



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2017년 2월

석사학위 논문

*Microcystis aeruginosa* 제어를 위한  
5-Benzylidenerhodanine 유도체 합성  
및 살조 활성 평가

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

조 두 리

*Microcystis aeruginosa* 제어를 위한  
5-Benzylidenerhodanine 유도체 합성  
및 살조 활성 평가

**Synthesis and algicidal activity evaluation of  
5-Benzylidenerhodanine derivatives against  
*Microcystis aeruginosa***

2017년 2월 24일

조선대학교 대학원  
신재생에너지융합학과  
조 두 리

*Microcystis aeruginosa* 제어를 위한  
5-Benzylidenerhodanine 유도체 합성  
및 살조 활성 평가

지도교수 조 훈

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2016년 10월

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

조 두 리

## 조두리의 석사학위논문을 인준함

위원장    조선대학교    교수              유 지 강           (인)

위    원    조선대학교    교수              이 창 훈           (인)

위    원    조선대학교    교수              조    훈           (인)

2016년 11월

조선대학교 대학원

## 목 차

List of Tables .....	iii
List of Schemes .....	iv
List of Figures .....	v
ABSTRACT .....	vi
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	6
A. 재료 .....	6
1. 유기합성 .....	6
2. 유해 조류 (시험종 및 배양조건) .....	6
3. <i>Danio reio</i> (Zebra fish) .....	7
4. 물벼룩( <i>Daphnia magna</i> ) .....	8
B. 약물 활성 측정 및 독성 시험 .....	10
1. Microplate assay / Measurement of LC <sub>50</sub> value .....	10
2. 물벼룩( <i>Daphnia magna</i> ) 급성 독성 시험 .....	10
3. <i>Danio rerio</i> (zebra fish) 독성 시험 .....	11
C. 세포의 형태변화 관찰 .....	12
1. 주사전자현미경 .....	12
D. Rhodanine 유도체 합성 .....	13
1. 화합물(1~29)의 합성 .....	14

III. 결과 및 고찰 .....	27
A. Rhodanine 화합물의 Microplate assay 결과 .....	27
1. <i>Microcystis aeruginosa</i> 살조활성 결과 .....	27
2. <i>Selenastrum capricornutum</i> 살조활성 결과 .....	31
3. Rhodanine 화합물과 2,4-Thiazolidinedione 화합물의 비교 .....	32
B. 물벼룩( <i>Daphnia magna</i> ) 급성 독성시험 결과 .....	34
C. <i>Danio rerio</i> (Zebra fish) 독성시험 결과 .....	35
D. 주사전자현미경을 통한 형태변화 관찰 .....	36
IV. 결론 .....	38
참고문헌 .....	39
<sup>1</sup> H NMR Spectra .....	42

## List of Tables

Table 1. 국내 담수조류의 특징 .....	2
Table 2. BG-11 (Blue-Green Medium) 조성표 .....	7
Table 3. M4 Medium 조성표 .....	8
Table 4. M4 Medium 배지의 Stock (1), (2) Solution 조성표 .....	9
Table 5. Compound 1-7 살조 활성 결과 .....	28
Table 6. Compound 8-15 살조 활성 결과 .....	28
Table 7. Compound 16-23 살조 활성 결과 .....	29
Table 8. Compound 24-29 살조 활성 결과 .....	31
Table 9. 무해조류 살조 활성 결과 .....	31
Table 10. Rhodanine (RH) 화합물과 2,4-Thiazolidinedione (TD) 화합물의 비교 .....	33



## List of Schemes

Scheme 1. Plausible mechanism for the synthesis of 5-arylidenerhodanines catalyzed by diammonium hydrogen phosphate. ....	13
Scheme 2. Reagents and conditions; $(NH_4)_2HPO_4$ , $H_2O$ , $90^\circ C$ , 20 min .....	14

## List of Figures

Figure 1. Harmful algae bloom in Nakdong river, South Korea. (이정아, 2015, 하늘에서 본 낙동강 녹조 현장, 한겨레) .....	1
Figure 2. <i>Microcystis aeruginosa</i> . (Kristian Peters, 2009, wikipedia) .....	3
Figure 3. 합성된 5-Benzylidenerhodanine 유도체 .....	27
Figure 4. 치환기의 거리가 서로 가까운 화합물의 농도에 따른 살조 비율 .....	30
Figure 5. Rhodanine과 2,4-Thiazolidinedione 유도체 .....	32
Figure 6. 시간에 따른 물벼룩 사망률 .....	34
Figure 7. 시간에 따른 <i>Danio rerio</i> 폐사율 .....	35
Figure 8. 약물 처리 전 <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	36
Figure 9. 약물 처리 후 <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	37

## ABSTRACT

### Synthesis and algicidal activity evaluation of 5-Benzylidenerhodanine derivatives against *Microcystis aeruginosa*

Du Ri Jo

Academic Advisor : Prof. Cho Hoon, Ph. D.

Department of Energy Convergence

Graduate School of Chosun University, South Korea

Harmful algae blooms (HABs) occur at rivers and lakes around the world. Due to the excessive propagation of harmful algae, scum is formed on the surface of the lake, resulted in blocking oxygen, damage of aquatic organisms and threats human health etc. Among the harmful algae blooms, *Microcystis aeruginosa* is the representative species.

In this study, 5-benzylidenerhodanine derivatives were synthesized using Rhodanine in order to control *Microcystis aeruginosa*. Algicidal activity was measured against harmful algae (*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*) and non-harmful algae (*Selenstrum capricornutum*).

When structure-activity relationship (SAR) is analyzed for 29 compounds, the phenyl substituents with halogen group show good inhibitory potency against *Microcystis aeruginosa*. Furthermore, the phenyl substituents with chlorine at C<sub>2</sub> of phenyl ring show higher algicidal effects than that with chlorine at C<sub>3</sub> of phenyl ring. Among the various synthetic 5-benzylidenerhodanine derivatives tested, 5-(2,4-Dichlorobenzylidene)-rhodanine was found to be the most potent inhibitor against *Microcystis aeruginosa* with 0.75  $\mu$ M of LC<sub>50</sub> value. Overall, the results show that 5-benzylidenerhodanine derivatives in one of the

possible methods for controlling and inhibiting *Microcystis aeruginosa*.

## I. 서론

현재 우리나라의 호소는 녹조현상이 빈번하게 발생함에 따라 수생태계와 공중보건학적인 피해가 매년 증가하고 있는 추세이다. (Figure 1) 유해 녹조물질이 식수로 사용되고 있는 상수원을 오염시키게 되면 인간의 건강에 직접적인 피해를 줄 수 있다. 우리나라는 1998년부터 상수원의 안전성을 확보하고 녹조현상으로 인한 피해를 줄이기 위해 녹조류의 발생 정도에 따라 “조류 경보제”를 시행하고 있다. 녹조현상은 국내뿐만 아니라 세계적으로 많은 연구가 진행되고 있다. [1-3]



Figure 1. Harmful algae bloom in Nakdong river, South Korea. (이정아, 2015, 하늘에서 본 낙동강 녹조 현장, 한겨레)

물속의 식물인 조류(algae)는 엽록소를 가지고 있으며, 햇빛과 이산화탄소를 이용해 광합성 작용을 한다. 녹조현상에서 문제가 되는 조류는 담수조류 중으로 규조류, 녹조류와 남조류로 구분되며 Table 1에서 나타내었다. [4]

Table 1. 국내 담수조류의 특징

구분	규조류	녹조류	남조류
주 발생 시기	겨울 ~ 봄	봄 ~ 초여름	여름
성장 수온	10℃ 이하	10℃ ~ 20℃	20℃ ~ 30℃
물빛 색깔	갈색	열은 녹색	진한 녹색

녹조현상(Harmful Algae Blooms, HABs)은 미디어와 전문가 표현에도 차이가 있지만 일반적으로 부영양화된 호소 또는 유속이 느린 하천에서 녹조류와 남조류가 크게 늘어나 물빛이 녹색으로 변하는 현상이다. 실제로는 녹조류(*Chlorophyta*) 보다는 남조류(*Cyanobacteria*)가 과다 증식하는 현상이다. [5]

다양한 녹조발생의 원인은 다양하지만 4 가지로 요약할 수 있다. (1) 수온의 상승(유해 조류의 최적 성장 조건에 요구되는 빛) (2) 과도한 영양염류 유입(질소(Nitrogen), 인(Phosphorus)등의 영양염류의 농도가 높아져 수생태계의 부영양화), (3) 느린 유속(느린 유속으로 인해 체류시간이 길어져 녹조생물의 대번식)과 (4) 과도한 유기물 유입(잡재적인 영양염류로 전환 가능) 등을 들 수 있다. 조류(algae)의 성장이 빠르게 진행되어 부유성의 조류, 남조류(*Cyanobacteria*)가 대량 증식하고 성장 수온이 20 ~ 30℃인 남조류는 일반적으로 광량이 상승하는 여름과 초가을에 전국의 강과 호수에서 발생한다. 겨울철은 수온이 낮아 조류가 대량 증식할 수 없다. 경제의 고도성장으로 인해 축산농가의 증가와 영농방식의 변화로 수생태계에 유입되는 생활하수나 산업폐수의 양의 증가하였다. 오염물질이 수계로 유입되어 수생태계의 유기물질에는 질소와 인과 같은 영양염류가 과잉 공급되었다. [6-8]

녹조현상은 인간의 생활과 생태계에 많은 피해가 나타난다. 상수원이 오염될 경우, 조류의 기원성 유해물질로 인해 정수처리 수질 저하, 유기물의 증가로 인한 부산물 증가, 보건학적 안정성의 위협으로 정수 처리 비용이 증가하게 된다. 물 색깔이 변하면서 수면의 찌꺼기와 악취 발생으로 인해 불쾌감을 유발한다. 호소의 표면이 녹색으로 변색되어 햇빛을 차단하므로 용존산소량이 감소된다. 이로 인한 어류의 폐사, 수생생물의 변화가 발생하여 악취 및 심미적인 피해가 나타나 수자원의 가치를 떨어뜨린다. [9-10]

남조류는 남조식물 중에서도 가장 원시적인 무리로 약 35억 년 전에 등장해 최초로

광합성을 시작한 생물로 원핵생물로 분류하고 있다. 현재 약 150속 2,000여종의 남조식물이 발견되었고 물이 있는 대부분의 곳에서 서식할 수 있다. 0.5 ~ 40  $\mu\text{m}$  크기로 섬유형태나 불규칙한 구형, 타원의 형태로 군체를 이루어 대규모로 성장하며 분열에 의해서 번식하여 ‘분열 식물’이라고도 한다. 환경부에서는 녹조현상으로 문제가 되는 남조류 4종을 유해 남조류로 지정하여 관리하고 있다. 유해 남조류 4종은 *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* 로 이 물질들은 독성물질을 생성한다. 이 유해 남조류는 간독소와 신경독소를 생성하고 냄새물질을 방출한다. [11-14] 국내 녹조 발생 시 흔히 나타나는 물질은 남조류 중 *Microcystis aeruginosa* 이다. (Figure 2) 부유성 군체로 세포는 구형 또는 불완전한 구형으로 이루어져 있으며, 엽은 청록색을 띄나 가스포군이 많으면 갈색으로 보이기도 한다. 발생 초기에는 작은 크기의 구형 또는 신장된 형태로 나타나며, 발생 후기에는 불규칙적인 신장된 넓은 잎 모양으로 나타난다. 발생 말기에는 군체가 확산하여 네트 모양이 형성되고 중간에 구멍이 생기거나, 불규칙적으로 배열되어 조밀하게 뭉쳐진 형태를 나타낸다. 극지 부위를 제외한 전 세계에서 분포한다. [15-17]

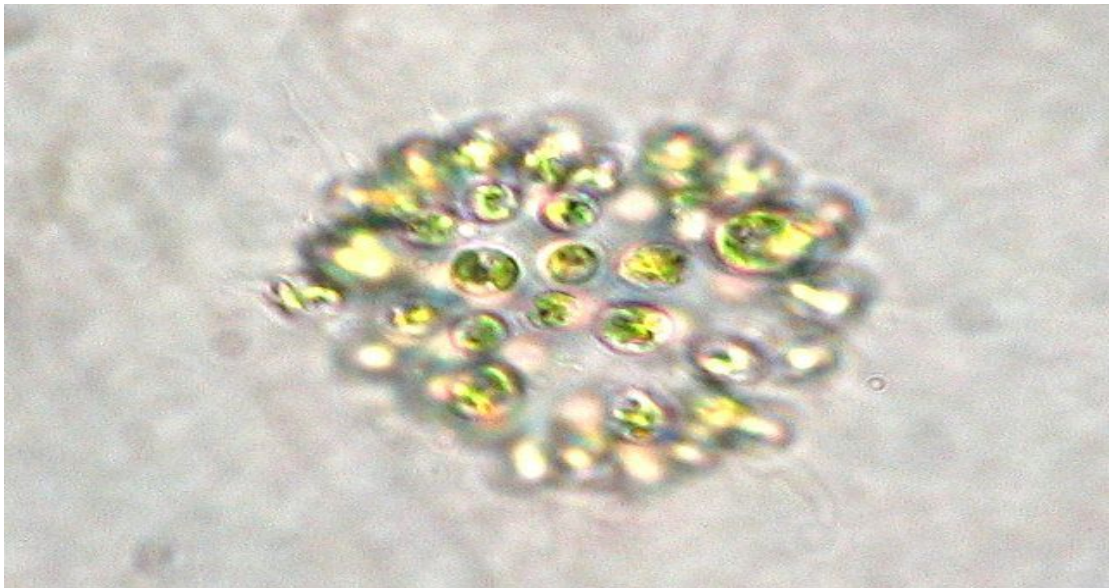


Figure 2. *Microcystis aeruginosa*. (Kristian Peters, 2009, wikipedia)

대표적인 조류 독성은 마이크로시스틴(*Microcystins*)으로 70여 가지의 변종이 있다.

마이크로시스틴 중 독성이 가장 강한 것은 마이크로시스틴-LR 이다. 독성은 생쥐 복강 내 투여 시 50-100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 으로 간에 특이적으로 발암을 촉진시키는 물질이다. [18-19] 남조류에서 발생하는 독성물질은 화학구조 상으로 펩티드계, 알칼로이드계, 리포다당계 등으로 분류된다. 독성 측면에서는 피부독소, 신경독소와 간장독소 등으로 분류된다. *Microcystis aeruginosa*에서 발생하는 독소인 *Microcystin-LR* (MC-LR)은 펩티드계의 간장독소로 전 세계적으로 가장 검출빈도가 높다. 약 1000년 전에 발견되었으며 세계보건기구(WHO)의 가이드라인에서 식수에 *microcystin* 이 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  이상 포함되어 있으면 소량으로도 치명적이라고 발표하였다. 이 독성물질은 인간과 동물에게 단기 및 장기적으로 중독 증상을 나타낸다. [20-21]

국내에서는 조류의 발생정도에 따라 경보를 발령하는 제도인 “조류경보제”를 1998년 도부터 실시하고 있다. 주요 하천 및 호소에서 유해 남조류의 세포 수에 따라 관심, 경계, 조류 대발생 경보를 발령한다. 관심 경보는 상수원구간 1000 cell/mL 이상, 친수활동 구간 20,000 cell/mL 이상, 경계 경보는 상수원구간 10,000 cell/mL 이상, 친수활동 구간 100,000 cell/mL 이상, 조류 대발생 경보는 상수원구간에서 1,000,000 cell/mL 이상에서 발령한다. [22]

녹조현상으로 인한 피해를 막기 위해서는 원인물질인 영양염류의 유입을 차단하여야 한다. 오염물질 처리시설 설치하거나 농경지 오염물질과 가축 배설물 관리, 생활 속 오염물질을 줄여야 한다. 또한, 댐과 저수지에 미리 물을 확보하여 녹조가 대량 발생했을 때 물을 방류하여 정체된 물을 교란시키거나 조류를 하루로 보내는 방법이 있다. 국내에서는 일반적으로 황토살포법, 화학약품 살포법, 응집제, 살조제 처리, 초음파 및 오존 처리법의 화학적 처리 방법을 사용한다. 처리방법이 용이하나 조류제거물질을 무분별하게 살포할 경우, 유해조류 뿐만 아니라 수계의 다른 생물들도 같이 침전되어 생태계의 교란이 발생할 수 있다. 침전된 생물의 분해에 많은 산소가 소모되고 수생생물의 유해성이 저하될 수 있다. 이러한 단점에도 불구하고 화학적인 처리방법은 처리시간의 단축, 우수한 살조 효과, 경제적인 측면을 이유로 지속적으로 수요가 요구되고 있다. 현재 국내에서 사용되고 있는 녹조현상의 제어 방법들의 문제점을 개선하고 유해 남조류를 선택적으로 제어하고 수생태계에 교란을 일으키지 않는 친환경적인 물질의 개발이 필요하다고 생각된다. [23-25]

본 연구에서 녹조 제어 물질의 개발을 위해 약리학적 특성을 갖는 Rhodanine (2-Sulfanylidene-1,3-thiazolidin-4-one)을 기본 구조로 다양한 유도체를 합성하였다. Rhodanine은 헤테로고리 화합물로 알도오스(aldose) 환원효소 억제제이며 당뇨병의 합



병증, 신경병증, 신장병증과 백내장 치료제 약물 소재로 사용되고 있다. [26-27] Rhodanine 유도체의 구조에 따른 *Microcystis aeruginosa* 살조 활성의 상관관계(SAR : Structure-Activity Relationship) 분석을 목적으로 선행 연구에서 *Microcystis aeruginosa*에 선택적인 살조 활성이 확인된 2,4-Thiazolidinedione 유도체와의 비교 분석을 수행하였다. 추가적으로 살조 효과를 보이는 물질을 대상으로 *Daphnia magna*와 *Danio rerio* 독성시험을 수행하였다. 또한, 주사전자현미경을 이용하여 합성된 물질의 처리 후 *Microcystis aeruginosa* 형태변화를 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### A. 재료

#### 1. 유기 합성

합성에 필요한 화학물질들은 TCI (Tokyo Chemical Industry), Sigma-Aldrich, Junsei, Alfa aesar, Acros 사의 순도 98% 이상의 시약을 사용하였다. 합성에 사용되는 용매는 99% 이상의 순도 높은 제품을 구매하여 사용하였다. 수분에 민감한 화학물질들은 N<sub>2</sub> 분위기에서 반응하였다.

TLC판, UV 램프와 발색시약을 이용하는 얇은 막 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)를 통해 1차 분석 후 불순물 제거를 위해 재결정 및 혼합물 용리제와 슬러리를 준비하여 컬럼관 안에 실리카 겔을 충전하는 컬럼 크로마토그래피(Column Chromatography)를 통해 합성물질을 순수하게 얻었다.

합성된 물질의 2차 분석은 FT-NMR (<sup>1</sup>H Nuclear magnetic resonance spectroscopy, JEOL JNM-LA, 300 MHz, Japan) 기기를 통해 측정하였다. <sup>1</sup>H NMR의 화학적 이동량(δ 등급)은 part per million (ppm)으로 표시하였으며, J-coupling 결합상수는 Hz 단위로 측정하였다. <sup>1</sup>H NMR의 표준시료는 CDCl<sub>3</sub> (Chloroform-d)와 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)를 사용하였다.

#### 2. 유해조류 (시험종 및 배양조건)

본 실험에서는 남조류(Cyanobacteria)인 *Microcystis aeruginosa* (HYK 0906 A2/ WREO 5, HYK 0906/ WREO 11), *Anabaena flos-apuae* (AG10026, KCTC 생물자원센터)와 무해 녹조인 *Selenastrum capricornutum* (AG10009, KCTC 생물자원센터)을 사용하였다.

조류(algae)들은 pH가 7-8 사이로 조절된 배지 BG-11 Medium (Uniqath Ltd. wade Road, Basingstocke, Hants RG24 0PW, UK)을 Table 2와 같은 조성표를 이용해 제조하였다. 대를 이어 배양하기 위해 2주에 한 번씩 신선한 배지로 계대 배양(subculture) 하여 광주기 12:12 cycle (light : dark), 2500-2700 Lux, 23-25℃의 정치조건으로 배양하였다.

Table 2. BG-11 (Blue-Green Medium) 조성표

<b>BG-11 (Blue-Green Medium)</b>			
Stocks			멸균 증류수 1 L
Compound			
1	<i>NaNO<sub>3</sub></i>	15.0 g/L	100.0 mL
2	<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	2.0 g/0.5L	10.0 mL
3	<i>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	3.75 g/0.5L	10.0 mL
4	<i>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</i>	1.80 g/0.5L	10.0 mL
5	Citric acid	0.30 g/0.5L	10.0 mL
6	Ammonium ferric citrate green	0.30 g/0.5L	10.0 mL
7	<i>EDTANa<sub>2</sub></i>	0.05 g/0.5L	10.0 mL
8	<i>Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub></i>	1.00 g/0.5L	10.0 mL
9	Trace metal solution		1.0 mL
	<i>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></i>	2.86 g/L	
	<i>MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</i>	1.81 g/L	
	<i>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	0.22 g/L	
	<i>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</i>	0.39 g/L	
	<i>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</i>	0.08 g/L	
	<i>Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</i>	0.05 g/L	

### 3. 물벼룩(*Daphnia magna*)

물벼룩은 전 세계적으로 분포하며 여러 가지 화학물질에 대한 높은 민감성을 나타낸다. 급성독성을 평가하는데 사용하는 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development)공시종인 *Daphnia magna*를 한국 화학 융합 시험 연구원(헬스케어 본부/독성 평가팀)에서 분양받아 배양하였다. 물벼룩 배양액은 M4 medium을 Table 3, Table 4 와 같은 조성표를 이용해 제조하였다. 물벼룩의 사육을 위해 *Chlorella*와 *Selenastrum*

*gracile* 와 같은 단세포 녹조류를 배양하여 먹이로 사용하였고 먹이로 사용한 *Chlorella* 와 *Selenastrum gracile*은 BG-11 배지로 2주에 한번 씩 계대배양 하여 사용하였다. 광주기 12:12 cycle (light : dark), 18-22°C 환경에서 사육하였다.

