acceptor electrophiles，而此強親電性物質會使細胞易受親荷性分子(nucleophilic moiety)攻擊(如: SH, -NH, $-\text{NH}_2$, OH-), 而由實驗結果看來此加成反應特別在低分子量的 primary propargylic alcohols 明顯,造成相對高的毒性效應.(Veith *et al.*, 1989; Bradbury and Christensen, 1991; Schultz and Tichy, 1993); 二級炔丙基醇的 EC_{50} 值的範圍則為 0.515mg/L (1-pentyn-3-ol) 至 64.08mg/L (4-heptyn-2-ol) (Final yield)。且其炔基接在碳一的位置時 (1-hexyn-3-ol、1-pentyn-3-ol、5-methyl-1-hexyn-3-ol), 其毒性比炔基接在碳三的位置 (3-butyn-2-ol、3-hexyne-2,5-diol、3-hexyn-2-ol) 還強, 炔基接在碳三的位置的毒性也是比接在碳四的位置還要強, 且不管在哪個反應終點下都可發現到相似的結果, 但炔基接在碳五的位置 (2-methyl-5-octyn-4-ol) 時, 毒性是比 4-heptyn-2-ol 以及 4-heptyn-3-ol 兩個還要強, 但是比 4-hexyn-3-ol 還要弱, 也就是說對於密閉式藻類毒性試驗評估二級炔丙基醇的實驗當中, 我們可以發現其毒性會隨著炔基接的位置的變化而有一定的規律。另外, 二級炔丙基醇中最毒的化合物為 1-pentyn-3-ol ($\text{EC}_{50}=0.515\text{mg/L}$), 在文獻上可發現此化合物對於纖毛蟲之 EC_{50} 為 1273mg/L (Shultz *et al.*, 2004), 兩物種之間的毒性結果相差了 2472.25 倍, 推斷為此化合物對於藻類具有較高的選擇性, 使得其對月芽藻的毒性會比對纖毛蟲來得強很多倍, 而至於更精確的原因, 則需要做更進一步的研究。

在 Table 1 所列的不飽和酯類中, 毒性最高者為 hexylacrylate ($\text{EC}_{50}=0.09\text{ mg/L}$), 毒性最低的則是 methyl methacrylate ($\text{EC}_{50}=256\text{ mg/L}$), 也可從表中發現, 普遍來說, 丙烯酸酯類(acrylate)化合物毒性皆高於甲基丙烯酸酯類(methacrylate)。並比較本研究中相同鏈長之不飽和酯類化合物(如 methyl acrylate 與 methyl methacrylate、ethyl acrylate 與 ethyl methacrylate 及 isobutyl acrylate 與 isobutyl methacrylate) 之毒性, 甲基取代於 α 碳後毒性與反應性降低、 $\log k_{ow}$ 約增加 0.55, 甲基取代造成毒性降低之

可能原因有兩種: 甲基取代於 α 碳上, 因立體障礙阻礙化合物與作用位置之鍵結而影響反應性及毒性; α 碳上之甲基取代基貢獻電子, 降低 β 碳上之部分正電荷, 使其親電性減低 (Schultz *et al.*, 2005)。甲基取代影響毒性與反應性之程度, 隨著側鏈碳數與 $\log k_{ow}$ 之增加而減少。由 Table 1 中 methyl acrylate 至 hexyl acrylate 及 methyl methacrylate 至 butyl methacrylate 之毒性變化, 可知其毒性隨側鏈烷基碳數越多, 毒性越強, 但此與 $\log k_{ow}$ 有極大關係, 因(meth)acrylates 之側鏈碳數與 $\log k_{ow}$ 呈現高度相關, acrylates 及 methacrylates 側鏈碳數與 $\log k_{ow}$ 之 R^2 分別為 0.889 及 0.986。於藻類毒性觀察到鏈長(或 $\log k_{ow}$)越大、毒性越高之現象, 於反應性中亦觀察到, 但較不明顯。比較同分異構物—側鏈為直鏈之 butyl methacrylate 與支鏈之 isobutyl methacrylate, 側鏈為支鏈之化合物毒性、反應性及 $\log k_{ow}$ 皆較低, 從反應性觀點探討, 可能原因為立體/空間障礙 (Steric hindrance) 阻擋親核試劑(如含親核性支鏈之胺基酸)與親電試劑之鍵結, 而使反應性及毒性降低(Chan and O'Brien, 2008; Schultz *et al.*, 2005), 此例中反應性之差異較不明顯, 且僅二化合物相比較, 應以更多例子佐證此論點。比較相同鏈長之化合物—含雙鍵之 vinyl methacrylate 毒性及反應性大於單鍵之 ethyl methacrylate ($\log k_{ow}$ 相反), 可知此碳鏈中若含不飽和鍵會使反應性及毒性增強, 此現象於纖毛蟲毒性亦觀察到, 但使毒性增強之原因於文獻中亦未有明確之理由 (Schultz and Yarbrough, 2004)。碳鏈中具其他取代基之 2-hydroxyethyl acrylate 及 benzyl methacrylate 分別為 acrylates 及 methacrylates 中反應性較高之化合物, 以反應性之觀點推測影響毒性之可能原因, 推電子基之取代基接於 α 碳上使反應性下降 (Schultz *et al.*, 2005), 假設於碳鏈上之取代基有相同效應, 2-hydroxyethyl acrylate 及 benzyl methacrylate 為拉電子基(前者拉電子效應較強) (Dailey and Shoolery, 1955), 為反應性較高之可能原因。此外, 2-hydroxyethyl acrylate 因其羥基與羰基之分子內氫鍵使反應性增強 (Schultz *et al.*, 2005), 故毒性較高。

