



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](#)

2019년 8월
석사학위 논문

살조물질 개발을 위한 Benzylamine 유도체의 합성 및 SAR

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

박 강 석

살조물질 개발을 위한 Benzylamine 유도체의 합성 및 SAR

Synthesis and SAR of substituted benzylamine derivatives as
algicides

2019년 8월 23일

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

박 강 석

살조물질 개발을 위한 Benzylamine 유도체의 합성 및 SAR

지도교수 조 훈

이 논문을 공학석사학위 신청 논문으로 제출함

2019년 4월

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

박 강 석

박강석의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 최재곤 (인)

위 원 조선대학교 교수 유지강 (인)

위 원 조선대학교 교수 조 훈 (인)

2019년 5월

조선대학교 대학원

Contents

List of Tables	I
List of Figures	III
Abstract	V
I . Introduction	1
1.1. 연구목적 및 배경	1
II. 재료 및 방법	6
2. 재료	6
2.1. 유기합성 및 분석	6
2.2. 유해조류	6
2.1.1. 시험종 및 배양조건	6
2.1.2. 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>)	10
2.1.3. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	12
3. 활성평가 및 시험방법	12
3.1. 유기조류 활성측정	12
3.2. 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>) 급성독성 시험	13
3.3. Zebrafish 독성시험(<i>Danio rerio</i>)	14
3.4. Chlorophyll 측정	14
3.5. 유해조류 세포관찰	15
3.5.1. S.E.M (Scanning Electron Microscope)	15
3.5.2. T.E.M (Transmission Electron Microscope)	15
4. 유기합성 및 실험방법	17
4.1. 화합물 (1~57) 합성	17

4.2. 화합물 (58~68) 합성	41
4.3. 화합물 (69~79) 합성	46
Ⅲ. 결과 및 고찰	51
5. 유해조류에 대한 활성 및 독성평가	48
5.1. 유해조류의 활성평가	48
5.2. 유해조류에 대한 살조 평가결과	64
5.3. Chlorophyll 비교실험	66
5.4. 물벼룩 급성독성 시험 결과	67
5.5. S.E.M을 통한 세포 관찰	72
5.6. T.E.M을 통한 세포 관찰	75
5.7. Zebra fish 독성 시험결과	77
Ⅳ. Conclusion	79
[Reference]	81
¹ H NMR Spectra	85

List of Tables

Table 1. Types of <i>Cyanobacteria</i>	2
Table 2. Types of Microcystin	3
Table 3. World Health Organization algae management standards	4
Table 4. Incubation condition of harmful algae	7
Table 5. Algae Blue-Green medium	8
Table 6. F/2 Culture media stock solution	9
Table 7. F/2 Culture medium	9
Table 8. M4 Culture medium Stock solution	11
Table 9. M4 Culture medium	12
Table 10. Algicidal activity of compound 1~8 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	49
Table 11. Algicidal activity of compound 9~13 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	50
Table 12. Algicidal activity comparision of compound 14~21 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	51
Table 13. Algicidal activity comparision of 22~30 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	52
Table 14. Algicidal activity comparision of 32~40 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	53
Table 15. Algicidal activity comparision of 41~48 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	54
Table 16. Algicidal activity comparision of 49~56 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	55
Table 17. Algicidal activity comparision of 26, 31, 36, 57 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	56
Table 18. Algicidal activity comparision of 58~63 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	57
Table 19. Algicidal activity comparision of 64~68 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	58
Table 20. Algicidal activity of compound 70~74 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	59
Table 21. Algicidal activity of compound 75~79 against harmful <i>Cyanobacteria</i>	60
Table 22. Algicial activity for lead compound against <i>Microcystis sp.</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Selena strum</i>	61
Table 23. Algicial activity lead compound for <i>Hererocapsa Circularisquama</i> , <i>Heterosigma</i>	

akashiwo and *Chattonella marina* 62

Table 24. Acute toxicity test of lead compounds to *Daphnia magna* 64

List of Figure

Figure 1. The inflow process of nutrients into water	2
Figure 2. Changes of cell number after treatment of compounds against <i>Microcystis sp.</i> ..	62
Figure 3. Changes of chlorophyll after treatment of compounds against <i>Microcystis sp.</i>	63
Figure 4. Acute toxicity test of compound 20 to <i>Daphnia magna</i>	65
Figure 5. Acute toxicity test of compound 24 to <i>Daphnia magna</i>	65
Figure 6. Acute toxicity test of compound 29 to <i>Daphnia magna</i>	66
Figure 7. Acute toxicity test of compound 30 to <i>Daphnia magna</i>	66
Figure 8. Acute toxicity test of compound 34 to <i>Daphnia magna</i>	67
Figure 9. Acute toxicity test of compound 35 to <i>Daphnia magna</i>	67
Figure 10. Acute toxicity test of compound 41 to <i>Daphnia magna</i>	68
Figure 11. Acute toxicity test of compound 44 to <i>Daphnia magna</i>	68
Figure 12. S.E.M image of <i>Microcystis sp.</i> after treatment of compound 34 at 0.5 μ M ..	69
Figure 13. Overall S.E.M image of <i>Microcystis sp.</i> after treatment of compound 34 at 0.5 μ M	70
Figure 14. S.E.M image of <i>Microcystis aeruginosa</i> after treatment of compound 34 at 0.5 μ M	70
Figure 15. Overall S.E.M image of <i>Microcystis aeruginosa</i> after treatment of compound 34 at 0.5 μ M	71
Figure 16. S.E.M image of <i>Selena strum</i> after treatment of compound 34 at 0.5 μ M	71
Figure 17. Overall S.E.M image of <i>Selena strum</i> at after treatment of compound 34 at 0.5 μ M	72
Figure 18. T.E.M image of <i>Microcystis sp.</i> at after treatment of compound 34 at 0.5 μ M	73
Figure 19. Overall T.E.M image of <i>Microcystis sp.</i> after treatment of compound 34 at 0.5 μ M	73
Figure 20. Acute toxicity test of compound 20 and 24 to Zebrafish	74

Figure 21. Acute toxicity test of compound **29**, **34**, and **41** to Zebrafish 75

ABSTRACT

Synthesis and SAR of substituted benzylamine derivatives as algicides

Kang Seok Park

Advisor : Prof. Hoon Cho, Ph.D.

Department of Energy Convergence

Graduate School of Chosun University

Harmful algal blooms are regarded as a serious water pollution problem worldwide. These masses of overgrown algae, resulting from water temperature rise due to eutrophication and global warming, reduce the light permeability of the water and cause tremendous damage to fisheries such as massive fish kills due to Microcystin toxins produced by harmful algae along with the decrease in dissolved oxygen caused by oxygen consumption in the course of bacterial degradation of algal debris.

Our lab has developed a variety of algaecides capable of selective control of harmful algae causing water pollution. In this study, we have synthesized various benzylamine derivatives based on previous research and analyzed their structure-activity relationships (SARs) towards *Microcystis sp.*, a harmful algal species belonging to the freshwater Cyanobacterial genus. Furthermore, we evaluated the selective algaecidal effect of compound **34** on *Microcystis aeruginosa* and *Selena strum*, harmful and non-harmful algal species, respectively, and verified its high selectivity. In an additional experiment to evaluate its algaecidal effect on red-tide species (*H. circularisquama*, *C. marina*, and *H. akashiwo*), no significant algaecidal effect was observed.

After selecting eight candidate compounds that showed high algaecidal activities against harmful algae, we measured the chlorophyll content, which is used as a measure of algal biomass, and performed toxicity testing on zooplankton water fleas (*Daphnia magna*) and Zebrafish (*Danio rerio*).

After a 5-day treatment at 0.5 μM concentration, chlorophyll was reduced by as much as 75% relative to the control group (291.874 mg/mL vs. 1150.506 mg/mL) compounds **20**,

34, and **41**. Toxicity testing on *Daphnia magna* and *Danio rerio* revealed all compounds to have EC₅₀ values exceeding 17.11 μM and 45.97 μM, respectively, i.e., 34-fold and 92-fold their respective treatment concentrations for controlling *Microcystis sp.*, demonstrating low toxicity.

To gain insight into the mechanism of the substance that showed high algaecidal effect on *Microcystis sp.* and *Microcystis aeruginosa*, we observed the time-series degradation status of the algal specimens after being treated with compound **34** at 0.5 μM concentration using S.E.M (Scanning Electron Microscopy) and TEM (Transmission Electron Microscope)

I . Introduction

1. 연구목적 및 배경

유해조류는 최근 전 세계적으로 심각한 문제로 대두되고 있는 수질 오염원 중 하나이다. 유해조류는 식물성플랑크톤(phytoplankton)의 종류 중 하나로써 해양생태계의 가장 기층에 해당하는 1차 식량원(primary productivity)의 역할을 담당한다. 사는 환경에 따라 명칭이 나뉘게 되는데, 주요 유해조류로는 해수(sea water)에서 자라는 적조류(red tide algae)와 담수(fresh water)에서 자라는 남조류(Cyanobacteria)로 구별된다.

유해조류가 심각한 수질 오염원으로 인식 된 것은 그렇게 오랜 시간이 걸리지 않았다. 인류는 산업화를 통해 무분별한 개발과 농업의 발달로 인해 수체로 영양염류(nitrogen, phosphorus)가 과도하게 유입 되면서 ‘부영양화(eutrophication)’가 일어나게 되었다. 영양물질의 과다 유입으로 조류의 과다증식을 통해 물의 색깔 변화와 빛 투과성이 감소하였고, 조류가 소멸하면서 산소가 소비되어 수체의 산소가 결핍되어 물고기의 폐사로 이어지게 되었다. 이로 인해 유기물질의 침전물이 증가하였으며, 퇴적물의 영양소 방출로 인한 악순환이 조류의 성장을 증가하게 하였다. [5][8][13][15]

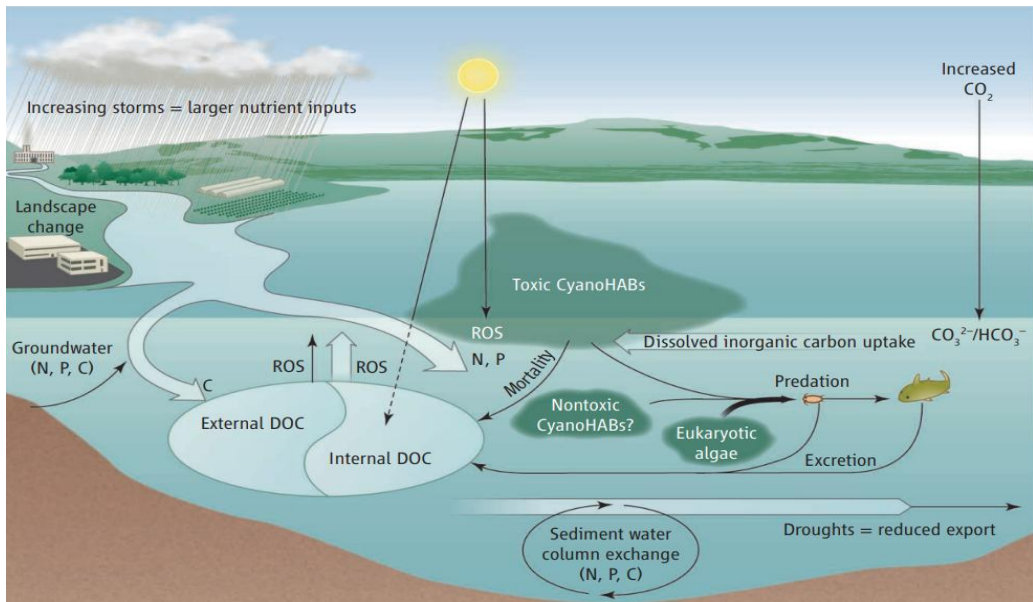


Figure 1. The inflow process of nutrients into water [7]

부영양화를 통해 과다증식한 조류는 무해조류와 유해조류로 나뉘게 되는데 수질오염의 문제를 야기하는 조류는 유해조류이다. 유해조류 중에 남조류(*cyanobacteria*)에 해당하는 *Microcystis*는 Microcystin, *Anabaena*는 Microcystin, Anatoxin, *Oscillatoria*는 Microcystin, Anatoxin, *Aphanizomenon*은 Saxitoxins이라는 독성물질을 생산한다. 이러한 독성물질은 수질오염의 주된 원인이 된다. [1]

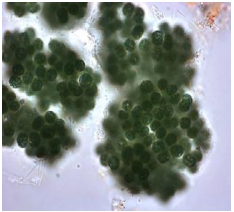
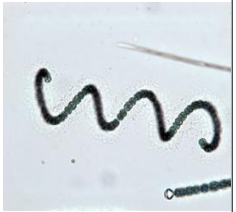
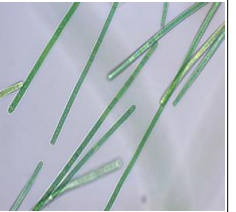
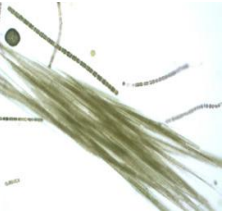
구분	<i>Microcystis</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Aphanizomenon</i>
현미경 사진				
단위세포 형태	길이 4~8 μm 구형 혹은 타원형	길이 7~15 μm 구형 혹은 타원형	직경 4~6 μm , 길이 2.5~4 μm 원통형	직경 4~6 μm , 길이 5~15 μm 원통형
군체형태	수백~천여개의 단위세포가 모여 군체를 형성	세포가 염주형태로 직선, 혹은 나선형으로 연결	단위세포가 실 모양으로 일렬로 연결	단위세포가 실 모양으로 일렬로 연결, 군체 형성
최적 성장온도	25 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ (고온성)	20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$	20 $^{\circ}\text{C}$ 이하	20 $^{\circ}\text{C}$ 전후
독성물질	Microcystins	Microcystins Anatoxin	Microcystins Anatoxin	Saxitoxins
영향	간 독소	간 독소 · 신경독소	간 독소 · 신경독소	신경독소

Table 1. Types of *Cyanobacteria* [1]

미국에서 1987-2000년까지 유해조류로 인한 피해액은 약 7천 5백만 달러 이상으로 추정되고, 일본은 물고기 떼죽음을 통해서 매년 수천만 달러의 피해가 발생되고 있다. 1996년 2월 브라질 북동부에 위치한 카루아루(caruaru)에서 60여명의 환자가 사망하는

사건이 발생하였는데, 사망원인이 *Microcystis*에서 주로 생성되는 Microcystin으로 인한 신경독성 및 급성 간독성으로 판명되었다. [14][16]

Microcystin은 Hapatotoxins의 7개 아미노산이 고리구조 형태로 구성되었으며 아미노산 구조와 종류에 따라 독성이 변하는데, 지금까지 밝혀진 바에 따르면 가장 독성의 세기가 강한 구조는 Microcystin-LR로 Microcystin-RR의 약 12 배정도의 독성 차이가 있다. [3][20]

Toxin	LD ₅₀ (µg/kg)	Reference
Microcystin-LR	50	Krishnamurthy <i>et al.</i> , 1986
Microcystin-LA	50	Botes <i>et al.</i> , 1982
Microcystin-YR	70	Watananbe <i>et al.</i> , 1988
Microcystin-RR	600	Watananbe <i>et al.</i> , 1988
Microcystin-AR	250	Namikoshi <i>et al.</i> , 1992
Microcystin-LY	90	Stoner <i>et al.</i> , 1989
Microcystin-FR	250	Namikoshi <i>et al.</i> , 1992

Table 2. Types of Microcystin

*Microcystis*에서 생성되는 독성물질 중 가장 강력한 독성을 띠는 Microcystin-LR을 이용한 동물실험에서 독성물질을 처리한 쥐와 대조군을 비교한 결과 대조군에 비해 쥐의 간 무게와 부피가 눈에 띄게 증가 하였다. 간의 내부 관찰 결과 간엽 전체에 심각한 간세포 분리 및 괴사가 발생하여 심각한 간세포 손실과 출혈이 발생하였다. 인간에 대한 Microcystin의 독성은 다양한 증상을 보였다. 알레르기 반응과 피부자극, 열과 천식, 구토, 독감과 같은 증상, 인후염, 염증, 발진, 간경화, 폐결핵, 시각장애, 신장 손상 및 간 손상으로 다양하게 증상이 나타났으며, 이러한 원인은 Microcystin이 인체 내에서 protein phosphatase 1과 2A의 강력한 억제제로 작용하여 체내의 단백질인산화가 증가하게 되고, 이 단백질인산화의 변화로 인해 세포골격파괴, 세포 분할, 종양 촉진 활동이 일어난다고 밝혀졌다. [10][11][18][22]

위와 같은 *Microcystis*의 독성문제로 인하여 WHO (World Health Organization)는 쥐 실험에서 Microcystin-LR에 대한 LD₅₀ (50% lethal dose)값이 0.04 µg/kg인 연구결과를 토대로 하여 음용수중 Microcystin-LR 함유 가이드라인을 1 µg/L로 하였다. [17]

유해조류의 과잉성장은 수생태계의 질서를 어지럽힐 뿐만 아니라 유독성물질 분비로 어업과 이 물을 이용한 인간에게 까지 영향을 미친다. 그렇기 때문에 최근 유해조류를

제어하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 유해조류제어를 위해 주로 사용되고 있는 점토를 이용한 방법은 *Microcystis*의 음이온성 당분과 점토의 양이온성 간의 흡착원리를 이용하여 침전시키는 방법이다. 단시간적으로 보면 *Microcystis*를 제어하는데 효과를 보이지만, 다른 음이온성을 띠는 미생물과 함께 침전됨으로써 수생태계의 질서를 파괴하고, 점토 내의 양이온을 띠는 정도에 따라 침전되는 효과의 차이가 크다는 한계점이 있다. 다른 방법으로는 식물성플랑크톤을 먹이로 하는 동물성플랑크톤인 물벼룩을 이용하는 방법이 있지만 과다한 처리비용으로 비경제적일 뿐만 아니라 물벼룩이 독성을 가지고 있는 식물성플랑크톤은 특수한 경우가 아니면 먹이로 삼지 않기 때문에 한계가 있다. [4][23]

	세부기준	권고사항
세계보건기구 (WHO)	1단계: 남조류 세포수 20,000 cells/mL 이상 남조류 우점시 Chl-a 10 µg/L 이상	인체 영향 적은 단계
	1단계: 남조류 세포수 100,000 cells/mL 이상 남조류 우점시 Chl-a 50 µg/L 이상	성인 2 L이상 섭취 시 질병 발병 가능
	3단계: 수면에 부유물 발생	소량으로도 치명적

Table 3. World Health Organization algae management standards [19]

독성물질 Geosmin 및 2-methyl-isoborneol을 생산하는 *Cyanobacteria*를 제어하는데 사용되는 화학물질인 황산알루미늄, 염화 제 2철은 처리 사용 농도에서는 생리적 독성이나 세포막 손상 또는 용해된 유기물질의 방출을 일으키지 않지만, 다당류의 일종인 *Cyanobacteria*는 첨가된 철이나 알루미늄을 킬레이트 할 수 있으며, 이로 인해 수체의 금속이온의 양을 증가 시킬 수 있고, 알루미늄은 인체에서 신장 투석환자의 뇌병증과 연계되어 있다는 심각한 문제점이 있다. 그렇기 때문에 *Cyanobacteria*를 제어하기 위해 사용된 알루미늄계 살조물질은 수중에 알루미늄의 농도를 증가하게 되고 이러한 결과는 인간의 건강에 위협이 될 수 있다. 또한, 수산화칼슘, 과산화수소를 이용할 경우 막 손상과 유기물질의 방출만을 야기했고, 염소, 황산구리, 과망간산칼륨은 대량의 유기물을 방출하는 결과를 보였다. 이에 대한 문제로는 염소가 유기물 전구체와 반응하

여 그중 일부는 haloform을 형성할 뿐만 아니라 chloroform이라는 발암물질을 발생하기 때문에 심각한 공중보건 문제를 야기한다. [24][25][26]

본 연구팀의 선행된 연구는 수생태계를 어지럽히지 않고 독성이 낮은 의약품을 기반으로 한 유기합성물을 통해 유해조류를 선택적으로 제어하는 방안을 고안하였다. 연구의 결과물인 N^1 -(3,4-dichlorobenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine이 *Cyanobacteria*의 종류 중 하나인 *Microcystis sp.*를 낮은 농도에서 높은 살조 효과를 보였고, 무해조류중 하나인 *Selenastrum*에서는 살조 효과를 보이지 않았다.

본 연구는 선행 연구에서 N^1 -(3,4-dichlorobenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine이 유해조류에 높은 선택성을 보였기 때문에 이를 토대로 다양한 benzylamine 유도체를 합성하여 *Microcystis sp.*에 대한 SAR (Structure Activity Relationship)을 분석하였다. 이 중 살조 능력이 우수한 화합물에 대해서는 추가적으로 물벼룩(*Daphnia magna*)과 인간과 유전자가 비슷한 Zebrafish (*Danio rerio*)를 이용한 독성평가를 진행하였다.

합성물질에 대한 *Cyanobacteria*의 살조 효과를 규명하기 위해 S.E.M (Scanning Electron Microscope)과 T.E.M (Transmission Electron Microscope)을 이용하여 세포막 변화를 관찰 하였다.

II. 재료 및 방법

2. 재료

2.1. 유기 합성 및 분석

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 N₂ 조건하에서 반응하였다.

모든 합성물질은 methylene chloride와 H₂O를 이용한 추출 방법과 silica gel로 충전된 column chromatography를 이용해 정제하였고, TLC (thin layer chromatography)와 발색시약, UV검출기를 통해 1차 분석을 진행하였다. 순수하게 얻어진 화합물은 ¹H NMR (¹H nuclear magnetic resonance), 범위 300 MHz에서 ¹H를 측정하고 ¹H MNR의 화학적 이동량(δ 등급)은 parts per million (ppm, 백만 분율)으로 표시하였으며, *J*-coupling 상수는 Hz (hertz) 단위로 측정하였다.

¹H NMR 용매로는 CDCl₃ (chloroform-d)와 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 사용하였다.

2.2. 유해조류

2.2.1. 시험종 및 배양조건

유해 남조류(*Cyanobacteria*)로는 *Microcystis sp.* (HYK0906-B3)와 *Microcystis aeruginosa* (HYK0906-A2)를 사용하였으며, 무해조류로는 *Selenastrum capricornutum* (AG10009, KCTC 생물자원센터)를 사용하였다. 유해 적조류(red tide algae)종으로는 와편모조류인 *Heterocapsa circularisquama*와 침편모조류인 *Chattonella marina* 및 *Heterosigma akashiwo* (KMMCC1133)를 한국해양미세조류은행에서 공급받아 사용하였다.

녹조류(*Cyanobacteria*)는 pH가 7~8 사이로 조절된 BG-11 medium (uniquath Ltd. wade road, basingstocke, hants RG24 0 PW, UK)을 사용하여 Table 5와 같은 조성으로 제조하

여 사용하였으며, 조류가 잘 자랄 수 있는 환경을 조성하기 위해 계대배양(subculture)을 14일에 1회씩 진행하였다. 녹조의 배양 조건으로 광주기 12:12 cycle (Light : Dark), 광도 2300~2700 Lux, 온도 20~25°C로 하였다.

적조류(red tide) 배양은 대한해협 해수를 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 0.2 µm membrane filter로 다시 여과한 다음 고온고압 멸균기 (15 min, 121°C)로 멸균하여 사용하였다. 멸균된 해수를 이용하여 Si가 제거된 F/2 medium에서 pH 8, 수온 23°C, 광주기 12:12 cycle (Light : Dark)로 조절하여, shaking incubator에서 RPM 45MIN-1로 설정하여 고농도의 밀도가 유지 될 때까지 배양하였다.

녹조류와 적조류의 배양 tube는 SPL사의 polystyrene으로 된 cell culture flask 75 cm³와 nalgene사의 polycarbonate으로 된 500 mL bottle을 사용하였다.

Incubation condition		
red tide	light : dark	12 h : 12 h
	Temperature	23°C±1°C
	pH	8
	Medium	F/2 without Si
<i>Cyanobacteria</i>	light : dark	12 h : 12 h
	Temperature	20~25°C
	pH	7~8
	Medium	BG-11

Table 4. Incubation condition of harmful algae

BG-11 (Blue-Green Medium)			
Composition			Per liter
1	NaNO ₃	15.0 g/L	100.0 mL
2	K ₂ PO ₄	2.0 g/0.5L	10.0 mL
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.75 g/0.5L	10.0 mL
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	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	EDTANa ₂	0.05 g/0.5L	10.0 mL
8	Na ₂ NO ₃	1.00 g/0.5L	10.0 mL
	Trace metal solution		1.0 mL
	H ₃ BO ₃	2.86 g/L	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g/L	
9	ZnSO ₄ ·H ₂ O	0.22 g/L	
	Na ₂ MOO ₄ ·2H ₂ O	0.39 g/L	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08 g/L	
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.05 g/L	

Table 5. Algae Blue-Green medium

Stock Solution Trace elements		
	Composition	g/L
1	Na ₂ EDTA	4.16 g
2	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15 g
3	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01 g
4	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022 g
5	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 g
6	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18 g
7	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.006 g
Stock Solution Vitamin mix		
	Composition	mg/L
1	Cyanocobalamin (vitamin B12)	0.5 mg
2	Thiamine HCl (vitamin B1)	100 mg
3	Biotin	0.5 mg

Table 6. F/2 Culture media Stock solution

F/2 Medium		
	Composition	Per liter
1	NaNO ₃	57 mg
2	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	5.65 mg
3	Trace elements stock solution	1.0 mL
4	Vitamin mix stock solution	1.0 mL

Table 7. F/2 Culture medium

2.2.2. 물벼룩 (*Daphnia magna*)

물벼룩은 수생태계의 1차 영양단계의 대표 생물종이고, 크기는 약 0.3 mm~6 mm 정도로 매우 작고 번식 능력이 뛰어나며 짧은 수명을 갖는 특징이 있다. 또한, 독성물질에 민감하고 독성시험의 재현성이 높기 때문에 급성독성을 평가하는데 사용되는 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) 공시종인 *Daphnia magna*를 한국화학융합시험연구원(헬스케어 본부/독성 평가팀)에서 분양받아 배양 및 실험을 진행하였다. 물벼룩 배양액은 M4 medium을 사용하였으며, 광주기 16 h, 광조건 8 h 암조건, 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지시켜 실험을 진행하였다.

Stock Solution Combined traced element (1)			
	Composition	Concentration (g/200 mL)	m/L
1	H ₃ BO ₃	11.438 g	1 mL
2	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.442 g	"
3	LiCl	1.224 g	"
4	RbCl	0.284 g	"
5	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.608 g	"
6	NaBr	0.064 g	"
7	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.252 g	"
8	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.067 g	"
9	ZnCl ₂	0.052 g	"
10	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.040 g	"
11	KI	0.013 g	"
12	Na ₂ SeO ₃	0.00876 g	"
13	NH ₄ VO ₃	0.0023 g	"
	Fe-DETA solution	Concentration (g/L)	
14	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	2.5 g	20 mL
15	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.995 g	
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
Stock Solution Vitamin mix (1)			
	Composition	g/L	
1	Cyanocobalamine (B12)	0.75 g	
2	Thiamine HCl	0.01 g	
3	Biotin	0.075 g	

Table 8. M4 culture medium stock solution

M4 Medium			
	Composition	Concentration (g/200 mL)	Per liter
1	CaCl ₂ ·2H ₂ O	58.76 g	1.0 mL
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	49.32 g	0.5 mL
3	KCl	11.60 g	0.1 mL
4	NaHCO ₃	12.96 g	1.0 mL
5	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	10.00 g	0.2 mL
6	NaNO ₃	0.548 g	0.1 mL
7	KH ₂ PO ₄	0.286 g	0.1 mL
8	K ₂ HPO ₄	0.368 g	0.1 mL
9	Combined traced element (1)	-	50 mL
10	Vitamin mix (1)	-	0.1 mL

Table 9. M4 culture medium

2.2.3. Zebrafish (*Danio rerio*)

Zebrafish는 쥐나 인간과 같은 “척추동물”이다. 길이 3~4 cm 정도의 잉어과의 소형 열대관상어이다. 수명은 약 2년 이며 번식은 생후 3개월이 지나고 가능하다. Zebrafish는 돌연변이 연구에서 밝혀지는 여러 결과들이 인간의 유전질환과 매우 유사하므로 이번 실험에서 사용하였다. Zebrafish의 사육 조건으로는 수온 26±1℃로 유지시키며 심리적 안정을 취하기 위해 약 2주 동안 실험실 수족관에서 안정기를 거쳤으며, 사료는 2일에 1회씩 주었다.