#### 4. *Danio rerio* (Zebra fish)

생태독성평가를 위해 널리 사용되는 공시어종인 *Danio rerio* (zebra fish)를 사용하였다. 수족관(광주광역시 성산수족관)을 통해 구입하여 100 L 어항에서 수돗물을 1차 여과시킨 후 탄소 필터로 2차 여과하여 활성탄으로 탈염한 배양수를 사용했으며, 항온장치를 이용하여 수온을 26°C로 유지하며 이들에 한번 씩 전용 사료(Color charasin)를 공급하여 사육하였다. 구입한 후 2주 동안 사육하여 검증된 안정성을 갖는 *Danio rerio*를 실험에 사용하였다.

Table 3. M4 Medium 조성표

M4 Medium		
	농도 (g/200 mL)	M4 해당량 (mL/L)
Stock (1)		50 mL
Stock (2)		0.1 mL
<i>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</i>	58.76 g	1.0 mL
<i>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	49.32 g	0.5 mL
<i>KCl</i>	11.60 g	0.1 mL
<i>NaHCO<sub>3</sub></i>	12.96 g	1.0 mL
<i>Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O</i>	10.00 g	0.2 mL
<i>NaNO<sub>3</sub></i>	0.548 g	0.1 mL
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	0.286 g	0.1 mL
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	0.368 g	0.1 mL

Table 4. M4 Medium 배지의 Stock (1), (2) Solution 조성표

<b>Stock (1) - Combined traced element</b>		
	농도 (g/200 mL)	Stock (1) 해당량 (mL/L)
$H_3BO_3$	11.438 g	1 mL
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.442 g	1 mL
$LiCl$	1.224 g	1 mL
$RbCl$	0.284 g	1 mL
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	0.608 g	1 mL
$NaBr$	0.064 g	1 mL
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.252 g	1 mL
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.067 g	1 mL
$ZnCl_2$	0.052 g	1 mL
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.040 g	1 mL
$KI$	0.013 g	1 mL
$Na_2SeO_3$	0.00876 g	1 mL
$NH_4VO_3$	0.0023 g	1 mL
	농도 (g/200mL)	20 mL
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	2.5 g	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.995 g	

<b>Stock (2) - Vitamin mix</b>	
	Stock (2) 해당량 (g/L)
Cyanocobalamine (vitamin B <sub>12</sub> )	0.75 g
Thiamine HCl (vitamin B <sub>1</sub> )	0.01 g
Biotin	0.075 g

## B. 약물 활성 측정 및 독성 시험

### 1. Microplate assay / Measurement of LC<sub>50</sub> value

녹조 대발생시의 상태인 고밀도로 배양된 *Microcystis aeruginosa*( $1 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>) 배양액을 준비된 96-well plate에 각각 180  $\mu$ L 씩 준비한 후 합성된 화합물을 최종 농도가 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1  $\mu$ M이 되도록 20  $\mu$ L 씩 접종하여 working volume은 200  $\mu$ L로 처리하였다. 대조군에는 180  $\mu$ L 배양액과 20  $\mu$ L BG-11 배지를 접종하였으며, 배양하는 동안 96-well plate 안의 실험군의 증발을 막기 위해 사이사이에 증류수를 넣어주었다. 접종 후 5일 동안 *Microcystis aeruginosa*의 최적의 배양조건에 맞춰 배양기에서 관찰하였다. 5일 후 plate에서 10  $\mu$ L 씩 분취하여 neubauer hemocytometer (SUPERIOR)와 현미경(Nikon, ECLIPSE E100, 0.3A, 50~60 Hz)을 이용하여 각 농도의 실험군과 대조군의 온전한 형태의 세포수를 계수하였다. 세포 수 감소율, 살조 활성 (Algicidal activity)은 식 1)을 사용해 계산하였다.

$$\text{살조 활성(Algicidal activity)} = (\text{대조군} - \text{실험군}) / \text{대조군} \times 100 \quad 1)$$

본 실험은 3회 반복하여 실시하였으며, 실험의 결과는 Microcal Origin software을 이용하여 상기 조류 세포수를 50% 제어할 수 있는 농도 값, LC<sub>50</sub>을 확인하였다.

### 2. 물벼룩(*Daphnia magna*) 급성 독성 시험

선별된 화합물의 농도별 생태 독성 값을 계산하기 위하여 지수식 시험 방법을 이용하여 시험하였다. 물벼룩은 독성물질의 영향에 의해 유영성을 잃게 된다. M4 Medium에 사육된 물벼룩 중 생후 2주 이상의 물벼룩 암컷 성체가 생산한 생후 24 시간미만의 어린 개체를 사용하였다. 시험용기(conical tube, 15 mL)에 M4 medium 사육용수는 물벼룩 1개체 당 2 mL 이상, 물벼룩 어린 개체를 5마리 씩 넣고 각 각의 농도의 화합물을 처리하였다. 4개의 반복구를 두어 실험하였고 실험조건은 배양조건과 동일하게 진행하였으며, 시험용기를 조용히 움직여 준 후, 약 15초 후에 관찰하여 일부기관(촉각, 후복

부 등)이 움직이나 유영하지 않음을 24시간동안 육안으로 관찰하였다.  $EC_{50}$  (50% Effective Concentration, 반수영향농도)을 이용하여 화합물의 물벼룩 급성 독성 시험에 대한 영향을 확인하였다.

### 3. *Danio rerio* (zebra fish) 독성 시험

독성시험은 시험 기간 동안 시험액을 교환하지 않는 지수식 방법(static nonrenewal test)으로 진행하였다. 부화 후 3개월 이상 된  $2 \pm 1$  cm 크기의 개체를 2주 동안 배양수에서 사육하며 0% 사망률을 확인한 후 사용하였다. 배양수에서의 화합물 석출을 막기 위해 tween 20을 이용하여 고체 화합물들을 micro micelle화 하였다. 플라스틱이나 유리 수조에 어류를 사육한 배양수 3 L 와 어류(*Danio rerio*) 5 마리를 넣은 후 선별된 화합물을 농도별로 처리하였다. 지표생물의 사망률과 기형율의 변화를 24시간 간격으로 96시간 이상 관찰하였다.

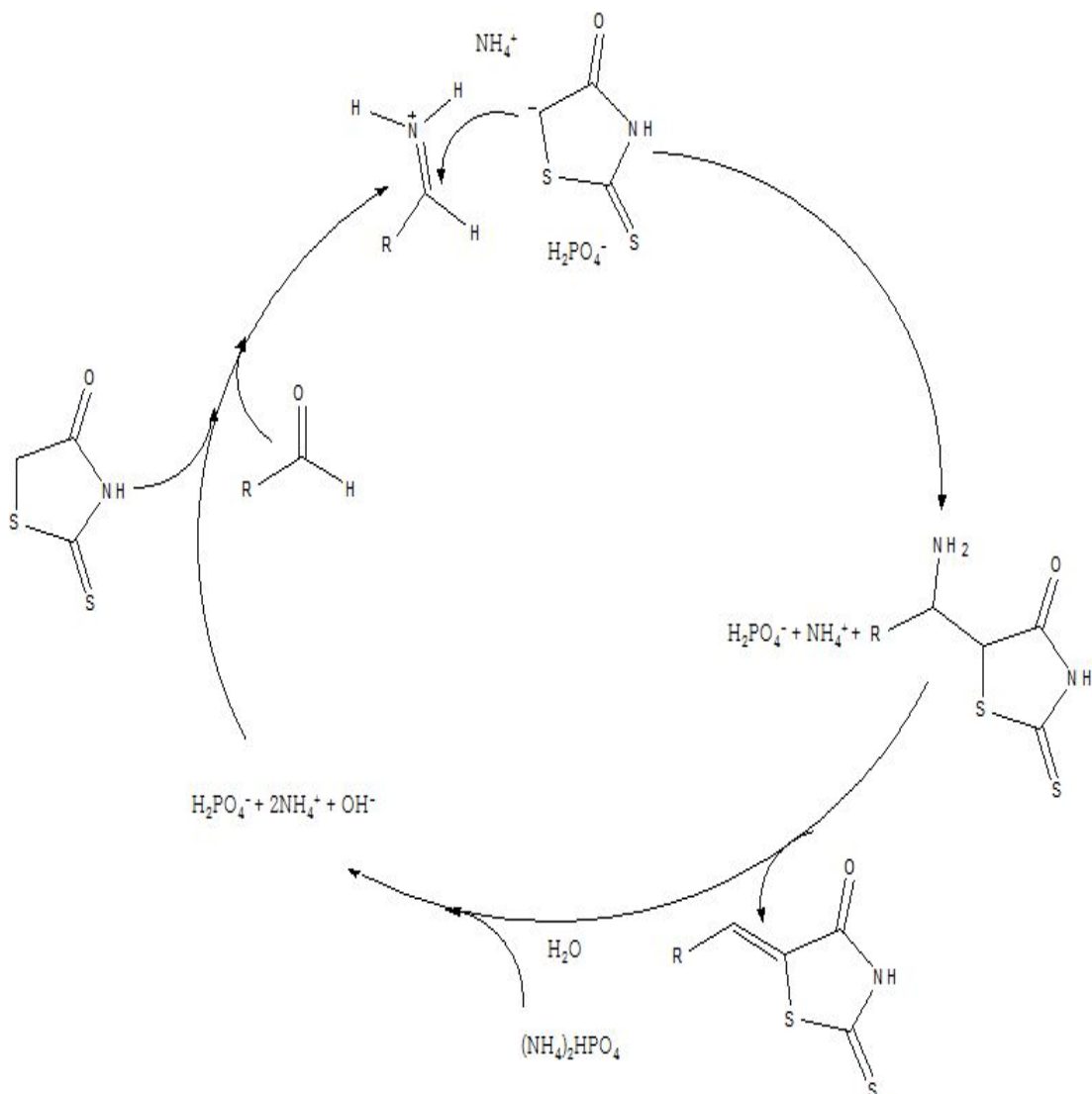
## C. 세포의 형태변화 관찰

### 1. 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscope, SEM)

주사전자현미경은 광학현미경보다 높은 배율을 관찰할 수 있다. 이를 이용해 화합물을 처리한 후 *Microcystis aeruginosa*의 표면을 관찰하였다. 관찰의 매체로 전자선(electron beam)을 사용하는데, 전자파를 사용하는 이유는 가시광선을 사용하는 경우보다 분해능을 대단히 높일 수 있고 고배율로 관찰할 수 있기 때문이다. 현미경의 내부는 진공상태여야 한다. 그 이유는 전자가 공기와 충돌하면 에너지가 소실되거나 굴절되어 원하는 대로 제어하기가 어렵기 때문이다. 전자선이 시료의 표면에 충돌하면서 발생하는 2차 전자, 투과전자, 산란전자, X-Ray 등을 측정하여 표면의 형태를 영상으로 나타낸다. SEM을 이용해 실험군(약물 처리된 *Microcystis aeruginosa*)과 대조군의 이미지 형태를 얻기 위하여 시료 전처리 과정을 거쳤다. 생체 시료인 조류는 시료채취, 절편, 고정, 탈수 및 포매, 건조 및 시료부착과 코팅의 순서로 진행된다. 원심분리기를 이용해 약물이 처리된 조류를 배지와 분리시킨다. 배지를 따라낸 후 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%의 Ethanol을 이용해 저농도의 Ethanol부터 희석하여 원심분리 하였다. 마지막 99% Ethanol을 따라낸 후 동결건조기(freezing dryer)를 이용해 24시간 건조시킨다. 시료대에 카본 양면 페스트를 부착하여 테이프 위에 핀셋을 이용하여 건조된 시료(조류)를 부착시킨다. 시료(조류)가 전도성을 띄지 않으므로 백금 코팅을 하여 2차 전자 발생효율을 높여주었다. [28-29]

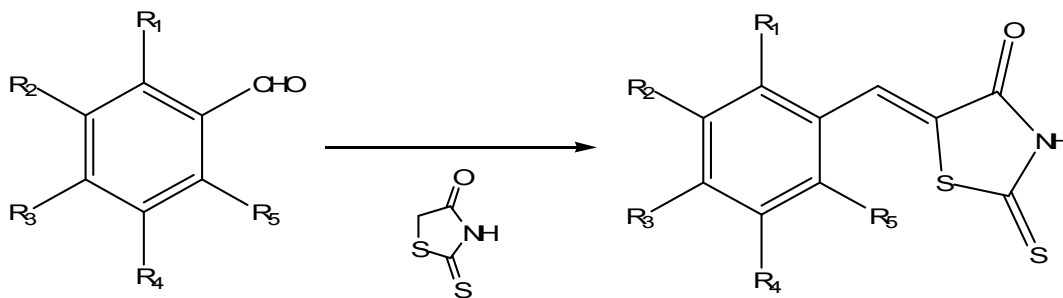


## D. Rhodanine 유도체 합성



Scheme 1. Plausible mechanism for the synthesis of 5-arylidenerhodanines catalyzed by diammonium hydrogen phosphate.

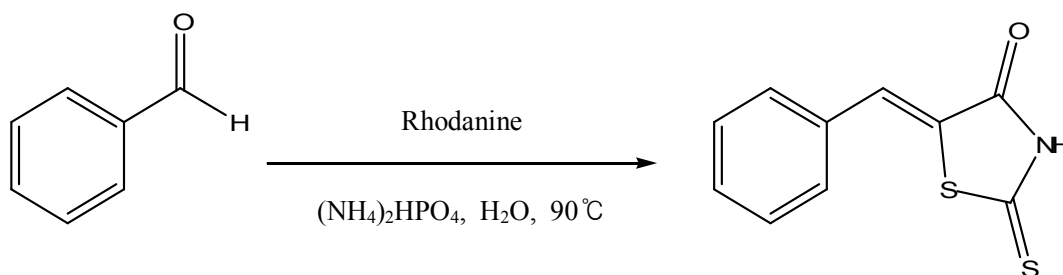
## 1. 화합물 (1~29)의 합성



Scheme 2. Reagents and conditions;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $90^\circ\text{C}$ , 20 min

Scheme 2는 1 ~ 29 까지의 화합물 합성방법을 도식화 하였으며, 구체적인 실험방법은 1번 화합물에 나타내었다. 이후의 실험방법은 모두 동일하므로 생략하였다.

### (1) 5-Benzylidenerhodanine

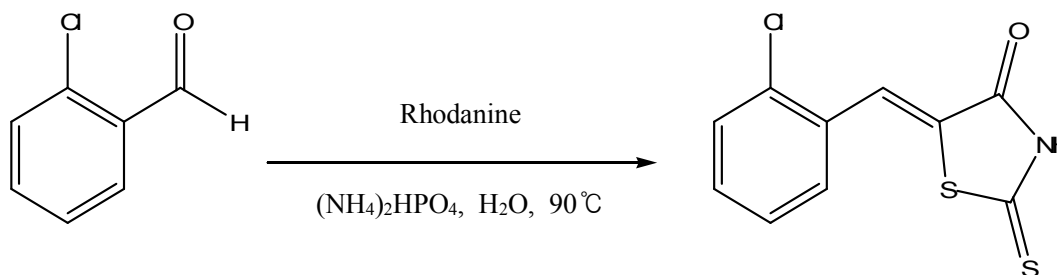


둥근 플라스크에 Benzaldehyde (0.382 mL, 3.75 mmol), Rhodanine (0.5 g, 3.75 mmol) 과 Diammonium hydrogen phosphate (0.0496 g, 0.375 mmol)을 넣고 용매  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL)에 녹인 후 oil bath에서 condenser를 장착한 후  $90^\circ\text{C}$ 에서 20분 동안 교반 시킨다. 20분 후 TLC를 통해 반응의 진행정도를 확인하였으며, 반응이 완료되었을 때  $\text{H}_2\text{O}$ 로 감압여과 시킨다. 여과 후 TLC에서 불순물 포인트가 나타나면 Ethanol로 재결정 하거나, 화합물에 Methanol을 넣어 10분 교반 후 감압여과를 통해 Methanol에 녹아있는 불순물을 제거한다. 이로써 순수한 노란색의 고체 화합물을 얻었다.

Yield : 85%

$^1\text{H NMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.88 (s, 1H),  $\delta$  7.66 (s, 1H),  $\delta$  7.62 (m, 5H)

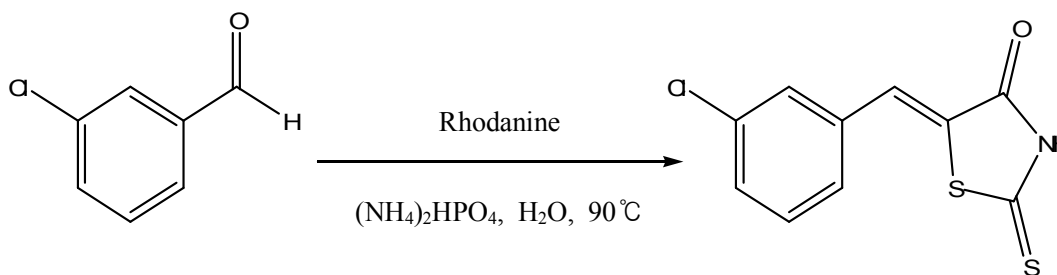
**(2) 5-(2-Chlorobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 70 %

$^1\text{H NMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.93 (s, 1H),  $\delta$  7.71 (s, 1H),  $\delta$  7.65 (m, 4H)

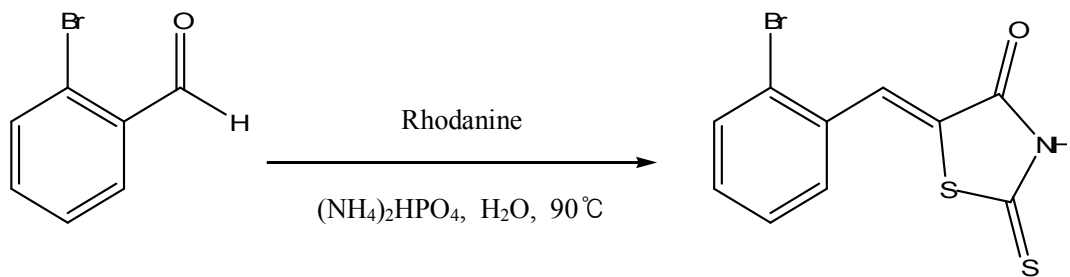
**(3) 5-(3-Chlorobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 83 %

$^1\text{H NMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.96 (s, 1H),  $\delta$  7.70 (s, 1H),  $\delta$  7.65 (s, 1H),  $\delta$  7.61 (m, 3H)

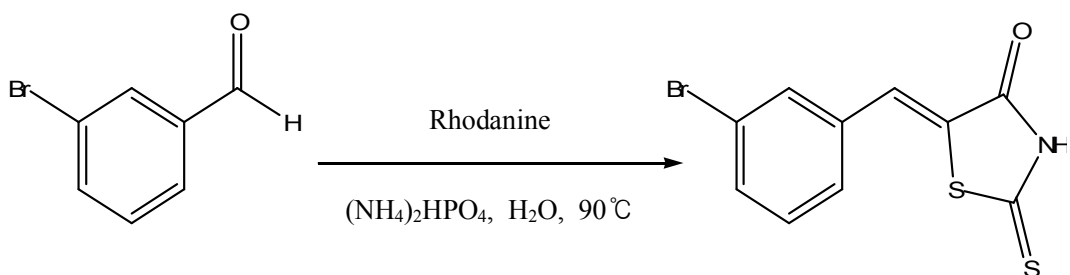
**(4) 5-(2-Bromobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 85 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  13.93 (s, 1H),  $\delta$  7.83 (d,  $J=8.04$  Hz, 1H),  $\delta$  7.72 (s, 1H),  $\delta$  7.60 (m, 2H),  $\delta$  7.45 (t,  $J=7.50$  Hz, 1H)