除了 EC_{50} 值之外, Table 1 也列出了本研究中各個化學物質對月芽藻的低影響濃度, 包

括利用 Dunnett's test 所求得的 NOEC 值以及利用 Probit 模式所求得的 EC10 值。比較兩低影響濃度之敏感度，可發現在本研究所選用的 57 種化學物質中，有 36 個化學物質的 NOEC 值明顯低於 EC10 值，所佔比例為 63.16%，由此結果可知 NOEC 之敏感度皆優於 EC10，故以 NOEC 值做為影響閾值的基礎可對水體環境提供較好之保護。

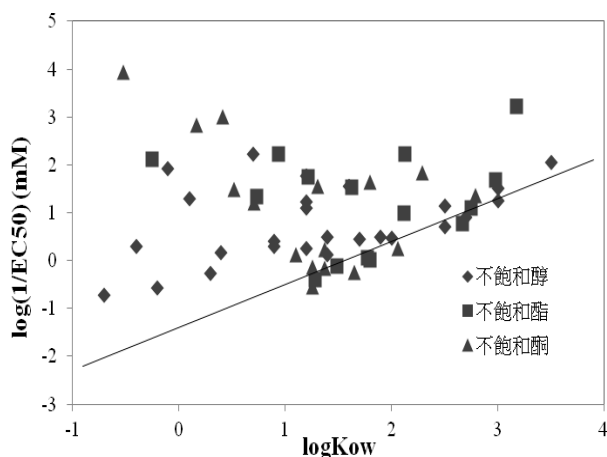


Figure 1. Correlation between baseline and observed toxicity. Baseline toxicity: $\log(1/EC_{50, FY}) = 0.9 \log K_{OW} - 1.4$ (Tsai and Chen, 2007)

Figure 1 為藻類毒性試驗結果(EC50 based on FY)與基線毒性(baseline toxicity)之比較。其中基線毒性方程式為本研究室先前研究所得之結果(Tsai and Chen, 2007)。由 Fig. 1 可知，本研究所選用之三類化合物(不飽和醇類-Propargylic alcohols、不飽和酯類-Acrylates & Methacrylates、不飽和酮類)毒性大多明顯高於基線毒性，以下分別就不同類化合物與物化參數的相關性來討論，並建立相關之 QSAR 方程式結果列於 Table 1，在統計回歸分析中，模式通常採用回歸係數之平方(R^2)，代表模式所解釋之方差)或自由度校正的 Q^2 ，標準偏差(Standard error)及檢驗值 F 等來評判。

由 Table 2 可知，Primary homopropargylic alcohols 與 $\log K_{OW}$ 有良好的相關性($R^2=0.92$)，此結果與 Schultz 等人(2004)所得的結果相似，而 Primary propargylic alcohols 的部份($R^2=0.81$)也有不錯的相關性，由以上結果

也可發現，雖然其毒性較基線毒性略高，但其作用機制可能和一般傳統的非極性麻醉機制類似，跟化合物的疏水性有很高的相關性。

使用 $\log P$ 對二級炔丙基醇類做迴歸分析，結果發現其迴歸效果是很差的($R^2=0.25$)，Schultz (2004) 也是把二級炔丙基醇類用 $\log K_{OW}$ 值做迴歸，所得到的 $R^2=0.339$ ，此結果是和本研究是相近的，這也可以發現對於二級炔丙基醇類來說，單用 $\log K_{OW}$ 值去做迴歸分析是不夠的。所以對於二級炔丙基醇類，本研究試著加入了 E_{lum} 值下去做迴歸，雖然其迴歸效果有略為提高($R^2=0.49$)，但還是不夠好的。其中 1-hexyn-3-ol，1-pentyn-3-ol，5-methyl-1-hexyn-3-ol 此三個化合物的殘差值都是很高的，故在此把這三類化合物當作 outlier，並對剩下之化合物做迴歸分析，所得到的結果為 Equation(4)。此三個 outlier 的炔基都是接在碳一的位置，由此可見，對於二級炔丙基醇類這類的化合物來說，炔基接在碳一的位置時，會有增強毒性的現象發生，而此現象也可以在纖毛蟲當中觀察到 (Shultz *et al.*, 2004)，此三種炔基接在碳一位置的毒性也比炔基接在碳三位置 (3-hexyne-2,5-diol，3-butyn-2-ol，3-hexyn-2-ol) 的毒性還要高的，這說明了二級炔丙基醇這類的化合物，炔基接在碳一的位置確實是會使毒性增高的。但是 Eq(4)之 $\log K_{OW}$ 值之係數為負，此情況是不符合預期的(疏水性越高毒性越強)。故在此本研究加入了 $\log K_{OW}$ 值以及 E_{lum} 值之互乘項，之後所得 Equation(5)。由 Eq(5)發現其迴歸效果也比 Eq(4)來說明顯的提高了許多，且 $\log K_{OW}$ 之係數也得到了正值。由此可發現對於二級炔丙基醇類之 QSAR 迴歸分析來說， $\log K_{OW}$ 以及 E_{lum} 兩物化參數之間之交互影響是很大的。