3. 활성평가 및 시험방법

3.1. 유해조류 활성측정

화합물에 대한 살조능을 확인하기 위해 BG-11, f/2 medium으로 배양된 녹조(1×10⁴ ~ 10×10⁴ cell/mL) 및 적조(14×10⁴ ~ 16×10⁴ cell/mL)를 96-well-plate에 180 μL씩 주입한 다음 화합물을 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 μM이 되도록 처리하였다.

약물 활성을 비교하기 위해 대조군도 같이 plate에 배양하였다. 녹조(20~25℃ 12L :

12D cycle)와 적조(23°C 12L : 12D cycle)를 각각 120 h, 및 24 h 동안 배양한 다음 Neubauer hemocytometer (SUPERIOR)와 전자현미경(Nikon, ECLI-PSE E100, 0.3 A, 50~60 Hz)을 이용하여 세포 감소율(algicidal activity)을 측정하였다.

$$\text{Algicidal activity (\%)} = (\text{대조군} - \text{실험군} / \text{대조군}) \times 100$$

위 실험은 3회 반복하여 실시하였으며, 결과 값을 이용해 LC₅₀을 도출하였다.

3.2. 물벼룩(*Daphnia magna*) 급성독성 시험

물벼룩 급성독성 시험에 사용된 시험용수는 OECD에 공시된 방법에 따라 조제된 M4 medium을 사용하였다. 사육된 물벼룩 중 생후 14일 이상의 물벼룩 암컷이 생산한 생후 24 h 미만의 어린 개체를 사용하였다.

시험방법으로 1 L volumetric flask에 화합물과 시험용수 1 L를 혼합하여 농도가 1000 mg/L가 되도록 한 후, 이를 희석하여 시험용액을 조제하였다. 시험용액을 중층에서 추출하여 millipore membrane filter (0.45 µm, hydrophilic polypropylene membrane filter)로 여과한 후, *Microcystis* 처리 농도의 10배부터 농도를 증가시켜 실험을 진행하였다.

각 시험용기(conical tube, 50 mL)에 시험용수 40 mL를 채운 후, 물벼룩을 각 용기에 5마리씩 넣고 농도별 시험용액을 처리하였다. 모든 시험용기에 대하여 실험시작 후, 24, 48 h 경과 시에 독성증상 및 유영저해 관찰을 실시하였다. 유영저해의 판정은 시험용액을 가볍게 저어준 다음 15 초 이내에 물벼룩 촉각(antennae)의 움직임에 상관없이 물벼룩이 유영하지 못하는 것으로 정의하였고, EC₅₀ (50% effective concentration, 반수영향농도)을 사용하여 각 화합물에 대한 물벼룩 급성독성시험에 대한 영향을 확인하였다.

3.3. Zebrafish (*Danio rerio*) 독성시험

Zebrafish 독성시험에 사용된 시험용수는 수돗물을 전처리필터(1.0 μm)와 세균제거필터(0.2 μm)를 통과시킨 후 수조에서 48 h 이상 경과 후 사용하였다.

실험 기간 동안 시험액을 교환하지 않는 지수식 시험방법(static system)으로 진행하였고, Zebrafish의 심리적 안정을 취하기 위해 약 2주 동안 실험실 수족관에서 사육하였으며 아사(餓死)에 대한 영향을 최소화하기 위해 실험 24 h 전 밥을 충분히 준 뒤, 절식을 실시하였다. Zebrafish가 이상이 없는 것을 확인한 후 실험을 진행하였다.

시험방법으로 1 L volumetric flask에 화합물과 시험용수 1 L를 혼합하여 농도가 1000 mg/L가 되도록 한 후 이를 희석하여 시험용액을 조제하였다. 시험용액을 중층에서 추출하여 millipore membrane filter (0.45 μm , hydrophilic polypropylene membrane filter)로 여과한 후, 물벼룩 처리 농도부터 농도를 증가시켜 실험을 실시하였다.

각 투명플라스틱 수조에 시험용수 3 L와 Zebrafish 5마리를 넣은 후, 24 h 간격으로 96 h 이상 Zebrafish가 특이증상 및 치사하였는지 관찰하였다. 치사의 판정은 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 간주하였고, LC₅₀ (50% lethal concentration 반수치사농도)을 사용하여 각 화합물에 대한 Zebrafish 독성시험에 대한 영향을 확인하였다.

3.4. Chlorophyll 측정

조류에 함유되어 있는 Chlorophyll을 측정하기 위한 방법으로 전처리 과정을 거친다. GF/C (glass microfiber filter, 47 mm)를 유리필터에 넣은 뒤, 준비된 *Microcystis sp.* 10 mL를 여과한 후 여과된 GF/C를 PTFE (polytetrafluoroethylene) 재질인 마쇄기(tissue grinder)에 넣고 아세톤:증류수(9:1) 혼합용액 약 10 mL와 같이 마쇄한다. 마쇄한 시료를 conical tube에 넣고 밀봉하여 4°C 냉장고에 넣고 암 조건에서 하룻밤 방치한다.

24 h 방치된 시료를 원심분리기(ependorf-5702 R)를 이용해 20분간 원심 분리한다. 상등액을 여과한 뒤, 10 mm 흡수 셀에 옮겨 파장 663 nm, 645 nm, 630 nm 및 750 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하고 아래 계산식을 이용하여 Chlorophyll 양을 계산하였다.

$$\text{Chlorophyll (mg/mL)} = \frac{(11.64X_1 - 2.16X_2 + 0.1X_3) \times V_1}{V_2}$$

X_1 : OD₆₆₃ - OD₇₅₀

X_1 : OD₆₄₅ - OD₇₅₀

X_1 : OD₆₃₀ - OD₇₅₀

V_1 : 상층액의 양 (mL)

V_1 : 여과한 시료의 양 (L)

3.5. 유해조류 세포관찰

3.5.1. S.E.M (Scanning Electron Microscope)

Sample 표면을 전자빔을 통해 scan하여 image화 시키는 전자현미경의 일종으로 고속의 전자를 발사하면 이 전자가 시료표면에 충돌을 통해 상호작용하여 시료에서 전자물질을 분석하게 된다. 시료의 분석은 고진공 상태에서 측정되므로 도중에 수분이나 용매 및 기타 기화될 수 있는 물질이 남아있을 경우 특정 신호를 유지하기 어려워 정확한 분석이 어렵기 때문에 전처리 과정을 진행하였다.

전처리 과정은 시료의 상태를 보존하기 위해 ethanol을 낮은 농도부터(20%, 40%, 60%, 80%, 99%) 조금씩 늘려가며 원심분리를 통해 수분 함량을 낮추었다.

남은 용매를 건조시키는 과정에서 불순물이 섞여 들어가는 것을 방지하기 위해 freeze drying으로 24 h 건조를 진행하였고, 시료의 표면을 코팅하기 위해 HITACHI-E1030으로 백금(pt) 10 mA 조건 하에서 코팅하였으며, 주사전자현미경(HITACHI-s4800)으로 가속전압 15 kV하에서 관찰하였다.

3.5.2. T.E.M (Transmission electron microscope)

투과 전자 현미경은 전자선을 이용하여 시료를 투과시켜 전자선을 전자렌즈로 확대하여 관찰하는 전자 현미경이다. 전자선을 사용하기 때문에 진공 환경이 필요하므로 시료의 전처리 과정을 진행하였다.

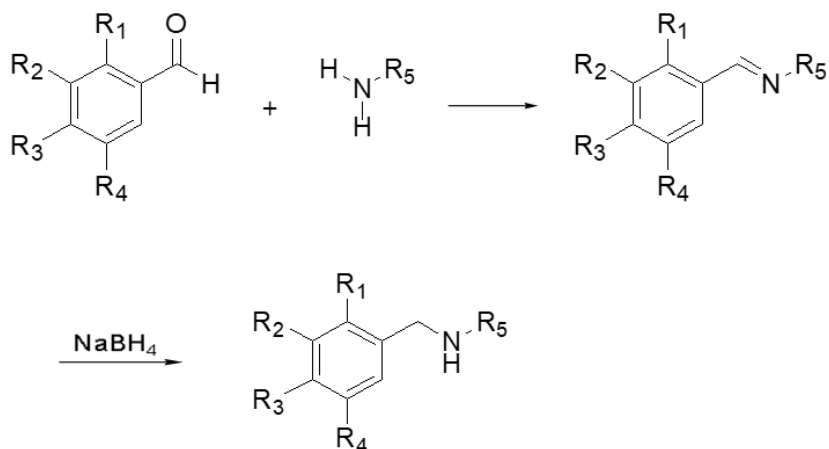
전처리 과정은 시료 조직을 신속히 세절(1 mm)하여, 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4 0.1M sodium cacodylate buffer, 4°C)에서 2 h 전 고정한 다음 이를 세척하기 위해 같은 용액으로 세척한 후, 1% osmium tetroxide (OsO₄) 고정액(pH 7.4, 0.1 M sodium cacodylate buffer, 4°C)으로 고정하고 같은 용액으로 세척을 반복한다. 저농도 ethanol(50%)로부터 고농도 ethanol (absolute)하에 탈수를 진행하고 propylene oxide로 치환 뒤에 epon mixture로 포매한다.

열충합 온도는 35°C, 45°C, 60°C로 온도를 천천히 올린 뒤, epon block을 만들어 1 μm로 cutting을 진행하고 1% toluidine blue로 염색하였다.

염색된 시료를 관찰하기 위해 diamond knife를 사용하여 ultra microtome (MT-7000)으로 초박절편(60 nm)을 만들어 reynold법(reynold, 1963)에 의한 이중염색(uranyl acetate, lead citrate) 후, 투과전자현미경(tecnaï G2 F30 S-TWIN)으로 가속전압 300 kV하에서 시료를 관찰하였다.

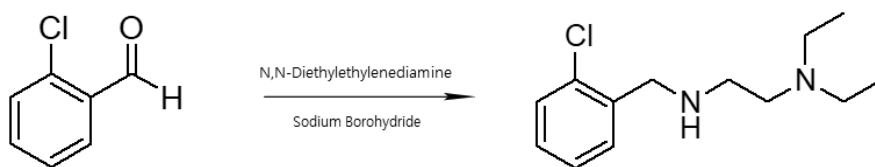
4. 유기합성 실험방법

4.1 화합물 (1~57)의 합성



Scheme 1. Synthesis of compounds (1~57) ; R₁ = Cl, Br, F, OMe, OH, NO₂, H; R₂ = OMe, Cl, NO₂, CH₃, H ; R₃ = OMe, Cl, F, NO₂, CH₃, H ; R₄ = Cl, OMe, H

(1) *N'*-(2-Chlorobenzyl)-*N*²,*N*²-diethylethane-1,2-diamine



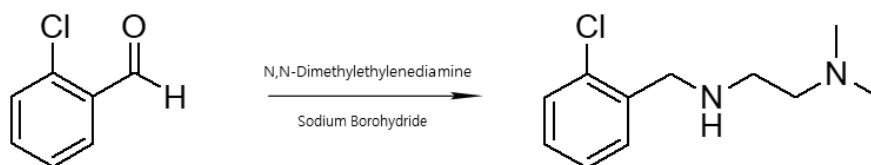
Methanol 5 mL에 2-chlorobenzaldehyde 0.3 g (2.13 mmol)를 녹인 다음 *N*²,*N*²-diethylethylenediamine 0.299 mL (2.13 mmol)을 넣고, 상온에서 1 h 동안 반응시켰다. 여기에 sodium borohydride 0.081 g (2.13 mmol)을 서서히 적가한 다음 1 h 동안 교반하였다. 반응의 진행정도는 TLC (Thin Layer Chromatography)로 확인하였으며, 반응이 더 이상 진행되지 않으면 용액에 물 20 mL를 가한 후 methylene chloride 10 mL

로 약 2회 반복 추출하고, magnesium sulfate anhydrous로 물을 제거한 다음 감압 증류하여 투명색 액체 N^1 -(2-chlorobenzyl)- N^2,N^2 -diethylethane-1,2-diamine를 얻었다.

Yield : 86%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.25(m, 4H), δ 3.81(s, 2H), δ 2.62(t, $J=5.85$ and 5.85 2H), δ 2.51(m, 6H), δ 2.17(m, 1H), δ 0.98 (t, $J=7.32$ Hz, 6H)

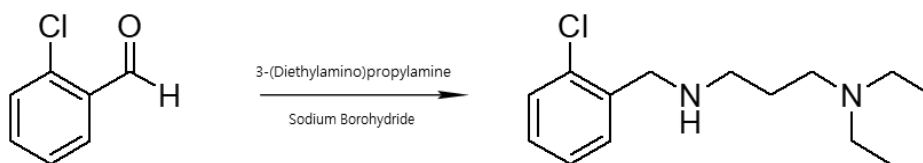
(2) N^1 -(2-Chlorobenzyl)- N^2,N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 90%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.50(dd $J=7.35$ Hz, 1H), δ 7.42(dd, $J=7.32$ and 1.47 Hz, 1H), δ 7.33(m, 2H), δ 3.77(s, 2H), δ 2.59(t, $J=6.57$ 2H), δ 2.33(t, $J=6.24$ Hz, 2H), δ 2.15 (s, 6H)

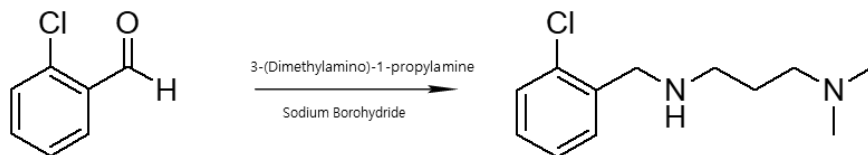
(3) N^1 -(2-Chlorobenzyl)- N^3,N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



Yield : 90%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.39(m, 2H), δ 7.26(m, 2H), δ 3.87(s, 2H), δ 2.67(t, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 2.54(p, $J=7.32$ Hz, 6H)

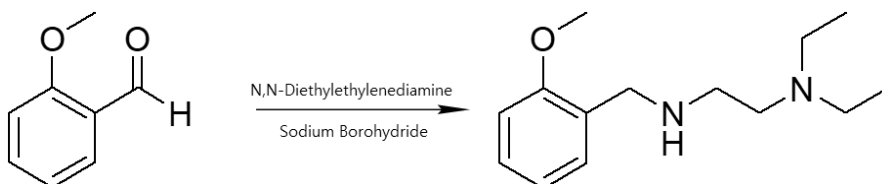
(4) *N*¹-(2-Chlorobenzyl)-*N*³,*N*³-dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 89%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.45(m, 2H), δ 7.31(m, 2H), δ 3.96(s, 2H), δ 2.75(t, *J*=8.79 Hz, 2H), δ 2.37(t, *J*=6.96 Hz, 6H), δ 1.77(m, 2H)

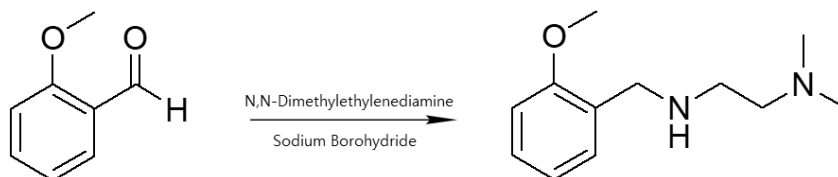
(5) *N*²,*N*²-Diethyl-*N*¹-(2-methoxybenzyl)ethane-1,2-diamine



Yield : 90%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.26(m, 2H), δ 6.92(m, 2H), δ 3.82(s, 3H), δ 3.79(s, 2H), δ 2.65(t, *J*=5.85 Hz, 2H), δ 2.57(t, *J*=5.49 Hz, 2H), δ 2.53(q, *J*=7.32 Hz, 4H), δ 2.08(s, 1H), δ 1.00(t, *J*=6.96 Hz, 6H)

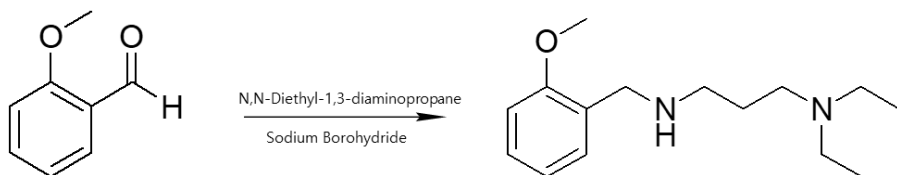
(6) *N*¹-(2-Methoxybenzyl)-*N*²,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 88%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26(m, 2H), δ 6.92(m, 2H), δ 3.82(s, 3H), δ 3.79(s, 2H), δ 2.68(t, $J=6.21$ Hz, 2H), δ 2.43(t, $J=6.21$ Hz, 2H), δ 2.17(s, 6H), δ 2.04(s, 1H)

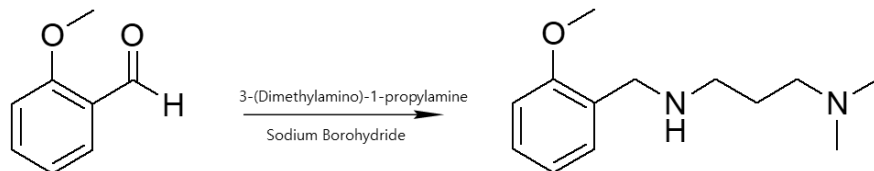
(7) N^3,N^3 -Diethyl- N^1 -(2-methoxybenzyl)propane-1,3-diamine



Yield : 87%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.20(m, 2H), δ 6.85(m, 2H), δ 3.75(s, 3H), δ 3.71(s, 2H), δ 2.57(t, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 2.47(m, 6H), δ 1.93(s, 1H), δ 1.64(q, $J=7.32$ Hz, 2H), δ 0.95(t, $J=7.32$ Hz, 6H)

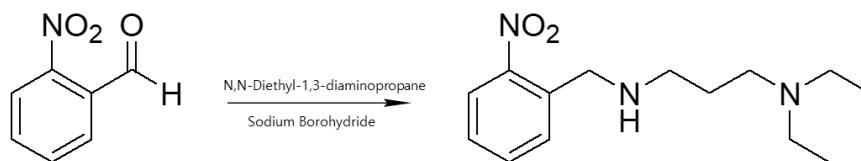
(8) N^1 -(2-Methoxybenzyl)- N^3,N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 89%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.29(m, 2H), δ 6.94(m, 2H), δ 3.84(s, 3H), δ 3.79(s, 2H), δ 2.66(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.34(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.22(s, 6H), δ 1.73(q, $J=7.32$ Hz, 2H)

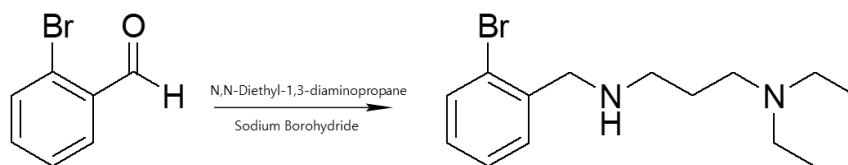
(9) *N*¹,*N*¹-Diethyl-*N*³-(2-nitrobenzyl)propane-1,3-diamine



Yield : 94.7%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.96(d, *J*=8.04 Hz, 1H), δ 7.67(m, 2H), δ 7.43(m, 1H), δ 4.02(s, 2H), δ 2.67(t, *J*=6.6 Hz, 2H), δ 2.55(m, 6H), δ 1.92(s, 1H), δ 1.70(q, *J*=6.93 Hz, 2H), δ 1.01(t, *J*=6.96 Hz, 6H)

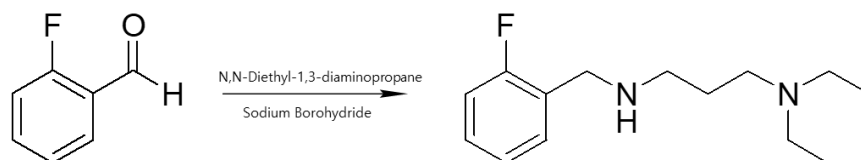
(10) *N*¹-(2-Bromobenzyl)-*N*³,*N*³-diethylpropane-1,3-diamine



Yield : 90.1%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.22(dd, *J*=1.08 and 1.11 Hz, 1H), δ 7.40(dd, *J*=1.83 and 1.47 Hz, 1H), δ 7.30(m, 1H), δ 7.14(td, *J*=1.83 and 1.8 and 1.83 Hz, 1H), δ 3.85(s, 2H), δ 2.67(t, *J*=6.57 Hz, 2H), δ 2.54(q, *J*=7.32 Hz, 6H), δ 1.80(s, 1H), δ 1.72(q, *J*=6.93 Hz, 2H), δ 1.02(q, *J*=6.96 Hz, 6H)

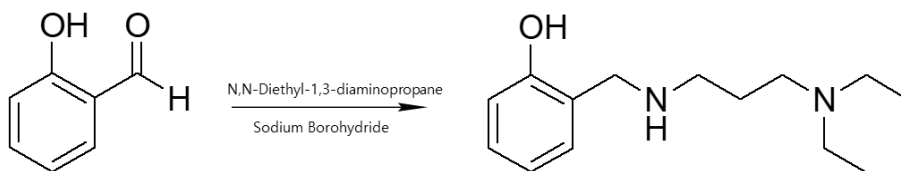
(11) *N*¹,*N*¹-Diethyl-*N*³-(2-fluorobenzyl)propane-1,3-diamine



Yield : 91%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.35(m, $J=5.85$ Hz, 1H), δ 7.24(m, 1H), δ 7.12(m, 2H), δ 3.83(s, 2H), δ 2.67(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.53(q, $J=7.35$ Hz, 6H), δ 1.71(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.02(t, $J=6.57$ Hz, 1H), δ 1.72(q, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 1.02(q, $J=7.32$ Hz, 6H)

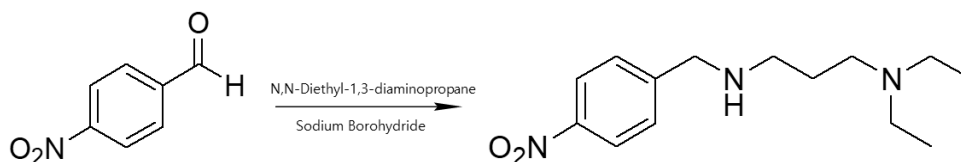
(12) 2-[(3-Diethylaminopropylamino)methyl]phenol



Yield : 88.3%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.16(t, $J=6.96$ Hz, 1H), δ 7.24(d, $J=7.32$ Hz, 1H), δ 6.82(m, 2H), δ 3.95(s, 2H), δ 2.72(t, $J=6.21$ Hz, 2H), δ 2.52(q, $J=7.32$ Hz, 6H), δ 1.71(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.02(t, $J=7.32$ Hz, 6H)

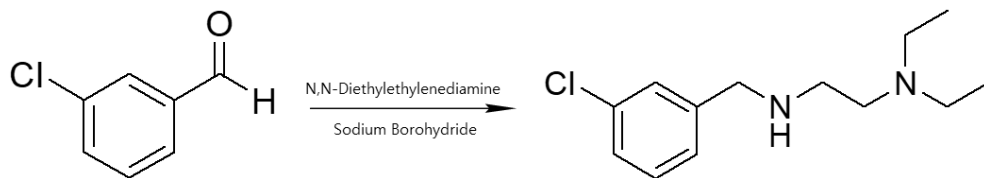
(13) N^1, N^1 -Diethyl- N^3 -(4-nitrobenzyl)propane-1,3-diamine



Yield : 87.5%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.17(m, 2H), δ 7.49(d, $J=8.79$ Hz, 2H), δ 3.87(s, 2H), δ 2.67(t, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 2.52(m, 6H), δ 1.86(s, 1H), δ 1.70(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.01(t, $J=6.96$ Hz, 6H)

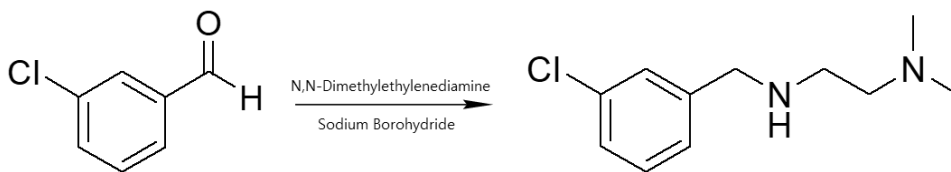
(14) *N*¹-(3-Chlorobenzyl)-*N*²,*N*²-diethylethane-1,2-diamine



Yield : 93.2%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.26(m, 4H), δ 3.71(s, 2H), δ 2.58(t, *J*=5.49 Hz, 2H), δ 2.49(m, 6H), δ 1.81(s, 1H), δ 0.96(t, *J*=6.96 Hz, 6H)

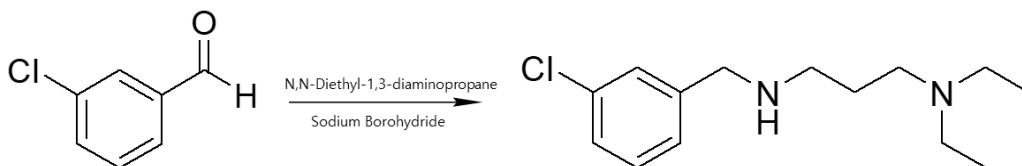
(15) *N*¹-(3-Chlorobenzyl)-*N*²,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 89.5%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.31(m, 4H), δ 3.70(s, 2H), δ 2.61(t, *J*=5.85 Hz, 2H), δ 2.36(t, *J*=5.85 Hz, 2H), δ 2.12(s, 6H), δ 1.77(s, 1H)

(16) *N*¹-(3,4-Dichlorobenzyl)-*N*³,*N*³-dimethylpropane-1,3-diamine

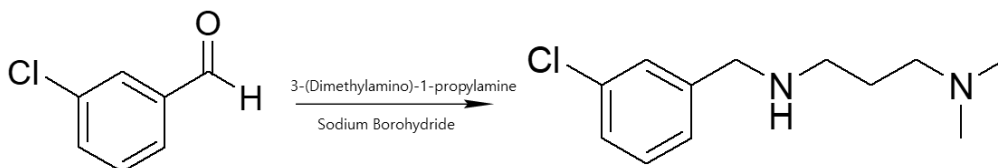


Yield : 89.9%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.26(m, 4H), δ 3.69(s, 2H), δ 2.60(t, *J*=6.96 Hz, 2H), δ

2.36(m, 6H), δ 1.72(s, 1H), δ 1.65(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 0.97(t, $J=6.96$ Hz, 6H)