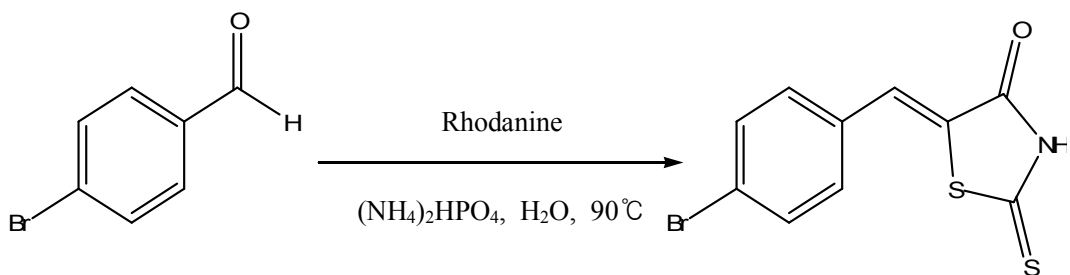
**(5) 5-(3-Bromobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 90 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  13.92 (s, 1H),  $\delta$  7.83 (s, 1H),  $\delta$  7.70 (d,  $J=7.68$  Hz, 1H),  $\delta$  7.63 (s, 1H),  $\delta$  7.58 (d,  $J=7.68$  Hz, 1H),  $\delta$  7.52 (t,  $J=7.71$  Hz, 1H)

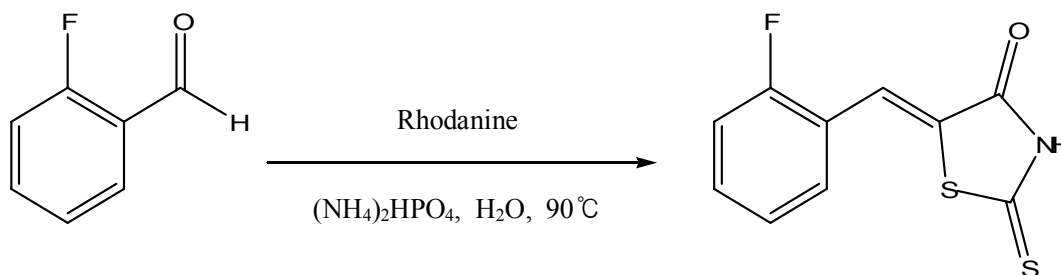
**(6) 5-(4-Bromobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 90 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.95 (s, 1H),  $\delta$  7.76 (d,  $J=8.43$  Hz, 2H),  $\delta$  7.63 (s, 1H),  $\delta$  7.57 (d,  $J=8.43$  Hz, 2H)

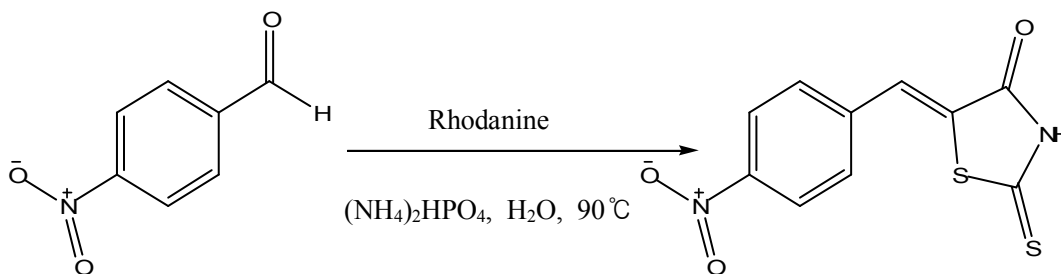
**(7) 5-(2-Fluorobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 68 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.85 (s, 1H),  $\delta$  7.60 (s, 1H),  $\delta$  7.46 (m, 3H),  $\delta$  7.34 (d,  $J=6.57$  Hz, 1H)

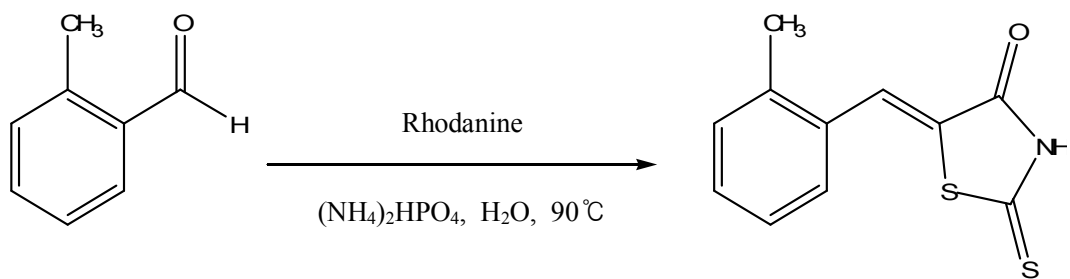
**(8) 5-(4-Nitrobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 75 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.97 (s, 1H),  $\delta$  8.36 (d,  $J=8.79$  Hz, 2H),  $\delta$  7.88 (d,  $J=8.79$  Hz, 2H),  $\delta$  7.74 (s, 1H)

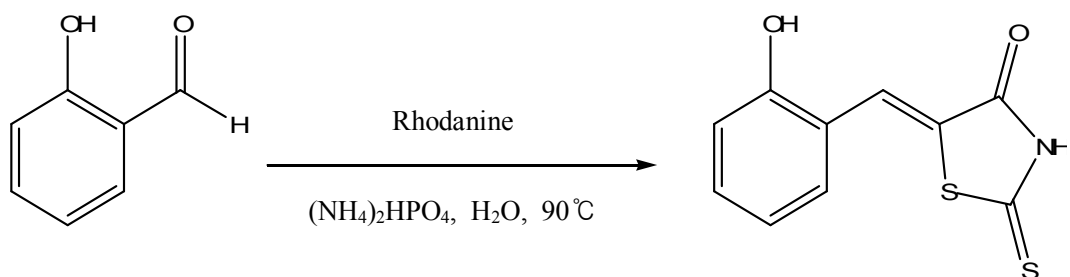
**(9) 5-(2-Methylbenzylidene)-rhodanine**



Yield : 85 %

$^1\text{H NMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.87 (s, 1H),  $\delta$  7.74 (s, 1H),  $\delta$  7.38 (m, 4H),  $\delta$  2.42 (s, 3H)

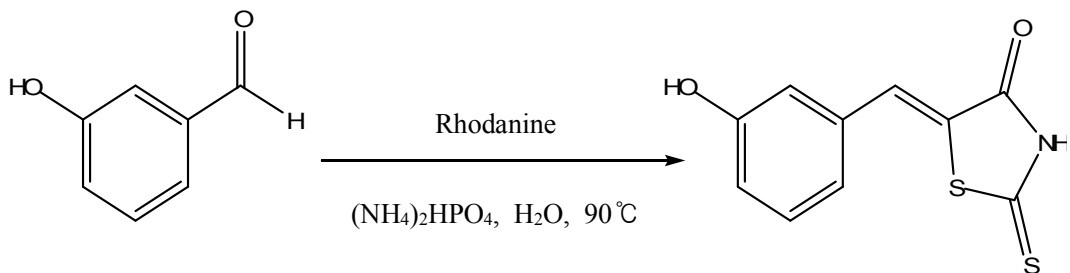
**(10) 5-(2-Hydroxybenzylidene)-rhodanine**



Yield : 90 %

$^1\text{H NMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.74 (s, 1H),  $\delta$  10.68 (s, 1H),  $\delta$  7.85 (s, 1H),  $\delta$  7.36 (m, 2H),  $\delta$  6.98 (m, 2H)

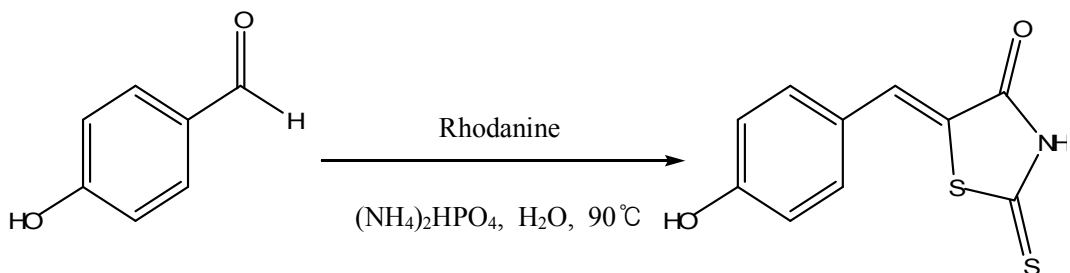
**(11) 5-(3-Hydroxybenzylidene)-rhodanine**



Yield : 92 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.83 (s,1H),  $\delta$  9.88 (s, 1H),  $\delta$  7.55 (s, 1H),  $\delta$  7.36 (t,  $J=7.71$  Hz, 1H),  $\delta$  7.06 (d,  $J=7.32$  Hz, 1H),  $\delta$  6.97 (s, 1H),  $\delta$  6.91 (d,  $J=8.43$  Hz, 1H)

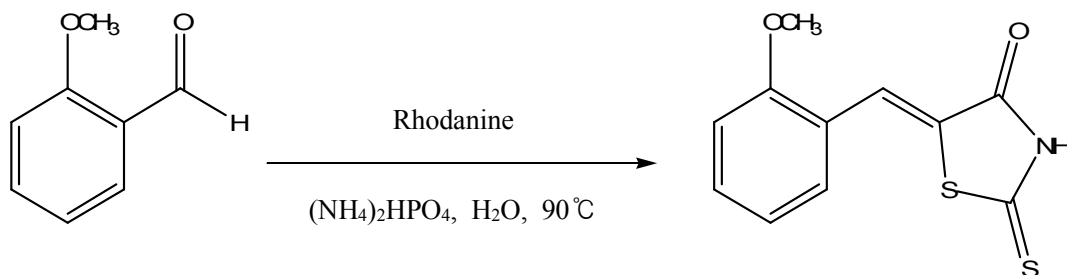
**(12) 5-(4-Hydroxybenzylidene)-rhodanine**



Yield : 90 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.71 (s, 1H),  $\delta$  10.44 (s, 1H),  $\delta$  7.56 (s, 1H),  $\delta$  7.48 (d,  $J=8.43$  Hz, 2H),  $\delta$  6.94 (d,  $J=8.43$  Hz, 2H)

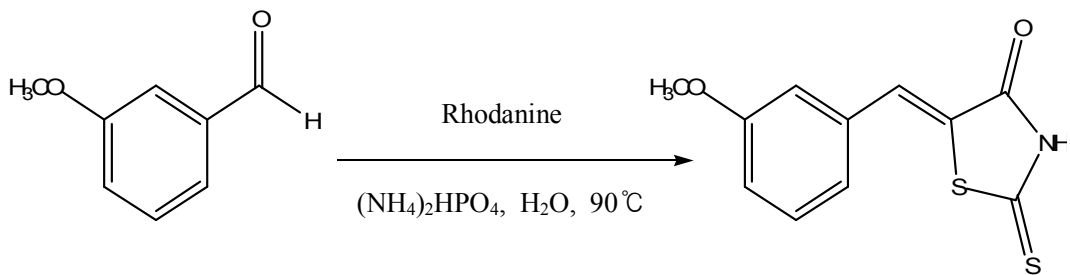
**(13) 5-(2-Methoxybenzylidene)-rhodanine**



Yield : 86 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.80 (s, 1H),  $\delta$  7.80 (s, 1H),  $\delta$  7.54 (t,  $J=6.6$  Hz, 1H),  $\delta$  7.42 (d,  $J=7.71$  Hz, 1H),  $\delta$  7.18 (m, 2H),  $\delta$  3.90 (s, 3H)

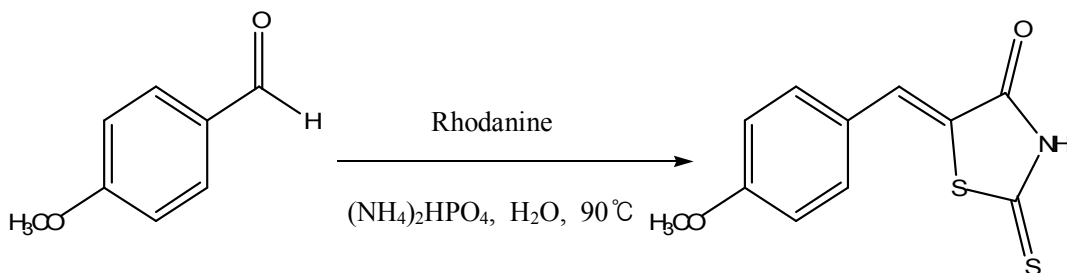
**(14) 5-(3-Methoxybenzylidene)-rhodanine**



Yield : 76 %

$^1\text{H NMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.86 (s, 1H),  $\delta$  7.62 (s, 1H),  $\delta$  7.48 (t,  $J=8.04$  Hz, 1H),  $\delta$  7.16 (m, 3H),  $\delta$  3.81 (s, 3H)

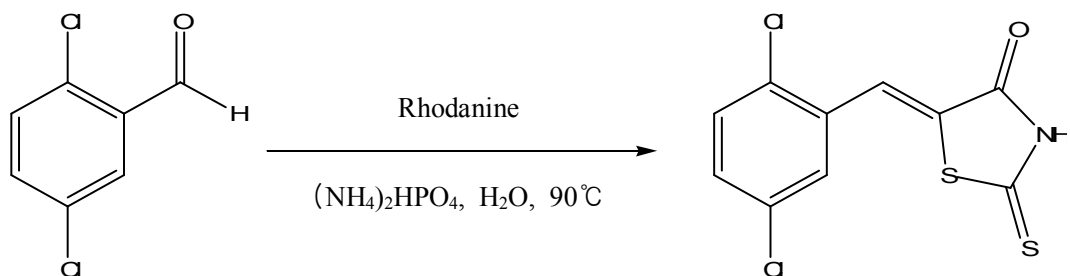
**(15) 5-(4-Methoxybenzylidene)-rhodanine**



Yield : 85 %

$^1\text{H NMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.77 (s, 1H),  $\delta$  7.62 (s, 1H),  $\delta$  7.59 (d,  $J=8.79$  Hz, 2H),  $\delta$  7.13 (d,  $J=8.43$  Hz, 2H),  $\delta$  3.83 (s, 3H)

**(16) 5-(2,5-Dichlorobenzylidene)-rhodanine**

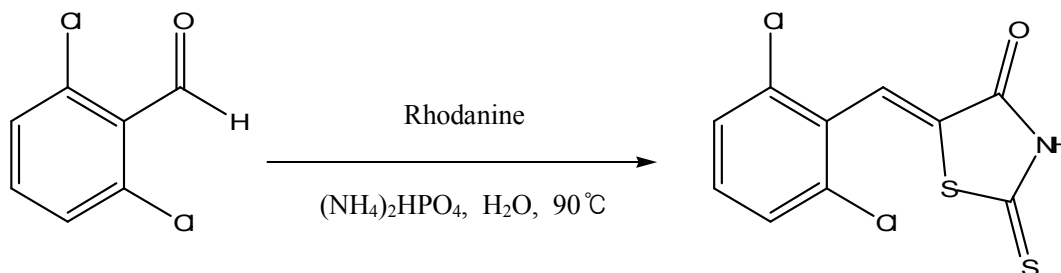


Yield : 95 %



$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  14.03 (s, 1H),  $\delta$  7.71 (m, 3H),  $\delta$  7.50 (s, 1H)

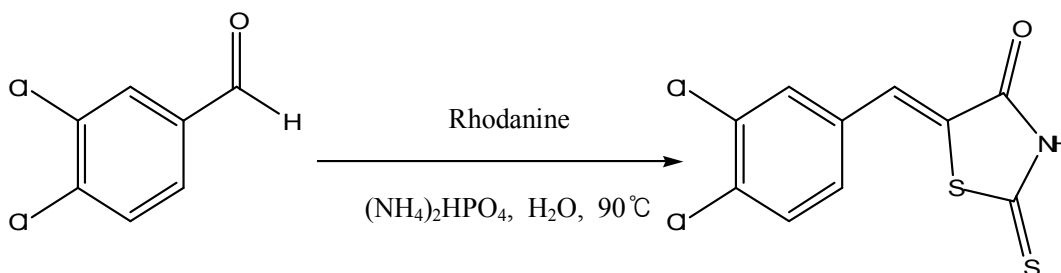
**(17) 5-(2,6-Dichlorobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 95 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.95 (s, 1H),  $\delta$  7.62 (m, 3H),  $\delta$  7.53 (t,  $J=7.35$  Hz, 1H)

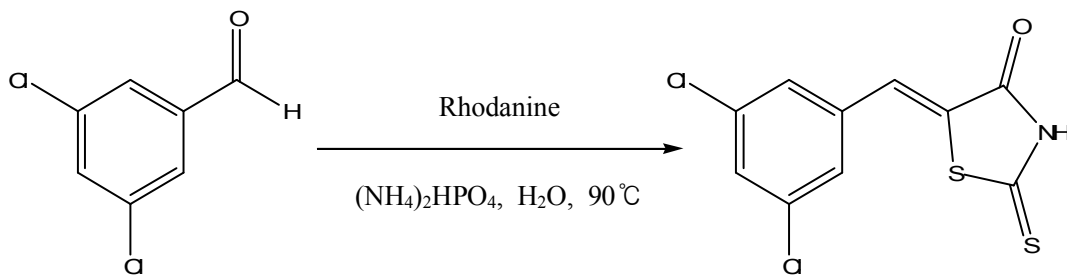
**(18) 5-(3,4-Dichlorobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 92 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.91 (s, 1H),  $\delta$  7.92 (s, 1H),  $\delta$  7.82 (d,  $J=8.43$  Hz, 1H),  $\delta$  7.64 (s, 1H),  $\delta$  7.55 (d,  $J=8.43$  Hz, 1H)

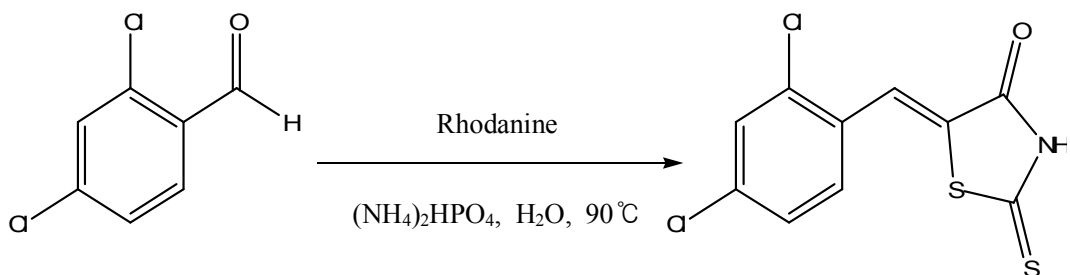
**(19) 5-(3,5-Dichlorobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 85 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.97 (s, 1H),  $\delta$  7.77 (s, 1H),  $\delta$  7.62 (m, 3H)

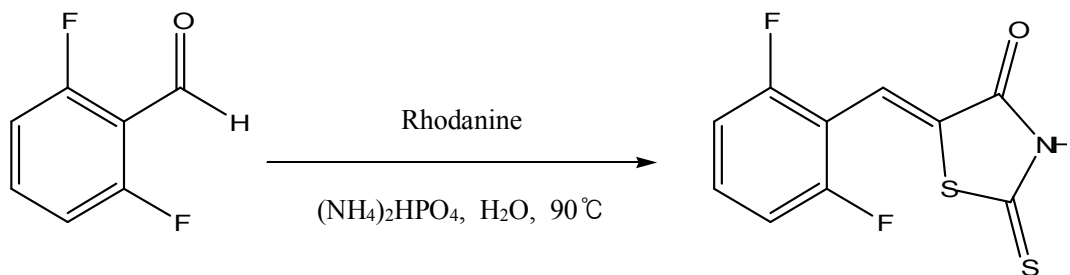
**(20) 5-(2,4-Dichlorobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 85 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  14.03 (s, 1H),  $\delta$  7.87 (s, 1H),  $\delta$  7.68 (s, 1H),  $\delta$  7.64 (d,  $J=8.40$  Hz, 1H),  $\delta$  7.56 (d,  $J=8.43$  Hz, 1H)

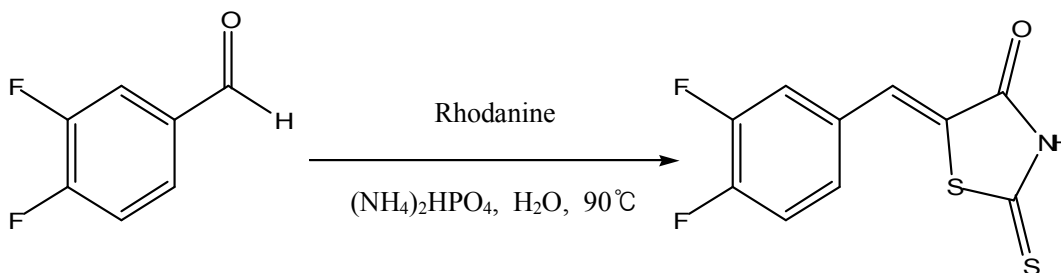
**(21) 5-(2,6-Difluorobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 62 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.88 (s, 1H),  $\delta$  7.69 (m, 1H),  $\delta$  7.50 (s, 1H),  $\delta$  7.32 (m, 2H)