不飽和酯類部分，除了 vinyl methacrylate 外，allyl methacrylate 及 benzyl methacrylate 與基線毒性之距離(殘差值)於 methacrylates 中亦偏高；由 acrylates 與圖中之分布情形，可觀察出除了 2-hydroxy ethyl acrylate 及 propargyl acrylate 外，其餘與 $\log K_{OW}$ 呈良好線性關係，此二化合物於 acrylates 中殘差值偏高。Acrylate 與 methacrylate 中與基線毒性殘差值較高之化

Table 2 Multiple linear regression for propargylic alcohols, acrylates and ketones based on final yield

Equation	n	R ²	Q ²	s	F	outliers
Primary propargylic alcohols						
(1) $\log(1/EC50) = 0.47 \log K_{ow} - 0.09$	9	0.81	0.78	0.36	29.04	
Primary homopropargylic alcohols						
(2) $\log(1/EC50) = 0.62 \log K_{ow} - 0.46$	7	0.92	0.90	0.23	55.26	
All primary propargylic alcohols						
(3) $\log(1/EC50) = 0.51 \log K_{ow} - 0.23$	16	0.83	0.81	0.32	66.26	
Secondary propargylic alcohols						
(4) $\log(1/EC50) = -0.28 \log K_{ow} - 2.08 E_{lumo} + 4.83$	7	0.85	-	-	-	1-hexyn-3-ol , 1-pentyn-3-ol , 5-methyl-1-hexyn-3-ol
(5) $\log(1/EC50) = 2.13 \log K_{ow} - 1.10 E_{lumo} - 1.52 \log K_{ow} * E_{lumo} + 3.41$	7	0.93	-	-	-	1-hexyn-3-ol , 1-pentyn-3-ol , 5-methyl-1-hexyn-3-ol
Methacrylate						
(6) $\log(1/EC50) = 1.09 \log K_{ow} - 1.78$	8	0.88	0.81	0.268	45.7	vinyl methacrylate
Acrylate & Methacrylate						
(7) $\log(1/EC50) = 0.93 \log k_{GSH} + 0.51 \log K_{ow} + 0.28$	15	0.91	0.84	0.335	60.5	
(8) $\log(1/EC50) = 0.90 \log k_{GSH} + 0.66 \log K_{ow} - 0.05$	14	0.95	0.92	0.266	94.3	2-Hydroxyethyl acrylate
(9) $\log(1/EC50) = 0.91 \log k_{GSH} + 0.57 \log K_{ow} - 3.71 E_{LUMO} + 1.01$	15	0.94	0.89	0.278	60.9	
Ketone						
(10) $\log(1/EC50) = -0.65 \Delta E + 0.98 \log(1/RC50) - 5.80$	13	0.91	0.87	0.328	58.6	
(11) $\log(1/EC50) = -0.38 \log K_{ow} + 1.08 \log(1/RC50) + 1.68$	15	0.88	0.82	0.470	1.68	

合物，其可能影響原因為碳鏈具不飽和鍵 unsaturated bonds 及特殊取代基而使反應性增加，而反應性影響毒性之程度亦受疏水性之影響， $\log K_{ow}$ 與殘差值 > 0.4 之物質 (n=9) 之相關係數 r 為 -0.797， $\log K_{ow}$ 越大越接近基線毒性，顯示麻醉性機制影響毒性之程度，隨著 $\log K_{ow}$ 之增加而上升，反之此值越小疏水性影響程度則減弱：如 $\log K_{ow} < 1$ 之 propargyl acrylate 及 2-hydroxyethyl acrylate，毒性以反應性（親電性機制）為主要貢獻，疏水性影響毒性程度小；而 $\log K_{ow} > 3$ 之 hexyl acrylate，毒性除了反應性之影響，因 $\log K_{ow}$ 高之關係，而使毒性增強。將作用機制為麻醉性

（酯麻醉）之 methacrylate，以 $\log k_{ow}$ 建立回歸式時，outlier 皆為 vinyl methacrylate，與基線毒性之殘差值大於 1，因其側鏈具雙鍵 (alkyl side-chain with double bonds)，反應性較其他 methacrylates 強，毒性作用機制屬反應性，由此可知 $\log K_{ow}$ 對此類化合物有好的預測能力及相關性 (Eq. 6)。若分別單獨以反應性參數 $\log k_{GSH}$ 及 $-\log RC50$ 迴歸，迴歸之結果雷同，但大部分之 methacrylates 於飽和溶解度下未達 RC50，故 $-\log RC50$ 之樣本數僅八筆，此二參數與毒性皆有一定程度之相關性及預測能力，故選用 $\log k_{GSH}$ 作為