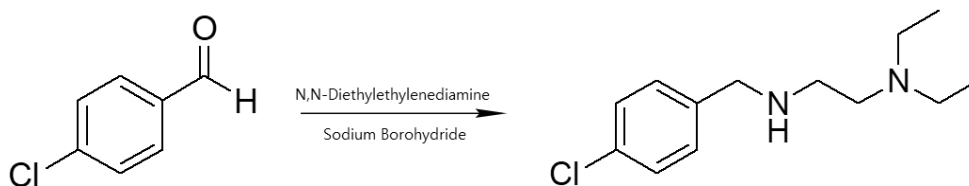
(17) *N*¹-(3-Chlorobenzyl)-*N*³,*N*³-dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 90.7%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.15(m, 4H), δ 3.69(s, 2H), δ 2.61(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.27(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.15(s, 6H), δ 1.63(q, $J=7.35$ Hz, 2H), δ 1.58(s, 1H)

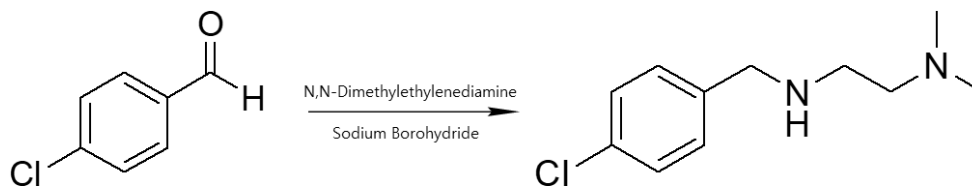
(18) *N*¹-(4-Chlorobenzyl)-*N*²,*N*²-diethylethane-1,2-diamine



Yield : 87%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.19(m, 4H), δ 3.69(s, 2H), δ 2.60(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.72(t, $J=6.96$ Hz, 6H), δ 2.15(s, 6H), δ 1.65(quin, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 1.50(s, 1H)

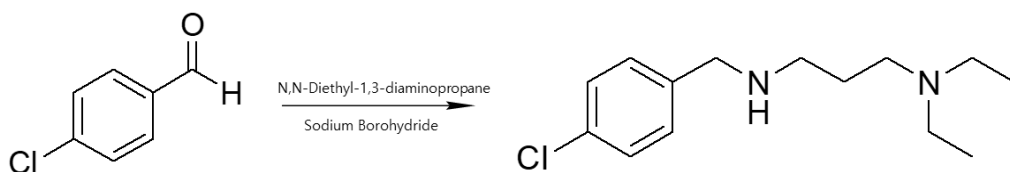
(19) *N*¹-(4-Chlorobenzyl)-*N*²,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 82.8%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.28(m, 4H), δ 3.82(s, 2H), δ 2.67(t, $J=5.49$ Hz, 2H), δ 2.42(t, $J=6.21$ Hz, 2H), δ 2.18(s, 6H), δ 1.96(s, 1H)

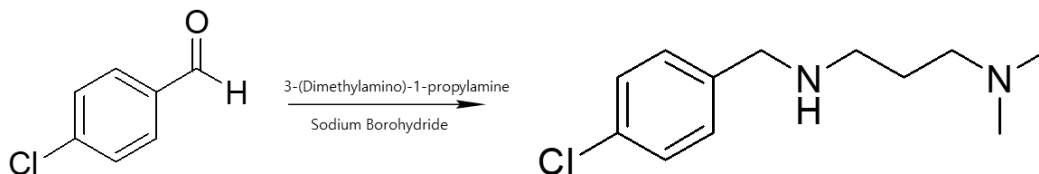
(20) N^1 -(4-Chlorobenzyl)- N^3, N^3 -diethyl-propane-1,3-diamine



Yield : 89%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.29(m, 4H), δ 3.74(s, 2H), δ 2.66(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.53(quin, $J=6.96$ Hz, 6H), δ 1.70(quin, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 1.02(t, $J=7.32$ Hz, 6H)

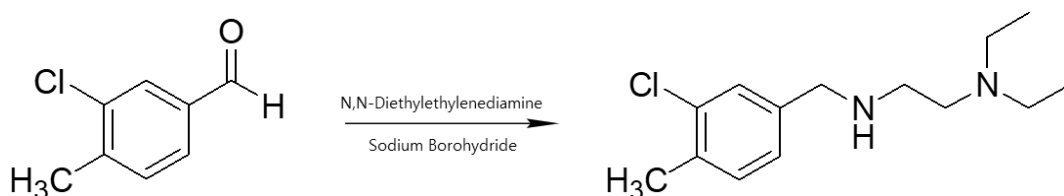
(21) N^1 -(4-Chlorobenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 30.5%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26(m, 4H), δ 3.74(s, 2H), δ 2.66(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.32(t, $J=7.32$ Hz, 2H), δ 2.21(s, 6H), δ 1.71(quin, $J=6.96$ Hz, 2H)

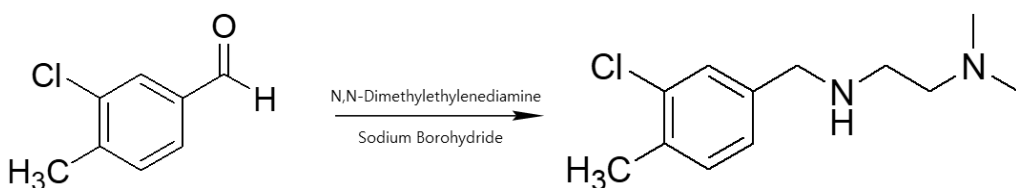
(22) *N*¹-(3-Chloro-4-methylbenzyl)-*N*²,*N*²-diethylethane-1,2-diamine



Yield : 86%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.26(m, 1H), δ 7.12(d, *J*=7.71 Hz, 1H), δ 7.06(dd, *J*=1.44 and 1.47 Hz, 1H), δ 3.69(s, 2H), δ 2.62(m, 2H), δ 2.52(m, 6H), δ 2.32(s, 6H), δ 1.90(s, 1H), δ 0.97(t, *J*=6.93 Hz, 6H)

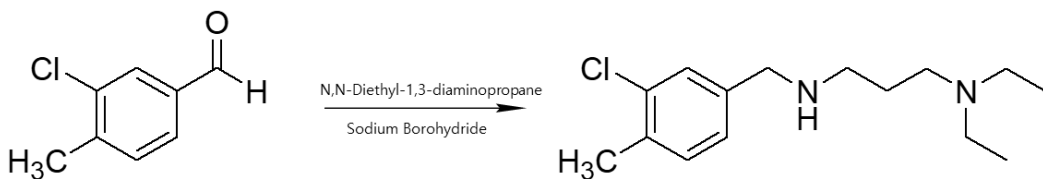
(23) *N*¹-(3-Chloro-4-methylbenzyl)-*N*²,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 89.1%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.26(d, *J*=8.04 Hz, 1H), δ 7.12(d, *J*=7.71 Hz, 1H), δ 7.06(d, *J*=7.68 Hz, 1H), δ 3.69(s, 2H), δ 2.62(t, *J*=5.85 Hz, 2H), δ 2.52(t, *J*=6.21 Hz, 2H), δ 2.29(s, 3H), δ 2.14(s, 6H), δ 1.79(s, 1H)

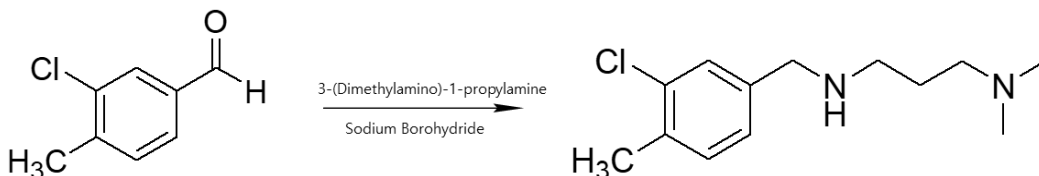
(24) *N*¹-(3-Chloro-4-methylbenzyl)-*N*³,*N*³-diethylpropane-1,3-diamine



Yield : 73.3%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26(d, $J=6.96$ Hz, 1H), δ 7.13(d, $J=7.71$ Hz, 1H), δ 7.06(d, $J=8.07$ Hz, 1H), δ 3.67(s, 2H), δ 2.61(t, $J=6.57$ Hz, 2H), δ 2.50(quin, $J=7.32$ Hz, 6H), δ 2.30(s, 3H), δ 1.70(s, 1H), δ 1.66(quin, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 0.99(t, $J=7.32$ Hz, 6H)

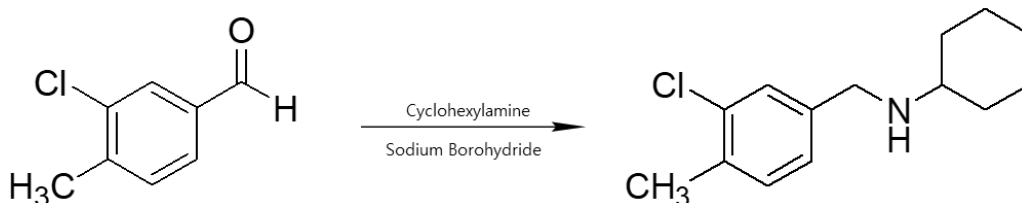
(25) N^1 -(3-Chloro-4-methylbenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 69.8%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26(s, 1H), δ 7.13(d, $J=7.71$ Hz, 1H), δ 7.06(d, $J=7.68$ Hz, 1H), δ 3.68(s, 2H), δ 2.2(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.30(t, $J=8.79$ Hz, 5H), δ 2.17(s, 6H), δ 1.67(quin, $J=7.32$ Hz, 2H)

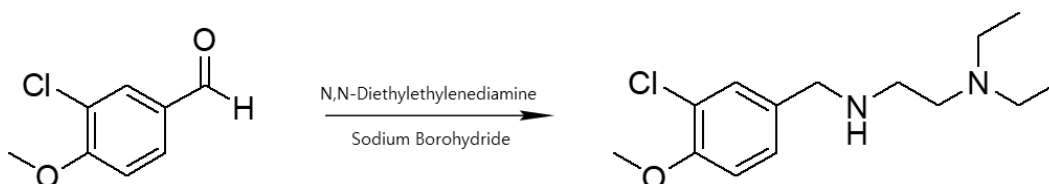
(26) (3-Chloro-4-methylbenzyl)cyclohexylamine



Yield : 73.3%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.31(sd, $J=1.47$ Hz, 1H), δ 7.17(d, $J=7.68$ Hz, 1H), δ 7.11(dd, $J=1.47$ and 1.47 Hz, 1H), δ 3.75(s, 2H), δ 2.49(m, 1H), δ 2.34(s, 3H), δ 1.91(d, $J=11.73$ Hz, 2H), δ 1.75(m, 2H), δ 1.63(m, 1H), δ 1.32(m, 6H)

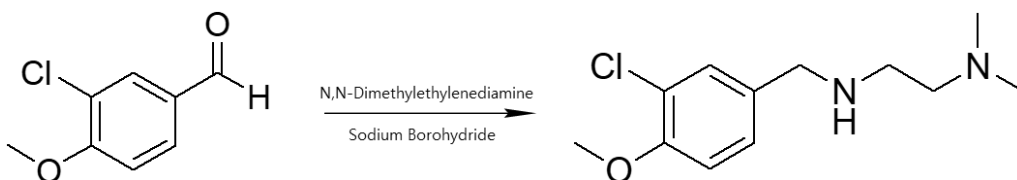
(27) *N*'-(3-Chloro-4-methoxybenzyl)-*N*²,*N*²-diethylethane-1,2-diamine



Yield : 72%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.71(sd, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.55(dd, *J*=1.83 and 2.19 Hz, 1H), δ 7.24(d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 4.24(s, 3H), δ 4.08(s, 1H), δ 3.00(t, *J*=5.49 Hz, 2H), δ 2.93(m, 6H), δ 2.21(s, 1H), δ 1.39(t, *J*=6.96 Hz, 6H)

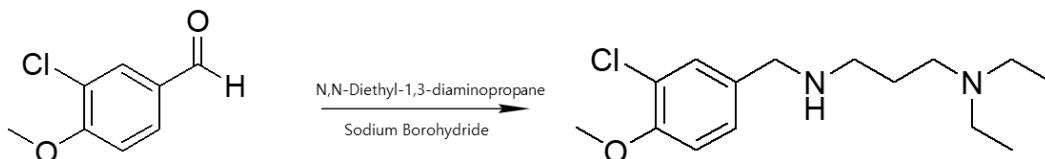
(28) *N*'-(3-Chloro-4-methoxybenzyl)-*N*²,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 87.4%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.27(sd, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.55(d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 6.80(d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 5.21(sd, *J*=1.47 Hz, 1H), δ 3.79(s, 3H), δ 3.63(s, 2H), δ 2.59(t, *J*=5.85 Hz, 6H), δ 2.35(t, *J*=5.85 Hz, 2H), δ 2.11(s, 6H), δ 1.80(s, 1H)

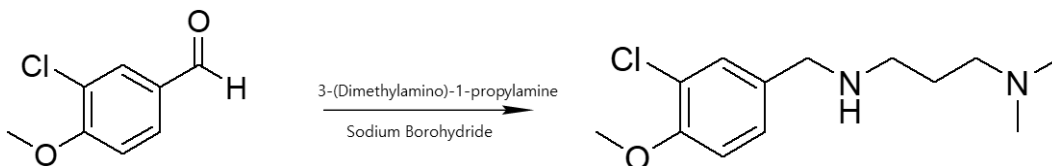
(29) *N*'-(3-Chloro-4-methoxybenzyl)-*N*³,*N*³-diethylpropane-1,3-diamine



Yield : 84.5%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.29(sd, $J=2.19$ Hz, 1H), δ 7.13(dd, $J=2.19$ and 2.19 Hz, 1H), δ 6.83(d, $J=8.07$ Hz, 1H), δ 3.85(s, 3H), δ 3.64(s, 2H), δ 2.60(t, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 2.49(q, $J=6.96$ Hz, 6H), δ 1.65(quin, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.01(t, $J=9.54$ Hz, 6H)

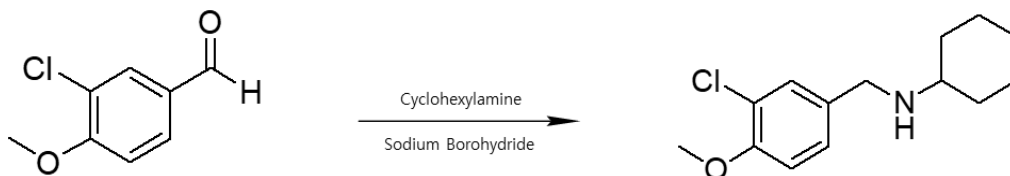
(30) N^1 -(3-Chloro-4-methoxybenzyl)- N^2, N^2 -dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 88.6%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.27(sd, $J=2.19$ Hz, 1H), δ 7.10(dd, $J=2.22$ and 1.83 Hz, 1H), δ 6.80(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 3.83(s, 3H), δ 3.62(s, 2H), δ 2.59(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.26(t, $J=7.35$ Hz, 2H), δ 2.26(t, $J=7.35$ Hz, 2H), δ 2.14(s, 6H), δ 1.64(quin, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.48(s, 1H)

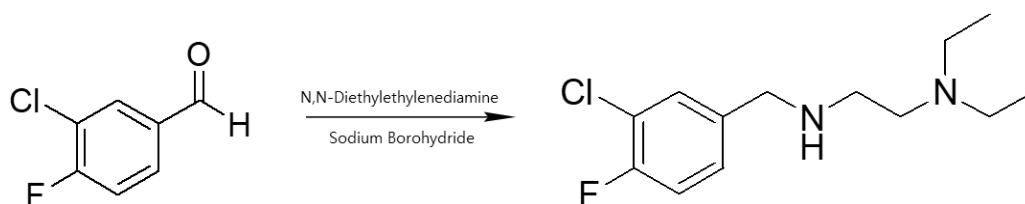
(31) (3-Chloro-4-methoxybenzyl)cyclohexylamine



Yield : 62.24%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.33(sd, $J=2.22$ Hz, 1H), δ 7.17(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 6.87(d, $J=8.4$ Hz, 1H), δ 3.87(s, 3H), δ 3.71(s, 2H), δ 2.47(m, 1H), δ 1.90(m, 2H), δ 1.74(m, 2H), δ 1.69(m, 1H), δ 1.22(m, 6H)

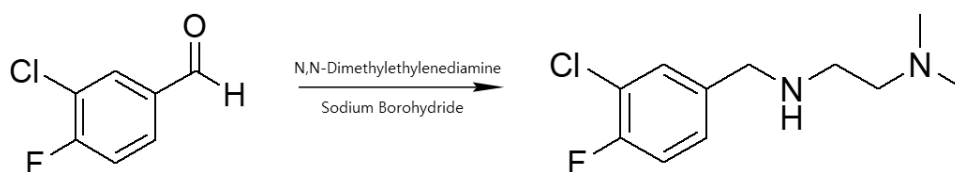
(32) N^1 -(3-Chloro-4-fluorobenzyl)- N^2,N^2 -diethylethane-1,2-diamine



Yield : 76.7%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36(dd, $J=2.19$ and 1.83 Hz, 1H), δ 7.17(m, 1H), δ 7.06(t, $J=8.79$ Hz, 1H), δ 3.71(s, 2H), δ 2.60(m, 2H), δ 2.50(m, 6H), δ 1.91(s, 1H), δ 0.99(t, $J=7.32$ Hz, 6H)

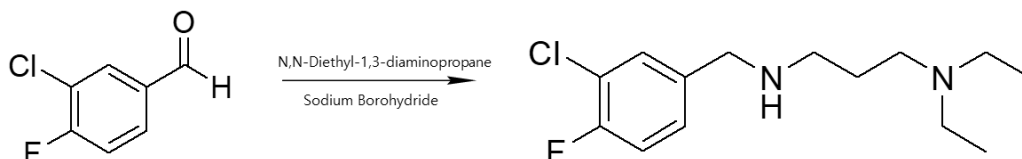
(33) N^1 -(3-Chloro-4-fluorobenzyl)- N^2,N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 48.7%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36(dd, $J=2.19$ and 2.19 Hz, 1H), δ 7.17(m, 1H), δ 7.05(t, $J=8.79$ Hz, 1H), δ 3.70(s, 2H), δ 2.63(t, $J=5.85$ Hz, 2H), δ 2.39(t, $J=6.21$ Hz, 2H), δ 2.16(s, 6H), δ 1.85(s, 1H)

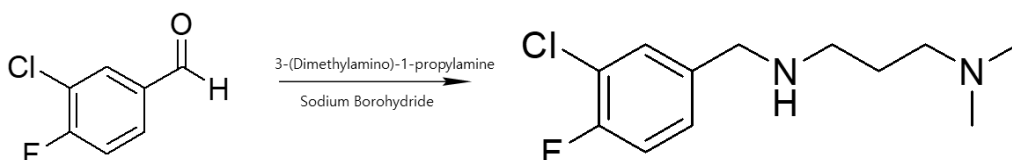
(34) N^1 -(3-Chloro-4-fluorobenzyl)- N^3,N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



Yield : 91.2%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.33(dd, $J=1.83$ and 2.19 Hz, 1H), δ 7.14(m, 1H), δ 7.03(t, $J=8.79$ Hz, 1H), δ 3.66(s, 2H), δ 2.60(t, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 2.48(m, 6H), δ 1.64(quin, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 0.99(t, $J=7.32$ Hz, 6H)

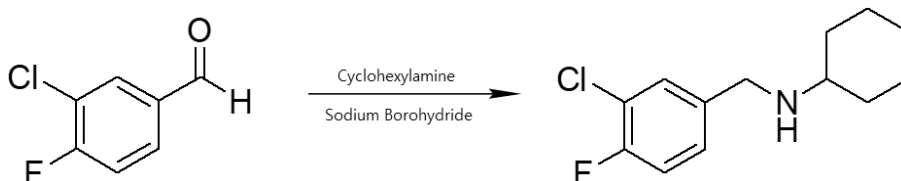
(35) N^1 -(3-Chloro-4-fluorobenzyl)- N^3,N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 94.1%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.33(dd, $J=2.19$ and 2.22 Hz, 1H), δ 7.15(m, 1H), δ 7.04(t, $J=8.79$ Hz, 1H), δ 3.68(s, 2H), δ 2.62(t, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 2.29(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.16(s, 6H), δ 1.66(quin, $J=6.96$ Hz, 6H), δ 1.53(s, 1H)

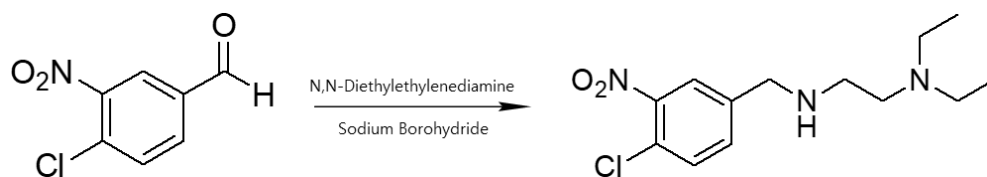
(36) (3-Chloro-4-fluorobenzyl)cyclohexylamine



Yield : 80.4%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.39(dd, $J=2.19$ and 1.83 Hz, 1H), δ 7.20(m, 1H), δ 7.09 (t, $J=8.79$ Hz, 1H), δ 3.75(s, 2H), δ 2.48(m, 1H), δ 1.91(d, $J=11.7$ Hz, 2H), δ 1.75(m, 2H), δ 1.63(m, 1H), δ 1.32(m, 6H)

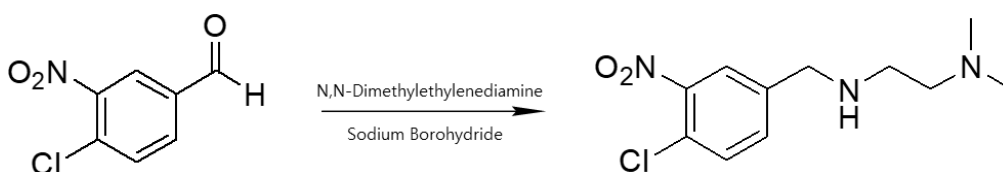
(37) *N*¹-(4-Chloro-3-nitrobenzyl)-*N*²,*N*²-diethylethane-1,2-diamine



Yield : 90.2%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.82(sd, *J*=1.83 Hz, 1H), δ 7.47(m, 2H), δ 3.79(s, 1H), δ 2.60(m, 2H), δ 2.52(m, 6H), δ 1.96(s, 1H), δ 0.97(t, *J*=3.66 Hz, 6H)

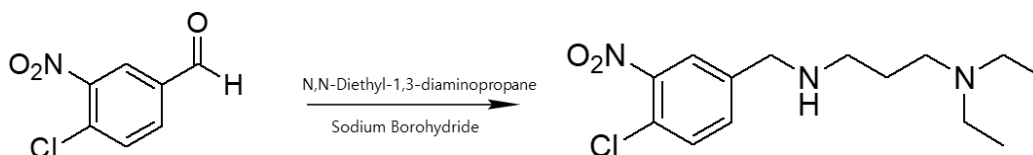
(38) *N*¹-(4-Chloro-3-nitrobenzyl)-*N*²,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 90.5%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.84(sd, *J*=1.44 Hz, 1H), δ 7.49(m, 2H), δ 3.81(s, 2H), δ 2.64(t, *J*=5.49 Hz, 2H), δ 2.40(t, *J*=6.24 Hz, 2H), δ 2.17(s, 6H), δ 1.92(s, 1H)

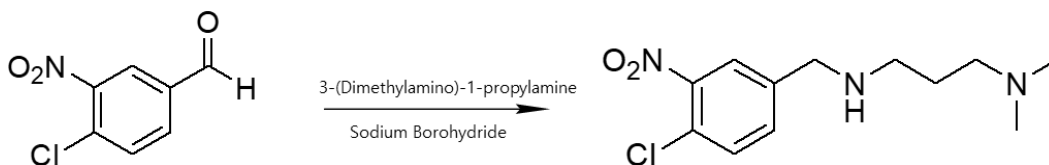
(39) *N*¹-(4-Chloro-3-nitrobenzyl)-*N*³,*N*³-diethylpropane-1,3-diamine



Yield : 89.1%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.85(s, 1H), δ 7.50(m, 2H), δ 3.81(s, 2H), δ 2.63(m, 2H), δ 2.52(m, 6H), δ 1.85(s, 1H), δ 1.69(quin, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 1.00(t, *J*=7.35 Hz, 6H)

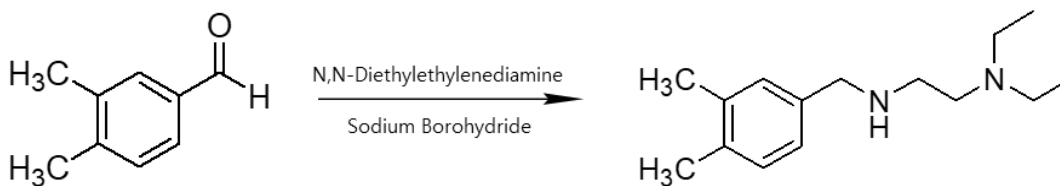
(40) *N*¹-(4-Chloro-3-nitrobenzyl)-*N*³,*N*³-dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 88.6%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.83(s, 1H), δ 7.48(m, 2H), δ 3.80(s, 2H), δ 2.64(t, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 2.33(t, *J*=6.21 Hz, 2H), δ 2.17(s, 6H), δ 1.68(quin, *J*=6.6 Hz, 2H)

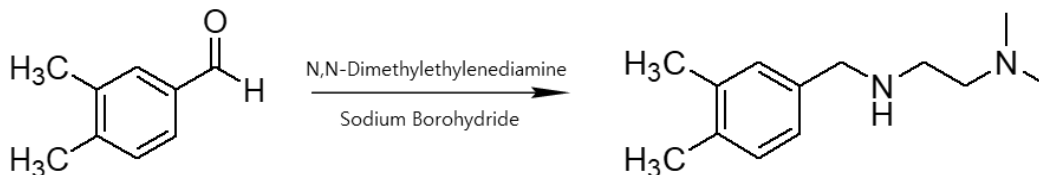
(41) *N*¹-(3,4-Dimethylbenzyl)-*N*²,*N*²-diethylethane-1,2-diamine



Yield : 70.5%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.10(q, *J*=8.07 Hz, 3H), δ 3.74(s, 2H), δ 2.70(t, *J*=5.85 Hz, 2H), δ 2.58(m, 6H), δ 2.25(d, *J*=3.66 Hz, 6H), δ 1.87(s, 1H), δ 1.02 (t, *J*=6.96 Hz, 6H)

(42) *N*¹-(3,4-Dimethylbenzyl)-*N*²,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine

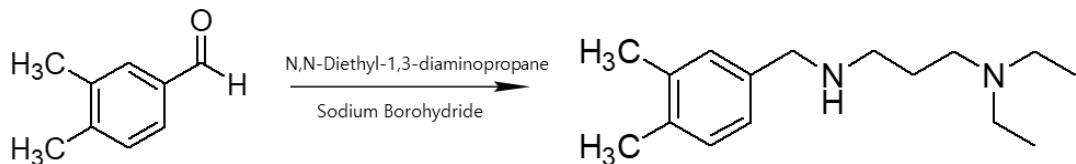


Yield : 78.5%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.10(q, *J*=10.26 Hz, 3H), δ 3.73(s, 2H), δ 2.70(t, *J*=5.85

Hz, 2H), δ 2.44(t, $J=5.85$ Hz, 2H), δ 2.25(d, $J=3.69$ Hz, 6H), δ 2.19(s, 6H)