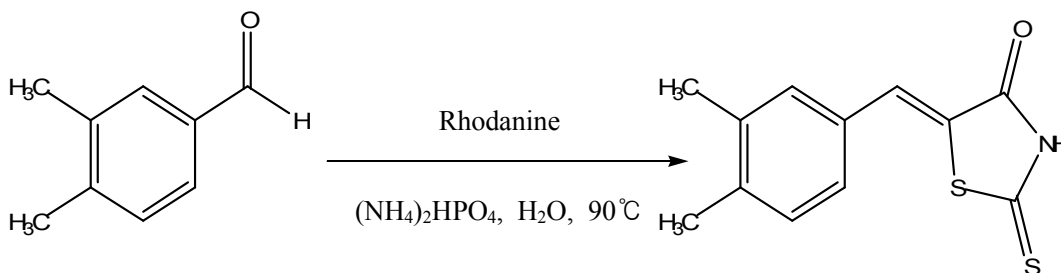
**(22) 5-(3,4-Difluorobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 65 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.90 (s, 1H),  $\delta$  7.73 (d,  $J=9.51$  Hz, 1H),  $\delta$  7.64 (s, 1H),  $\delta$  7.61 (d,  $J=9.51$  Hz, 1H),  $\delta$  7.47 (s, 1H)

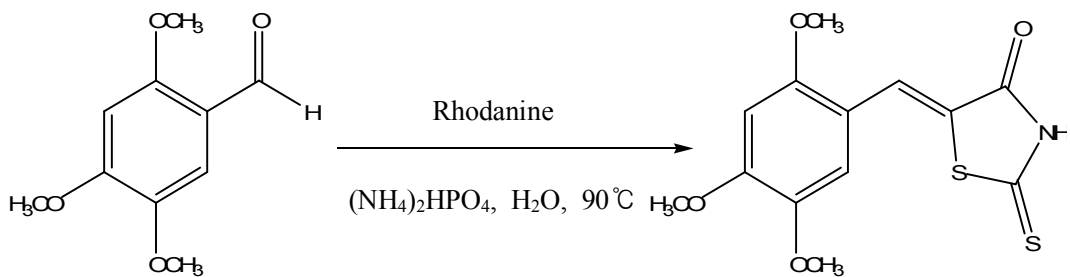
**(23) 5-(3,4-Dimethylbenzylidene)-rhodanine**



Yield : 90 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.78 (s, 1H),  $\delta$  7.62 (s, 1H),  $\delta$  7.22 (m, 3H),  $\delta$  3.84 (s, 3H),  $\delta$  3.82 (s, 3H)

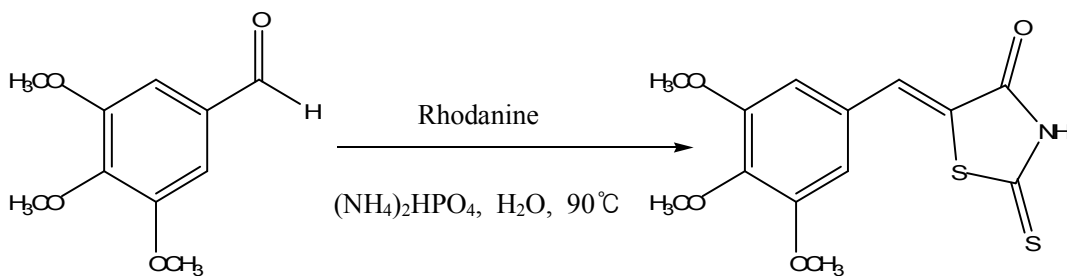
**(24) 5-(2,4,5-Trimethoxybenzylidene)-rhodanine**



Yield : 80 %

$^1\text{H NMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.84 (s, 1H),  $\delta$  7.61 (s, 1H),  $\delta$  6.91 (s, 2H),  $\delta$  3.84 (m, 9H)

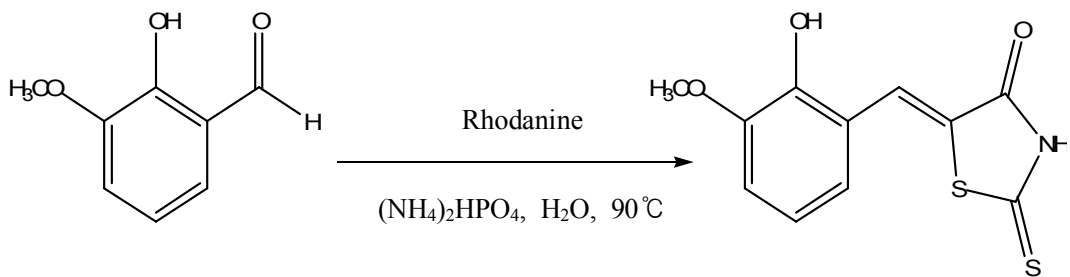
**(25) 5-(3,4,5-Trimethoxybenzylidene)-rhodanine**



Yield :80 %

$^1\text{H NMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.84 (s, 1H),  $\delta$  7.61 (s, 1H),  $\delta$  6.92 (s, 2H),  $\delta$  3.84 (s, 6H),  $\delta$  3.73 (s, 3H)

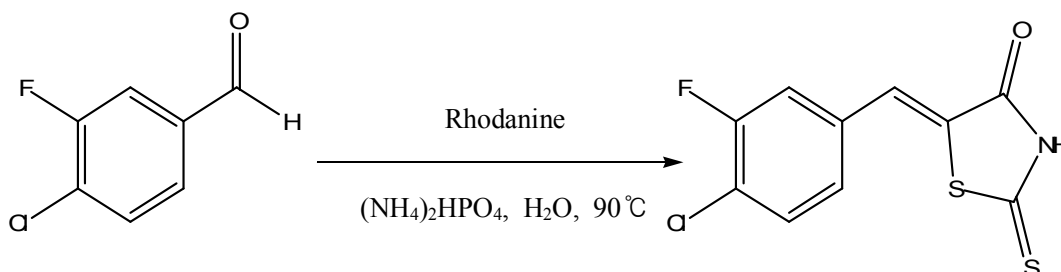
**(26) 5-(2-Hydroxy-3-methoxybenzylidene)-rhodanine**



Yield : 85 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.74 (s, 1H),  $\delta$  9.89 (s, 1H),  $\delta$  7.87 (s, 1H),  $\delta$  7.12 (dd,  $J=2.94$  and  $6.22$  Hz, 1H),  $\delta$  6.93 (m, 2H),  $\delta$  3.84 (s, 3H)

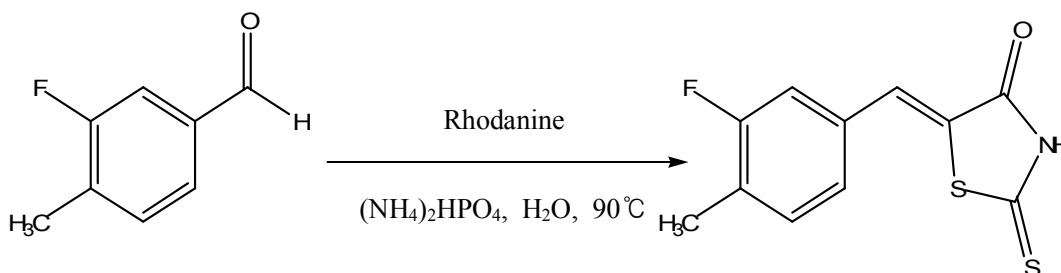
**(27) 5-(4-Chloro-3-fluorobenzylidene)-rhodanine**



Yield : 75 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.94 (s, 1H),  $\delta$  7.79 (m, 2H),  $\delta$  7.64 (s, 1H),  $\delta$  7.45 (d,  $J=8.40$  Hz, 1H)

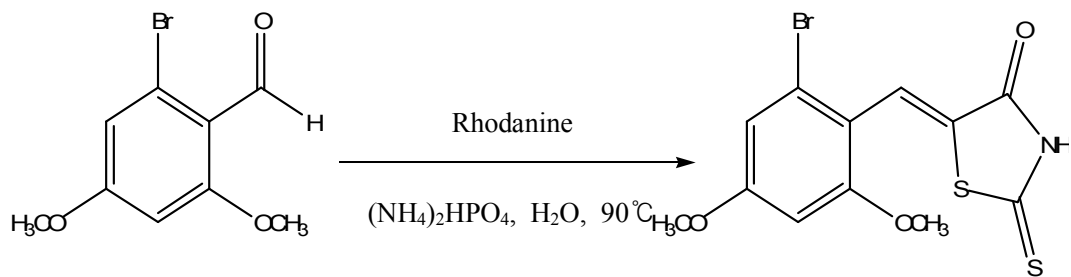
**(28) 5-(3-Fluoro-4-methylbenzylidene)-rhodanine**



Yield : 70 %

$^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.88 (s, 1H),  $\delta$  7.62 (s, 1H),  $\delta$  7.47 (m, 2H),  $\delta$  7.34 (d,  $J=8.04$  Hz, 1H),  $\delta$  2.29 (s, 3H)

**(29) 5-(2-Bromo-4,6-Dimethoxybenzylidene)-rhodanine**



Yield : 70 %

$^1\text{H NMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.94 (s, 1H),  $\delta$  7.67 (s, 1H),  $\delta$  7.38 (s, 1H),  $\delta$  6.94 (s, 1H),  $\delta$  3.86 (d,  $J=6.21$  Hz, 6H)

### III. 결과 및 고찰

#### A. Rhodanine 화합물의 Microplate assay 결과

효과적인 유해조류(Harmful algae)의 제어를 위해 SAR (Structure-Activity Relationship), 구조 활성 관계를 분석하였다. 유해녹조인 *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*, 무해조류인 *Selenastrum capricornutum* 중에 대하여 Microplate assay를 진행하였다. *Anabaena flos-aquae*는 모든 화합물에 접종 농도 5  $\mu$ M 이상에서 활성이 거의 나타나지 않았다. 반면에 몇몇의 화합물은 *Microcystis aeruginosa*에 대해 선택적인 살조 활성을 보였다. 또한, 기존의 2,4-Thiazolidinedione 화합물과의 비교분석을 통해 화학구조와의 상관관계를 분석하였다.

#### 1. *Microcystis aeruginosa* 살조 활성 결과

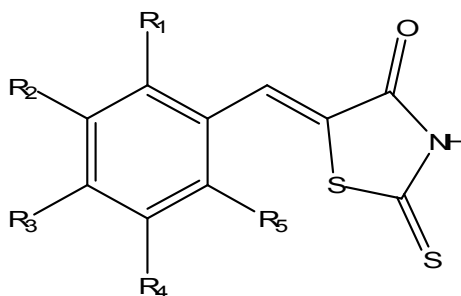


Figure 3. 합성된 5-Benzylidenerhodanine 유도체

Table 5. Compound 1-7 살조 활성 결과

Compound NO.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	LC <sub>50</sub> (μM)
1	- H	- H	- H	- H	- H	2.74
2	- Cl	- H	- H	- H	- H	2.80
3	- H	- Cl	- H	- H	- H	1.11
4	- Br	- H	- H	- H	- H	1.83
5	- H	- Br	- H	- H	- H	1.78
6	- H	- H	- Br	- H	- H	1.21
7	- F	- H	- H	- H	- H	1.94

할로젠(halogen) 치환기가 1개 붙은 화합물은 다른 화합물에 비하여 LC<sub>50</sub> 값이 3 μM 이하의 높은 살조 활성을 보였다. bromine (-Br) 치환기는 R<sub>1</sub> 에서 R<sub>3</sub> 로 순으로 LC<sub>50</sub> 값이 낮아짐을 알 수 있었다. chlorine (-Cl)치환기 R<sub>1</sub> 에서 R<sub>2</sub> 로 LC<sub>50</sub> 값이 두 배 이상 낮아짐을 확인하였다.

Table 6. Compound 8-15 살조 활성 결과

Compound NO.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	LC <sub>50</sub> (μM)
8	- H	- H	-NO <sub>2</sub>	- H	- H	3.49
9	- CH <sub>3</sub>	- H	- H	- H	- H	3.85
10	- OH	- H	- H	- H	- H	2.64
11	- H	- OH	- H	- H	- H	> 10
12	- H	- H	- OH	- H	- H	> 5
13	- OCH <sub>3</sub>	- H	- H	- H	- H	> 5
14	- H	- OCH <sub>3</sub>	- H	- H	- H	3.58
15	- H	- H	- OCH <sub>3</sub>	- H	- H	> 10



hydroxy (-OH) 치환기는 R<sub>1</sub> 의 위치에서 가장 높은 활성이 측정되었으며 methoxy (-OCH<sub>3</sub>) 치환기는 R<sub>2</sub> 위치에서 LC<sub>50</sub> 값이 5 μM 이하의 결과가 나왔지만 hydroxy (-OH) 치환기와 methoxy (-OCH<sub>3</sub>) 치환기는 다른 위치에서는 5 μM 이상에서도 살조 활성을 보이지 않았다.

Table 7. Compound 16-23 살조 활성 결과

Compound NO.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	LC <sub>50</sub> (μM)
16	- Cl	- H	- H	- Cl	- H	0.84
17	- Cl	- H	- H	- H	- Cl	0.83
18	- H	- Cl	- Cl	- H	- H	0.98
19	- H	- Cl	- H	- Cl	- H	1.16
20	- Cl	- H	- Cl	- H	- H	0.75
21	- F	- H	- H	- H	- F	3.09
22	- H	- F	- F	- H	- H	2.00
23	- H	- CH <sub>3</sub>	- CH <sub>3</sub>	- H	- H	>10

두 개의 같은 할로젠(halogen)치환기가 붙은 화합물 중 chlorine (-Cl) 치환기가 붙은 화합물은 평균 1 μM 이하의 낮은 LC<sub>50</sub> 값이 나타났다. chlorine (-Cl) 치환기는 fluorine (-F) 치환기가 붙은 화합물보다 2배 이상 낮은 LC<sub>50</sub> 값으로 가장 높은 활성을 보였다. 두 개의 chlorine (-Cl)중 하나의 chlorine (-Cl)가 R<sub>1</sub> 의 자리에 위치하였을 때가 R<sub>2</sub> 에 위치하였을 때와 비교하여 LC<sub>50</sub> 값이 낮아짐을 확인하였다. chlorine (-Cl) 치환기의 위치가 서로 가까울수록 더 낮은 LC<sub>50</sub> 값을 나타냄을 확인하였다. 하나의 chlorine (-Cl) 치환기가 R<sub>1</sub> 에 위치하고 치환기의 위치가 가장 가까운 Compound 20번이 가장 낮은 LC<sub>50</sub> 값을 나타냈다. (Figure 4) 또한, fluorine (-F)도 치환기의 위치가 서로 가까울수록 더 낮은 LC<sub>50</sub> 값을 나타냈다. methyl (-CH<sub>3</sub>) 치환체가 10 μM 이상에서도 살조 활성을 보이지 않았다.

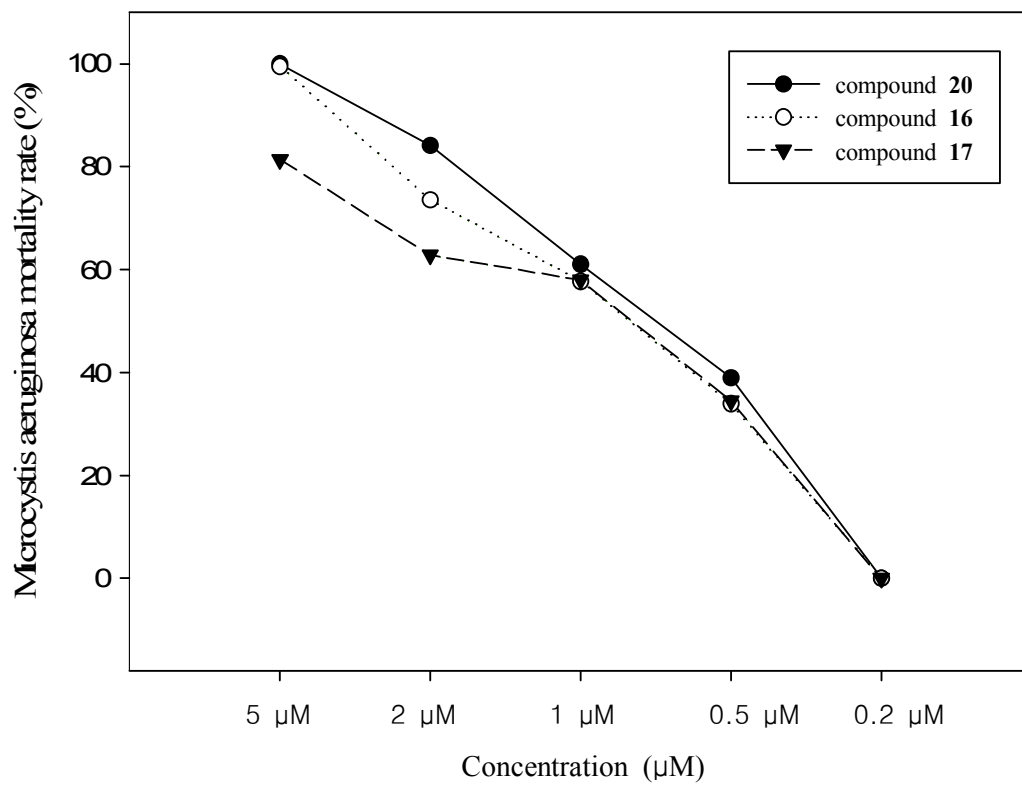


Figure 4. 치환기의 거리가 서로 가까운 화합물의 농도에 따른 살조 비율

Table 8. Compound 24-29 살조 활성 결과

Compound NO.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	LC <sub>50</sub> (μM)
24	- OCH <sub>3</sub>	- H	- OCH <sub>3</sub>	- OCH <sub>3</sub>	- H	> 10
25	- H	- OCH <sub>3</sub>	- OCH <sub>3</sub>	- OCH <sub>3</sub>	- H	> 10
26	- OH	- OCH <sub>3</sub>	- H	- H	- H	> 10
27	- H	- F	- Cl	- H	- H	2.53
28	- H	- F	- CH <sub>3</sub>	- H	- H	2.37
29	- Br	- H	- OCH <sub>3</sub>	- H	- OCH <sub>3</sub>	> 5

3 개의 methoxy (-OCH<sub>3</sub>) 치환기가 붙었을 경우에도 10 μM 이상에서도 살조 활성이 보이지 않았다. R<sub>1</sub> 에 bromine (-Br) 치환기가 한 개 붙은 compound 4번의 LC<sub>50</sub> 값은 1.83으로 높은 살조 활성을 나타냈지만 두 개의 methoxy (-OCH<sub>3</sub>) 치환기가 추가된 경우 LC<sub>50</sub> 값이 5 μM 이상으로 살조 활성이 급격하게 낮아짐을 확인하였다. 역시나 할로젠(halogen) 치환기가 있는 경우 3 μM 이하의 살조 활성을 보였다.

## 2. *Selenastrum capricornutum* (무해조류) 살조 활성 결과

대부분의 화합물은 무해조류에 대한 살조 활성을 보이지 않았으며 5개의 화합물만이 살조 활성을 나타냈다.

Table 9. 무해조류 살조 활성 결과

Compound NO.	무해조류 LC <sub>50</sub> (μM)
4	1.94
6	4.27
17	4.32
18	4.37
20	1.12

### 3. Rhodanine 화합물과 2,4-Thiazolidinedione 화합물의 비교

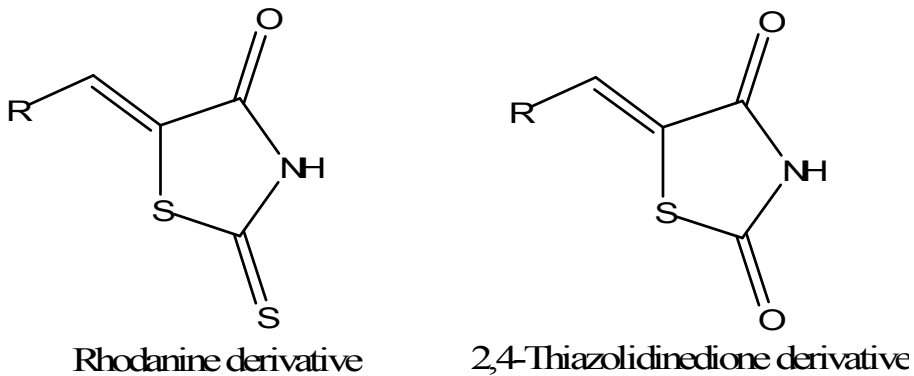


Figure 5. Rhodanine과 2,4-Thiazolidinedione 유도체

녹조 제어물질로 선행 연구에서 활성이 확인된 2,4-Thiazolidinedione 유도체와 Rhodanine 유도체의 *Microcystis aeruginosa* 살조 활성을 비교하였다. 같은 치환기를 가진 Thiazolidindione의 유도체와 Rhodanine 유도체의 살조 활성을 Table 10에서 나타내었다. Compound NO는 합성된 물질의 번호, 치환기는 Benzaldehyde를 기재하였다. 치환기에 따른 구조 활성 관계를 분석한 결과 하나의 할로젠(halogen) 치환기가 합성된 물질과 Benzaldehyde의 ortho 위치에 있는 hydroxy (-OH), nitrogen dioxide (-NO<sub>2</sub>), bromine (-Br)가 있는 물질이 양쪽에서 높은 활성을 나타내었다. 반대로 3,4,5-Trimethoxy (-OCH<sub>3</sub>)는 양쪽에서 낮은 활성이 나타났다.