反應性參數進行回歸。(meth)acrylates 對月芽藻之毒性,疏水性及反應性為主要之貢獻,logK_{OW} 越大疏水性影響毒性之程度越大,若單以反應性參數迴歸,高 log k_{OW} (疏水性影響大)之化合物則會造成干擾,故將 log k_{OW} 最大之化合物 hexyl acrylate 及 benzyl methacrylate 移除 (log K_{OW} 分別為 3.18 及 2.98),迴歸結果皆有提升。將毒性結果與 logK_{OW} 及 log k_{GSH} 同時進行迴歸,結果如表中之 Eq(7),相關性、預測能力及模式之顯著性皆提升、誤差降低,由此可證明此二參數對預測毒性上之互補性,此模式於毒性之預估上具有好的效力。雖反應性與疏水性相互補足,但當 logK_{OW} 值太小(如反應性為主要影響之 2-hydroxyethyl acrylate,其 logK_{OW} 為 -0.25),疏水性對模式建立之影響反而大於反應性,因此將 logK_{OW} 為負值之 2-hydroxyethyl acrylate 當作 outlier,使模式誤差降低、相關性、預測能力及模式之顯著性皆明顯提升(Eq.8),此模式對 log K_{OW} 為 0.94~3.18 之(meth)acrylates 有良好之預測能力。最後將 E_{LUMO} 加入與 log k_{GSH} 及 log K_{OW} 一同迴歸(未移除 Outlier)可得到 Eq(9),其迴歸結果有小幅度提升,但比只有 log k_{GSH} 及 log K_{OW} 且移除 Outlier 後所建立的方程式之迴歸結果差。由各參數之迴歸結果顯示,屬麻醉性物質之 methacrylates (除了側鏈具雙鍵、作用機制為反應性之 vinyl methacrylate),以 log k_{OW} 為參數可提供良好之毒性預測;而對於(meth)acrylates,以 log k_{OW} 及 log k_{GSH} 為參數與 QSAR 模式適合度(Goodness of fit)最佳,對於此類化合物之藻類毒性有良好之預測能力。

α,β -不飽和酮類為親電性物質(electrophile)之反應性有機物,此種有機物之毒性一般而言較非反應性物質(麻醉性物質)高,以麻醉性之物化參數 Log K_{OW} 迴歸結果並無良好相關性(R² 為 0.23~0.25),於是利用試驗毒物其有機化學原理,以 α,β -不飽和酮類在不同結構上,其電子轉移的能力不同,所造成電子雲密度有差異,導致毒性改變,故利用一些電性參數與毒性數據迴歸分析,討論其結果。Eq(10) 為利用最高佔有分子軌域能-最低未佔有分子軌域能(ΔE)也稱之為能量間隙(Energy gap)、反應性參數(Log(1/RC50)),與其藻類在三種不同反應終

點之毒性數據所建立之迴歸式,由迴歸式係數觀察,Log(1/RC50)與毒性之關係最為明顯,其次為 ΔE ;反應性參數越高,毒性亦越強;而 ΔE 值越大,毒性則越低,顯示能量間隙越大,其化合物的結構傾向於越穩定,毒性因而較弱(Schultz *et al.*, 1995)。Eq(10) 中由於 3-butyn-2-one、3-hexyn-2-one、6-methyl-5-hepten-2-one 三個化合物缺乏完整資料,所以將其挑出迴歸式外,故樣本數剩 13 個不飽和酮。試驗毒物與細胞間之交互作用關係的代表參數為 RC50,因親電性物質之毒性易受到 GSH 烷基化影響,隨著 GSH 被消耗會使硫氫基(-SH) 容易受到攻擊,又親電性毒化物會與 GSH 自發性的結合加以保護細胞內所含之硫氫基遭受攻擊。RC50 的大小就代表反應的程度,其值愈低,反應性越高。利用 Table 1 中 Log K_{OW}、Log(1/RC50)與藻類毒性數據迴歸分析得 Eq(11),顯示相關性均佳,兩種不同反應終點其 Log(1/RC50)的斜率均大於 Log P 之斜率,顯示其影響毒性較大,由此足見反應性越高,毒性亦越高,結果與文獻相似(Yarbrough and Schultz, 2007)。其中由於 6-methyl-5-hepten-2-one 反應性太低以致參數值無法得之,故將其挑出於迴歸式外,樣品數剩 15 個不飽和酮(n=15)。

Table3 所列為本研所得數據與文獻中其他物種毒性數據之比較以及本研所用化學物質在歐盟水體生物風險分級標準。根據歐盟(EU, European Union)對水體生物毒性之風險分級標準(Faucon *et al.*, 1999),以 DO、FY、GR、fathead minnow、water flea 及 Ciliate 中最小之 EC₅₀ 或 LC₅₀,評估這些化合物對環境影響之風險。如 Table 3 所示,本研所用選用的化合物之危害分級包含 R50/R53 (1 個, 1.8%)、R50 (8 個, 14%)、R51 (22 個, 38.6%)及 R52 (20 個, 35.1%),而在風險代號中以 R50、R50/R53 及 R51/R53 代表該化合物對環境具危險性,由此可知,本研中所選用之化合物大多對環境

Table 3. Substance classification for environmental effects and comparisons of algal toxicity test results with other species