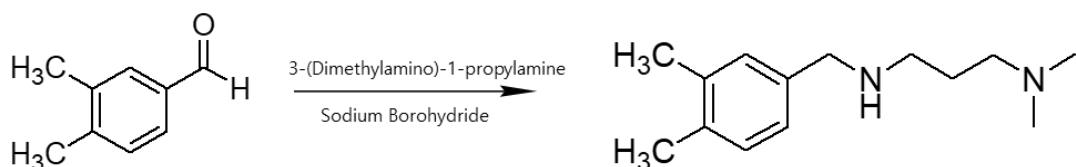
(43) N^1 -(3,4-Dimethylbenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



Yield : 72.1%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.06(q, $J=7.32$ Hz, 3H), δ 3.71(s, 2H), δ 2.67(t, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 2.54(quin, $J=6.96$ Hz, 6H), δ 2.24(sd, $J=3.3$ Hz, 6H), δ 1.71(quin, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.03(t, $J=6.93$ Hz, 6H)

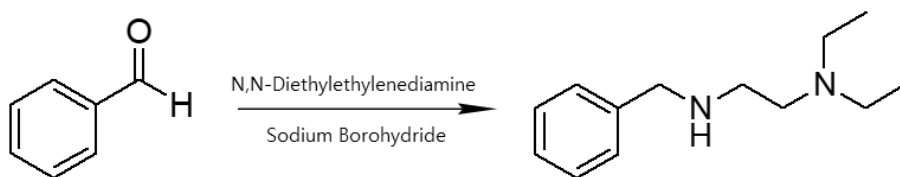
(44) N^1 -(3,4-Dimethylbenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 73.2%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.09(q, $J=7.32$ Hz, 3H), δ 3.71(s, 2H), δ 2.68(t, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 2.33(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.24(sd, $J=3.66$ Hz, 6H), δ 2.21(s, 6H), δ 1.72(q, $J=7.32$ Hz, 2H), δ 1.49(s, 1H)

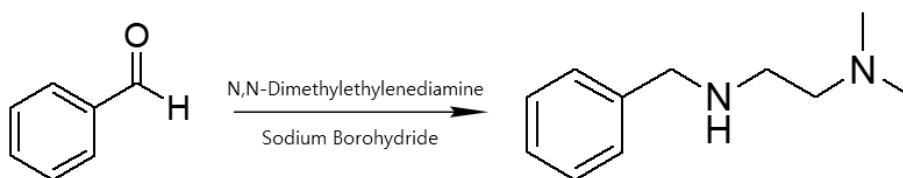
(45) *N*¹-Benzyl-*N*²,*N*²-diethylethane-1,2-diamine



Yield : 87%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.33(sd, *J*=4.02 Hz, 4H), δ 3.80(s, 2H), δ 2.70(t, *J*=5.85 Hz, 2H), δ 2.58(m, 6H), δ 1.76(s, 2H), δ 1.02(t, *J*=6.96 Hz, 6H)

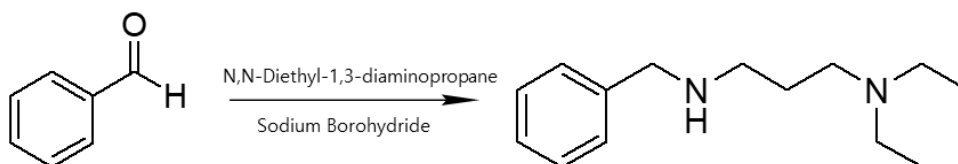
(46) *N*¹-Benzyl-*N*²,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 95%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.33(sd, *J*=4.38 Hz, 4H), δ 3.81(s, 2H), δ 2.71(t, *J*=5.85 Hz, 2H), δ 2.44(t, *J*=6.21 Hz, 2H), δ 2.19(s, 6H), δ 1.70(s, 2H)

(47) *N*¹-Benzyl-*N*³,*N*³-diethylpropane-1,3-diamine

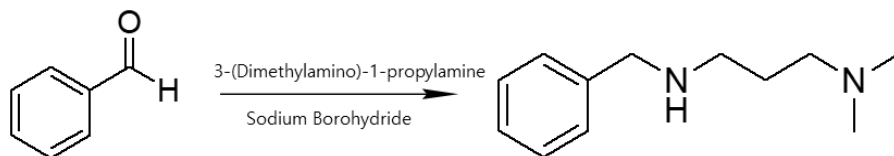


Yield : 95%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.27(sd, *J*=4.38 Hz, 4H), δ 7.22(m, 1H), δ 3.73(s, 2H), δ

2.67(t, $J=8.07$ Hz, 2H), δ 2.49(quin, $J=6.96$ Hz, 6H), δ 1.74(s, 1H), δ 1.67(quin, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 0.99(t, $J=6.96$ Hz, 6H)

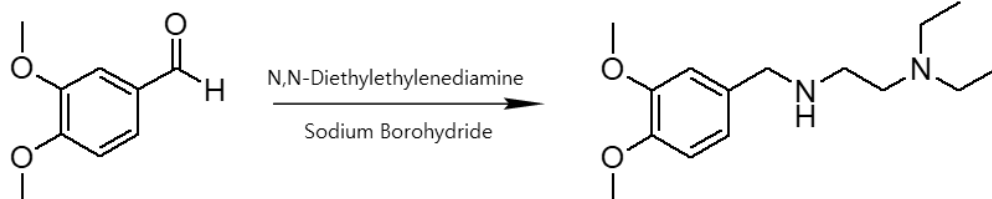
(48) N^1 -Benzyl- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 85.8%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.27(d, $J=4.38$ Hz, 4H), δ 7.21(m, 1H), δ 3.74(s, 2H), δ 2.65(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.29(t, $J=7.32$ Hz, 2H), δ 2.17(s, 6H), δ 1.79(s, 1H), δ 1.68(quin, $J=6.96$ Hz, 2H)

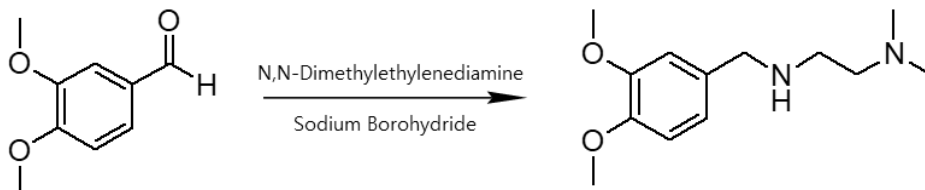
(49) N^1 -(3,4-Dimethoxybenzyl)- N^2, N^2 -diethylethane-1,2-diamine



Yield : 96.4%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.88(m, 1H), δ 6.83(m, 2H), δ 3.92(d, $J=5.49$ Hz, 6H), δ 3.74(s, 2H), δ 2.68(t, $J=6.21$ Hz, 2H), δ 2.58(m, 6H), δ 1.89(s, 1H), δ 1.01(t, $J=6.96$ Hz, 6H)

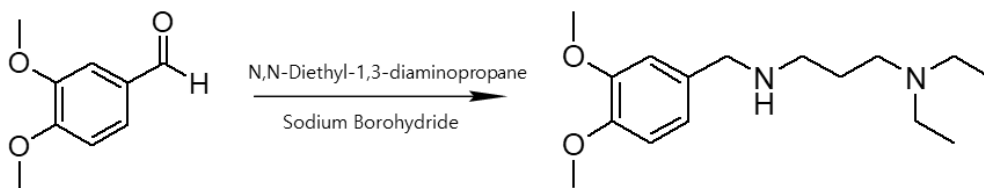
(50) N^1 -(3,4-Dimethoxybenzyl)- N^2,N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 86.3%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.89(m, 1H), δ 6.83(m, 2H), δ 3.92(d, $J=3.3$ Hz, 6H), δ 3.74(s, 2H), δ 2.69(t, $J=5.85$ Hz, 2H), δ 2.43(t, δ 2.69(t, $J=6.21$ Hz, 2H), δ 2.19(s, 6H)

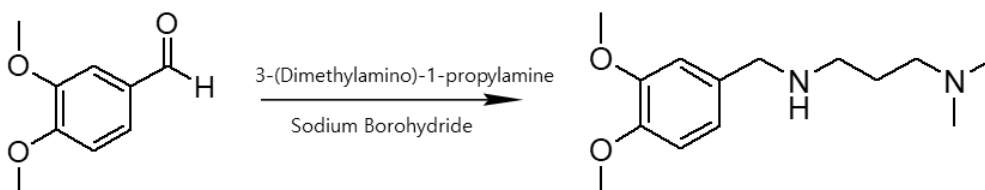
(51) N^1 -(3,4-Dimethoxybenzyl)- N^3,N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



Yield : 81.5%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.84(m, 1H), δ 6.79(m, 2H), δ 3.84(d, $J=6.6$ Hz, 6H), δ 3.68(s, 2H), δ 2.64(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.50(quin, $J=7.32$ Hz, 6H), δ 1.68(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 0.99(t, $J=6.96$ Hz, 6H)

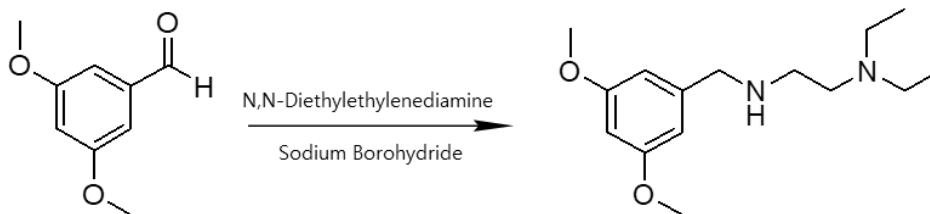
(52) N^1 -(3,4-Dimethoxybenzyl)- N^3,N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 84.0%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.84(m, 1H), δ 6.80(m, 2H), δ 3.86(d, $J=6.96$ Hz, 6H), δ 3.70(s, 2H), δ 2.66(t, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 2.30(t, $J=7.35$ Hz, 2H), δ 2.18(s, 6H), δ 1.70(q, $J=6.96$ Hz, 2H)

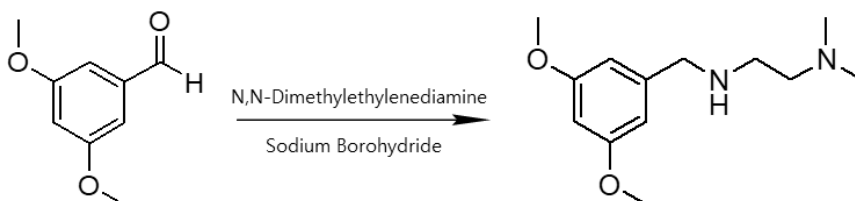
(53) N^1 -(3,5-Dimethoxybenzyl)- N^2,N^2 -diethylethane-1,2-diamine



Yield : 91.2%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.49(sd, $J=2.19$ Hz, 2H), δ 6.35(t, $J=2.19$ Hz, 1H), δ 3.78(s, 6H), δ 3.74(s, 2H), δ 2.66(t, $J=5.88$ Hz, 2H), δ 2.58(m, 6H), δ 1.84(s, 1H), δ 1.02(t, $J=6.96$ Hz, 6H)

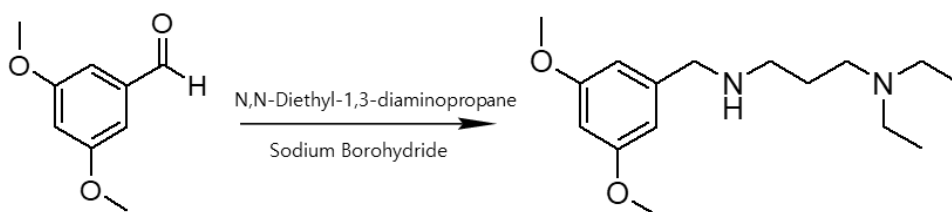
(54) N^1 -(3,5-Dimethoxybenzyl)- N^2,N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



Yield : 88.6%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.49(sd, $J=2.19$ Hz, 2H), δ 6.35(t, $J=2.55$ Hz, 1H), δ 3.78(s, 6H), δ 3.75(s, 2H), δ 2.69(t, $J=6.21$ Hz, 2H), δ 2.43(t, $J=6.21$ Hz, 6H), δ 2.19(s, 6H), δ 1.78(s, 1H)

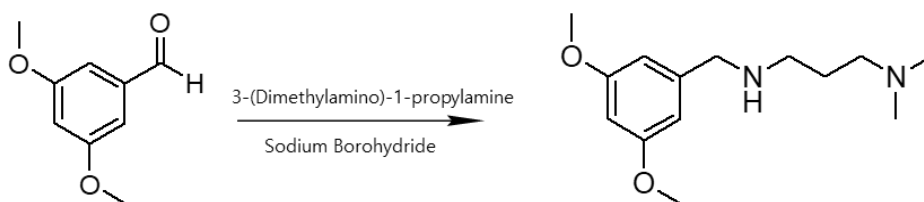
(55) *N*¹-(3,5-Dimethoxybenzyl)-*N*³,*N*³-diethylpropane-1,3-diamine



Yield : 90.2%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.48(sd, *J*=2.55 Hz, 2H), δ 6.35(sd, *J*=2.55 Hz, 1H), δ 3.84(s, 6H), δ 3.72(s, 2H), δ 2.65(t, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 2.51(quin, *J*=7.32 Hz, 6H), δ 1.69(q, *J*=7.32 Hz, 6H), δ 1.00(t, *J*=6.84 Hz, 6H)

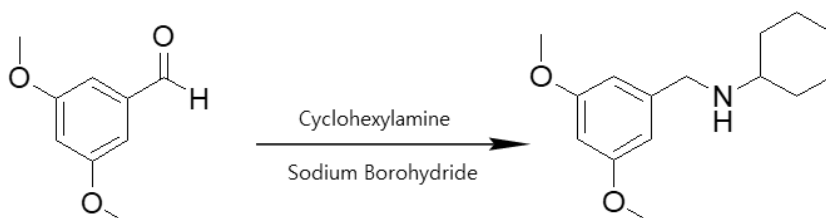
(56) *N*¹-(3,5-Dimethoxybenzyl)-*N*³,*N*³-dimethylpropane-1,3-diamine



Yield : 80.5%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.48(sd, *J*=2.19 Hz, 2H), δ 6.35(m, 1H), δ 3.82(s, 6H), δ 3.73(s, 2H), δ 2.68(t, *J*=6.93 Hz, 2H), δ 2.33(t, *J*=7.32 Hz, 2H), δ 2.21(s, 6H), δ 1.71(s, 1H), δ 1.68(quin, *J*=7.32 Hz, 2H)

(57) Cyclohexyl-(3,5-dimethoxybenzyl)amine



Yield : 68.3%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.48(sd, *J*=2.19 Hz, 2H), δ 6.35(t, *J*=2.19 Hz, 1H), δ

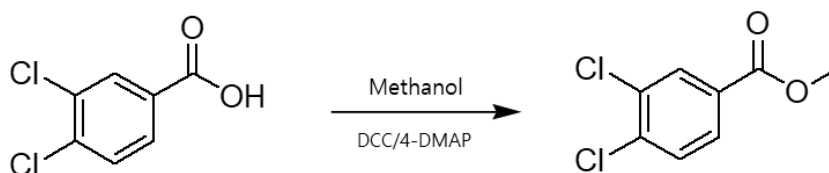
3.78(s, 6H), δ 3.75(s, 2H), δ 2.51(m, 1H), δ 1.92(m, 2H), δ 1.74(m, 2H), δ 1.62(m, 1H),
 δ 1.31(m, 6H)

4.2. 화합물 (58~68)의 합성



Scheme 2. Synthesis of compounds (58~68) ; R = Alkyl or cycloalkyl

(58) Methyl 3,4-dichlorobenzoate

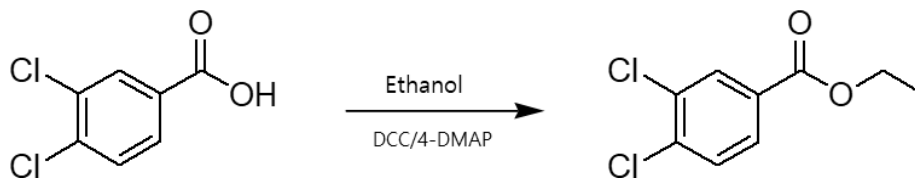


Methylene chloride 50 mL에 3,4-dichlorobenzoic acid 0.5 g (2.617 mmol)를 녹인 다음 methanol 0.317 mL (7.851 mmol)와 4-dimethylaminopyridine 0.256 g (2.096 mmol)을 넣고 10분 동안 교반하였다. 용액을 0 °C로 냉각시킨 뒤 *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide 0.594 g (2.882 mmol)를 넣고 5 분간 반응시킨 다음 상온에서 3 h 동안 교반하였다. TLC로 반응의 진행 정도를 확인한 다음 더 이상 반응의 진행이 되지 않으면 silica gel 로 충전 된 column chromatography를 이용하여 순수한 투명한 액체 methyl 3,4-dichlorobenzoate를 얻었다. 이동상 용매는 hexane : ethyl acetate 4 : 1을 사용하였다.

Yield : 75.4%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.09(s, 1H), δ 7.92(m, 1H), δ 7.82 (m, 1H), δ 3.86(s, 1H)

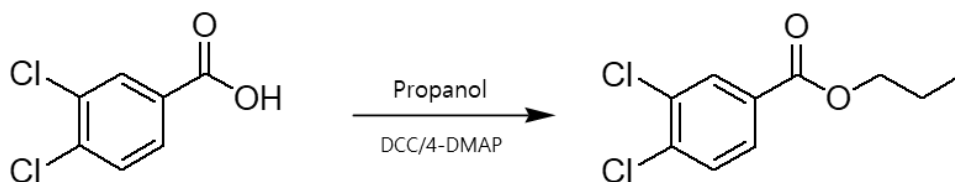
(59) Ethyl 3,4-dichlorobenzoate



Yield : 70.5%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.08(sd, $J=1.47$ Hz, 1H), δ 7.92(dd, $J=1.44$ and 2.19 Hz, 1H), δ 7.82(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 4.36(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.35(t, $J=6.96$ Hz, 3H)

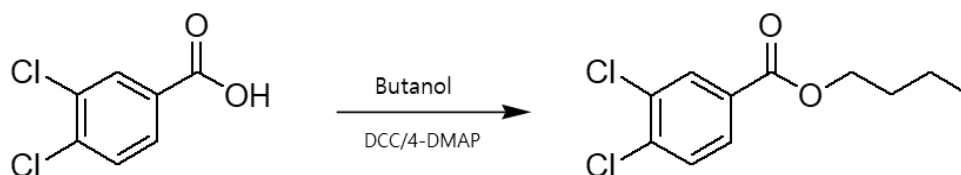
(60) Propyl 3,4-dichlorobenzoate



Yield : 69.4%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.03(s, 1H), δ 7.89(d, $J=8.4$ Hz, 1H), δ 7.78(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 4.25(t, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 1.77(quin, $J=6.93$ Hz, 2H), δ 0.98(t, $J=7.32$ Hz, 3H)

(61) Butyl 3,4-dichlorobenzoate

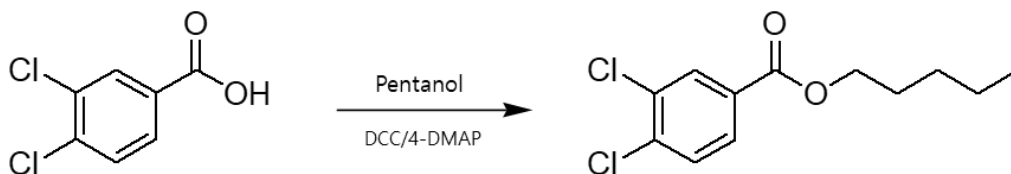


Yield :68.5%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.04(s, 1H), δ 7.89(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 7.80(d, $J=8.43$

Hz, 1H), δ 4.30(t, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 1.73(quin, $J=6.24$ Hz, 2H), δ 1.46(quin, $J=7.32$ Hz, 2H), δ 0.94(t, $J=7.32$ Hz, 3H)

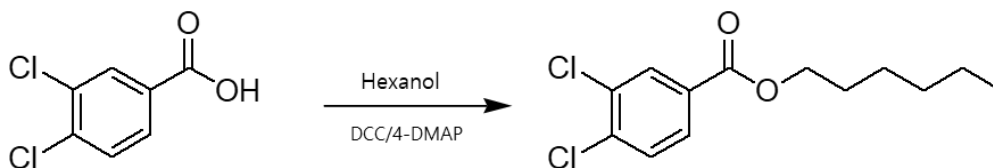
(62) Pentyl 3,4-dichlorobenzoate



Yield : 63.5%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.04(s, 1H), δ 7.89(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 7.80(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 4.30(t, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 1.73(quin, $J=6.24$ Hz, 2H), δ 1.46(quin, $J=7.32$ Hz, 2H), δ 0.94(t, $J=7.32$ Hz, 3H)

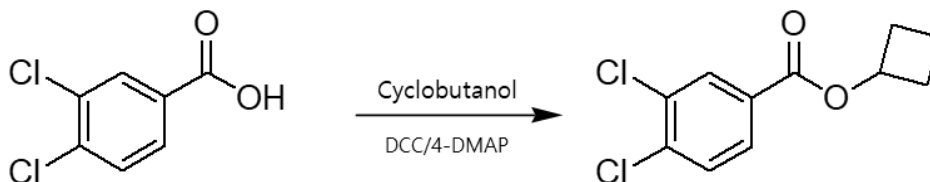
(63) Hexyl 3,4-dichlorobenzoate



Yield : 62.4%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.07(s, 1H), δ 7.92(d, $J=8.4$ Hz, 1H), δ 7.82(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 4.30(t, $J=6.6$ Hz, 2H), δ 1.73(m, 2H), δ 1.35(m, 7H), δ 0.91(t, $J=6.96$ Hz, 3H)

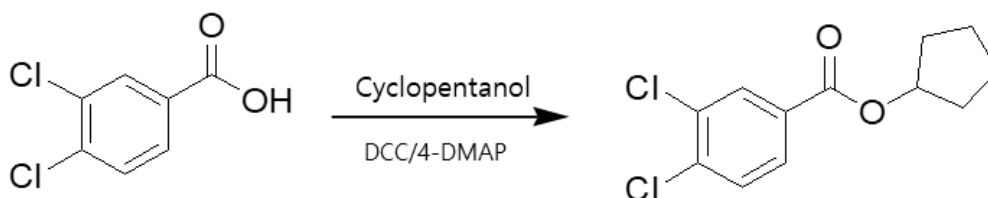
(64) Cyclobutyl 3,4-dichlorobenzoate



Yield : 50.4%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.04(sd, *J*=1.47 Hz, 1H), δ 7.89(d, *J*=6.96 Hz, 1H), δ 7.80(d, *J*=8.4 Hz, 1H), δ 4.28(t, *J*=6.57 Hz, 2H), δ 1.71(q, *J*=6.96 Hz, 2H), δ 1.39(m, 6H), δ 0.88(t, *J*=6.6 Hz, 3H)

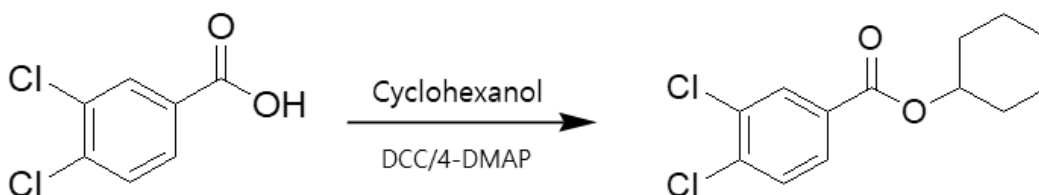
(65) Cyclopentyl 3,4-dichlorobenzoate



Yield : 61.1%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.09(s, 1H), δ 7.92(d, *J*=8.07 Hz, 1H), δ 7.82(d, *J*=8.4 Hz, 1H), δ 5.16(q, *J*=7.68 Hz, 1H), δ 2.38(m, 2H), δ 2.21(m, 2H), δ 1.82(m, 3H)

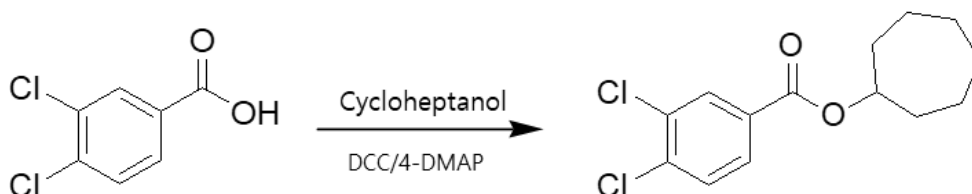
(66) Cyclohexyl 3,4-dichlorobenzoate



Yield : 63.1%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.04(sd, $J=1.11$ Hz, 1H), δ 7.88(m, 1H), δ 7.79(d, $J=8.4$ Hz, 1H), δ 5.32(t, $J=5.49$ Hz, 1H), δ 1.93(m, 2H), δ 1.86(m, 6H)

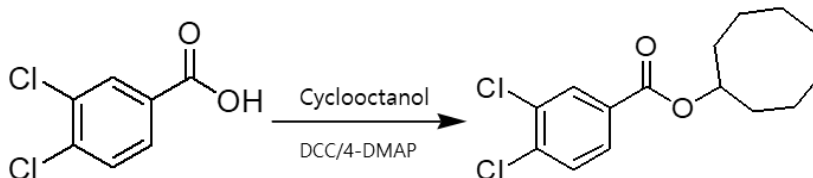
(67) Cycloheptyl 3,4-dichlorobenzoate



Yield : 64.5%

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.06(s, 1H), δ 7.91(d, $J=8.4$ Hz, 1H), δ 7.81(d, $J=8.07$ Hz, 1H), δ 4.94(m, 1H), δ 1.86(s, 2H), δ 1.73(s, 2H), δ 1.56(m, 7H)

(68) Cyclooctyl 3,4-dichlorobenzoate



Yield : 68.1%

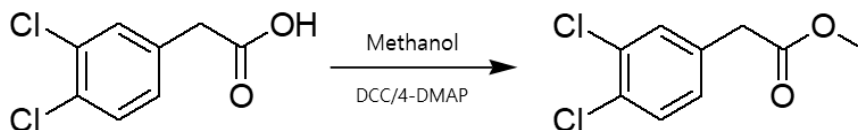
^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.05(sd, $J=1.83$ Hz, 1H), δ 7.90(d, $J=8.07$ Hz, 1H), δ 7.81(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 5.11(m, 1H), δ 1.94(m, 2H), δ 1.91(m, 11H)

4.3. 화합물 (69~79)의 합성



Scheme 3. Synthesis of compounds (69~79) ; R₁ = Alkyl or cycloalkyl

(69) Methyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate

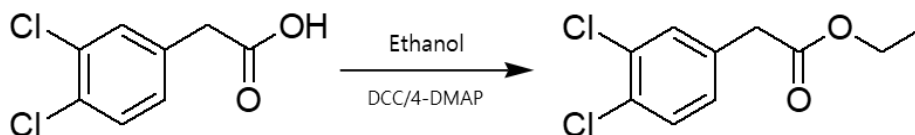


Methylene chloride 50 mL에 3,4-dichlorophenylacetic acid 0.5 g (2.617 mmol)를 녹인 다음 methanol 0.317 mL (7.851 mmol)와 4-dimethylaminopyridine 0.256 g (2.096 mmol)을 넣어 10분 동안 교반하였다. 용액을 0°C로 냉각시킨 뒤 *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide 0.594 g (2.882 mmol)를 넣고 5 분간 반응시킨 다음 상온에서 3 h 동안 교반하였다. TLC를 이용하여 반응의 진행 정도를 확인한 다음 더 이상 반응의 진행이 되지 않으면 silica gel로 충전된 column chromatography를 이용하여 순수한 methyl 2-(3,4-dichlorophenyl)acetate인 투명색의 액체를 얻었다. 이동상 용매는 hexane : ethyl acetate 4 : 1을 사용하였다.