Table 10. Rhodanine (RH) 화합물과 2,4-Thiazolidinedione (TD) 화합물의 비교

Compound NO.	치환기(-R)	TD-LC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	RH-LC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
3	3-Cl	0.60	1.11
4	2-Br	1.03	1.83
5	3-Br	0.34	1.78
6	4-Br	0.76	1.21
7	2-F	0.78	1.94
8	2-NO <sub>2</sub>	1.80	3.49
10	2-OH	2.78	2.64
11	3-OH	4.19	>10
12	4-OH	>10	>5
14	3-OCH <sub>3</sub>	1.69	3.58
15	4-OCH <sub>3</sub>	1.33	>10
18	3,4-Cl	0.43	0.93
21	2,6-F	2.50	3.09
22	3,4-F	0.89	2.00
25	3,4,5-OCH <sub>3</sub>	>10	>10
26	2-OH, 3-OCH <sub>3</sub>	0.40	>10
27	4-Cl, 3-F	0.32	2.53

## B. 물벼룩(*Daphnia magna*) 급성 독성시험 결과

LC<sub>50</sub> 값이 3 μM 이하인 화합물 compound 3 번, 10 번, 20 번 물질을 대상으로 물벼룩에 대한 급성 독성시험을 시행하였다. 물벼룩에 화합물을 접종한 결과 할로젠 (halogen) 치환기가 붙은 화합물들은 대체적 높은 독성이 나타났으며, hydroxy (-OH) 치환기가 붙은 화합물이 낮은 독성을 나타냈다. compound 10번은 3.2 μM 농도까지는 100%의 생존율을 보이며, 유영저해 또한 일어나지 않았다. 3.5 μM 농도에서 10시간 후 20%의 유영저해가 일어나며 사멸하였고, 20시간 후 60%의 유영저해가 일어남을 확인하였다. EC<sub>50</sub> 값은 3.4 μM 정도로 나타났다.

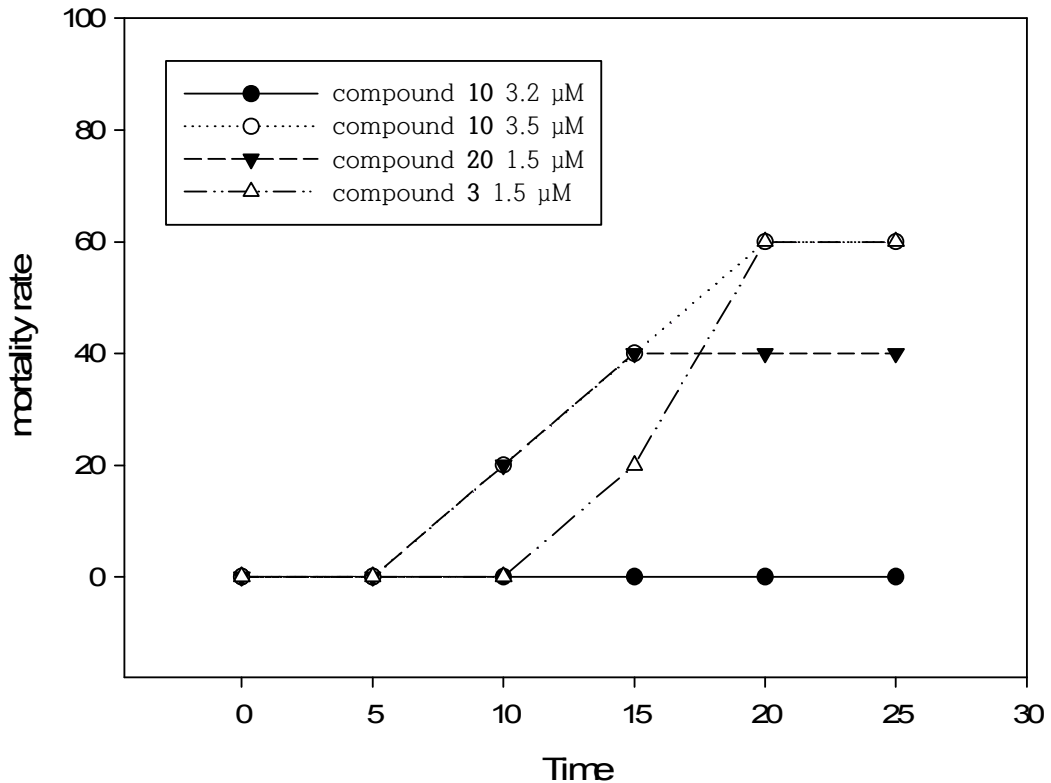


Figure 6. 시간에 따른 물벼룩 사망률

### C. *Danio rerio* (Zebra fish) 독성시험 결과

물벼룩(*Daphnia magna*) 급성 독성시험 결과, *Microcystis aeruginosa*에 대한 LC<sub>50</sub> 이상에서도 유영저해가 일어나지 않은 compound 10번을 대상으로 *Danio rerio* 독성시험을 시행하였다. 5 μM 농도에서 24 시간 후 90%의 폐사율이 나타났고, 3 μM 농도에서 96 시간 후 83.3 %의 폐사율이 나타났다. 2 μM 농도에서는 48시간까지는 100%의 생존률을 보였으나 72 시간 이후 33%, 96 시간 이후 50%의 폐사율이 나타남을 확인하였다.

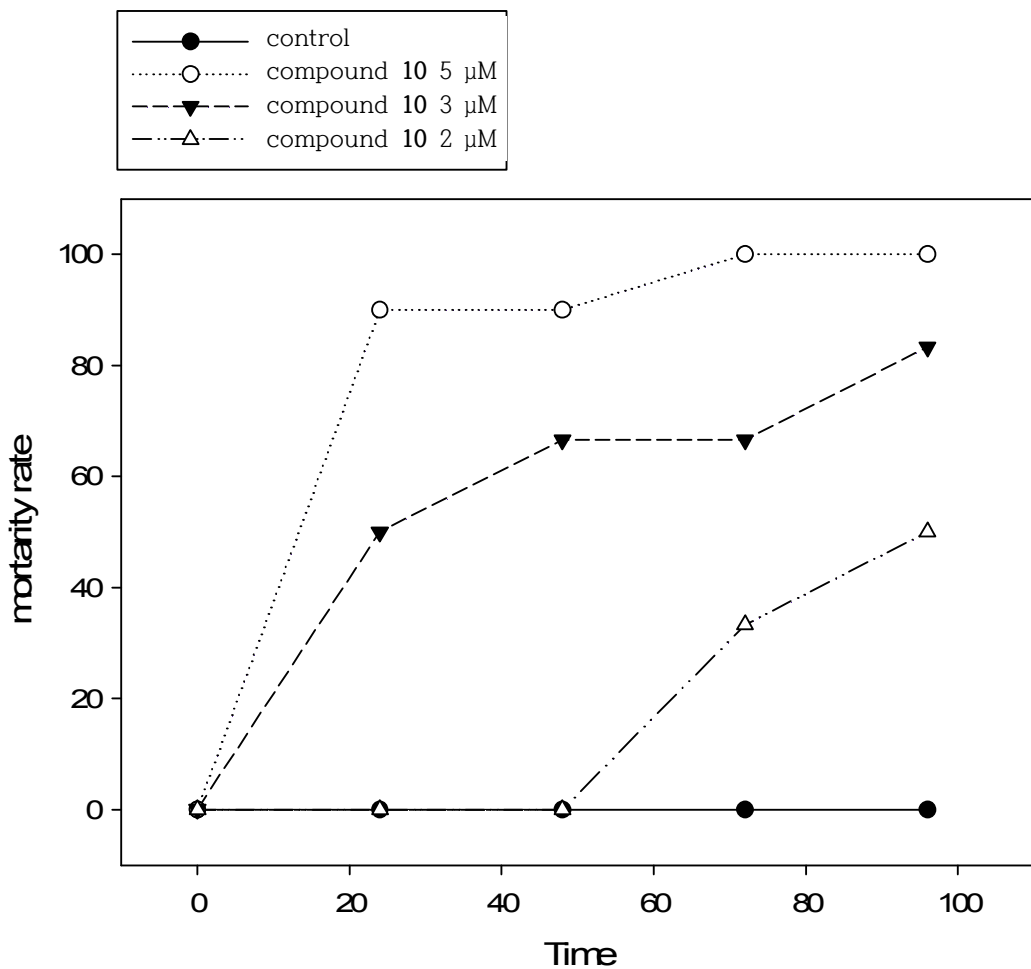


Figure 7. 시간에 따른 *Danio rerio* 폐사율

## D. 주사전자현미경을 통한 형태변화 관찰

*Microcystis aeruginosa*에 합성된 물질을 처리한 후의 표면을 주사전자현미경을 통해 관찰하였다. 약물 처리 전 정상적인 조류는 일반적인 모습인 불규칙한 구형의 형태인 것을 확인할 수 있다. (Figure 8) 약물 처리 후 세포의 표면이 파괴됨을 알 수 있다. (Figure 9) 합성된 물질로 인해 세포의 표면이 파괴되어 유해 조류를 제어하는 것이라 판단된다.

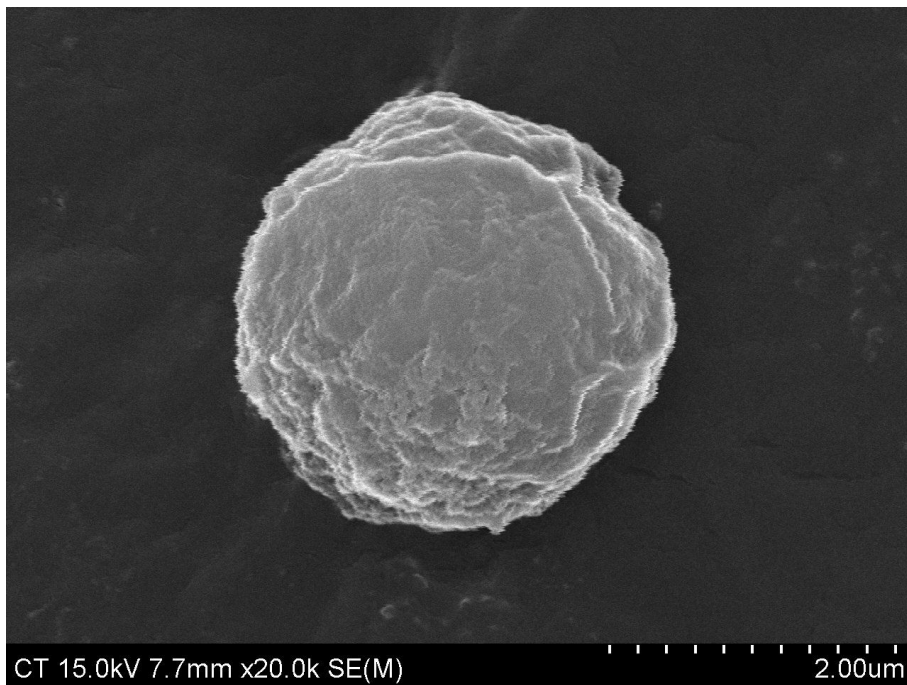


Figure 8. 약물 처리 전 *Microcystis aeruginosa*



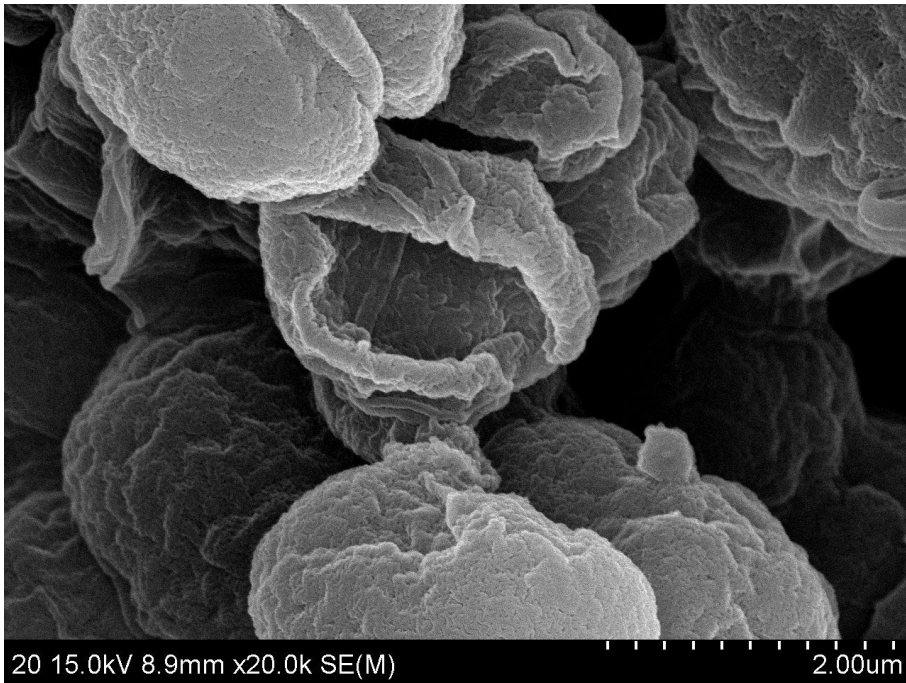


Figure 9. 약물 처리 후 *Microcystis aeruginosa*

## IV. 결론

국내뿐만 아니라 전 세계의 강과 호수에서 유해녹조류(Harmful Algae Blooms, HABs)의 발생으로 많은 문제를 일으키고 있다. 유해조류의 과도한 번식으로 인해 호소의 표면에 스컴(scum, 액체 표면에 더러운 성분이 모인 거품)이 형성되어 산소를 차단시켜 심미적인 피해와 경제적인 피해가 발생한다.

본 연구는 알도오스(aldose) 환원효소 억제제이며 당뇨병의 합병증, 신경병증, 신장병증과 백내장 치료제 약물 소재로 사용되는 Rhodanine을 기본 골격으로 5-Benzylidenerhodanine 유도체를 합성하여 유해 남조류(*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*)와 무해조류(*Selenastrum capricornutum*)에 대한 살조 활성을 측정하였다. 총 29개의 유도체를 합성하여 structure-activity relationship (SAR)을 통해 화합물의 구조에 따른 살조 활성을 분석하였다. 화합물들은 *Microcystis aeruginosa*에 대해 뛰어난 살조 활성을 나타내었으나, *Anabaena flos-aquae*에는 LC<sub>50</sub> 값이 > 5 μM 으로 활성 나타나지 않았다. 화합물의 구조에 따른 살조 활성을 분석한 결과, 할로젠(halogen) 치환기가 붙은 화합물의 살조 활성이 우수하였으나 methoxy (-OCH<sub>3</sub>) 치환기는 살조 활성이 감소하는 경향을 보였다. hydroxy (-OH) 치환기의 경우 phenyl ring의 C<sub>2</sub> 위치에서 높은 살조 활성이 나타났다. Dichloro 치환기가 붙은 화합물은 한 개의 치환기가 phenyl ring의 C<sub>2</sub> 자리에 위치할 때, C<sub>3</sub> 자리에 비해서 더 높은 살조 활성이 나타났고 Dichloro 치환기의 거리가 서로 가까울수록 높은 살조 활성이 나타나는 경향성을 확인하였다. 5-(2,4-Dichlorobenzylidene)-rhodanine의 LC<sub>50</sub> 값이 0.75 μM로 가장 좋은 살조 활성이 나타났다.

주사전자현미경을 통해 세포의 형태를 관찰한 결과, 합성된 화합물이 *Microcystis aeruginosa*의 어떠한 기질에 영향을 주는지는 알 수 없으나 처리 후 세포의 표면이 파괴된 것으로 보아 약물이 세포 표면과의 접촉을 통해 세포의 사멸을 유도하는 것으로 사료된다.

향후 *Microcystis aeruginosa* 제어에 관한 합성을 진행할 경우, 이러한 화합물의 구조를 기반으로 설계한다면 유해 조류에 대해 우수한 살조 활성을 나타내는 물질의 개발에 도움을 줄 것이라 사료된다.

## 참 고 문 헌

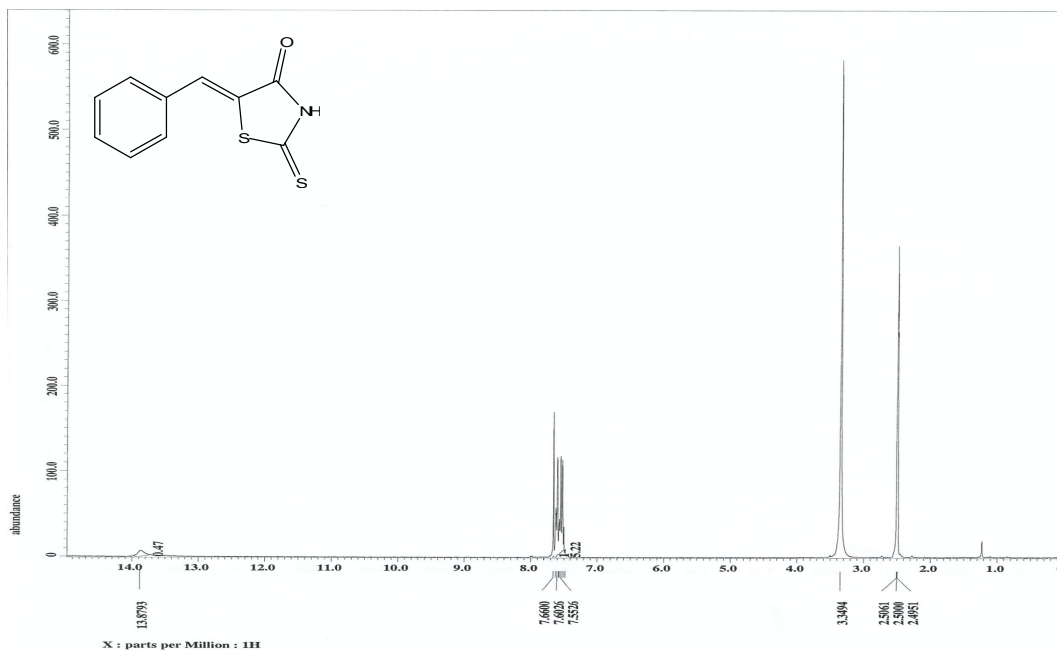
1. Choi, Gye-Woon, et al. "The Effect and Application of Flow Induction Machine in Artificial Canal Way and Lake through Water Quality Model Test." *Journal of Korea Water Resources Association* 44.6 (2011): 477-486.
2. 이인규. "한국의 조류 생태와 응용." 아카데미 서적 (2001).
3. 박종근. "한국의 조류(Algae): 담수산 남조류 I." 대한민국 생물지(환경부, 국립생물자원관) 제 5권 1호 (2012).
4. Davis, Timothy W., et al. "The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms." *Harmful algae* 8.5 (2009): 715-725
5. <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1222639&cid=40942&categoryId=32300>, doopedia 두산백과.
6. Watanabe, Mariyo F., and Shinshi Oishi. "Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions." *Applied and Environmental microbiology* 49.5 (1985): 1342-1344.
7. 조완희, et al. "대청호의 조류발생 분석." *환경영향평가* 21.3 (2012): 367-380.
8. Anderson, Donald M., Patricia M. Glibert, and Joann M. Burkholder. "Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences." *Estuaries* 25.4 (2002): 704-726.
9. 남혜림, 양보람, 정성목, 박정안, 박찬혁, 하준수, 이상협. "녹조발생에 따른 정수처리 공정별 조류기인물질 모니터링." *한국물환경학회*, F-7 (2016).
10. 김희용, et al. "녹조현상에 대한 청소년들의 이해." *한국환경교육학회 2013 년 하반기 학술발표대회 논문집* (2013): 93-95.
11. 김연화, et al. "금강 주요지점에서의 환경 인자와 남조류 세포수의 배타적 인과성분석." *한국환경과학회지* 25.7 (2016): 937-950.
12. 박정원, and 권덕기. "보문: 합천호에서 남조류 수화현상 (녹조현상) 의 초기 발생에 대한 연구-1. 수계에서 *Microcystis aeruginosa* Kuetz. 의 현존량 증가와 K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 및 Ca<sup>2+</sup> 농도와의 상관관계." *한국하천호수학회지* 31.2 (1998): 97-102.
13. Lee, Kwon-Ho, and So-Hyun Lee. "Monitoring of Floating Green Algae Using

- Ocean Color Satellite Remote Sensing." *Journal of the Korean Association of Geographic Information Studies* 15.3 (2012): 137-147.
14. 조은영, et al. "영일만 연안의 생태계 연구: I. 식물플랑크톤의 종조성과 군집의 다양성." *Algae* 15.1 (2000): 49-59.
  15. Kurmayer, Rainer, Guntram Christiansen, and Ingrid Chorus. "The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee." *Applied and Environmental Microbiology* 69.2 (2003): 787-795.
  16. Mlouka, Alyssa, et al. "The gas vesicle gene cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA rearrangements that lead to loss of cell buoyancy." *Journal of bacteriology* 186.8 (2004): 2355-2365
  17. 정승원, 이진환, and 유종수. "한강하류의 환경학적 연구 V. 식물플랑크톤 군집 대발생의 특징." *Algae* 18.4 (2003): 255-262.
  18. Tillett, Daniel, et al. "Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide - polyketide synthetase system." *Chemistry & biology* 7.10 (2000): 753-764.
  19. 김범惱, et al. "국내 호수에서 발생한 남조류의 microcystin 함량과 독성평가." *Korean J. Limnol* 32.4 (1999): 288-294.
  20. Codd, Geoffrey A., James S. Metcalf, and Kenneth A. Beattie. "Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria." *Toxicon* 37.8 (1999): 1181-1185.
  21. MacKintosh, Carol, et al. "Cyanobacterial microcystin LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants." *FEBS letters* 264.2 (1990): 187-192.
  22. Jeong, Dong-Hwan, et al. "A study on the management and improvement of alert system according to algal bloom in the Daecheong Reservoir." *Journal of Environmental Impact Assessment* 20.6 (2011): 915-925.
  23. Sengco, Mario R. "Prevention and control of *Karenia brevis* blooms." *Harmful Algae* 8.4 (2009): 623-628.
  24. Jang, Kam-Yong, et al. "Evaluation on the Phosphate Uptake Rate of Green