Chemical	Algae(EC ₅₀)		Fathead minnow ^b		Water flea ^d	Ciliate ^e	Hepatocyte ^h	Classification ⁱ
	(DO)	(FY)	(GR)	(LC ₅₀)	(EC ₅₀)	(IGC ₅₀)	(LC ₅₀)	
Primary propargylic alcohols								
2-propyn-1-ol	25.15 [2]	28.9 [3]	55.8 [4]	1.53 [1]	-	658.7 [5]	-	R51
2-butyn-1-ol	49.84 [3]	47.2 [2]	67.5 [4]	10.1 [1]	-	519.0 [5]	-	R52
2-butyn-1,4-diol	1141 [3]	464.2 [2]	1214 [4]	53.6 [1]	-	6530 [5]	-	R52
2-pentyn-1-ol	76.2 [2]	42.5 [1]	109.5 [3]	-	-	314.6 [4]	-	R52
2-hexyn-1-ol	68.12 [2]	32.2 [1]	86.5 [3]	-	-	237.6 [4]	-	R52
2-heptyn-1-ol	62.91 [2]	38.4 [1]	285.2 [4]	-	-	173.5 [3]	-	R52
2-octyn-1-ol	25.07 [2]	24.4 [1]	78.6 [3]	-	-	81.0 [4]	-	R52
2-nonyn-1-ol	9.7 [2]	7.8 [1]	21.3 [3]	-	-	31.4 [4]	-	R51
2-decyn-1-ol	1.7 [3]	1.4 [2]	3.6 [4]	1.07 [1]	-	15.8 [5]	-	R51
Primary homopropargylic alcohols								
3-butyn-1-ol	367.8 [3]	262.3 [2]	2263 [4]	36.1 [1]	-	4849 [5]	-	R52
3-pentyn-1-ol	142.1 [1]	158.5 [2]	492 [3]	-	-	1273 [4]	-	-
3-hexyn-1-ol	77.78 [2]	37.8 [1]	89.7 [3]	-	-	1028 [4]	-	R52
3-heptyn-1-ol	171.5 [2]	83.6 [1]	525.2 [4]	-	-	234.3 [3]	-	R52
3-octyn-1-ol	71.66 [2]	40.8 [1]	140.5 [4]	-	-	120.5 [3]	-	R52
3-nonyn-1-ol	21.42 [3]	10.1 [1]	16.8 [2]	-	-	64.1 [4]	-	R52
3-decyn-1-ol	5.88 [2]	4.8 [1]	10.1 [4]	-	-	5.88 [2]	-	R51
Secondary propargylic alcohols								
1-hexyn-3-ol	2.71 [2]	1.7 [1]	5.9 [3]	-	-	21.5 [4]	-	R51
1-pentyn-3-ol	0.74 [2]	0.5 [1]	1.0 [3]	-	-	1273[4]	-	R50
3-butyn-2-ol	8.27 [2]	3.6 [1]	40.4 [3]	11.63 [4]	-	176.1 [5]	-	R51
3-hexyne-2,5-diol	6.09 [2]	1.4 [1]	9.5 [3]	-	-	329.2 [4]	-	R51
4-heptyn-2-ol	93.83 [2]	64.1 [1]	218.7 [3]	-	-	467.6 [4]	-	R52

4-heptyn-3-ol	85.74 [2]	40.9 [1]	96.0 [3]	-	-	120.2 [4]	-	R52
4-hexyn-3-ol	19.28 [2]	8.0 [1]	23.3 [3]	-	-	152.0 [4]	-	R51
3-hexyn-2-ol	16.26 [2]	5.8 [1]	21.9 [3]	-	-	30.3 [4]	-	R51
2-methyl-5-octyn-4-ol	37.92[2]	17.7 [1]	40.0 [3]	-	-	55.8 [4]	-	R52
5-methyl-1-hexyn-3-ol	5.58 [2]	3.2 [1]	14.0 [3]	-	-	26.9 [4]	-	R51
Acrylate								
Methyl-	5.62	4.05 [2] ^a	6.53	-	2.21 [1]	24.4 [3]	243 [4]	R51
Ethyl-	7.13	1.81 [1]	6.02	251 [2]	4.37 [3]	31.0 ^f [4]	159 [5]	R51
Propargyl-	0.98	0.647 [1]	0.916	-	-	9.59 ^f [2]	-	R50 ^j
Isobutyl-	2.51	0.759 [1]	2.52	2.08 [2]	-	65.6 [3]	1410 [4]	R50 ^j
Hexyl-	0.183	0.0942 [1]	0.582	1.11 [2]	-	28.4 [3]	1330 [4]	R50/R53 ^j
2-Hydroxy ethyl-	2.40	0.883 [2]	2.79	4.84 [3]	0.784 [1]	23.7 ^g [5]	12 [4]	R50 ^j
Methacrylate								
Methyl-	486 [4]	256 [2]	521 [5]	259 [3]	69.2 [1]	2190 ^f [6]	5250 [7]	R52
Ethyl-	158 [2]	101 [1]	173 [3]	-	-	983 [4]	3530 [5]	-
Vinyl-	4.90 [2]	3.25 [1]	7.68 [3]	-	-	466 [4]	-	R51
Allyl-	62.4 [5]	13.2 [2]	33.1 [4]	0.98 [1]	-	600 [6]	14 [3]	R50 ^j
Butyl-	11.0 [1]	11.4 [2]	16.0 [3]	-	31.8 [4]	264 [5]	-	R52
Isobutyl-	23.2 [1]	23.5 [2]	30.9 [3]	32.6 ^c [5]	31.8 [4]	270 [6]	4010 [7]	R52
2-Ethoxy ethyl-	240 [3]	203 [2]	373 [4]	27.7 [1]	-	951 [5]	-	-
Tetrahydrofurfuryl-	230 [3]	168 [2]	316 [4]	34.7 [1]	-	-	-	-
Benzyl-	3.39 [1]	3.64 [2]	5.15 [4]	4.64 [3]	-	39.5 [5]	-	R51
Ketone								
3-Butyn-2-one	0.013 [2]	0.008 [1]	0.014 [3]	-	-	0.73 [4]	-	R50
3-Hexyn-2-one	0.21 [2]	0.14[1]	0.30 [3]	-	-	2.98 [4]	-	R50
2-Cyclopenten-1-one	9.35 [3]	5.02 [1]	8.72 [2]	-	-	11.42 [4]	-	R51