Yield : 62.1%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.60(d, *J*=8.4 Hz, 2H), δ 7.29(d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 3.75(s, 2H), δ 3.62(s, 3H)

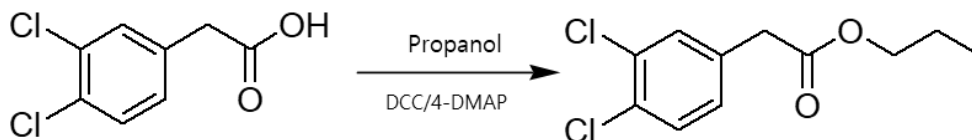
(70) Ethyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



Yield : 63.5%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.58(d, $J=7.32$ Hz, 2H), δ 7.28(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 4.12(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 3.72(s, 2H), δ 1.20(t, $J=7.32$ Hz, 3H)

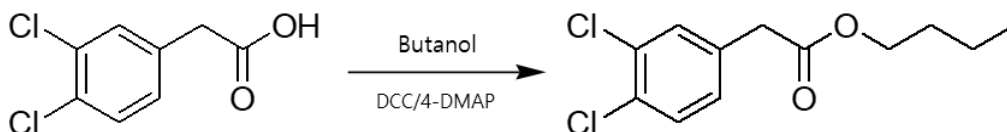
(71) Propyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



Yield : 65.5%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.60(d, $J=8.07$ Hz, 2H), δ 7.29(d, $J=8.04$ Hz, 1H), δ 4.02(t, $J=6.57$ Hz, 2H), δ 3.74(s, 2H), δ 1.61(quin, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 0.88(t, $J=7.32$ Hz, 3H)

(72) Butyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



Yield : 60%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.60(d, $J=8.04$ Hz, 2H), δ 7.29(d, $J=8.43$ Hz, 1H), δ 4.06(t, $J=6.21$ Hz, 2H), δ 3.73(s, 2H), δ 1.59(q, $J=6.96$ Hz, 2H), δ 1.36(quin, $J=7.32$ Hz, 2H), δ 0.89(t, $J=7.32$ Hz, 3H)

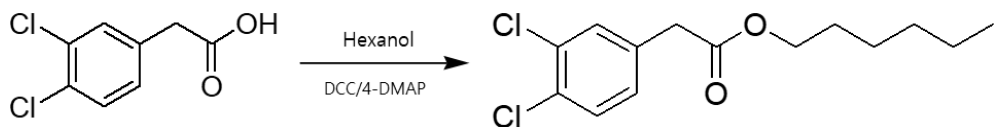
(73) Pentyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



Yield : 63%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.60(d, *J*=8.04 Hz, 2H), δ 7.29(d, *J*=8.4 Hz, 1H), δ 4.05(t, *J*=6.21 Hz, 2H), δ 3.73(s, 2H), δ 1.64(t, *J*=6.6 Hz, 2H), δ 1.24(s, 4H), δ 0.86(t, *J*=6.21 Hz, 3H)

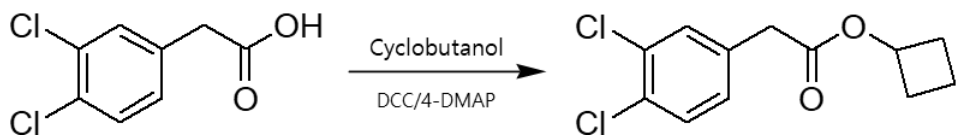
(74) Hexyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



Yield : 68%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.59(d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.29(d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 4.05(t, *J*=6.57 Hz, 2H), δ 3.73(s, 2H), δ 1.59(m, 2H), δ 1.25(m, 6H), δ 0.86(m, 3H)

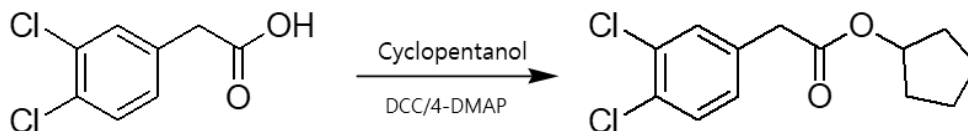
(75) Cyclobutyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



Yield : 87%

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.59(d, *J*=8.43 Hz, 2H), δ 7.28(d, *J*=8.43 Hz, 1H), δ 4.93(quin, *J*=7.68 Hz, 1H), δ 3.71(s, 2H), δ 2.30(m, 2H), δ 2.06(m, 2H), δ 1.82(m, 3H)

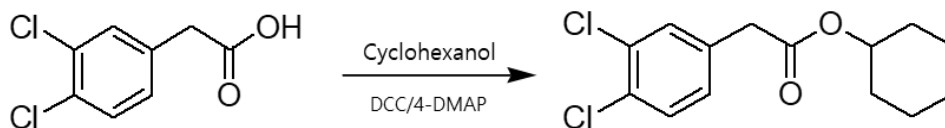
(76) Cyclopentyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



Yield : 45%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.58(d, $J=8.79$ Hz, 2H), δ 7.27(d, $J=8.04$ Hz, 1H), δ 5.09 (t, $J=5.85$ Hz, 1H), δ 3.68(s, 2H), δ 1.81(m, 2H), δ 1.61(m, 6H)

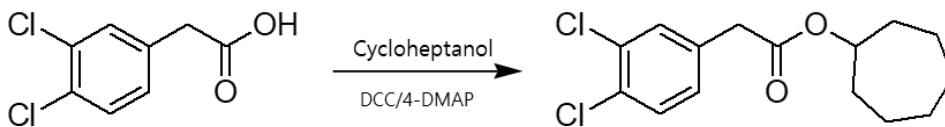
(77) Cyclohexyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



Yield : 62.1%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.60(d, $J=8.4$ Hz, 2H), δ 7.29(d, $J=8.07$ Hz, 1H), δ 4.70 (m, 1H), δ 3.71(s, 2H), δ 1.77(m, 2H), δ 1.63(m, 2H), δ 1.47(m, 6H)

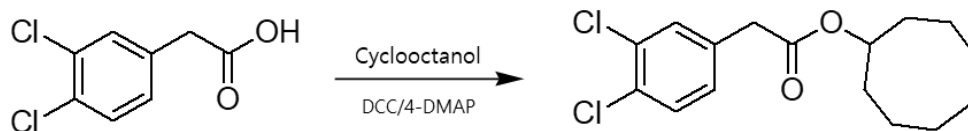
(78) Cycloheptyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



Yield : 70.5%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.59(d, $J=8.43$ Hz, 2H), δ 7.28(d, $J=8.04$ Hz, 1H), δ 4.87 (m, 1H), δ 3.69(s, 2H), δ 1.85(m, 2H), δ 1.65(m, 10H)

(79) Cyclooctyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



Yield : 63.5%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.58(d, $J=8.07$ Hz, 2H), δ 7.28(d, $J=8.07$ Hz, 1H), δ 4.87 (m, 1H), δ 3.68(s, 2H), δ 1.77(m, 14H)

Ⅲ. 결과 및 고찰

5. 유해조류에 대한 활성 및 독성평가

5.1. 유해조류의 활성 평가

Benzylamine과 3,4-dichlorobenzoyl 기본골격에 다양한 치환기를 도입한 후, 각각의 유도체에 대한 SAR (Structure Activity Relationship) 분석을 진행하였다. 3,4-Dichlorobenzoyl의 경우 기본 골격구조를 고정시키고 치환기의 사슬 개수와 고리 개수를 늘려가며 *Microcystis sp.*에 대한 활성평가를 진행하였지만, 모든 화합물에서 LC₅₀ 값이 5 μM 이상으로 낮은 살조능을 보였다.

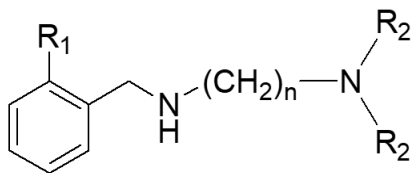
치환된 benzyl기에 *N',N'*-diethylethylenediamine, *N',N'*-dimethylethylenediamine, *N',N'*-diethyl-1,3-diaminopropane, 3-(dimethylamino)-1-propylamine을 도입한 화합물에 대한 살조능 평가를 통해 SAR 분석을 진행하였다.

*Microcystis sp.*에 대한 살조능 평가를 통해 살조능이 우수한 화합물을 lead compound로 선정하여 유해조류인 *Microcystis aeruginosa*와 무해조류로 구분되는 *Selena strum*을 대상으로 살조평가를 진행하였고, 추가로 유해적조인 *H. circularisquama*, *C. marina*, *H. akashiwo*에 대한 활성평가를 진행하였다.

유해조류의 활성결과 값은 녹조의 경우 120 h, 적조의 경우 24 h 후 개체수를 측정하여 반수치사농도(LC₅₀)를 도출해 냈다.

물벼룩과 Zebrafish를 이용한 독성평가를 진행하였으며, 이를 통한 결과 값으로 물벼룩 EC₅₀ (48 h)값과 Zebrafish LC₅₀ (96 h)을 도출하였다.

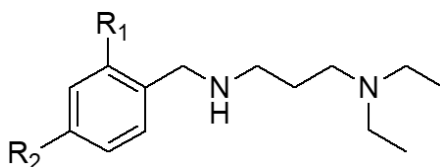
Table 10. Algicidal activity of compound 1~8 against harmful *Cyanobacteria*



LC ₅₀ (120 h) (μM)				
Compound NO.	n	R ₁	R ₂	<i>Microcystis sp.</i>
1	2	Cl	CH ₂ CH ₃	5<
2	2	Cl	CH ₃	5<
3	3	Cl	CH ₂ CH ₃	2.36
4	3	Cl	CH ₃	5<
5	2	OMe	CH ₂ CH ₃	5<
6	2	OMe	CH ₃	4.40
7	3	OMe	CH ₂ CH ₃	2.97
8	3	OMe	CH ₃	2.68

위 표에서는 R₁ 탄소 자리에 Cl 또는 OCH₃로 치환하고 R₂ 탄소자리에 methyl 또는 ethyl기를 도입한 다음 아민 사슬 개수(n)에 따른 활성평가를 진행하였다. R₁ 탄소 자리에 Cl을 도입할 경우 R₂에 ethyl기가 결합된 화합물 3이 가장 높은 활성을 나타냈으나, R₁ 탄소 자리에 OCH₃를 도입했을 경우 R₂에 methyl기가 결합된 화합물 8이 가장 높은 활성을 보였다.

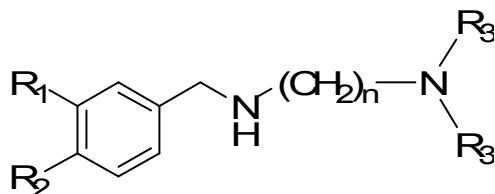
Table 11. Algicidal activity of compound 9~13 against harmful *Cyanobacteria*



LC ₅₀ (120 h) (μM)			
Compound NO.	R ₁	R ₂	<i>Microcystis sp.</i>
9	NO ₂	H	5<
10	Br	H	2.88
11	F	H	5<
12	OH	H	5<
13	H	NO ₂	2.96

Table 10의 결과를 바탕으로 R₁ 탄소자리의 치환기 변화에 따른 활성을 비교하는 실험을 진행하였다. R₁ 탄소자리에 NO₂, Br, F, OH로 치환하여 활성을 비교하였을 때 R₁ 탄소자리에 Cl로 치환 하였을 때가 가장 활성이 좋았고 NO₂, F 또는 OH로 치환할 경우 거의 활성을 보이지 않았다.

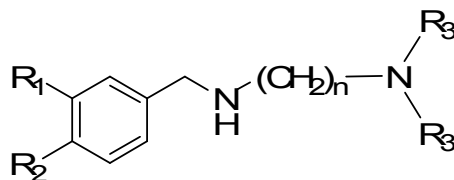
Table 12. Algicidal activity of compound **14~21** against harmful *Cyanobacteria*



LC ₅₀ (120 h) (μM)					
Compound NO.	R ₁	R ₂	R ₃	n	<i>Microcystis sp.</i>
14	Cl	H	CH ₂ CH ₃	2	4.87
15	Cl	H	CH ₃	2	5<
16	Cl	H	CH ₂ CH ₃	3	0.83
17	Cl	H	CH ₃	3	0.84
18	H	Cl	CH ₂ CH ₃	2	4.35
19	H	Cl	CH ₃	2	5<
20	H	Cl	CH ₂ CH ₃	3	0.53
21	H	Cl	CH ₃	3	0.91

Table 10. 11. 의 경향성을 살펴보았을 때 화합물 **3**에서 *Microcystis sp.*에 대한 활성이 가장 높게 나왔다. 위치에 따른 Cl의 경향성 분석결과 R₁과 R₂ 탄소에 Cl로 치환된 benzyl 그룹에 *N,N'*-diethyl-1,3-diaminopropane이 연결된 화합물 **16**과 **20**이 가장 높은 활성을 보였다.

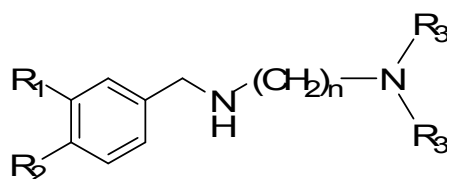
Table 13. Algicidal activity of compound **22~30** against harmful *Cyanobacteria*



LC ₅₀ (120 h) (μM)					
Compound NO.	R ₁	R ₂	R ₃	n	<i>Microcystis sp.</i>
22	Cl	CH ₃	CH ₂ CH ₃	2	5<
23	Cl	CH ₃	CH ₃	2	5<
24	Cl	CH ₃	CH ₂ CH ₃	3	0.49
25	Cl	CH ₃	CH ₃	3	0.68
27	Cl	OMe	CH ₂ CH ₃	2	5<
28	Cl	OMe	CH ₃	2	5<
29	Cl	OMe	CH ₂ CH ₃	3	0.6
30	Cl	OMe	CH ₃	3	0.88

R₁ 탄소 자리를 Cl로 고정시키고 R₂ 탄소에 CH₃와 OCH₃로 치환하여 활성을 비교하였다. 또한 Cl, OMe 또는 CH₃로 치환된 benzyl 그룹에 chain 길이(n)가 2인 alkyl diaminoethane과 chain 길이(n)가 3인 alkyl diaminopropane을 도입하였을 경우 chain 길이(n)가 3인 *N,N'*-dialkyl-1,3-diaminopropane 결합체가 높은 활성을 보였다.

Table 14. Algicidal activity of compound **32~40** against harmful *Cyanobacteria*

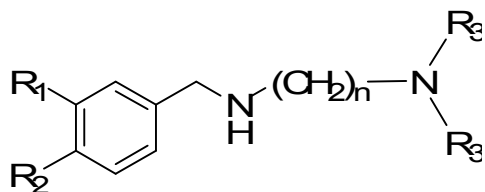


LC ₅₀ (120 h) (μM)					
Compound NO.	R ₁	R ₂	R ₃	n	<i>Microcystis sp.</i>
32	Cl	F	CH ₂ CH ₃	2	1.83
33	Cl	F	CH ₃	2	5<
34	Cl	F	CH ₂ CH ₃	3	0.42
35	Cl	F	CH ₃	3	0.63
37	NO ₂	Cl	CH ₂ CH ₃	2	5<
38	NO ₂	Cl	CH ₃	2	5<
39	NO ₂	Cl	CH ₂ CH ₃	3	2.08
40	NO ₂	Cl	CH ₃	3	1.76

Benzene ring에 Cl, F, NO₂를 도입하여 각각 구조에 따른 활성을 평가 하였다. 그 결과 R₁, R₂에 각각 Cl과 F를 도입한 benzyl 그룹에 N',N'-diethyl-1,3-diaminopropane을 결합시킨 화합물 **34**가 LC₅₀ 0.42 μM로 가장 높은 활성을 나타내었다.

R₁, R₂에 Cl과 F로 치환될 경우 R₃ 치환기는 methyl 보다 ethyl 치환기가 보다 높은 활성을 보였으나 R₁, R₂에 NO₂와 Cl로 각각 도입되었을 경우에는 반대로 methyl 치환기가 보다 높은 활성을 보였다.

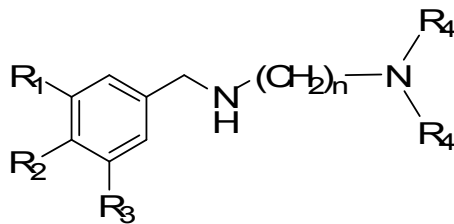
Table 15. Algicidal activity of compound 41~48 against harmful *Cyanobacteria*



LC ₅₀ (120 h) (μM)					
Compound NO.	R ₁	R ₂	R ₃	n	<i>Microcystis sp.</i>
41	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₃	2	0.54
42	CH ₃	CH ₃	CH ₃	2	1.67
43	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₃	3	3.46
44	CH ₃	CH ₃	CH ₃	3	0.73
45	H	H	CH ₂ CH ₃	2	5<
46	H	H	CH ₃	2	5<
47	H	H	CH ₂ CH ₃	3	1.34
48	H	H	CH ₃	3	1.95

위 표에서는 R₁ 자리와 R₂ 자리에 각각 CH₃와 H로 치환시켜 amine기에 따른 활성비교를 실시하였다. CH₃로 치환된 화합물에서는 *N',N'*-diethylethylenediamine으로 치환된 화합물이 LC₅₀ 0.54 μM로 가장 높은 활성을 나타내었고, H로 치환된 화합물에서는 *N',N'*-diethyl-1,3-diaminopropane으로 치환된 화합물이 LC₅₀ 1.34 μM로 가장 높은 활성을 보였다.

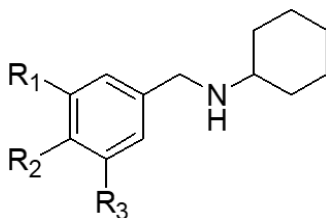
Table 16. Algicidal activity of compound 49~56 against harmful *Cyanobacteria*



Compound NO.	LC ₅₀ (120 h) (μM)					
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	n	<i>Microcystis sp.</i>
49	OMe	OMe	H	CH ₂ CH ₃	2	5<
50	OMe	OMe	H	CH ₃	2	5<
51	OMe	OMe	H	CH ₂ CH ₃	3	3.2
52	OMe	OMe	H	CH ₃	3	4.05
53	OMe	H	OMe	CH ₂ CH ₃	2	5<
54	OMe	H	OMe	CH ₃	2	5<
55	OMe	H	OMe	CH ₂ CH ₃	3	0.85
56	OMe	H	OMe	CH ₃	3	0.87

위 표에서는 R₁, R₂, R₃ 탄소자리에 치환기를 OCH₃로 치환시켜 활성비교를 실시하였다. R₁, R₂자리에 OCH₃로 치환 시켰을 때와 R₁, R₃자리에 OCH₃로 치환 시켰을 때 *N,N'*-diethyl-1,3-diaminopropane을 붙인 화합물에서 가장 높은 활성을 보였다.

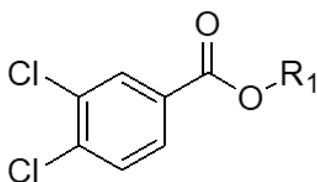
Table 17. Algicidal activity of compound **26**, **31**, **36**, **57** against harmful *Cyanobacteria*



LC ₅₀ (120 h) (μM)				
Compound NO.	R ₁	R ₂	R ₃	<i>Microcystis sp.</i>
26	Cl	CH ₃	H	0.86
31	Cl	OMe	H	2.61
36	Cl	F	H	4.23
57	OMe	H	OMe	4.31

Cl, F, OMe 또는 CH₃로 치환된 benzyl 그룹에 cyclohexylamine을 도입하여 *Microcystis sp.*에 대한 살조능을 비교 분석한 결과 **R₁**과 **R₂**에 각각 Cl과 CH₃ 치환기를 도입한 화합물 **26**이 가장 높은 활성을 보였다.

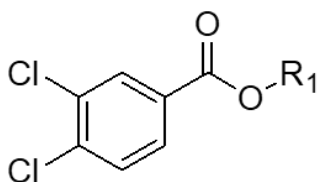
Table 18. Algicidal activity of compound **58~63** against harmful *Cyanobacteria*

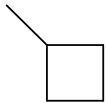
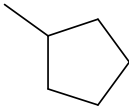
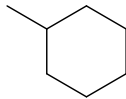
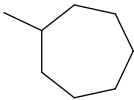
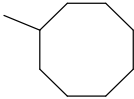


LC ₅₀ (120 h) (μM)		
Compound NO.	R ₁	<i>Microcystis sp.</i>
58	CH ₃	5<
59	CH ₂ CH ₃	5<
60	CH ₂ CH ₂ CH ₃	5<
61	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	5<
62	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	5<
63	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	5<

3,4-Dichlorobenzoyl에 사슬형 알킬기 사슬 1~6개로 치환하여 *Microcystis sp.*에 대한 살조 능력을 평가하였다. 모든 유도체에 대한 살조 능력은 5 μM 이상으로 나타나 살조 능력이 없다는 것을 알 수 있다.

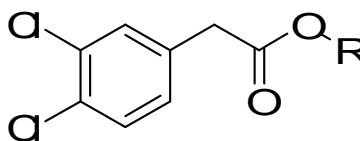
Table 19. Algicidal activity of compound **64~68** against harmful *Cyanobacteria*



LC ₅₀ (120 h) (μM)		
Compound NO.	R ₁	<i>Microcystis sp.</i>
64		5<
65		5<
66		5<
67		5<
68		5<

3,4-Dichlorobenzoyl 그룹에 고리형 알킬기로 치환하여 *Microcystis sp.*에 대한 살조 평가를 진행하였다. 고리 개수에 따른 살조 능력은 5 μM 이상으로 나타나 살조 능력이 없다는 것을 알 수 있다.

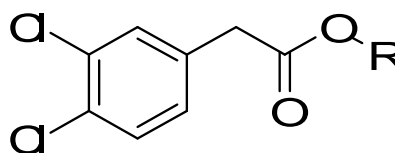
Table 20. Algicidal activity of compound 70~74 against harmful *Cyanobacteria*

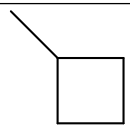
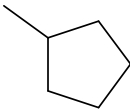
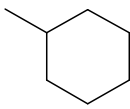
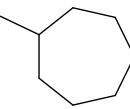
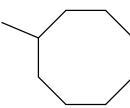


LC ₅₀ (120 h) (μM)		
Compound NO.	R	<i>Microcystis</i> sp.
69	CH ₃	5<
70	CH ₂ CH ₃	5<
71	CH ₂ CH ₂ CH ₃	5<
72	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	5<
73	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	5<
74	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	5<

사슬 길이에 따른 3,4-dichlorophenyl acetate의 활성 측정된 결과 사슬 길이에 따른 살조 능력은 LC₅₀ 값이 5 μM 이상으로 살조 능력이 없다는 것을 알 수 있었다.

Table 21. Algicidal activity of compound 75~79 against harmful *Cyanobacteria*



LC ₅₀ (120 h) (μM)		
Compound NO.	R	<i>Microcystis sp.</i>
75		5<
76		5<
77		5<
78		5<
79		5<

고리 크기에 따른 3,4-dichlorophenyl acetate의 활성을 측정한 결과 고리 크기에 따른 살조능은 LC₅₀ 값이 5 μM 이상으로 나타나 살조 능력이 없다는 것을 알 수 있었다.

5.2. 유해조류에 대한 살조 평가 결과

후보물질의 선정은 유해조류로 구분되는 *Cyanobacteria*의 종류인 *Microcystis sp.*에 살조 평가를 통해 도출된 LC₅₀ 값을 이용하였다. 낮은 농도에서 살조 능력이 효과적인 물질을 lead compound로 선정하였다.

*Cyanobacteria*종인 *Microcystis aeruginosa*와 무해조류로 구분되는 *Selena strum*을 이용해 살조 평가를 진행하였고, 같은 방법으로 LC₅₀을 도출해 냈다.

적조(red tide)에서 대표적인 유해조류로 분류되는 *Heterocapsa circularisquama*, *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*를 이용해 위와 같은 방법으로 살조 평가를 진행하였다. 적조에서는 대체로 높은 LC₅₀값을 보였으며, 이 중에서도 화합물 34가 가장 우수한 살조능을 보였다.

Compounds	LC ₅₀ (120 h) (μM)		
	<i>Microcystis sp.</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Selena Strum</i>
20	0.53	0.82	3.87
24	0.49	0.8	3.79
29	0.6	1.01	3.76
30	0.88	1.8	4.01
34	0.42	0.62	3.88
35	0.63	1.02	3.9
41	0.54	0.92	4.16
44	0.73	1.5	4.32

Table 22. Algicidal activity of lead compounds against *Microcystis sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Selena strum*

Compounds	LC ₅₀ (24 h) (μM)		
	<i>Heterocapsa circularisquama</i>	<i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>Chattonella marina</i>
20	2.87	5<	4.3
24	1.26	2.51	1.49
29	1.81	5<	3.68
30	2.3	5<	4.1
34	1.43	5<	2.25
35	2.21	5<	3.06
41	2.46	5<	3.31
44	2.81	5<	3.5

Table 23. Algicidal activity of lead compounds against *Hererocapsa Circularisquama*, *Heterosigma akashiwo* and *Chattonella marina*

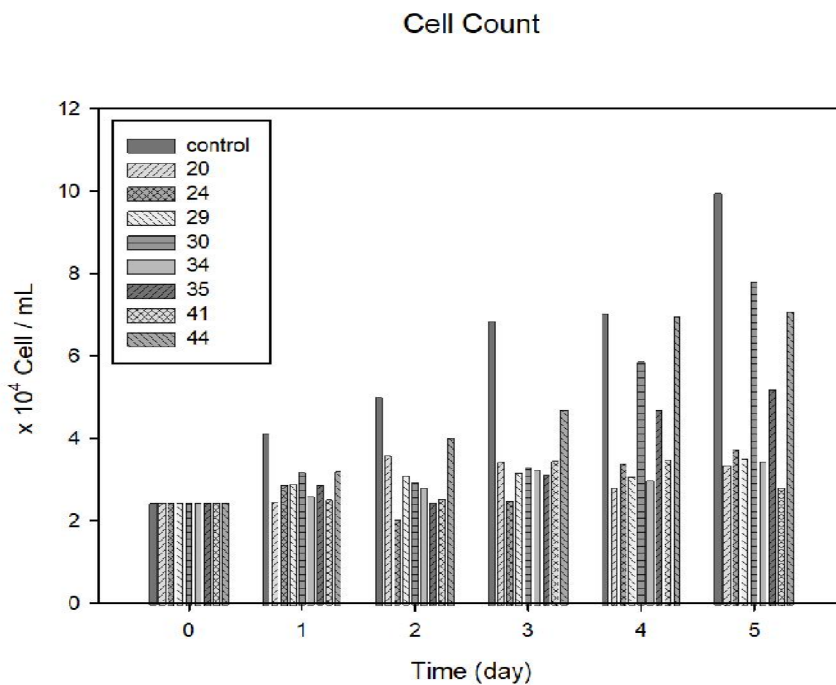


Figure 2. Changes of cell number after treatment of compounds against *Microcystis sp.*

5.3. Chlorophyll 비교실험

모든 조류는 Chlorophyll을 가지고 있어 이를 이용해 광합성을 한다. 수질오염의 가장 심각한 문제인 Microcystin을 생성하는 *Microcystis sp.* 와 *Microcystis aeruginosa*를 통해 살조 능력을 평가했으며, 이를 토대로 수체에 존재하는 Chlorophyll 양을 측정하는 실험을 진행하였다. 화합물 20, 24, 29, 30, 34, 35, 41, 44를 0.5 μM 농도로 처리하여 120 h 동안 수체의 Chlorophyll 함유량 변화를 관찰하였다. 화합물 30, 35, 44를 제외한 모든 화합물에서 Chlorophyll 양이 눈에 띄게 줄어든 것을 확인 할 수 있었다.