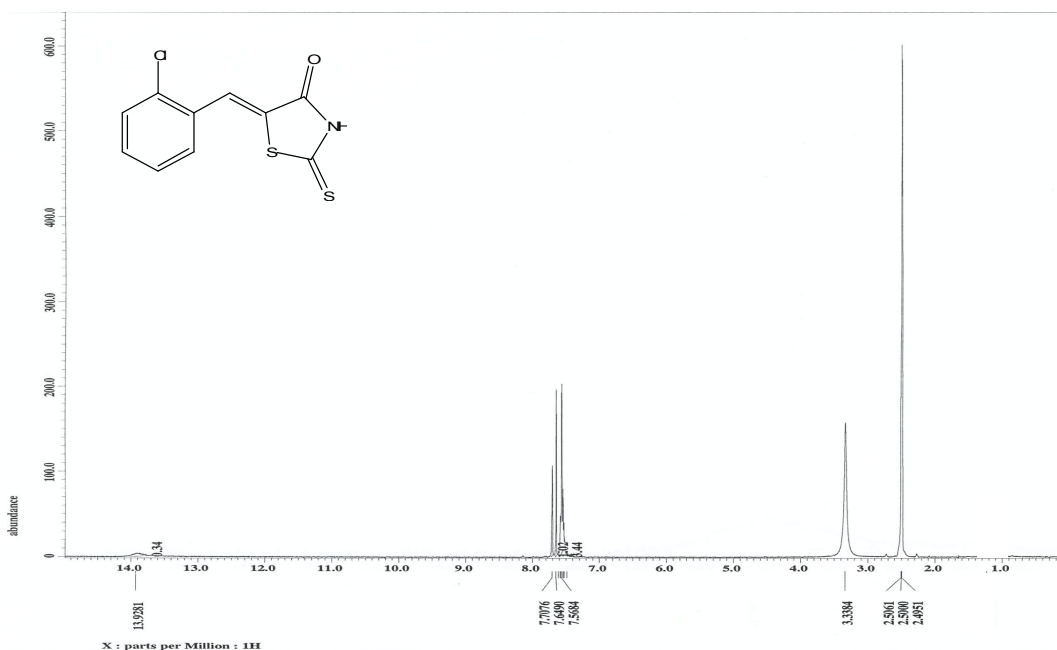
- Algae under Diurnal Rhythm and Algae Control Method." *Journal of Environmental Science International* 14.9 (2005): 873-879.
25. 한재호, et al. "담수조류의 대량번식에 따른 피해를 최소화하기 위한 녹조제거기 개발." *한국해양환경·에너지학회지* 3.1 (2000): 62-69.
  26. Tomasic, T., and L. Peterlin Masic. "Rhodanine as a privileged scaffold in drug discovery." *Current medicinal chemistry* 16.13 (2009): 1596-1629.
  27. Sing, Wan Theng, et al. "Arylalkylidene rhodanine with bulky and hydrophobic functional group as selective HCV NS3 protease inhibitor." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 11.2 (2001): 91-94.
  28. 이홍립, et al. "주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM)." *한국기초과학지원연구원* (2015).
  29. 황인옥, and 김재천. "주사전자현미경의 기초." *일본전자현미경학회 관동지부편* (1994).

## $^1\text{H}$ NMR Spectra

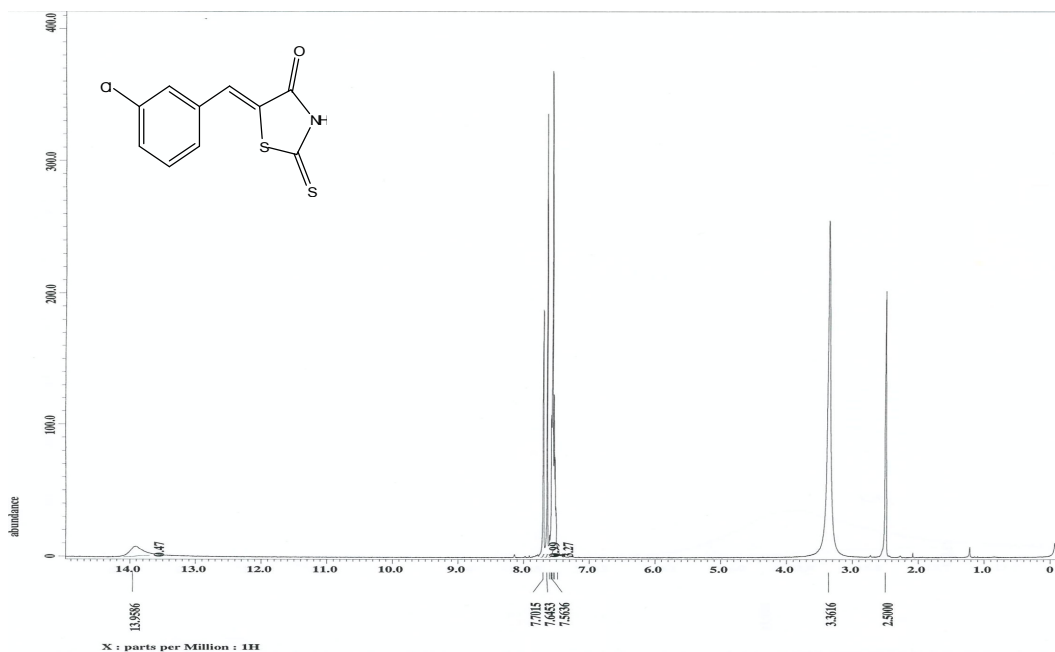
### 1. 5-Benzylidenerhodanine



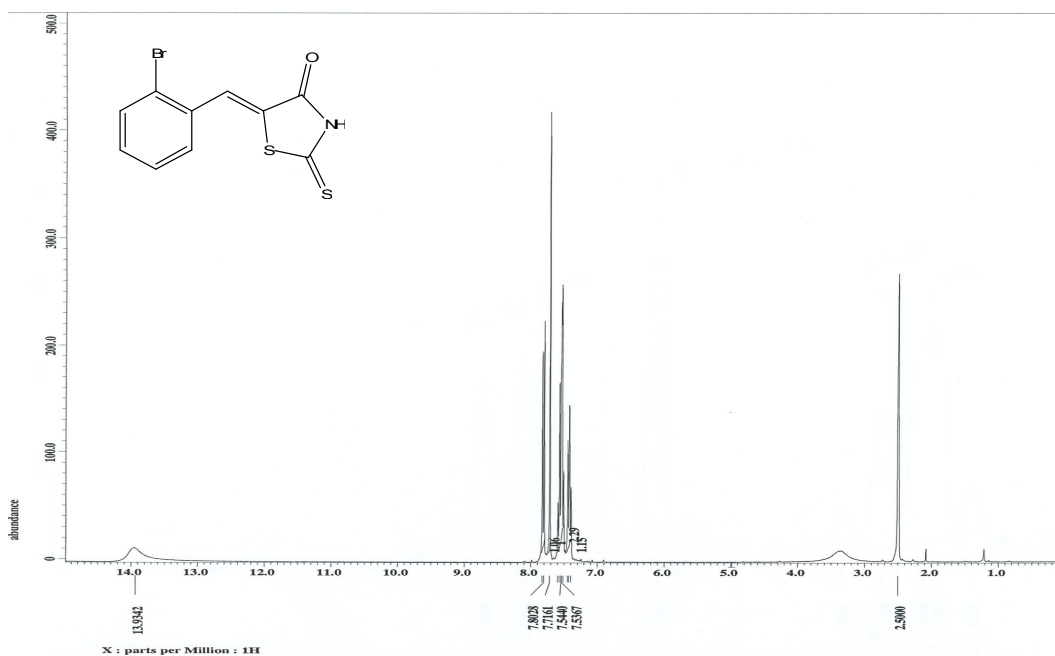
### 2. 5-(2-Chlorobenzylidene)-rhodanine