2-Methyl-2-cyclopenten-1-one	153.7 [3]	129.8 [2]	196 [4]	-	-	18.89 [1]	-	R52
3-Methyl-2-cyclopenten-1-one	406.9 [2]	334.6 [1]	466.3 [3]	-	-	-	-	-
3-Penten-2-one	5.18 [3]	2.73 [1]	4.00 [2]	-	-	70.14 [4]	-	R51
3-Methyl-3-penten-2-one	58.45 [2]	58.16 [1]	72.11 [3]	-	-	644 [4]	-	R52
4-Methyl-3-penten-2-one	180.7 [3]	144.0 [2]	213.5 [4]	-	-	2.15 [1]	-	R51
4-Hexene-3-one	3.40 [2]	2.76 [1]	4.21 [1]	-	-	2022 [4]	-	R51
5-Hexen-2-one	129.4 [3]	74.06 [2]	180.2 [4]	-	-	5.28 [1]	-	R51
5-Methyl-5-hexen-2-one	269.0 [2]	202.1 [1]	384.9 [3]	-	-	1355 [4]	-	-
3-Heptene-2-one	3.74 [3]	2.55 [1]	3.31 [2]	-	-	11.53 [4]	-	R51
6-Methyl-5-hepten-2-one	71.85 [2]	69.79 [1]	126.3 [3]	-	-	428 [4]	-	R52
3-Buten-2-one	0.10 [3]	0.07 [1]	0.09 [2]	-	-	2.17 [4]	-	R50
3-Octene-2-one	4.12 [3]	1.88 [1]	4.09 [2]	-	-	217 [4]	-	R51
3-Nonene-2-one	10.00 [2]	6.03 [1]	15.88 [3]	-	-	832 [4]	-	R51

具有一定程度之危害性。

以 Table 3 比較不同物種對本研究所選定之化學物質之敏感度及相關性，以各化合物對不同物種之毒性排序取平均值，將此平均值排序而得到物種敏感度排序。敏感度由高至低：藻類最終細胞變化量(FY) > 藻類溶氧產生量(Δ DO) > 藻類生長率(GR) > 水蚤 > 鱒魚 > 纖毛蟲 > 肝細胞，水蚤之敏感度雖居第二，但其資料數目未超過半數（僅六筆），故較不具代表性，而此結果表示本研究所採用之密閉式藻類（月芽藻）毒性試驗方法最具敏感性。另外比較本研究結果與其他物種的文獻毒性數據之相關性發現，(meth)acrylates 的月芽藻的毒性結果與鱒魚及纖毛蟲毒性之 R^2 為最高，與鱒魚之迴歸如下，allyl methacrylate 為 outlier，因其水解產物魚體內會轉換成毒性更強之 acrolein:

$$\log(1/LC_{50}) = 0.408 + 0.576 \log(1/EC_{50,FY}) \quad (12)$$

$$n = 9, R^2 = 0.838, Q^2 = 0.690, s = 0.338, F = 36.9$$

與纖毛蟲之迴歸為:

$$\log(1/IGC_{50}) = -0.877 + 0.642 \log(1/EC_{50,FY}) \quad (13)$$

$$n = 14, R^2 = 0.736, Q^2 = 0.645, s = 0.406, F = 33.4$$

與水蚤毒性之 R^2 為 0.809，雖具有相關性，但因其樣本數少，較不具代表性，需要更多資料才能更真確地分析。與老鼠肝細胞毒性之相關性極低，推測低相關性之可能原因為 (meth)acrylates 對藻類與肝細胞之主要毒性作用機制不同，或是樣本數目少，部分特例（離群值）影響分析結果。而 α, β -不飽和酮類的毒性結果則是與纖毛蟲(Ciliate)的數據有高度相關性：

$$\log(1/IGC_{50}) = -0.742 - 0.625 \log(1/EC_{50,FY}) \quad (14)$$

$$n = 16, R^2 = 0.916$$

由上述之迴歸結果，顯示月芽藻毒性對此纖毛蟲毒性有相當程度之相關性及預測能力，表示月芽藻為可做為纖毛蟲之適當替代物種 (Surrogate)。

五、結論

本研究以親電性物質 α, β -不飽和醇、 α, β -不飽和酯類（丙烯酸酯類及甲基丙烯酸酯類）以及不飽和酮類為毒物、月芽藻為試驗物種，進行 BOD 瓶密閉式藻類毒性試驗，以 DO、FY 及 GR 為反應終點探討毒物對月芽藻之毒性影響，