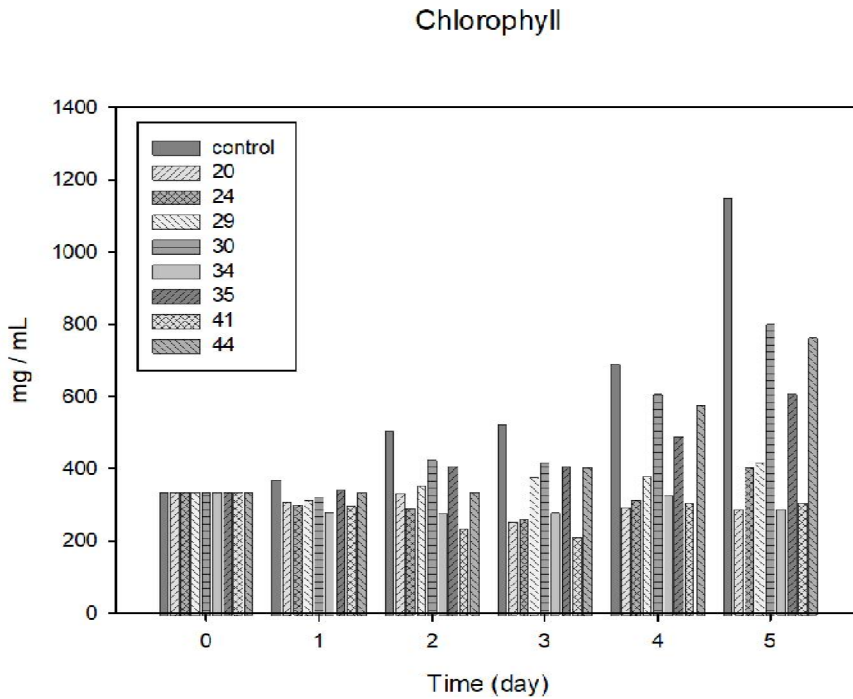


Figure 3. Changes of chlorophyll after treatment of compounds against *Microcystis sp.*

5.4. 물벼룩 급성독성 시험 결과

후보물질로 선정된 각 화합물에 대한 물벼룩 급성독성시험을 진행 하였다. OECD기준 48 h를 기준으로 영향을 받은 물벼룩에 대해 EC₅₀ 값을 구하였다. 각 화합물에 대한 물벼룩 독성은 각 화합물 마다 다르고 이에 대한 농도별 변화를 그래프로 도식화하였다.

Compound	EC ₅₀ (μM)
20	24.58
24	21.18
29	33.74
30	25.01
34	18.32
35	17.11
41	31.69
44	17.48

Table 24. Acute toxicity test of lead compounds to *Daphnia magna*

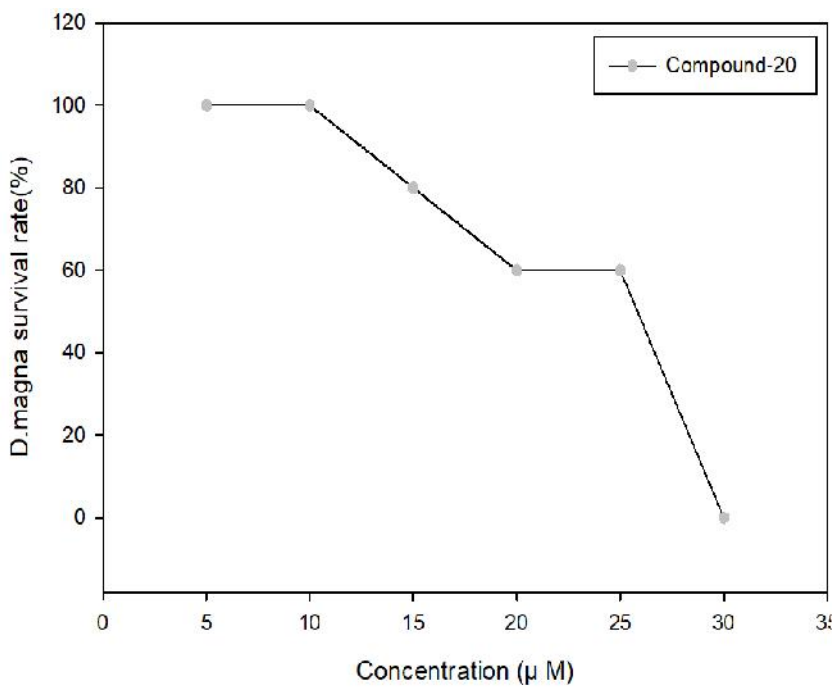


Figure 4. Acute toxicity test of compound **20** to *Daphnia magna*

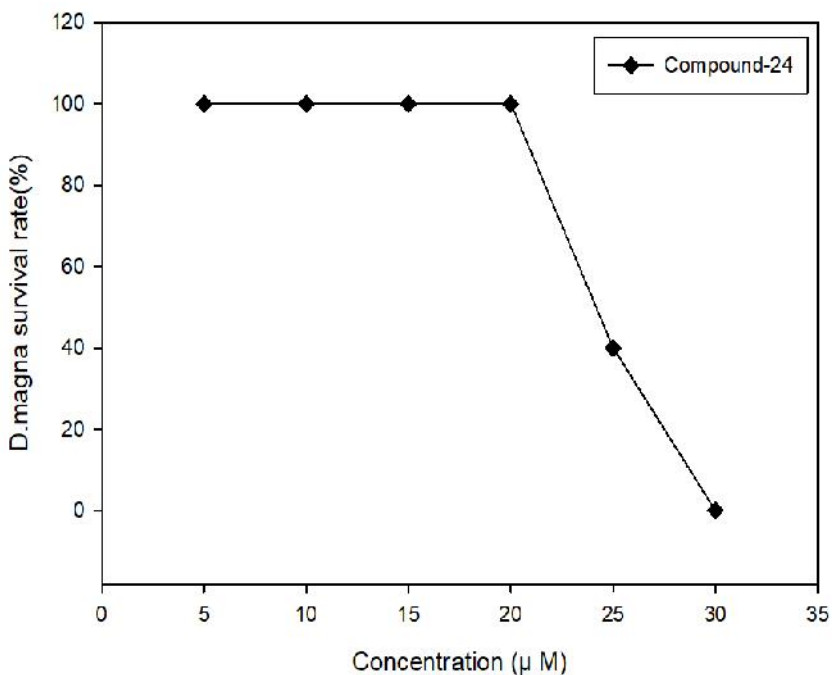


Figure 5. Acute toxicity test of compound **24** to *Daphnia magna*

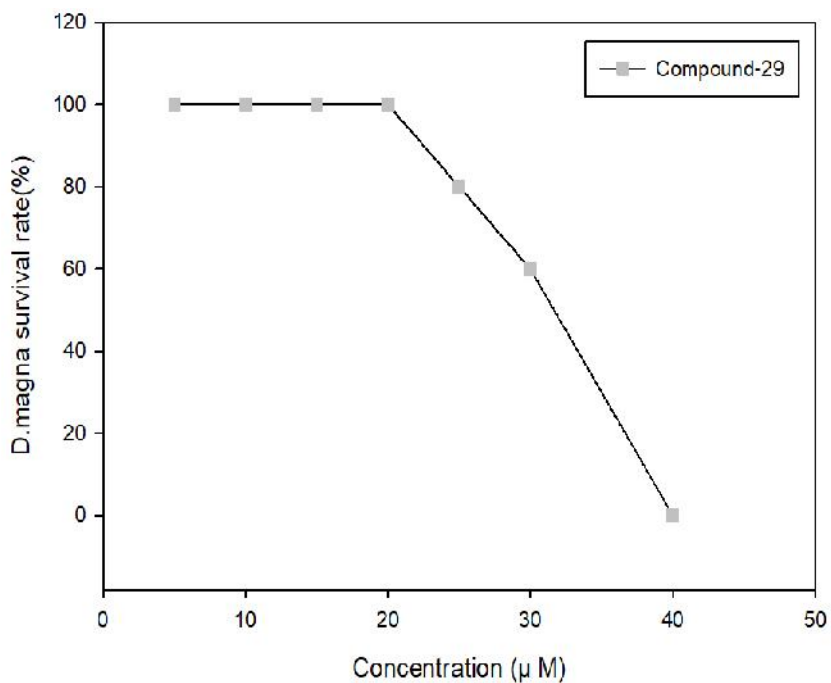


Figure 6. Acute toxicity test of compound **29** to *Daphnia magna*

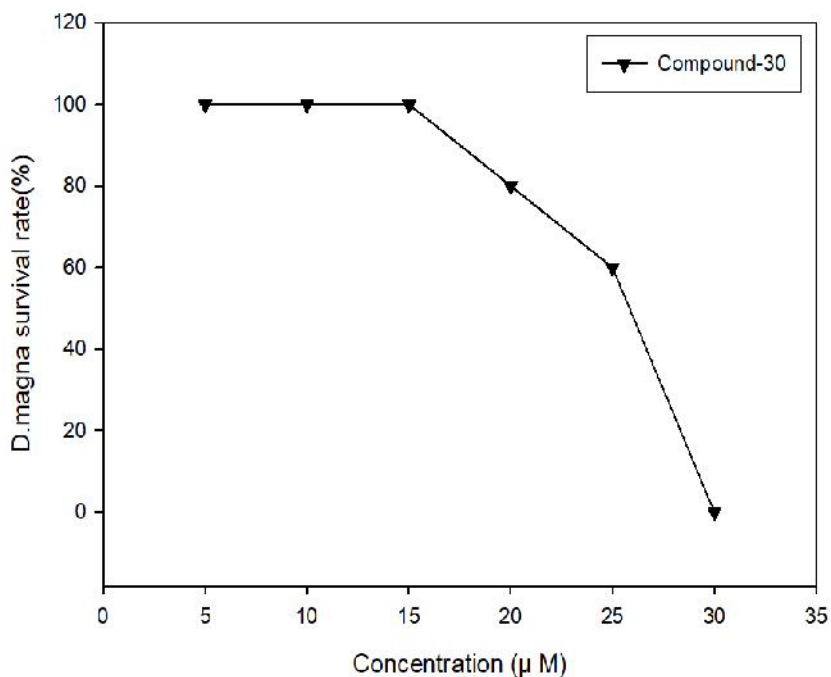


Figure 7. Acute toxicity test of compound **30** to *Daphnia magna*

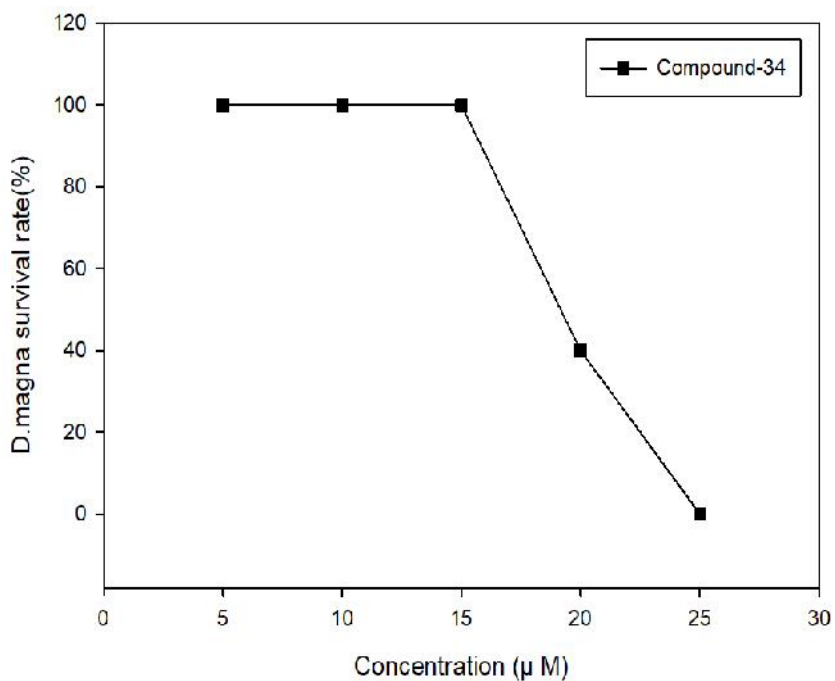


Figure 8. Acute toxicity test of compound **34** to *Daphnia magna*

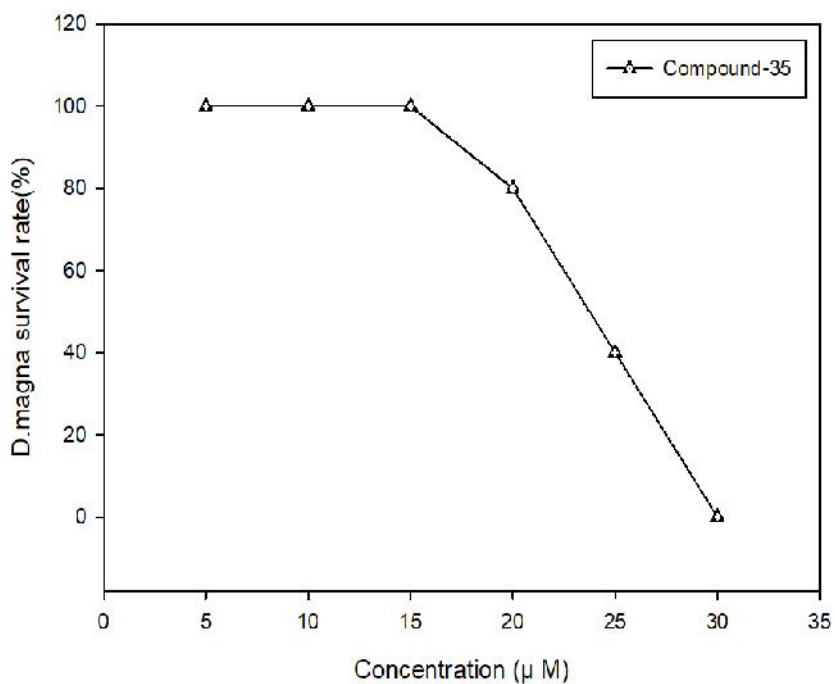


Figure 9. Acute toxicity test of compound **35** to *Daphnia magna*

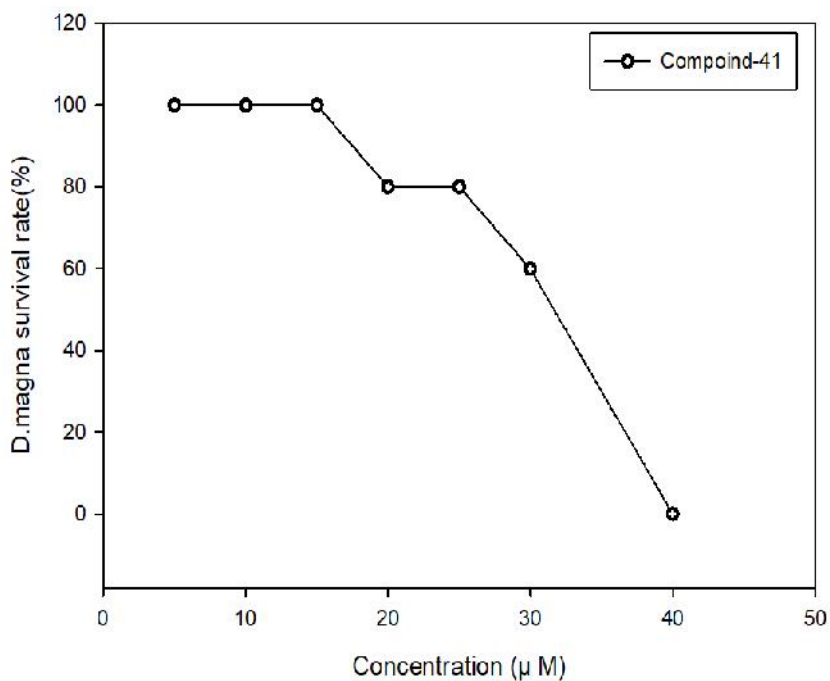


Figure 10. Acute toxicity test of compound 41 to *Daphnia magna*

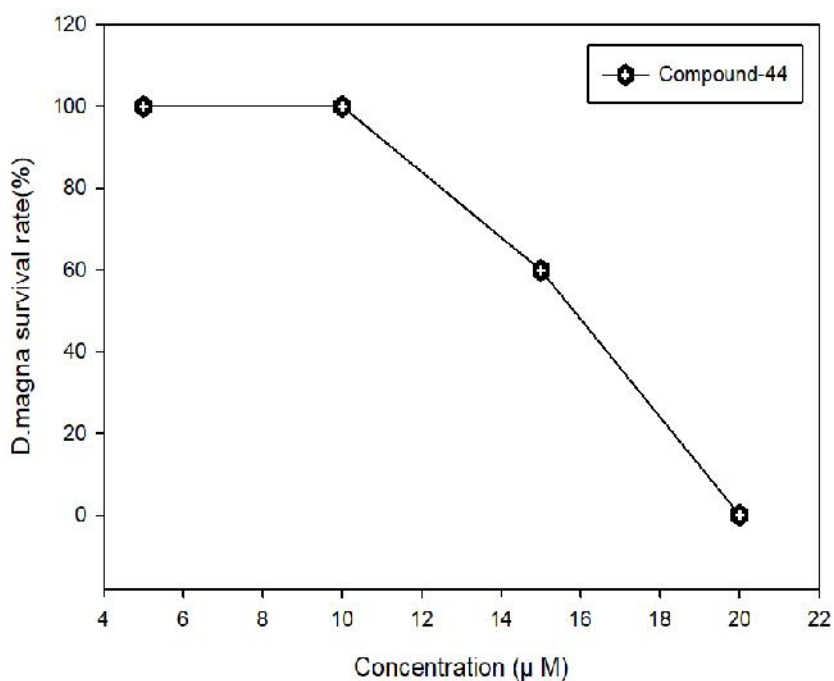


Figure 11. Acute toxicity test of compound 44 to *Daphnia magna*

5.5. S.E.M 세포 관찰

대표적으로 *Cyanobacteria*에서 유해조류로 구분되는 *Microcystis aeruginosa*에 가장 좋은 살조 능력을 보인 화합물 **34**를 처리하기 전과 후에 S.E.M을 통해 세포 표면을 관찰하였다. 약물 처리 전의 경우 동그란 구 형태를 띠었고 약물 처리 24 h 후에 세포를 감싸고 있던 막이 벗겨지는 모습을 관찰 하였다. 120 h 지난 후엔 세포가 형태를 알 수 없을 정도로 일그러진 모양을 관찰 할 수 있었다.

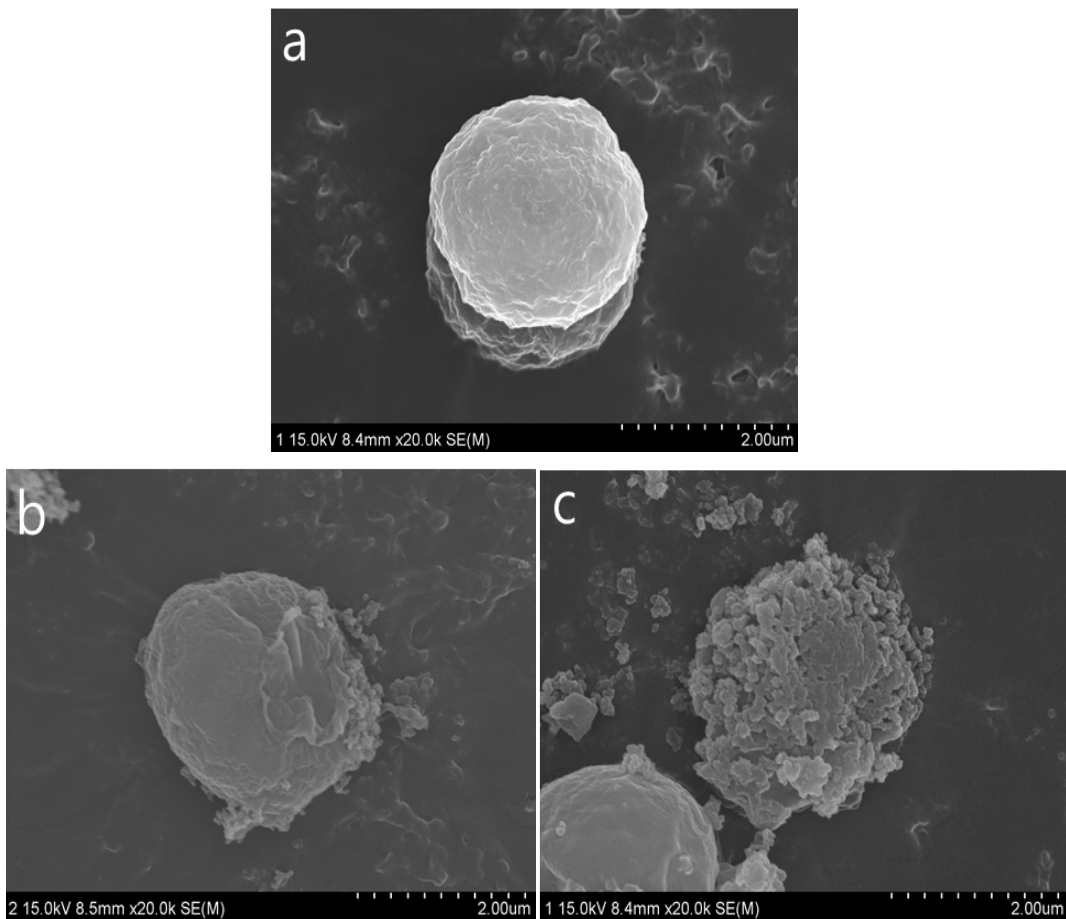


Figure 12. S.E.M image of *Microcystis sp.* after treatment of compound **34** at 0.5 μ M

*Microcystis sp.*의 전체 모습을 관찰한 결과 대조군은 구의 모습과 세포막의 형태가 선명히 잘 이루고 있는 것을 확인 할 수 있는 반면, 화합물 **34**를 처리하고 120 h후 모습은 세포 전체가 대조군 대비 세포의 형태가 일그러지고 세포의 막이 파괴됨을 확인할 수 있었다.

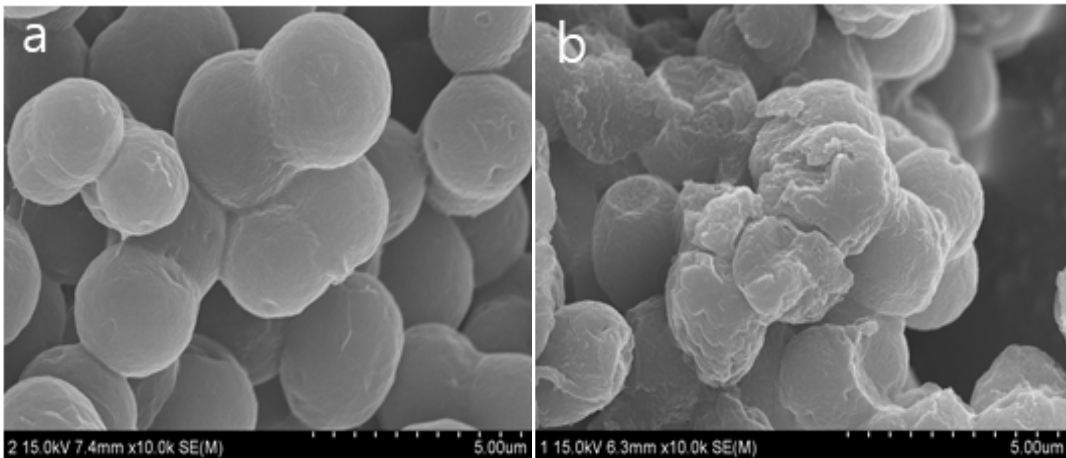


Figure 13. Overall S.E.M image of *Microcystis sp.* after treatment of compound **34** at 0.5 μM

*Microcystis sp.*와 같은 종인 *Microcystis aeruginosa*를 같은 방법으로 화합물 **34**를 0.5 μM 처리 후 세포 관찰하였다.

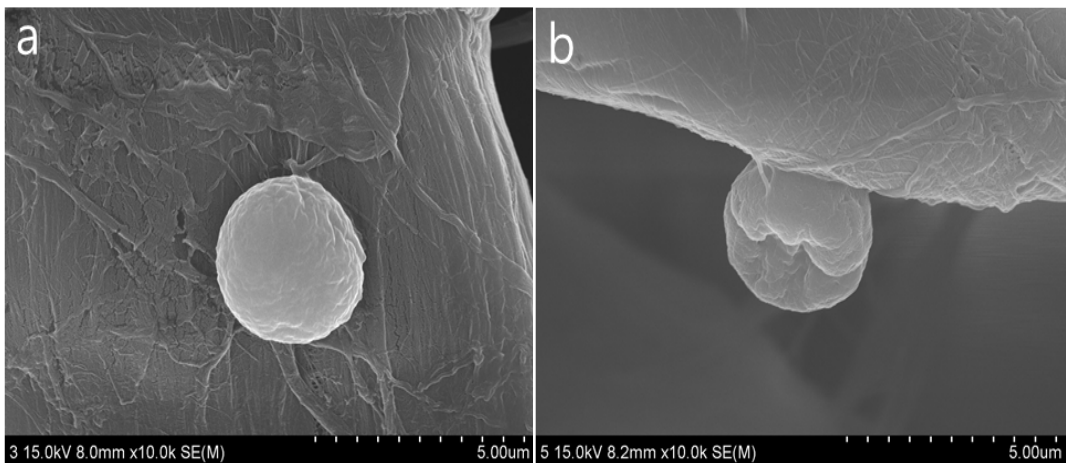


Figure 14. S.E.M image of *Microcystis aeruginosa* after treatment of compound **34** at 0.5 μM

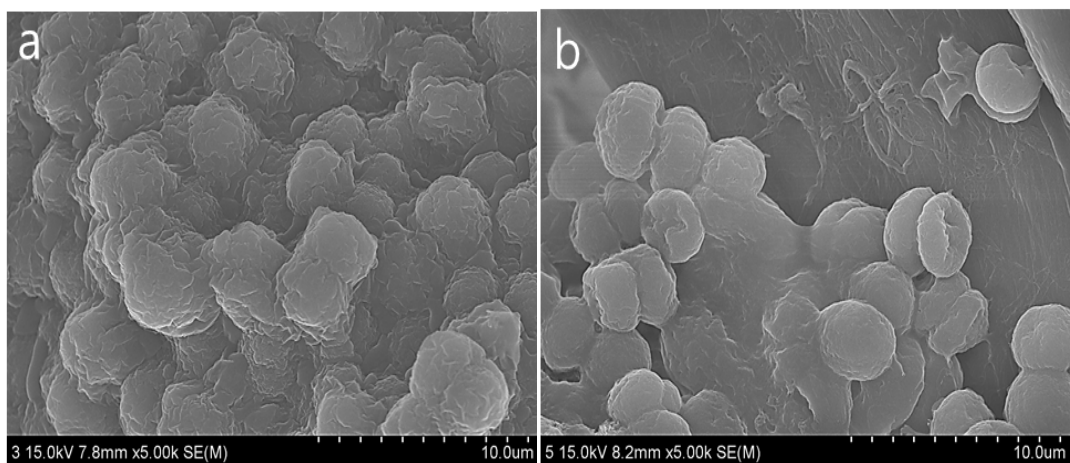


Figure 15. Overall S.E.M image of *Microcystis aeruginosa* after treatment of compound **34** at 0.5 μM

*Cyanobacteria*인 *Microcystis sp.*와 *Microcystis aeruginosa* 의 경우 0.5 μM 로 처리했을 때 세포막이 파괴됨을 관찰 할 수 있었다. 또한 유해조류에 대한 살조물질의 선택성을 확인하기 위해 추가로 무해조류로 구분되는 *Selena strum*에 살조물질을 같은 농도로 처리한 다음 S.E.M을 통해 세포 변화를 관찰하였다.