### 3. 5-(3-Chlorobenzylidene)-rhodanine

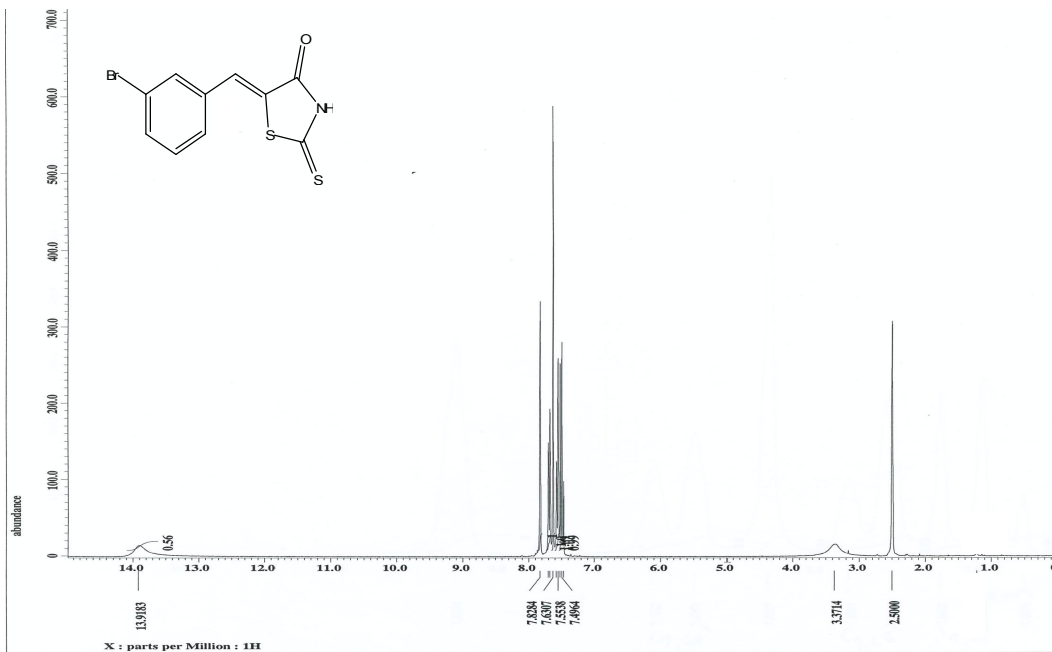


### 4. 5-(2-Bromobenzylidene)-rhodanine

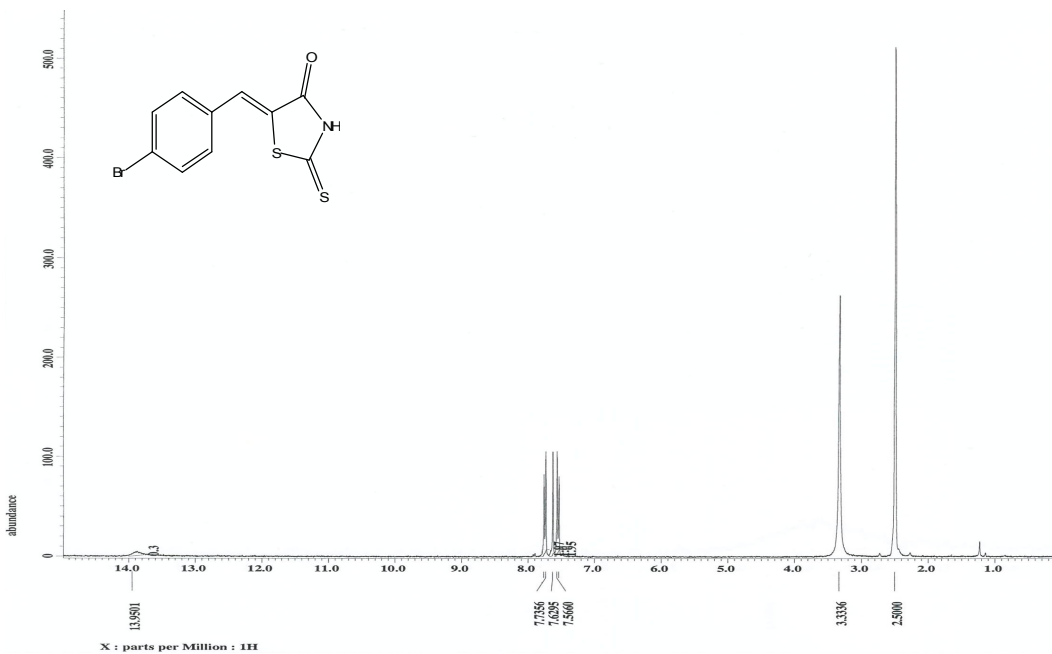




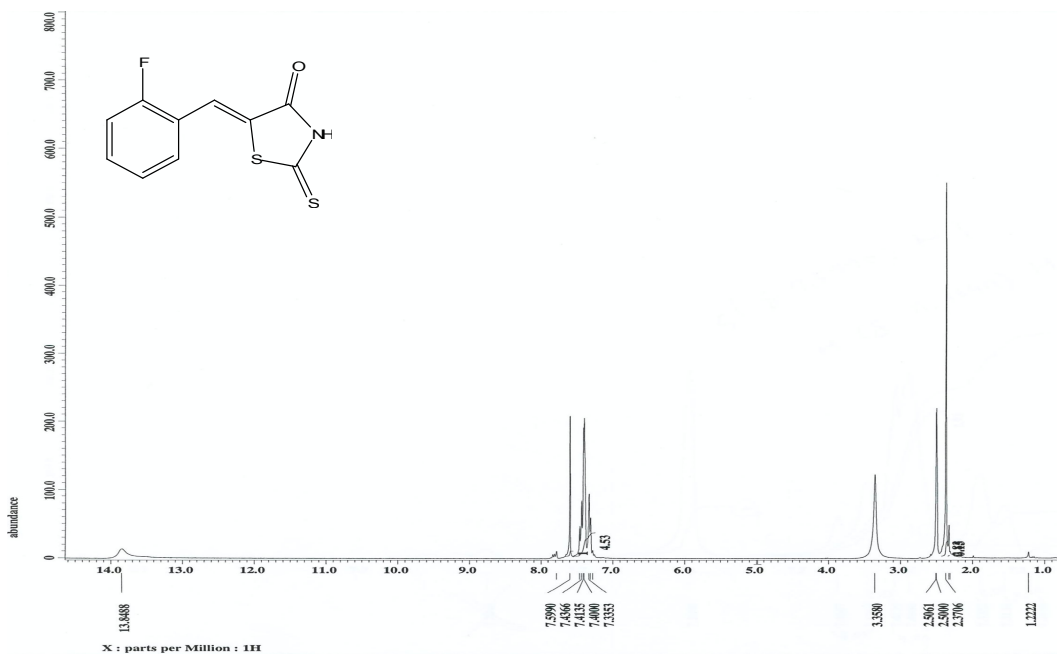
5. 5-(3-Bromobenzylidene)-rhodanine



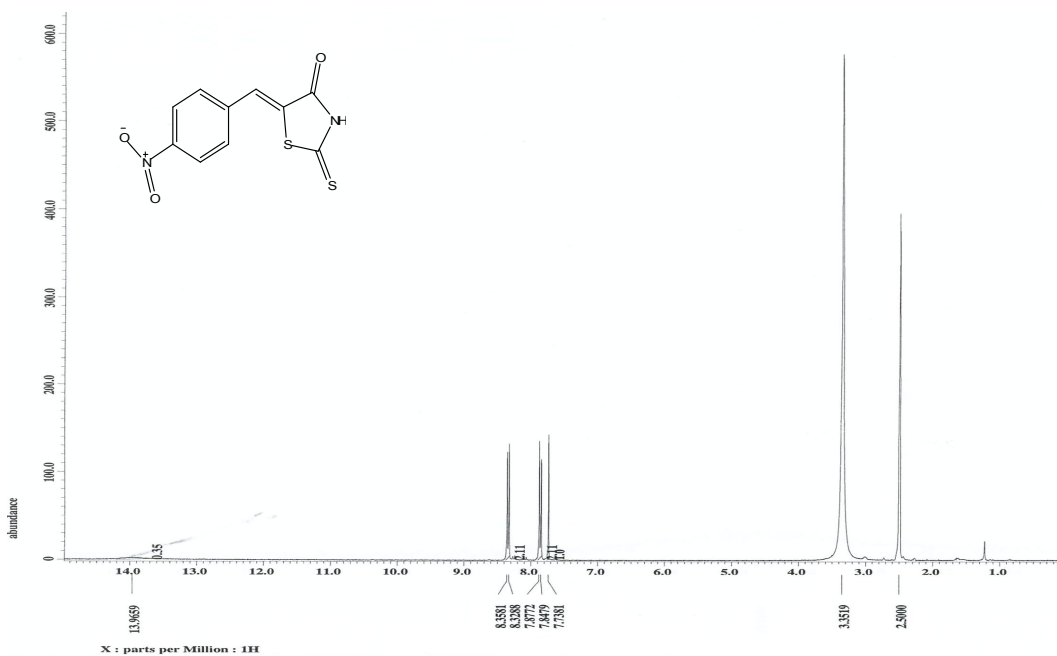
6. 5-(4-Bromobenzylidene)-rhodanine



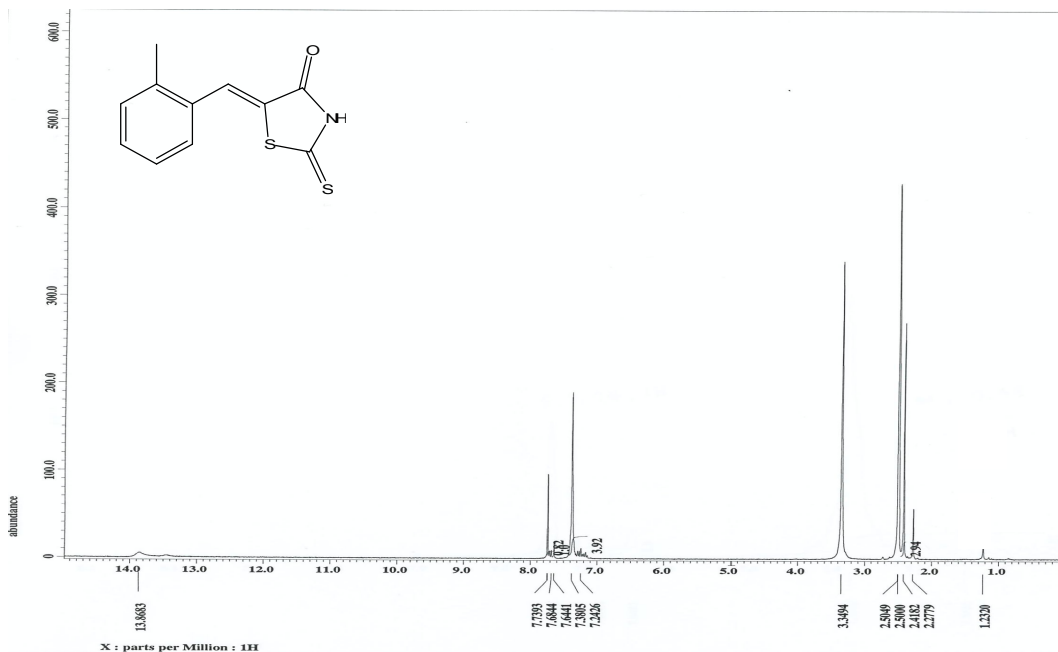
7. 5-(2-Fluorobenzylidene)-rhodanine



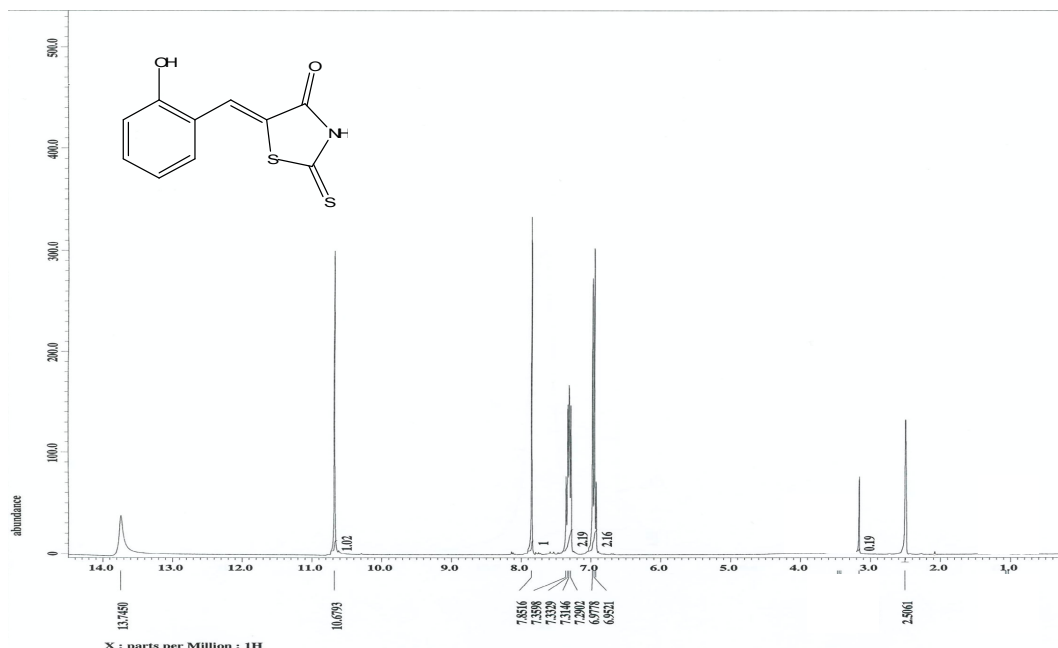
8. 5-(4-Nitrobenzylidene)-rhodanine



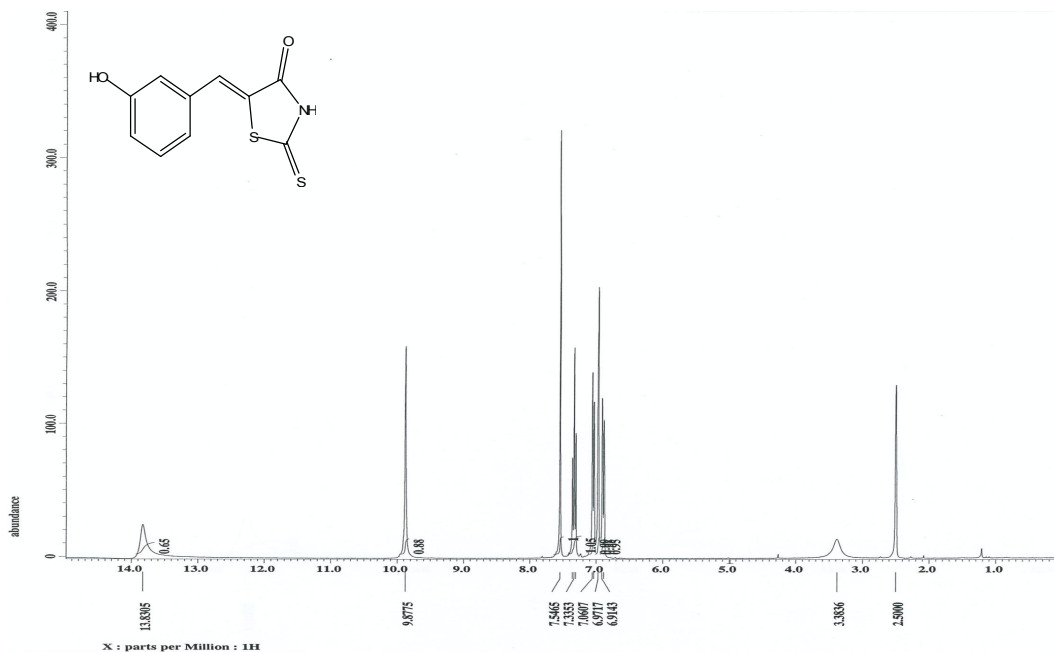
9. 5-(2-Methylbenzylidene)-rhodanine



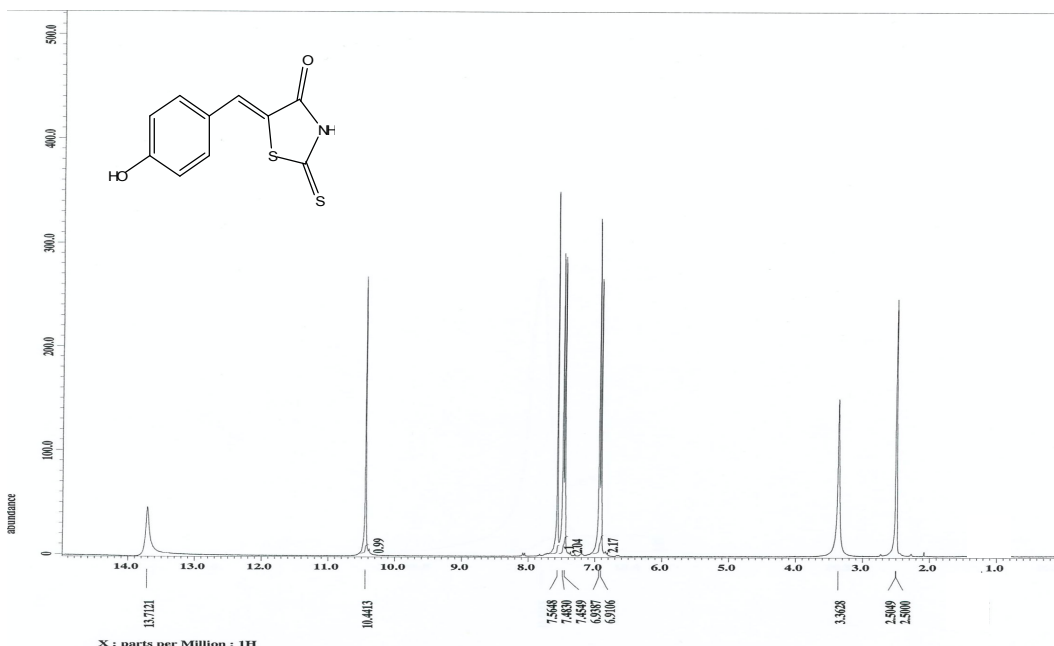
10. 5-(2-Hydroxybenzylidene)-rhodanine



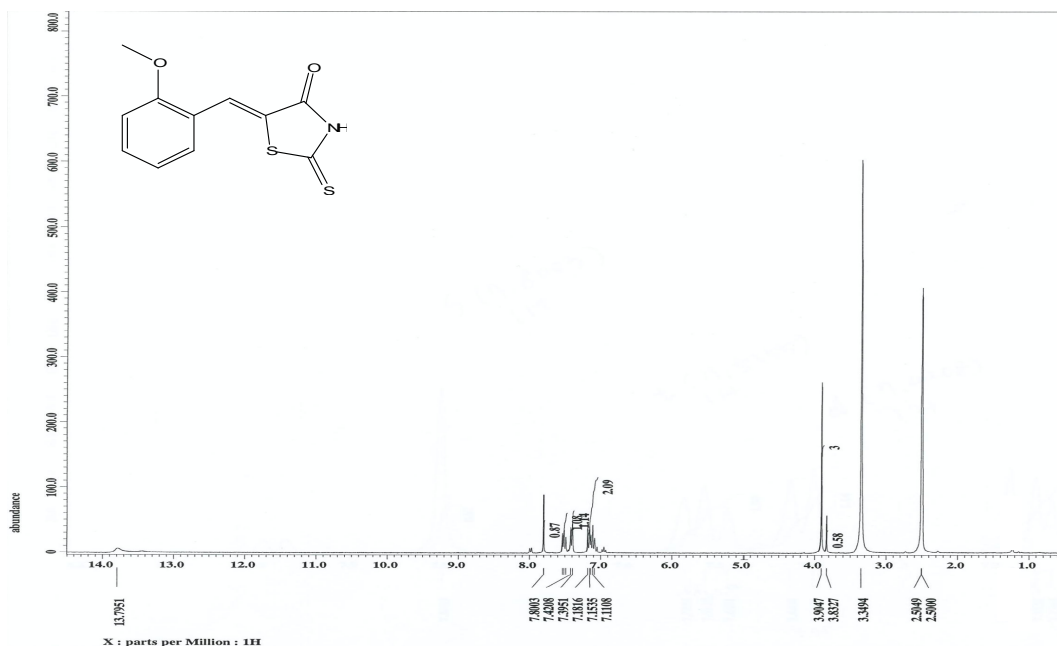
### 11. 5-(3-Hydroxybenzylidene)-rhodanine



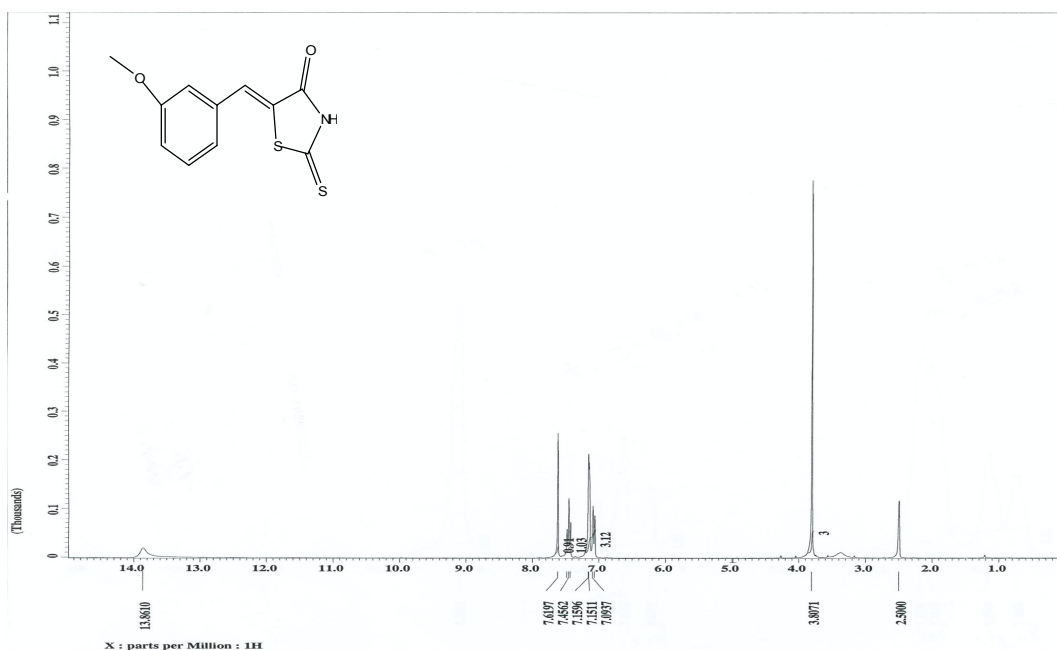
### 12. 5-(4-Hydroxybenzylidene)-rhodanine



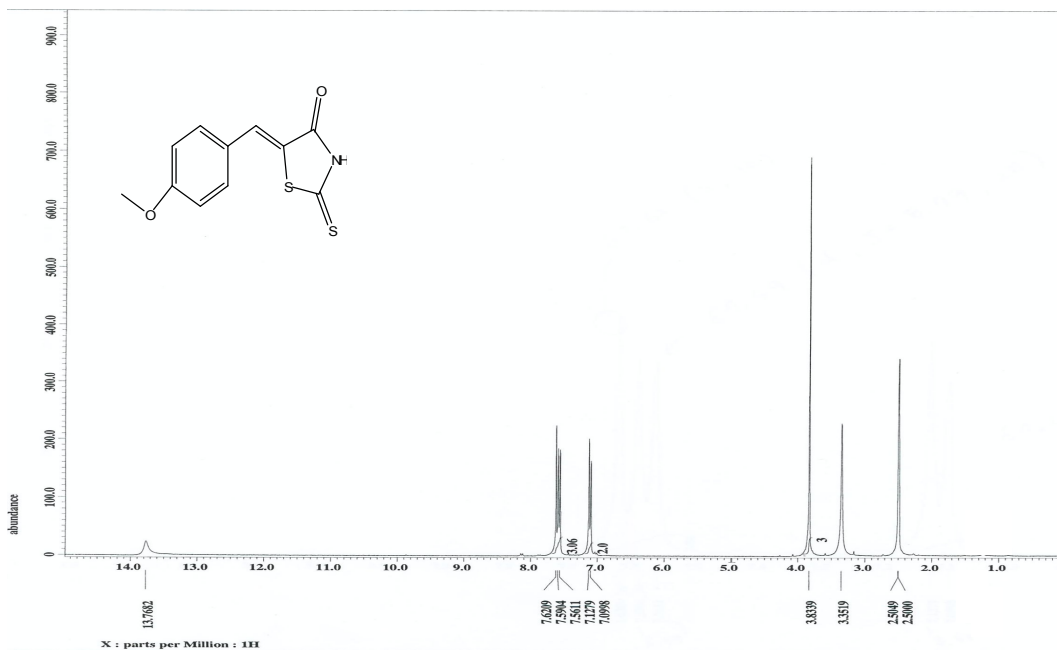
13. 5-(2-Methoxybenzylidene)-rhodanine



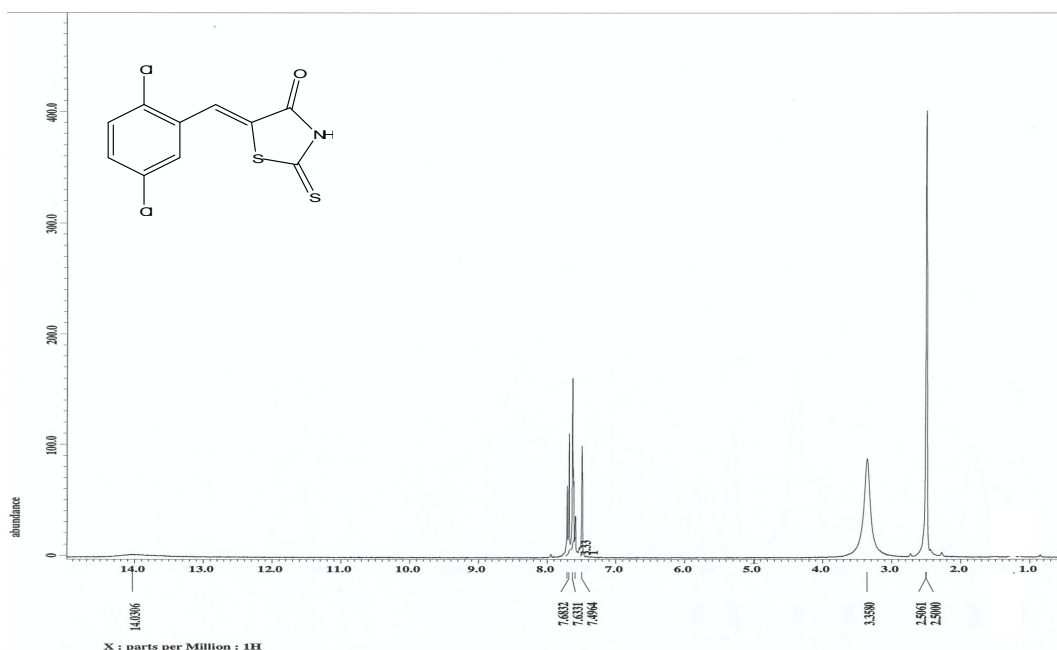
14. 5-(3-Methoxybenzylidene)-rhodanine



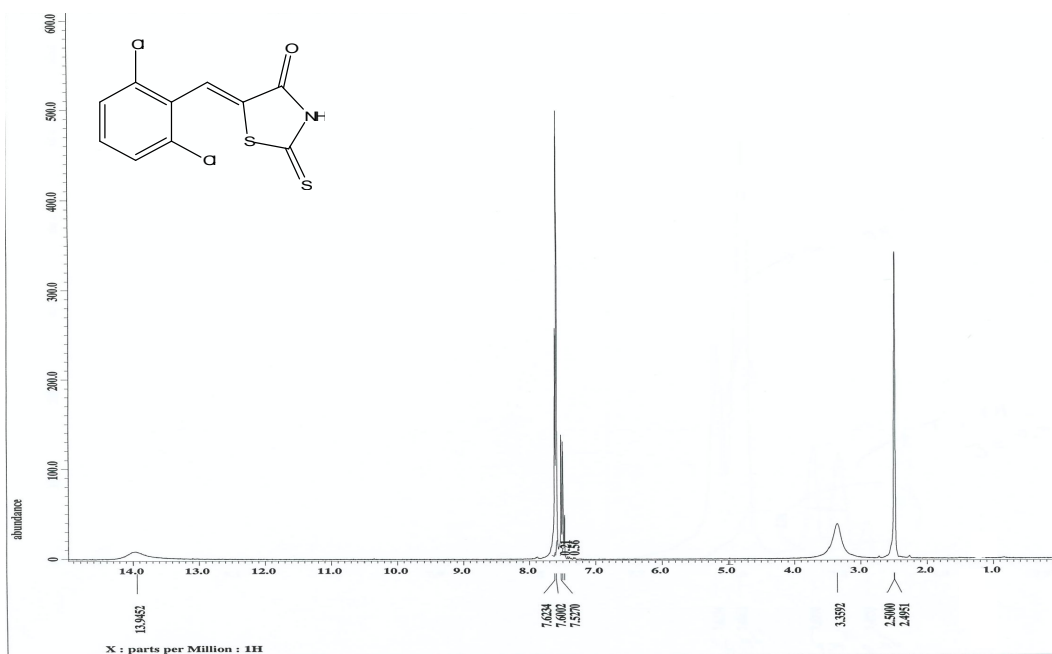
15. 5-(4-Methoxybenzylidene)-rhodanine



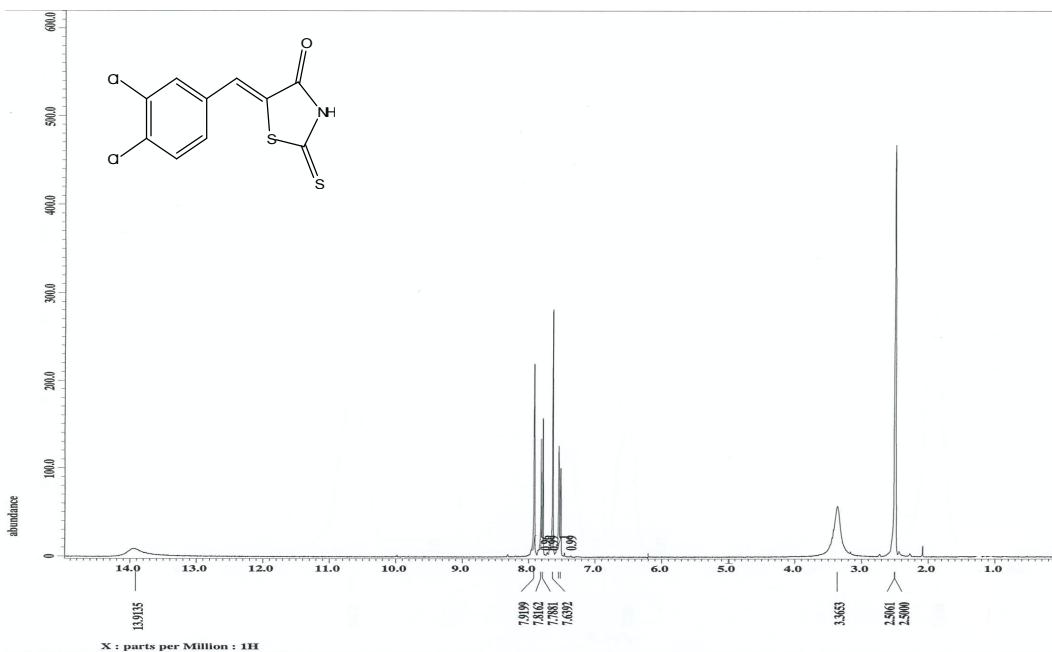
16. 5-(2,5-Dichlorobenzylidene)-rhodanine



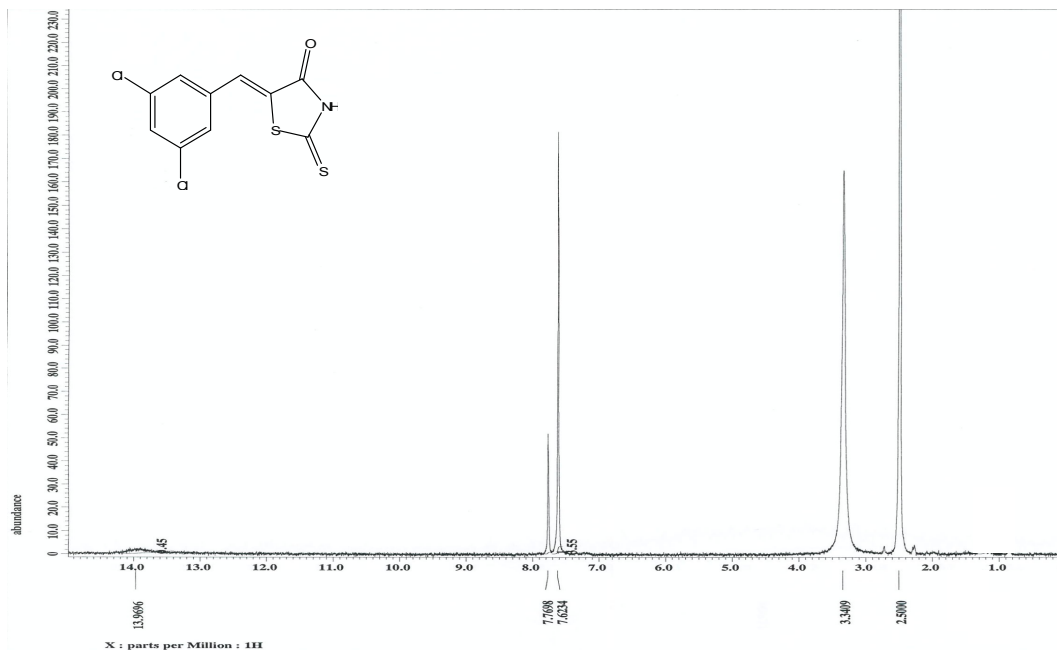
17. 5-(2,6-Dichlorobenzylidene)-rhodanine