(meth)acrylat 毒性增強之特性源自於對側鏈未接官能基及雙鍵之 (meth)acrylates，毒性隨碳鏈越長 ($\log k_{ow}$ 越大) 而越強。碳鏈中含不飽和鍵亦使毒性及反應性增強。使毒性減低之特性：側鏈為支鏈，因空間障礙關係使反應性及毒性低於側鏈為直鏈之丙烯酸酯。甲基接於 α 碳上因立體障礙及電荷轉移（使親電性減低），使反應性及毒性降低。Acrylates 為反應性機制、methacrylates 為麻醉性機制（除 vinyl methacrylate 為反應性），(meth)acrylates 對月芽藻之毒性，疏水性及反應性為主要之貢獻， $\log k_{ow}$ 越大疏水性影響毒性之程度越大，相對地反應性影響毒性之比例則降低。在低影響濃度部分，(meth)acrylates 對月芽藻之 EC_{50} 、 EC_{10} 及 NOEC 皆以反應終點 FY 最為敏感，而 NOEC 較 EC_{10} 敏感，意即於毒性評估上較具保護力。

依試驗物種對丙烯酸酯之敏感度排序依序為藻類最終細胞變化量(FY) > 藻類溶氧產生量(Δ DO) > 藻類生長率(GR) > 水蚤 > 鱒魚 > 纖毛蟲 > 肝細胞。以藻類毒性為參數，建立預測其他試驗物種毒性之迴歸式中，以反應終點 GR 預測鱒魚、纖毛蟲毒性之結果最好—對鱒魚毒性之 $r^2_{(adj)}$ 及 Q^2 分別為 0.814 及 0.690、對纖毛蟲則為 0.714 及 0.645，表示月芽藻可作為鱒魚及纖毛蟲之替代物種。

在 QSAR 之迴歸中，methacrylates（扣除反應性高之 vinyl methacrylate）以 $\log k_{ow}$ 為參數適合度最佳。(meth)acrylates 以 $\log K_{ow}$ 與 $\log k_{GSH}$ 為參數適合度最佳，移除 outlier ($\log k_{ow}$ 為負值之 2-hydroxyethyl acrylate) 後之 $r^2_{(adj)}$ 、 Q^2 分別為 0.935 及 0.923。

六、參考文獻

- Ahner, B.A., Wei, L.P., Oleson, J.R. and Ogura, N. (2002). Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 232, 93-103.
- Aptula, A.O. and Roberts, D.W. (2006). Mechanistic applicability domains for nonanimal-based prediction of toxicological end points: General principles and application to reactive toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 19, 1097-1105.
- Aptula, A.O., Patlewicz, G. and Roberts, D.W. (2005). Skin sensitization: reaction mechanistic applicability domains for structure-activity relationships. *Chem. Res. Toxicol.*, 18, 1420-1426.
- Bearden, A.P. and Schultz, T.W. (1997). Structure-Activity Relationships for *Pimephales* and *Tetrahymena*: a Mechanism of Action Approach. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 6, 1311-1317.
- Bradbury, S.P. and Christensen, G.M. (1991). Inhibition of alcohol dehydrogenase activity by acetylenic and allylic alcohols: Concordance with in vivo electrophilic reactivity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10, pp.1155-1160.
- Böhme, A., Thaens, D., Paschke, A. and Schüürmann, G. (2009). Kinetic glutathione chemoassay to quantify thiol reactivity of organic electrophiles-application to alpha,beta-unsaturated ketones, acrylates, and propiolates. *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 742-750.
- Chan, K. and O'Brien, P.J. (2008). Structure-activity relationships for hepatocyte toxicity and electrophilic reactivity of alpha,beta-unsaturated esters, acrylates and methacrylates. *J. Appl. Toxicol.*, 28, 1004-1015.
- Chen C.Y., Lin K.C. (1997). Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:1337-1344
- Chen, H.F. and Hee, S.S.Q. (1995). Ketone EC(50) value in the microtox test. *Ecotox. Environ. Safe.*, 30, 120-123.
- Cronin, M.T.D., Netzeva, T.I., Dearden, J.C., Edwards, R. and Worgan, A.D.P. (2004). Assessment and modeling of the toxicity of organic chemicals to *Chlorella vulgaris*: Development of a novel database. *Chem. Res. Toxicol.*, 17, 545-554.
- Cronin, M.T.D., Sinks, G.D. and Schultz, T.W. (2001). Modelling of toxicity to the ciliate *tetrahymena pyriformis* : the Aliphatic Carbonyl domain. In *Forecasting the Environmental Fate and Effects of Chemicals*, 113-124.
- Dailey, B.P. and Shoolery, J.N. (1955) The electron withdrawal power of substituent groups. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3977-3981,
- Fahey, R.C., Buschbacher, R.M. and Newton, G.L. (1987). The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms. *J. Mol. Evol.*, 25, 81-88.
- Faucon, J.C., Bureau, R., Faisant, J., Briens, F. and Rault, S. (1999) Ecotoxicological endpoints in European notification procedure impact on the classification for the aquatic environment. *Chemosphere*, 38, 2849-2863.
- Freidig, A.P. and Hermens, J.L.M. (2001). Narcosis and chemical reactivity QSARs for acute fish toxicity. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 19, 547-553.
- Freidig, A.P., Verhaar, H.J.M. and Hermens, J.L.M. (1999) Quantitative structure-property relationships for the chemical reactivity of acrylates and methacrylates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 1133-1139
- Hermens, J.L.M. (1990). Electrophiles and acute toxicity to fish. *Environ. Health Perspect.*, 87, 219-225.
- Karabunarliev, S., Mekenyan, O.G., Karcher, W., Russom, C.L. and 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.
- Koleva, Y.K., Madden, J.C. and Cronin, M.T.D. (2008). Formation of categories from structure-activity relationships to allow read-across for risk assessment: toxicity of

- alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds. *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 2300-2312.
- Lin, J.H., Kao, W.C., Tsai, K.P. and Chen, C.Y. (2005). A novel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. *Water Res.*, 39, 1869-1877.
- Lipnick, R.L. (1990). Outliers-their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity. 4th International Workshop on Quantitative Structure-Activity Relationships in Environmental Toxicology, Veldhoven, Netherlands, Sep 16-20, 131-153.
- Lipnick, R.L., Johnson, D.E., Gilford, J.H., Bickings, C.K. and Newsome, L.D. (1985). Comparison of fish toxicity screening data for 55 alcohols with the Quantitative Structure-Activity relationship of minimum toxicity for nonreactive nonelectrolyte organic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 4, 281-296.
- Mekenyan, O.G., Veith, G.D., Bradbury, S.P. and Russom, C.L. (1993). Structure-toxicity relationships for alpha,beta-unsaturated alcohols in fish. *Quant. Struct. Act. Relat.*, 12, 132-136.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (2009). The 2007 OECD list of High Production Volume chemicals.
- Papa, E., Battaini, F. and Gramatica, P. (2005) Ranking of aquatic toxicity of esters modelled by QSAR. *Chemosphere*, 58, 559-570.
- 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
- Russom, C.L., Drummond, R.A. and Hoffman, A.D. (1988). Acute toxicity and behavioral effects of acrylates and methacrylates to juvenile fathead minnows. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41, 589-596.
- Schultz, T.W. and Tichy, M. (1993). Structure-toxicity relationships for unsaturated alcohols to *Tetrahymena pyriformis*: C5 and C6 analogs and primary propargylic alcohols. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 681-688.
- Schultz, T.W. and Yarbrough, J.W. (2004) Trends in structure-toxicity relationships for carbonyl-containing alpha,beta-unsaturated compounds. *SAR QSAR Environ. Res.*, 15, 139-146.
- Schultz, T.W., Carlson, R.E., Cronin, M.T.D., Hermens, J.L.M., Johnson, R., O'Brien, P.J., Roberts, D.W., Siraki, A., Wallace, K.B. and Veith, G.D. (2006). A conceptual framework for predicting the toxicity of reactive chemicals: modeling soft electrophilicity. *SAR QSAR Environ. Res.*, 17, 413-428.
- Schultz, T.W., Netzeva, T.I., Roberts, D.W. and Cronin, M.T.D. (2005). Structure-toxicity relationships for the effects to *Tetrahymena pyriformis* of aliphatic, carbonyl-containing, alpha,beta-unsaturated chemicals. *Chem. Res. Toxicol.*, 18, 330-341.
- Schultz, T.W., Ralston, K.E., Roberts, D.W., Veith, G.D., Aptula, A.O. (2007). Structure-activity relationships for abiotic thiol reactivity and aquatic toxicity of halo-substituted carbonyl compounds. 12th International Workshop on Quantitative Structure - Activity Relationships in Environmental Toxicology (QSAR 2006), Lyon, FRANCE, May 08-12, 21-29.
- Schultz, T.W., Seward-Nagel, J., Foster, K.A. and Tucker, V.A. (2004). Population Growth Impairment of Aliphatic Alcohols to *Tetrahymena*. *Environ. Toxicol.*, 19, 1-10.
- Schultz, T.W., Sinks, G.D. and Hunter, R.S. (1995). Structure-toxicity relationships for alkanones and alkenones. *SAR QSAR Environ. Res.*, 3, 27-26.
- Schultz, T.W., Yarbrough, J.W. (2004). Trends in structure-toxicity relationships for carbonyl-containing alpha,beta-unsaturated compounds. *SAR QSAR Environ. Res.*, 15, 139-146.
- Schultz, T.W., Yarbrough, J.W. and Johnson, E.L. (2005) Structure-activity relationships for reactivity of carbonyl-containing compounds with glutathione. *SAR QSAR Environ. Res.*, 16, 313-322.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1996). Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. Algal Toxicity, Tiers I and II.

Tsai, K.P. and Chen, C.Y. (2007). An algal toxicity database of organic toxicants derived by a closed-system technique. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26, 1931-1939.

Veith, G.D., Lipnick, R.L. and Russom, C.L. (1989) The toxicity of acetylenic alcohols to the fathead minnow, *Pimephales promelas*—narcosis and proelectrophile activation. *Xenobiotica*, 19, 555–565.

Xia, B.B., Liu, K.P., Gong, Z.G., Zheng, B., Zhang, X.Y. and Fan, B.T. (2009). Rapid toxicity prediction of organic chemicals to *Chlorella vulgaris* using quantitative structure-activity relationships methods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72, 787-794.

Yarbrough, J.W. and Schultz, T.W. (2007). Abiotic sulfhydryl reactivity: A predictor of aquatic toxicity for carbonyl-containing alpha,beta-unsaturated compounds. *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 558-562.