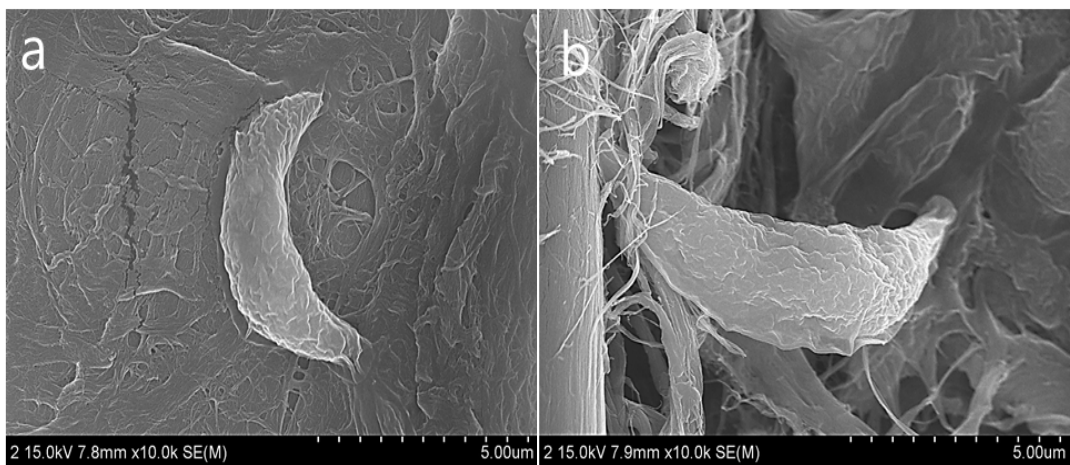


Figure 16. S.E.M image of *Selena strum* after treatment of compound **34** at 0.5 μM

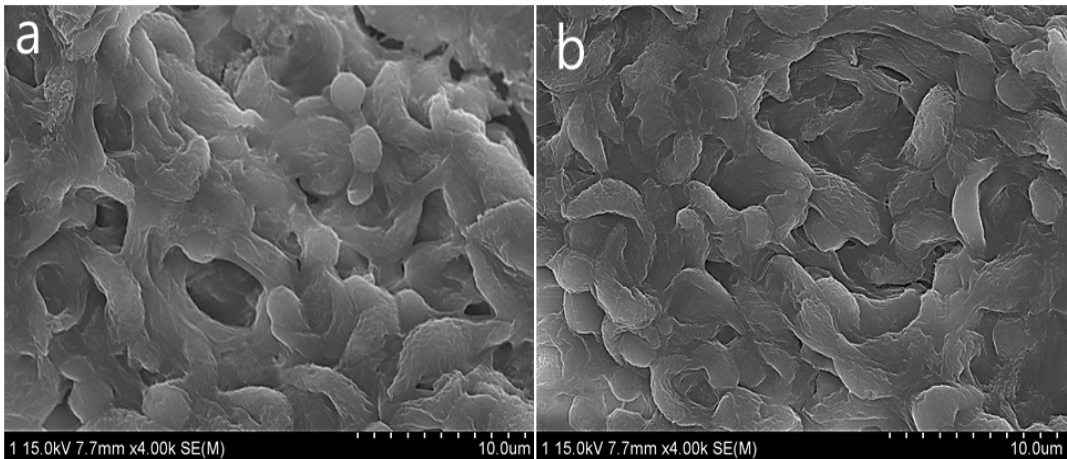


Figure 17. Overall S.E.M image of *Selena strum* at after treatment of compound **34** at 0.5 μM

무해조류 *Selena strum*에 대해 유해조류와 같은 조건으로 실험한 결과 세포막의 변화나 파괴되는 흔적을 찾아볼 수 없었다. 따라서 화합물 **34**는 0.5 μM 의 낮은 농도에서는 유해조류만을 선택적으로 제어한다는 것을 확인하였다.

5.6. T.E.M 세포 관찰

T.E.M은 세포 속 내부를 관찰할 수 있는 microscope이다. 대조군 대비 약물 처리 후 화합물 **34**가 *Microcystis sp.*에 어떻게 작용하는지에 대한 과정을 T.E.M을 이용하여 관찰하였다. 약물 0.5 μM 을 처리 한 후 일정한 시간(120 h)에 대조군과 비교하여 세포를 관찰 하였다.

대조군은 세포벽이 선명하게 잘 형성되어 있고, 세포 질 내부의 세포막이 조밀하게 이루어져 건강한 세포의 모습을 보인 반면, 화합물 **34**를 처리한 세포는 세포의 경계가 분명하지 않고 세포질 내부가 붕괴된 현상을 보였다. 또한 외부 세포막이 사라지면서 삼투압에 의해 세포 내부로 물이 침투된 현상을 확인할 수 있었다.

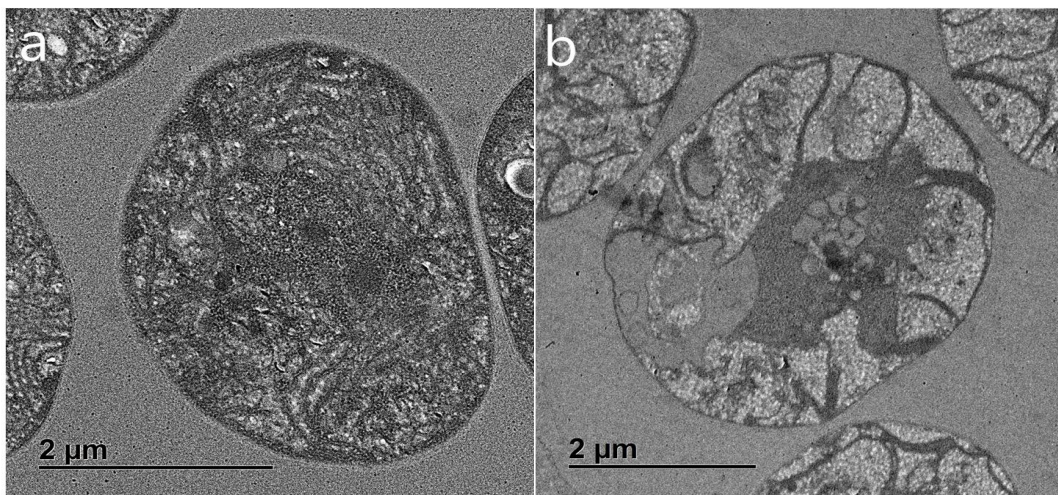


Figure 18. T.E.M image of *Microcystis sp.* at after treatment of compound **34** at 0.5 μM

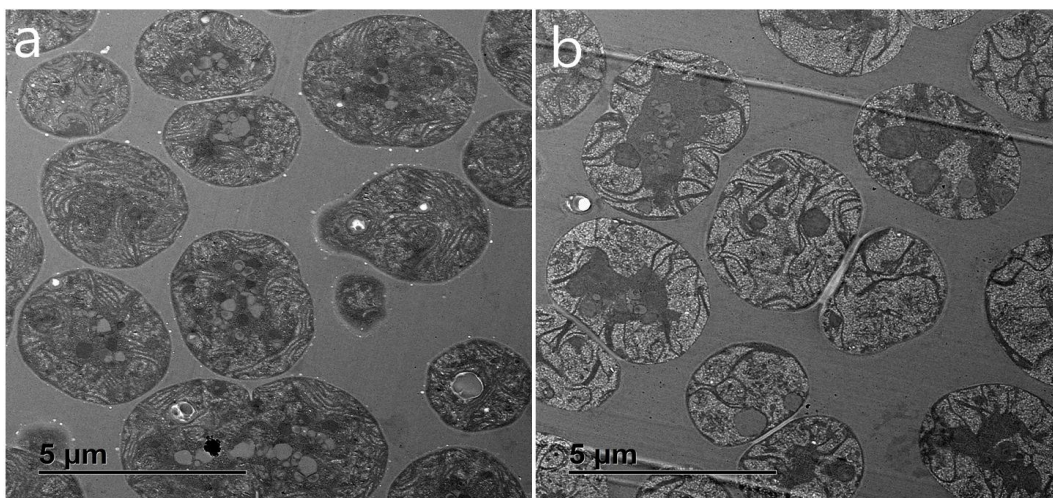


Figure 19. Overall T.E.M image of *Microcystis sp.* after treatment of compound **34** at 0.5 μM

5.7. Zebrafish (*Danio rerio*) 독성시험 결과

Microcystis sp., *Microcystis aeruginosa*에 대한 살조능 평가와 Chlorophyll 감소율 평가를 통해 0.5 μM 에서도 눈에 띄게 세포 수 감소와 Chlorophyll 양의 감소를 보인 화합물에 대해서 인간의 유전 형태와 유사한 물고기인 Zebrafish를 이용해 독성시험을 진행하였다.

독성시험 결과 치환기가 1개 달린 화합물 **20**에서 가장 높은 LC_{50} 값 94.97 μM 을 보였고 C₃ 자리에 Cl, C₄ 자리에 F로 치환된 화합물 **34**에서 가장 낮은 LC_{50} 값 45.97 μM 을 보였다. Zebrafish에 대한 후보물질의 독성평가에서는 LC_{50} 값이 약 46 ~ 95 μM 범위로 나타나 낮은 독성을 보였다.

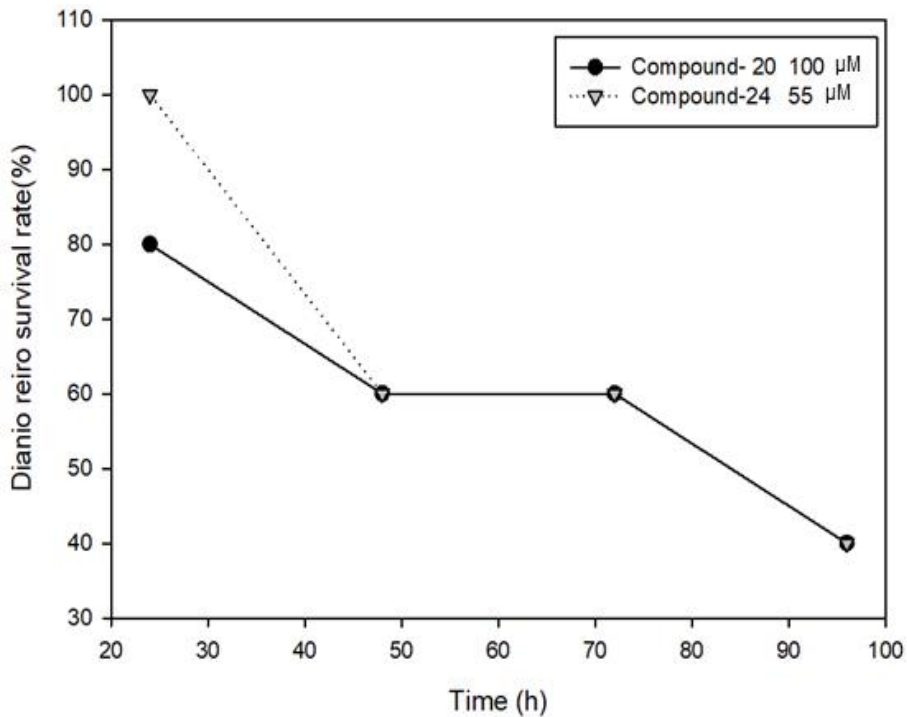


Figure 19. Acute toxicity test of compound **20** and **24** to Zebrafish

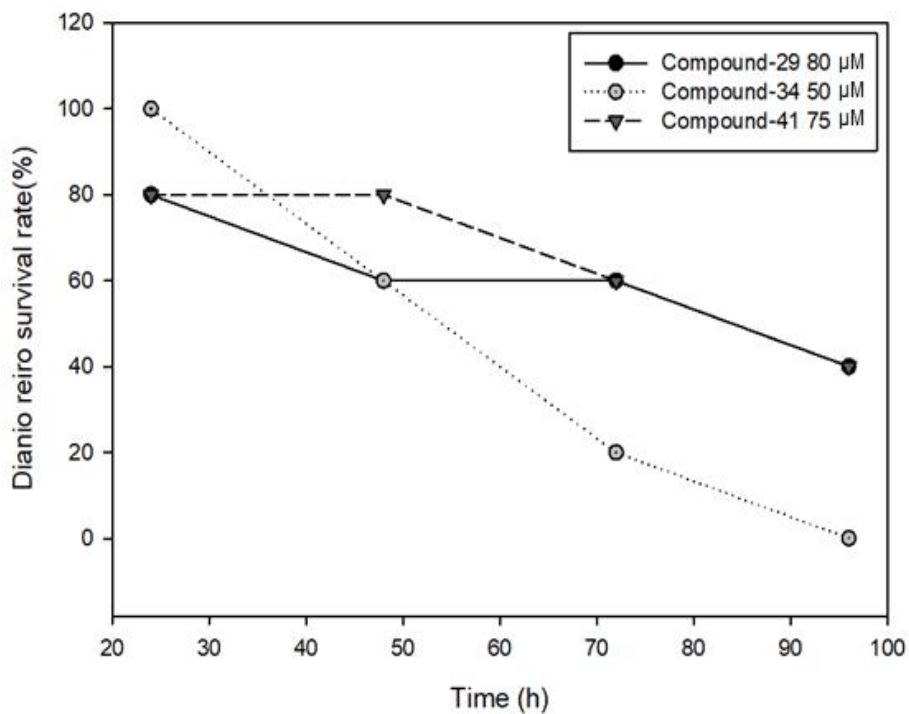


Figure 20. Acute toxicity test of compound **29**, **34**, and **41** to Zebrafish

IV. Conclusion

본 연구에서는 선행된 연구에서 *Microcystis*에 높은 살조능을 보인 N^1 -(3,4-dichloro-benzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine 구조를 바탕으로 다양한 유도체를 합성하여 *Microcystis*에 대한 살조능 비교실험을 진행하였다.

Cl 치환기를 N^1 -benzyl- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine의 C₂, C₃, C₄에 도입하여 살조능 평가한 결과 각각 2.36 μ M, 0.83 μ M, 0.53 μ M의 LC₅₀값을 보여 C₄가 가장 높은 살조능을 보였다.

Phenyl 그룹의 C₃를 Cl로 고정시킨 후, C₄ 자리에 CH₃, OCH₃, F를 도입하여 살조능을 비교한 결과, F로 치환된 화합물에 대한 LC₅₀ 값이 0.42 μ M로 가장 우수한 살조능을 보였다.

가장 우수한 살조능을 보인 화합물 **20**, **34**를 이용하여 무해조류로 구분되는 *Selenastrum*에 대한 살조능을 평가한 결과 LC₅₀ 값이 각각 3.87 μ M 및 3.88 μ M로 나타나 유해조류에 비해 낮은 독성을 보였다.

화합물 **20** 및 **34**를 각각 0.5 μ M 처리한 다음 Chlorophyll 양을 측정된 결과 약물처리 120 h후 대조군 대비 약 75% Chlorophyll이 감소되었다.

물벼룩을 이용한 독성평가에서 화합물 **20**의 경우 *Microcystis sp.*에 대한 LC₅₀값 0.53 μ M 보다 약 46.37배 높은 24.58 μ M로 나타났으며, 화합물 **34**에 대한 독성평가에서는 *Microcystis sp.*에 대한 LC₅₀값 0.42 μ M 보다 약 67.42배 높은 18.32 μ M로 나타나 낮은 독성을 보였다. (Table 24.)

Zebrafish를 이용한 독성평가에서는 화합물 **20** 및 **34**에 대한 LC₅₀값이 각각 94.97 μ M 과 45.97 μ M로 나타나 매우 낮은 독성을 보였다. (Figure 19, 20)

살조능이 가장 우수한 화합물 **34**를 이용해 약물 처리에 따른 세포 파괴과정을 규명하고자 S.E.M과 T.E.M을 이용하여 세포 파괴과정을 관찰한 결과 약물을 처리한 세포에서는 시간이 지남에 따라 막이 제거되고 결국 세포가 완전히 파괴됨을 관찰 할 수 있었다. 무해조류 종인 *Selenastrum*에서는 같은 조건에서 세포의 막이나 세포의 표면에서 큰 변화를 관찰할 수 없었다.

또한, T.E.M을 통해 세포 내부 변화를 관찰한 결과 대조군에서는 세포질 속의 막이 촘촘히 잘 이루어져 있으며, 세포벽의 형태가 뚜렷한 반면 약물을 처리한 세포에서는 세포질 내부의 막이 사라지고, 외부의 세포벽이 파괴되어 삼투압에 의해 내부로 물이 유입됨으로 인하여 세포가 파괴되는 현상을 확인 할 수 있었다.

본 연구를 통해 의약품을 기반으로 한 유기살조물을 이용하여 전 세계적으로 심각한 수질오염과 인간의 건강을 위협하는 독성물질을 발생시키는 유해조류를 효과적으로 제

어할 수 있음을 확인하였다.

[Reference]

- [1] 환경부(2016) 물 환경 정보시스템. 「녹조(綠潮), 녹조현상은 무엇인가?」
- [2] Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353–367.
- [3] Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., & Neilan, B. A. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology*, 7(10), 753–764.
- [4] Jolanda Verspagen, Aggregation with clay causes sedimentation of thebuoyant cyanobacteria *Microcystis* spp. (n.p.: Aquatic Microbial Ecology, n.d.), 165-174.
- [5] O’Brien, W. J. (1974). The Dynamics of Nutrient Limitation of Phytoplankton Algae: A Model Reconsidered. *Ecology*, 55(1), 135–141.
- [6] Davidson, K., Gowen, R. J., Harrison, P. J., Fleming, L. E., Hoagland, P., & Moschonas, G. (2014). Anthropogenic nutrients and harmful algae in coastal waters. *Journal of Environmental Management*, 146, 206–216.
- [7] Paerl, H. W., & Otten, T. G. (2013). Blooms Bite the Hand That Feeds Them. *Science*, 342(6157), 433–434.
- [8] Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., & Gobler, C. J. (2009). 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), 715–725.
- [9] Post, D. M., Pace, M. L., & Hairston, N. G. (2000). Ecosystem size determines food-chain length in lakes. *Nature*, 405(6790), 1047–1049.
- [10] Ding, W.-X., Shen, H.-M., Shen, Y., Zhu, H.-G., & Ong, C.-N. (1998). Microcystic *Cyanobacteria* Causes Mitochondrial Membrane Potential Alteration and Reactive Oxygen Species Formation in Primary Cultured Rat Hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*, 106(7), 409
- [11] Ding, W.-X., Shen, H.-M., Zhu, H.-G., & Ong, C.-N. (1998). Studies on Oxidative Damage Induced by Cyanobacteria Extract in Primary Cultured Rat Hepatocytes.

Environmental Research, 78(1), 12–18.

[12] WHO, “Guidelines for drinking water quality,” 2nd ed. Addendum to Volume 2, Health criteria and other supporting information, Geneva, Switzerland(1998).

[13] Ferreira, J. G., Andersen, J. H., Borja, A., Bricker, S. B., Camp, J., Cardoso da Silva, M., ... Claussen, U. (2011). Overview of eutrophication indicators to assess environmental status within the European Marine Strategy Framework Directive. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 93(2), 117–131.

[14] Anderson, D. M. (2009). Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean & Coastal Management*, 52(7), 342–347.

[15] Hecky, P. E. AND P. KILHAM. 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: A review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnology and Oceanography* 33:796-822.

[16] Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R., Barreto, V., Ward, C., ... Codd, G. (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, 352(9121), 21–26.

[17] WHO. Report of the Working Meeting on Chemical Substances in Drinking Water, Geneva, 1997: 5.2.

[18] Codd, G. A., Morrison, L. F., & Metcalf, J. S. (2005). Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3), 264–272.

[19] Chorus, I. and Bartram, J. (1999) *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*. E & FN Spon /Chapman & Hall, London, 416 pp

[20] Rinehart, K. L., Namikoshi, M., & Choi, B. W. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 159–176.

[21] Liu, T., Mazmouz, R., Ongley, S. E., Chau, R., Pickford, R., Woodhouse, J. N., & Neilan, B. A. (2017). Directing the Heterologous Production of Specific Cyanobacterial Toxin Variants. *ACS Chemical Biology*, 12(8), 2021–2029.

[22] Hooser, S. B., Beasley, V. R., Lovell, R. A., Carmichael, W. W., & Haschek, W. M. (1989). Toxicity of Microcystin LR, a Cyclic Heptapeptide Hepatotoxin from

Microcystis aeruginosa, to Rats and Mice. *Veterinary Pathology*, 26(3), 246–252.

[23] Chislock, M. F., Sarnelle, O., Jernigan, L. M., & Wilson, A. E. (2013). Do high concentrations of microcystin prevent *Daphnia* control of phytoplankton? *Water Research*, 47(6), 1961–1970.

[24] Jabulani Gumbo, Biological control of *Microcystis* dominated harmful algal blooms (n.p.: Biotechnology, n.d.), 4765-4773.

[25] Sengco, Mario R. "Prevention and control of *Karenia brevis* blooms." *Harmful Algae* 8.4 (2009): 623-628.

[26] Pitois, S., Jackson, M. H., & Wood, B. J. B. (2000). Problems associated with the presence of cyanobacteria in recreational and drinking waters. *International Journal of Environmental Health Research*, 10(3), 203–218.

[27] Chislock, M. F., Sarnelle, O., Jernigan, L. M., & Wilson, A. E. (2013). Do high concentrations of microcystin prevent *Daphnia* control of phytoplankton? *Water Research*, 47(6), 1961–1970.

[28] OECD (2000) Draft guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23

[29] OECD 202 (2004) OECD guideline for the testing of chemicals. ‘*Daphnia* sp., acute immobilisation test’

[30] Krishnamurthy, T., Szafraniec, L., Hunt, D. F., Shabanowitz, J., Yates, J. R., Hauer, C. R., ... Missler, S. (1989). Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(3), 770–774.

[31] Rott, E. (1981). Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweizerische Zeitschrift Für Hydrologie*, 43(1), 34–62.

[32] 수질오염공정시험기준-국가법령정보센터 [시행 2018.12.21.] [국립환경과학원고시 제 2018-65.2018.12.21., 일부개정]

[33] MARKER, A. F. H. (1972). The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*, 2(4), 361–385.

[34] Botes, D. P., Kruger, H., & Viljoen, C. C. (1982). Isolation and characterization of

four toxins from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 20(6), 945–954.

[35] Watanabe, M. F., Oishi, S., Harada, K.-I., Matsuura, K., Kawai, H., & Suzuki, M. (1988). Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, 26(11), 1017–1025. *Microcystis*- YR,RR.

[36] Namikoshi M, Rinehart KL, Sakai R, Stotts RR, Dahlem AM, Beasley VR, Carmichael WW, Evans WR (1992a) Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. *J. org. Chem.* 57: 866-872.

[37] Namikoshi M, Sivonen K, Evans WR, Sun F, Carmichael WW, Rinehart KL (1992d) Isolation and structures of microcystins from a cyanobacterial water bloom (Finland). *Toxicon* 30: 1473-1479.

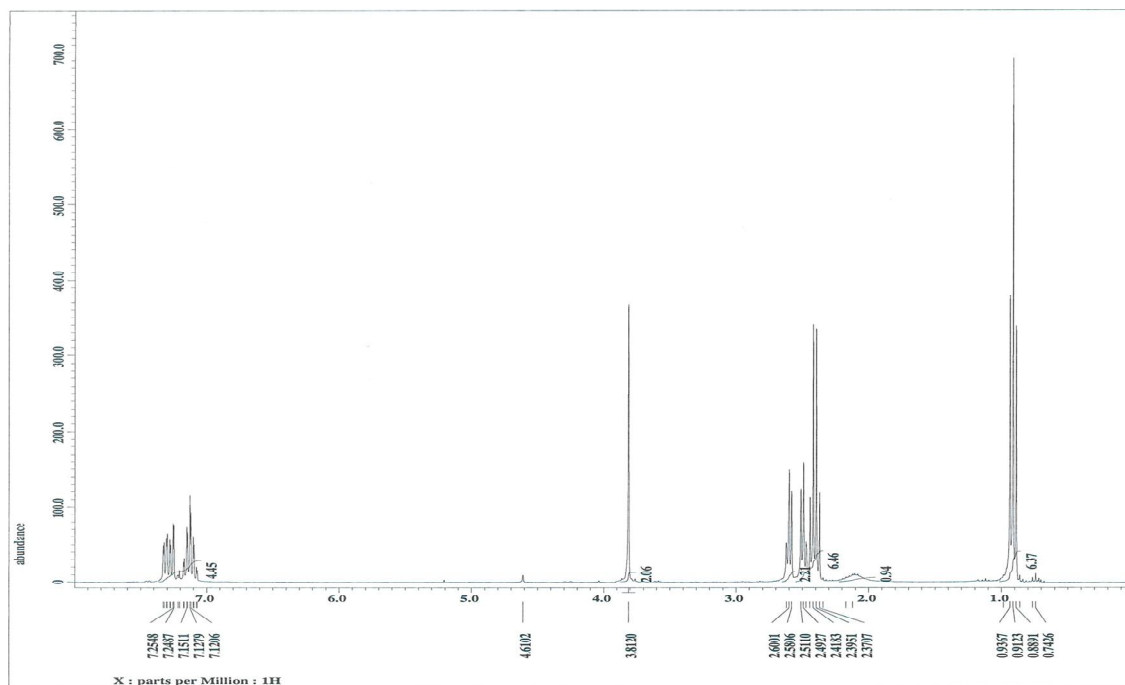
[38] Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H (1992) Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. clin. Oncol.* 118: 420-424.

[39] Choi, D., Yu, S., Baek, S. H., Kang, Y.-H., Chang, Y.-C., & Cho, H. (2016). Synthesis and algicidal activity of new dichlorobenzylamine derivatives against harmful red tides. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(3), 463–476.