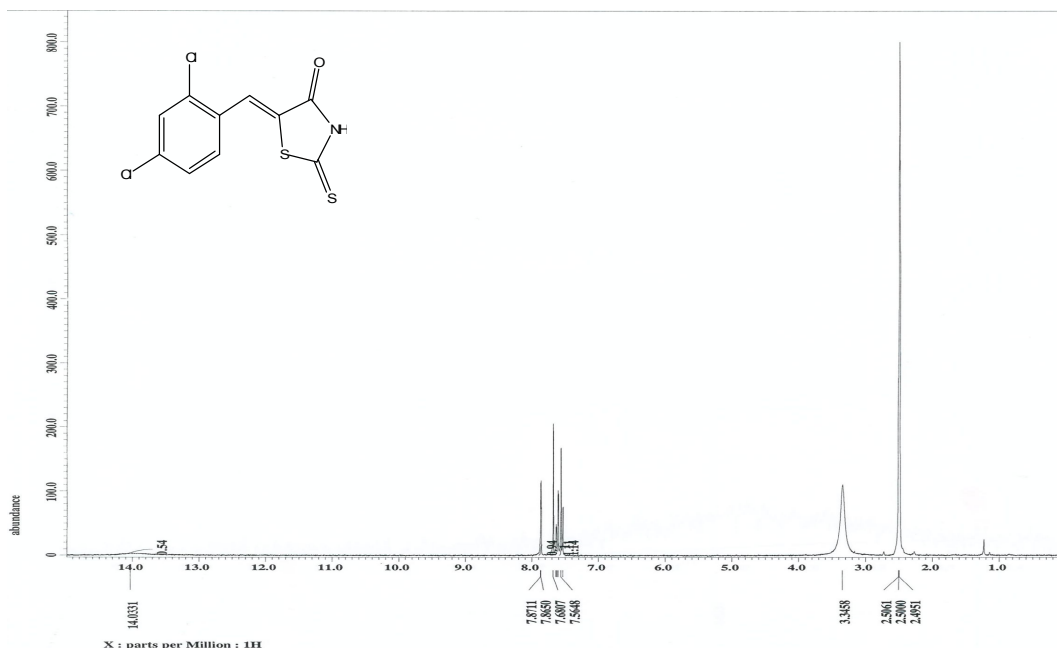
18. 5-(3,4-Dichlorobenzylidene)-rhodanine



19. 5-(3,5-Dichlorobenzylidene)-rhodanine

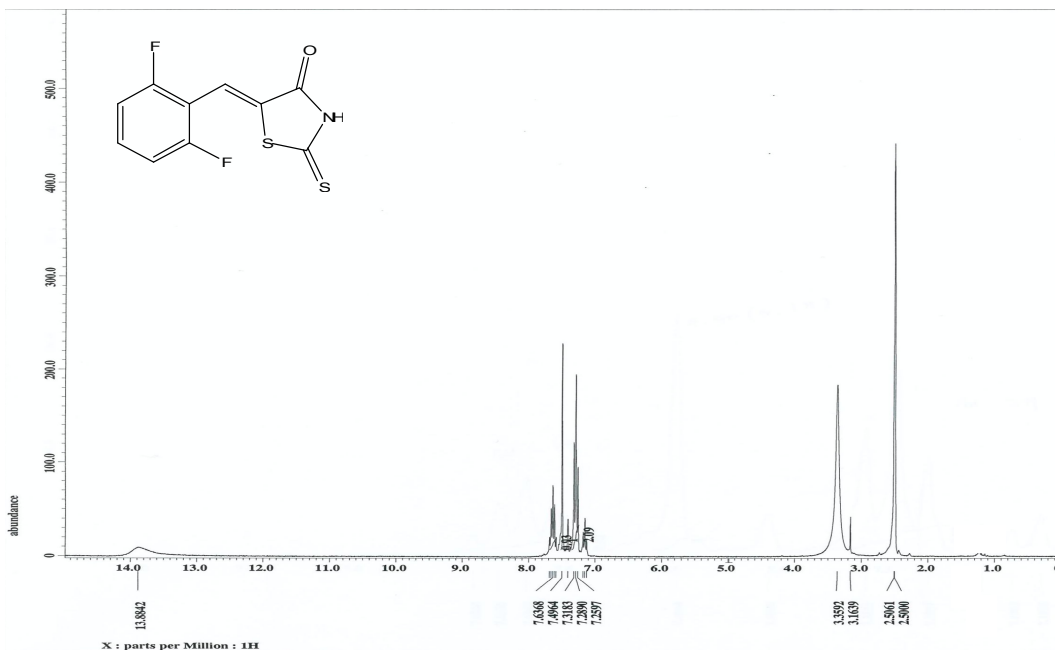


20. 5-(2,4-Dichlorobenzylidene)-rhodanine

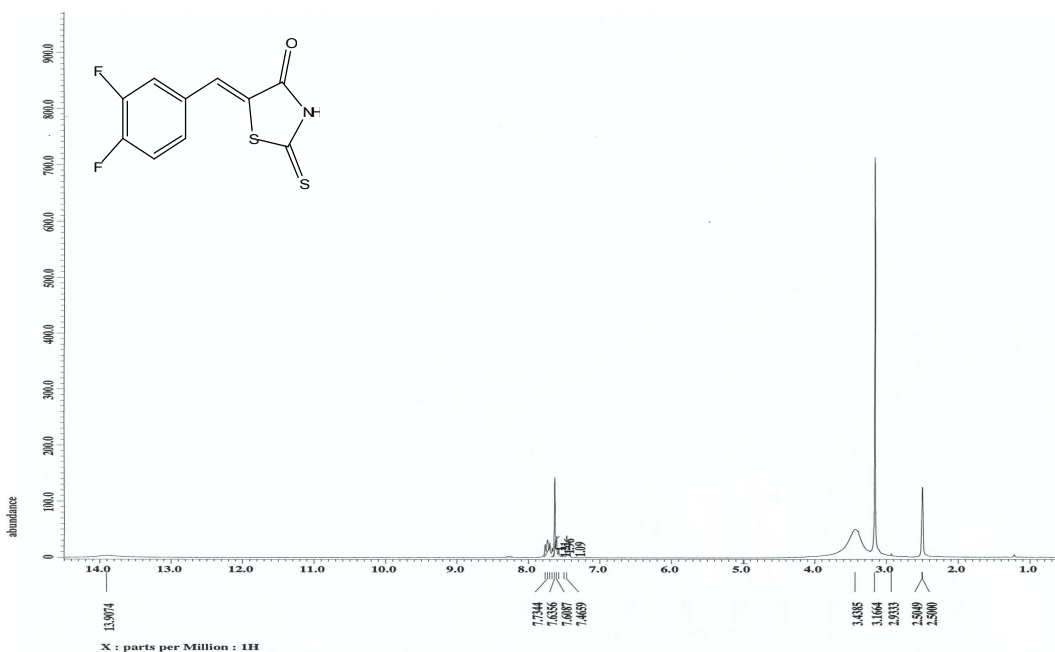




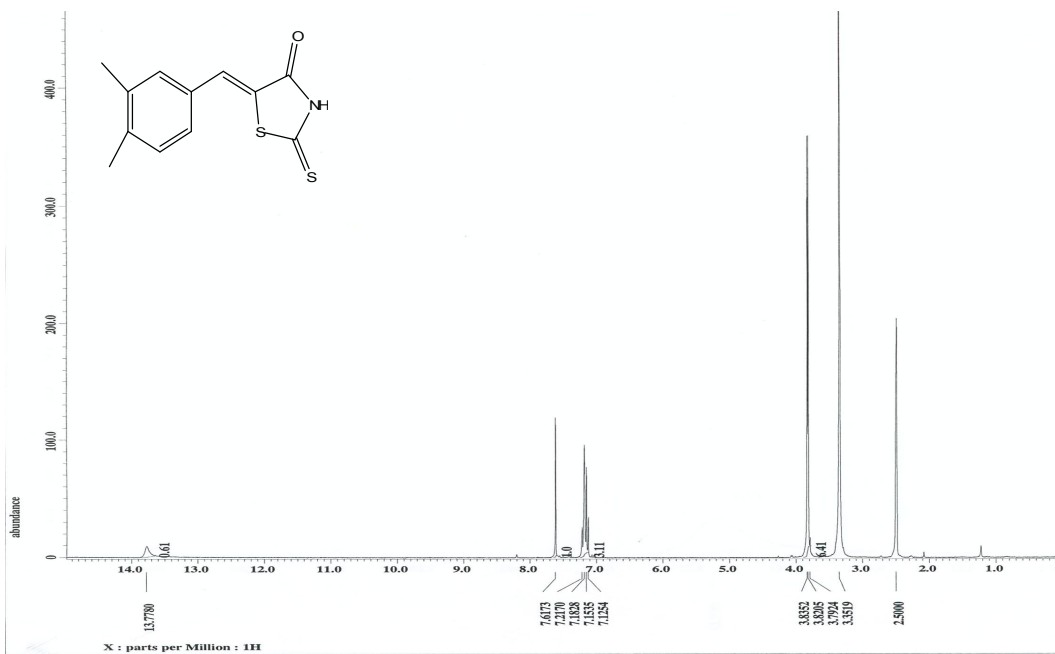
21. 5-(2,6-Difluorobenzylidene)-rhodanine



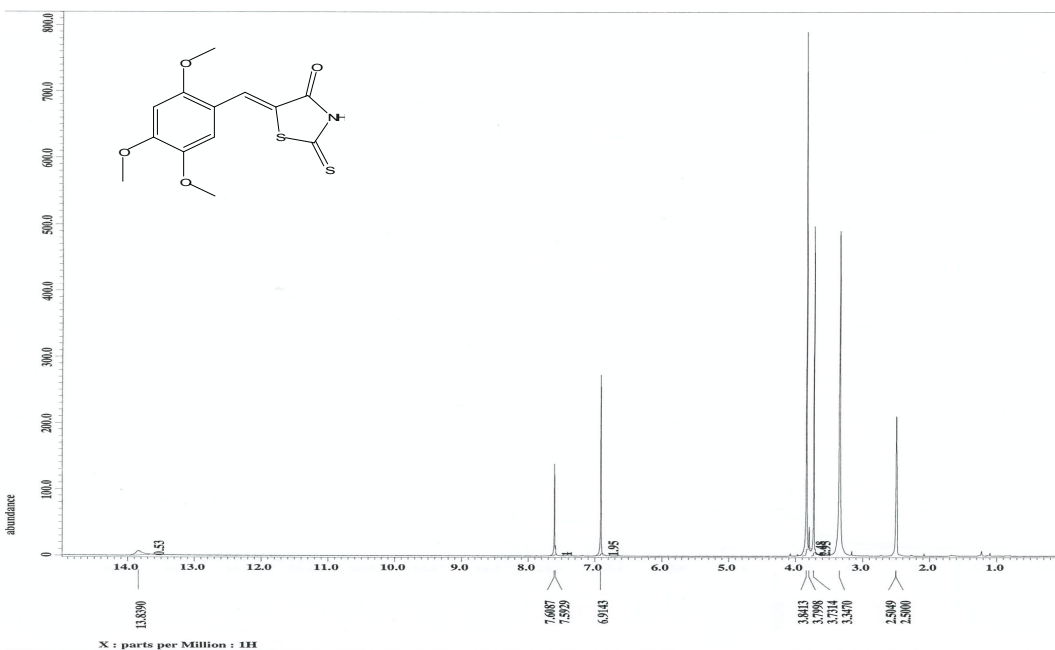
22. 5-(3,4-Difluorobenzylidene)-rhodanine



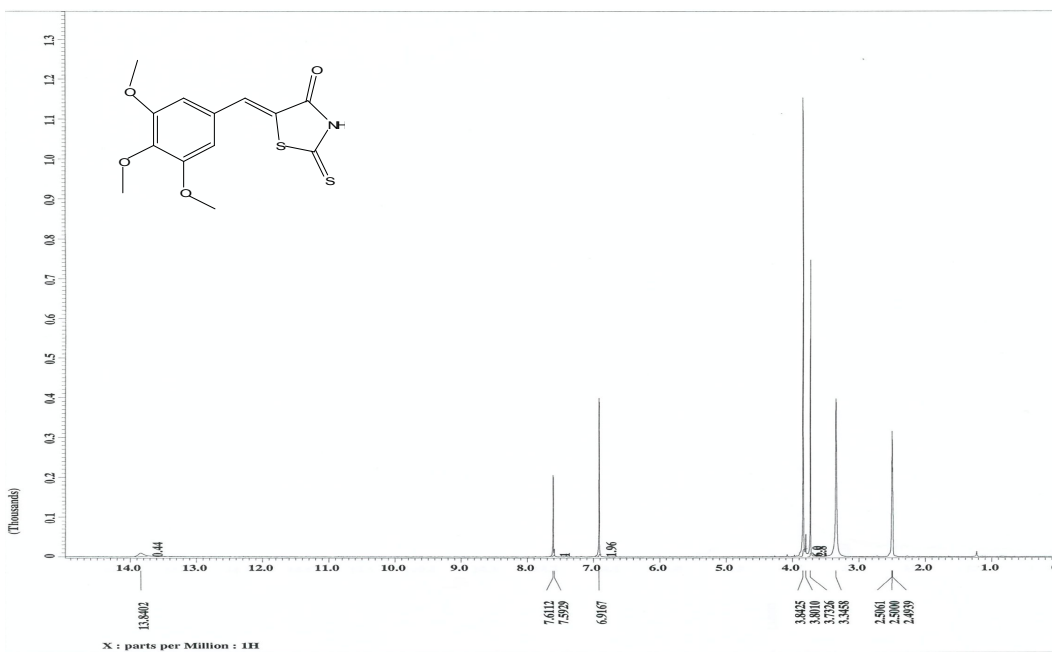
23. 5-(3,4-Dimethylbenzylidene)-rhodanine



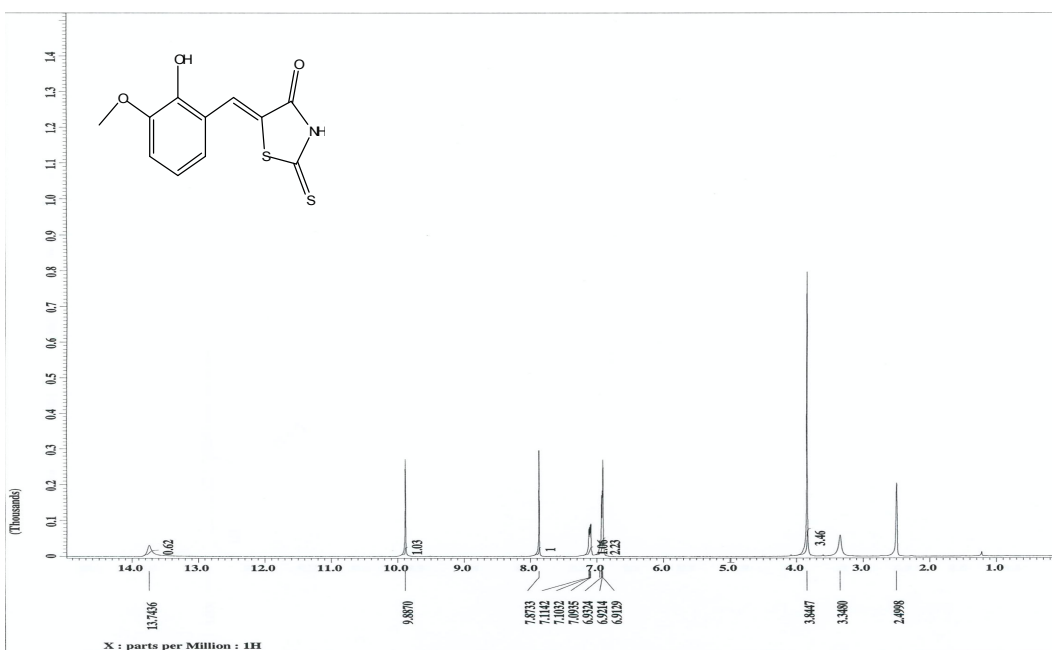
24. 5-(2,4,5-Trimethoxybenzylidene)-rhodanine



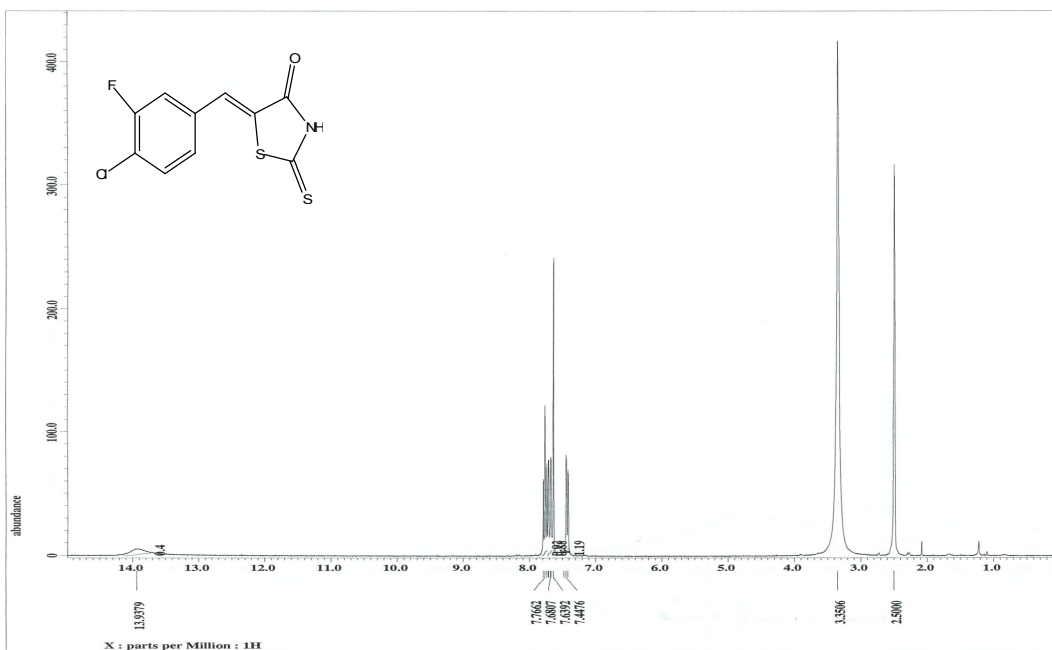
25. 5-(3,4,5-Trimethoxybenzylidene)-rhodanine



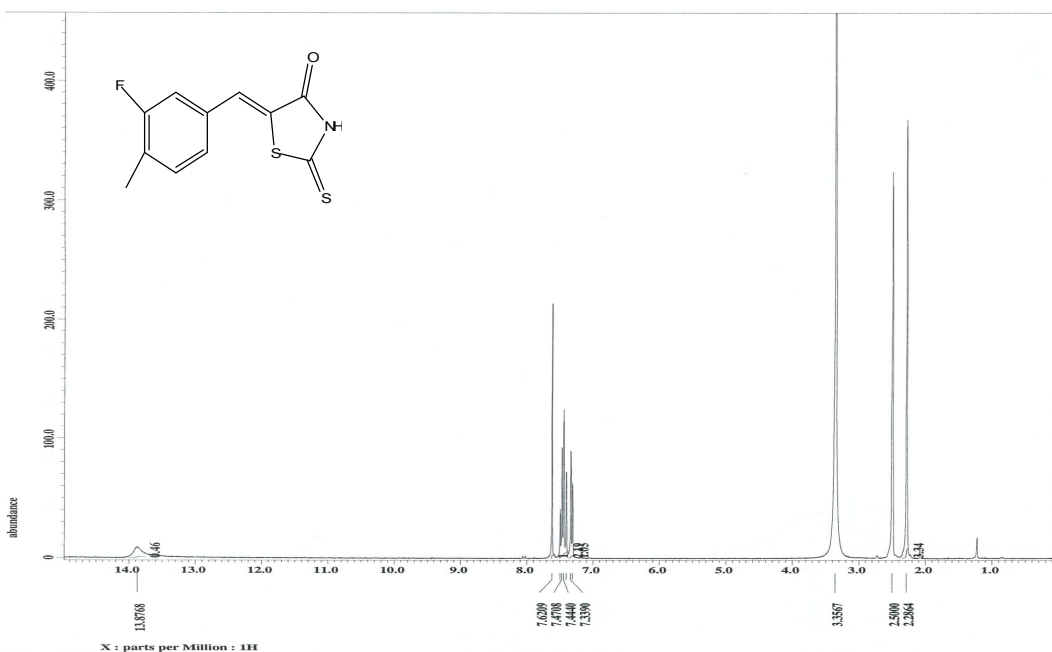
26. 5-(2-Hydroxy-3-methoxybenzylidene)-rhodanine



27. 5-(4-Chloro-3-Fluorobenzylidene)-rhodanine



28. 5-(3-Fluoro-4-methylbenzylidene)-rhodanine



29. 5-(2-Bromo-4,6-dimethoxybenzylidene)-rhodanine