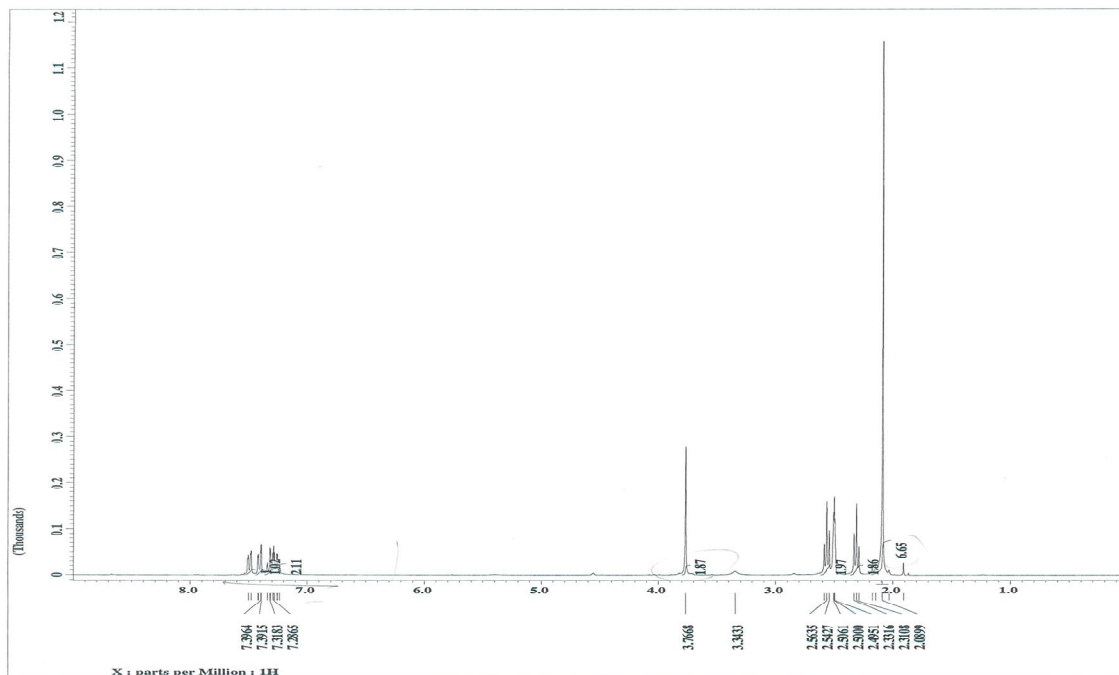
[40] 손형규(2017). *Microcystis aeruginosa*에 대한 dichlorobenzylamine 유도체의 살조능 평가. 석사. 조선대학교

^1H NMR Spectra

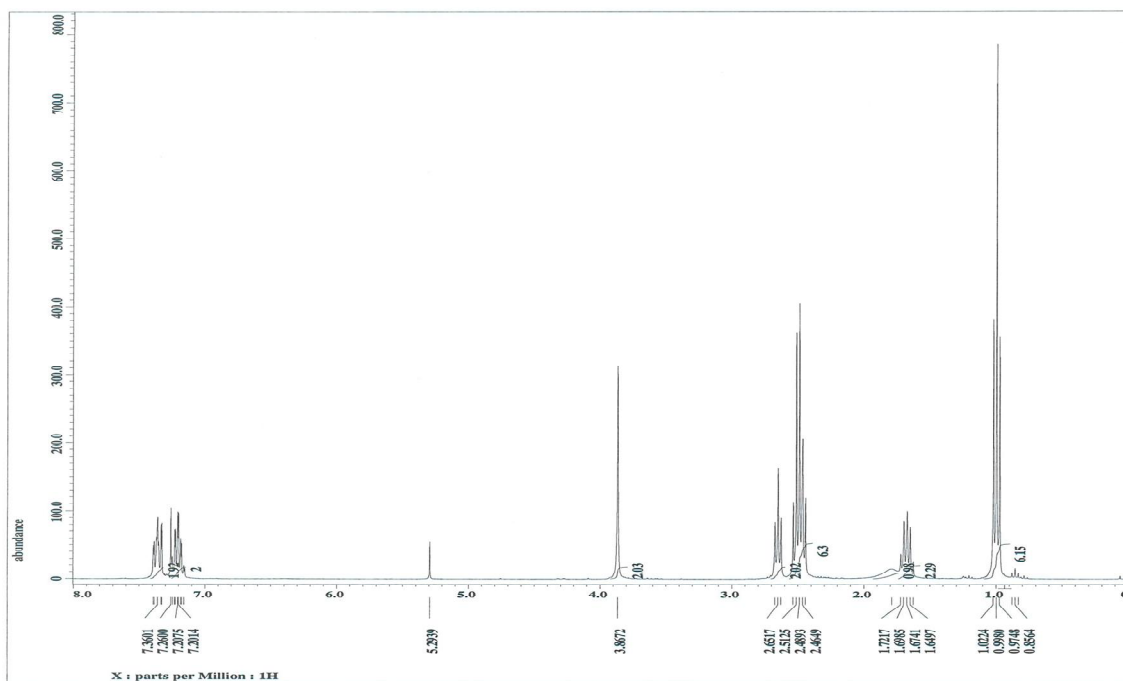
(1) N^1 -(2-Chlorobenzyl)- N^2, N^2 -diethylethane-1,2-diamine



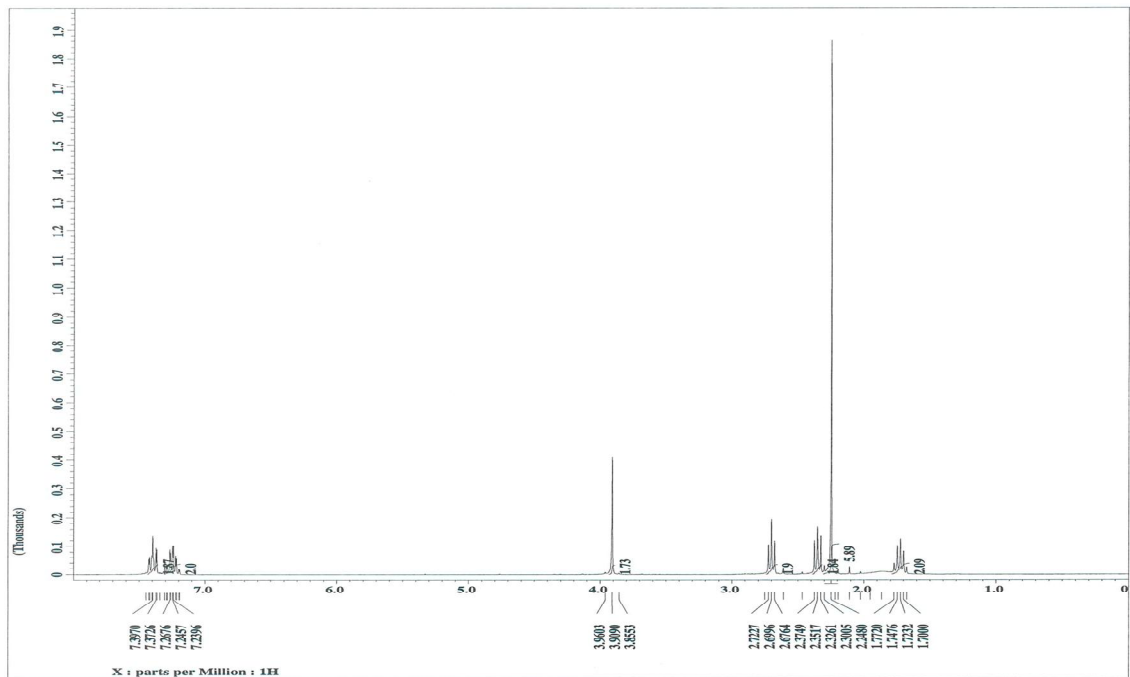
(2) N^1 -(2-Chlorobenzyl)- N^2, N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



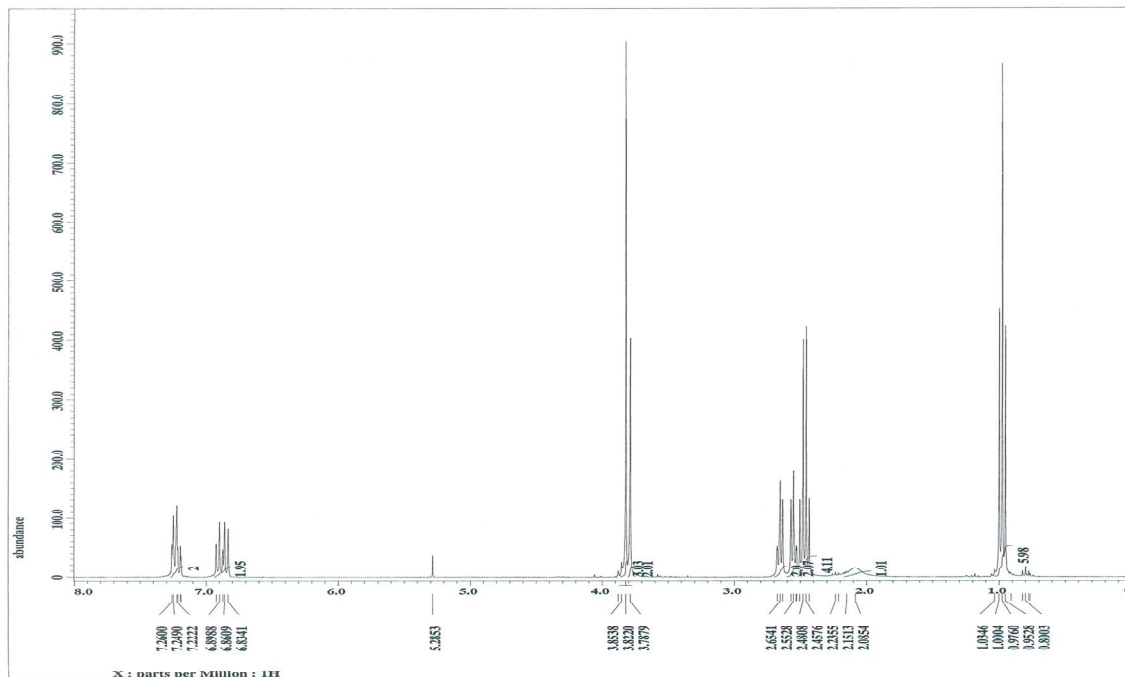
(3) N^1 -(2-Chlorobenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diaminene



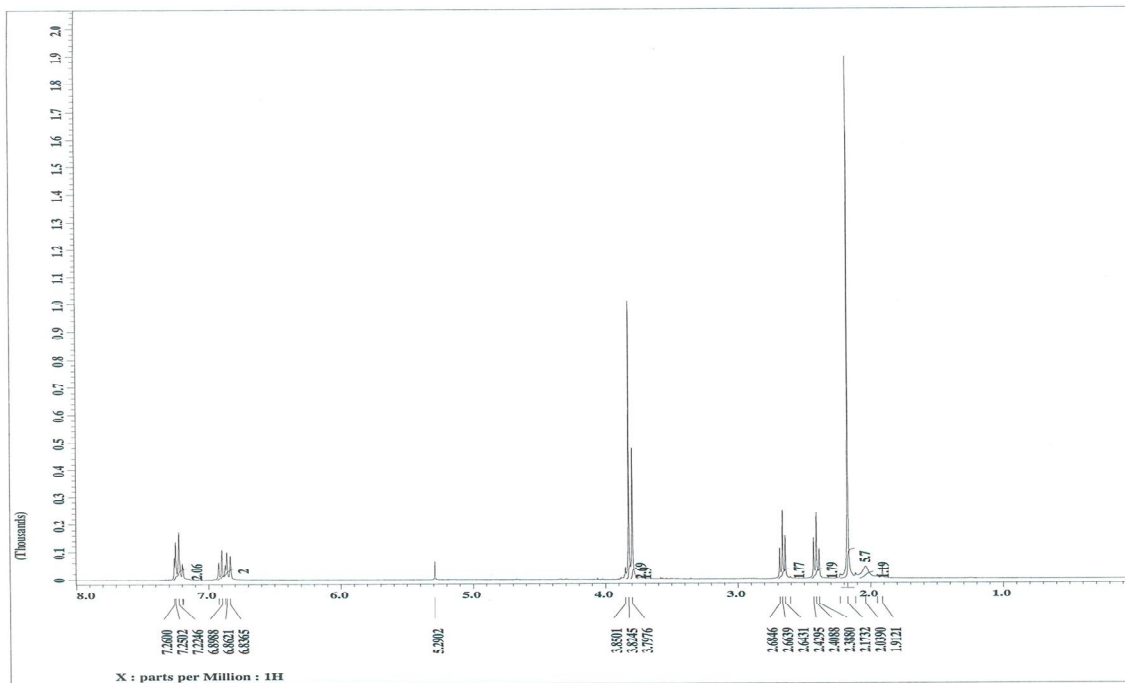
(4) N^1 -(2-Chlorobenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



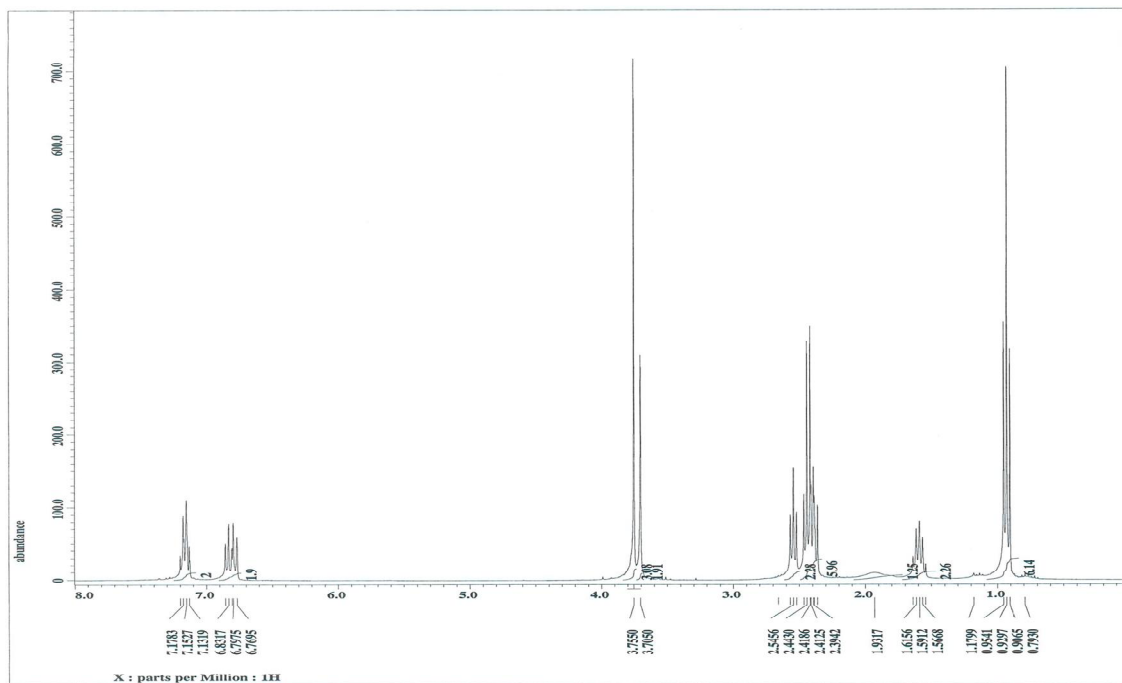
(5) N^2,N^2 -Diethyl- N^1 -(2-methoxybenzyl)ethane-1,2-diamine



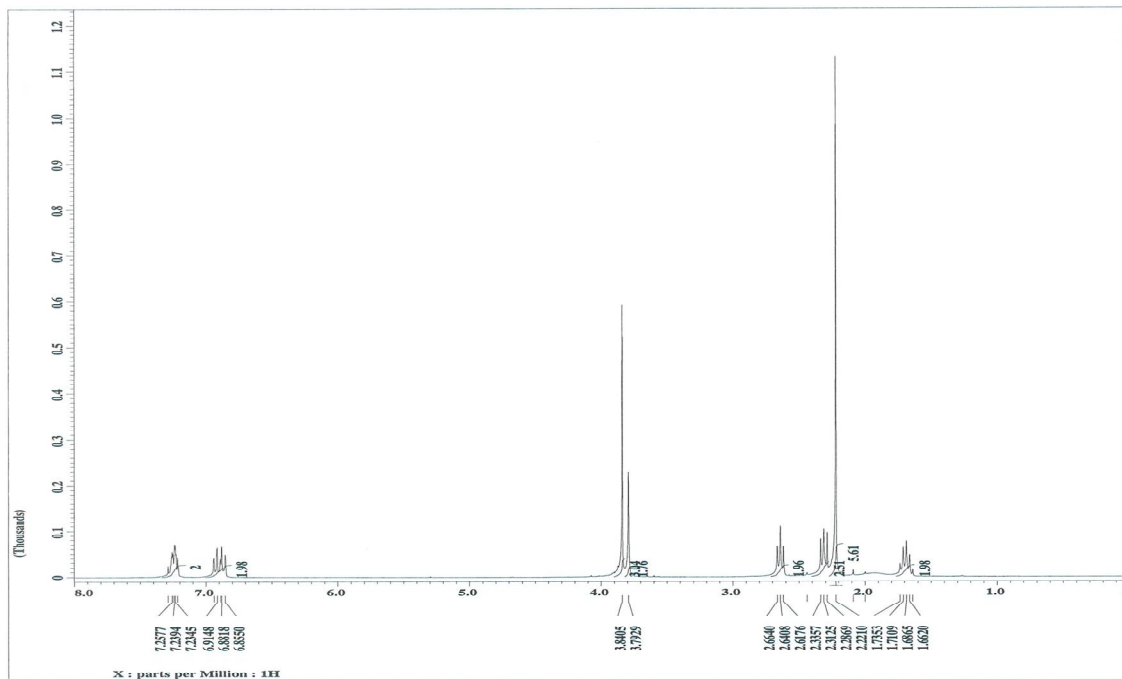
(6) N^1 -(2-Methoxybenzyl)- N^2,N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



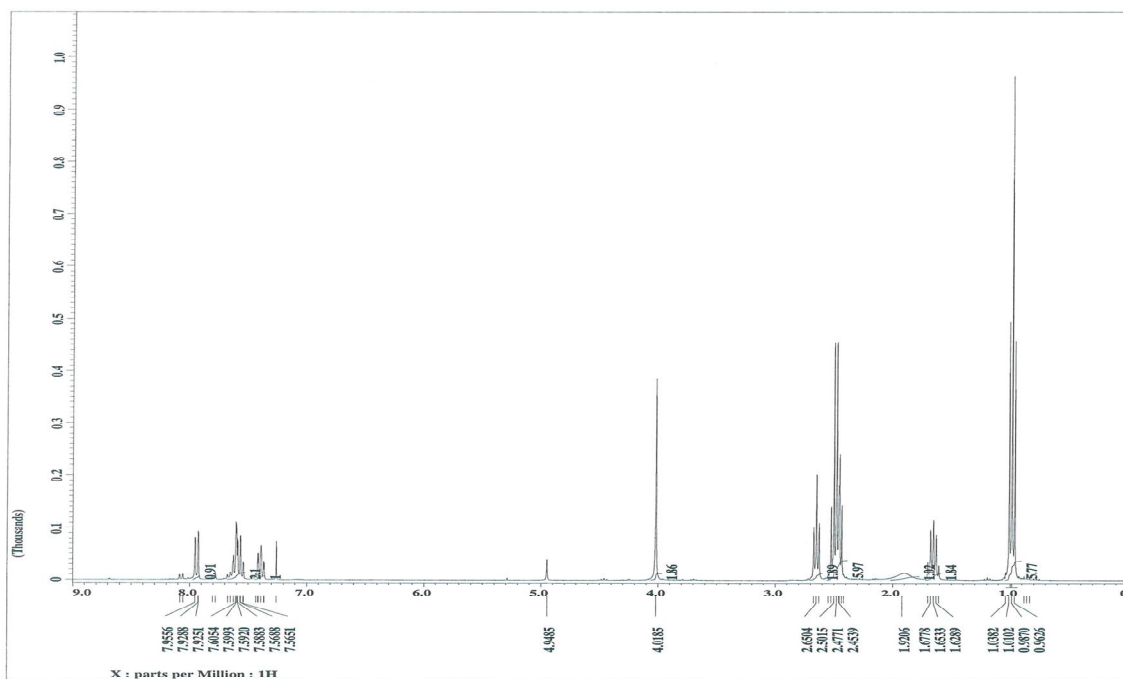
(7) N^3,N^3 -Diethyl- N^1 -(2-methoxybenzyl)propane-1,3-diamine



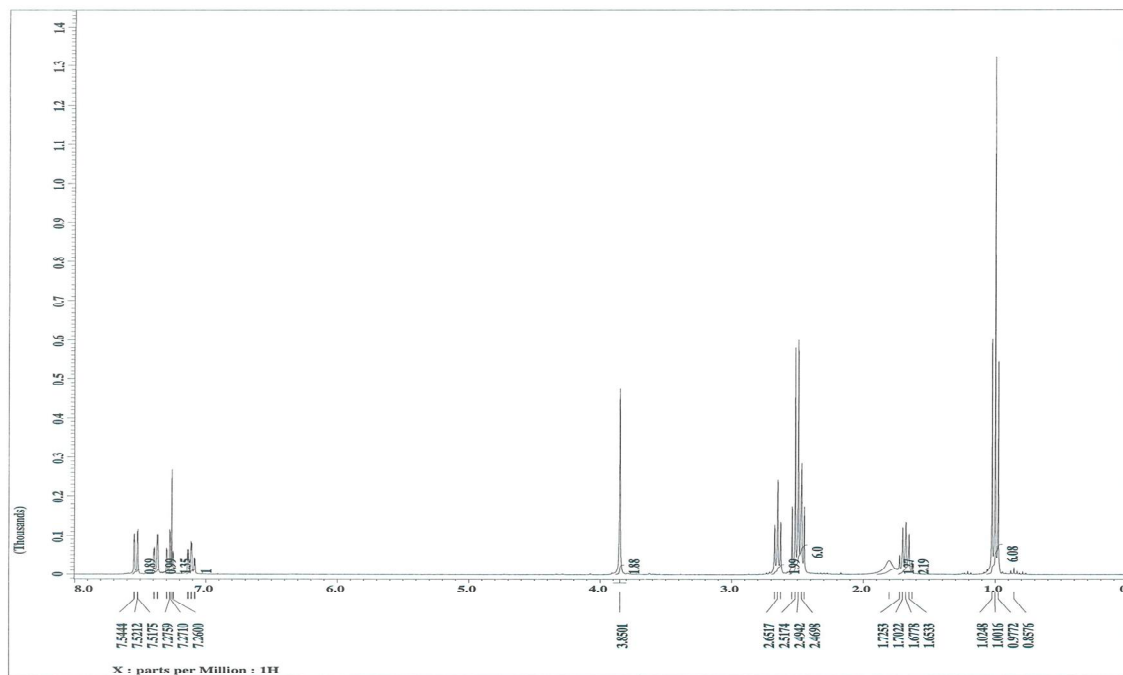
(8) N^1 -(2-Methoxybenzyl)- N^3,N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



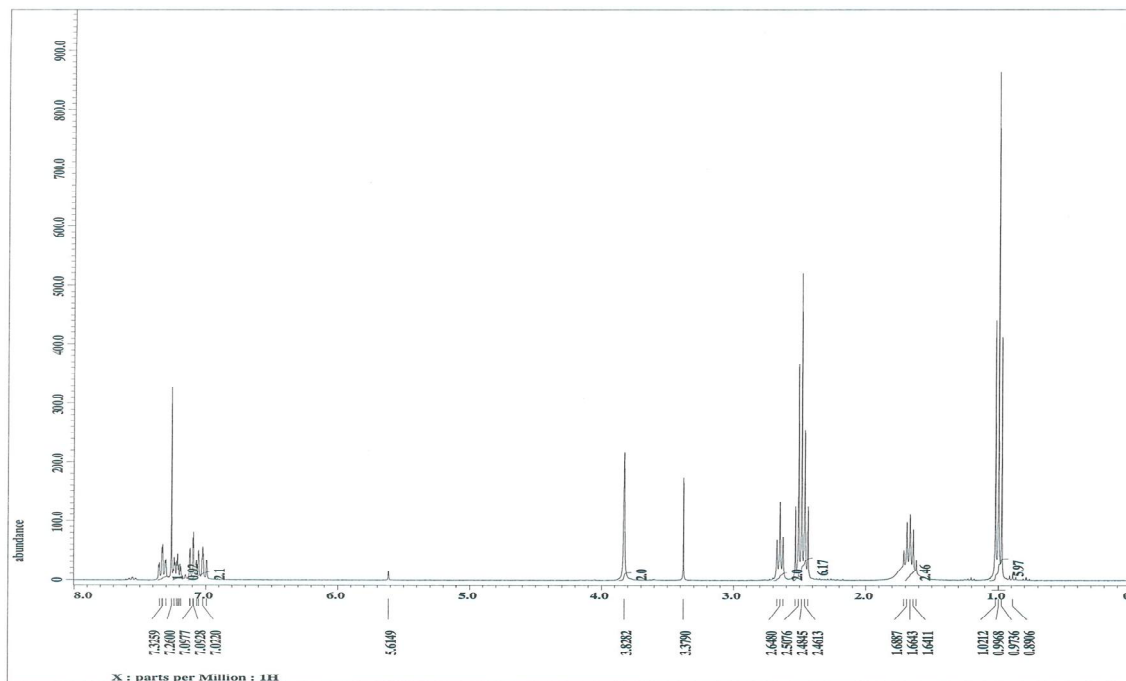
(9) N^1, N^1 -Diethyl- N^3 -(2-nitrobenzyl)propane-1,3-diamine



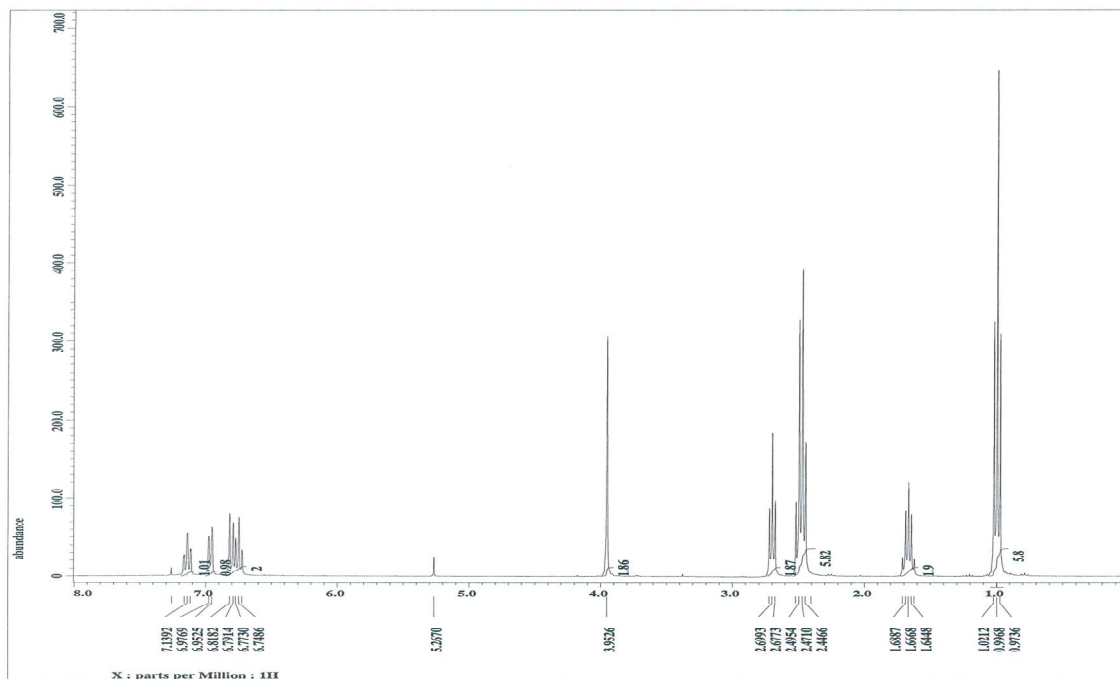
(10) N^1 -(2-Bromobenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



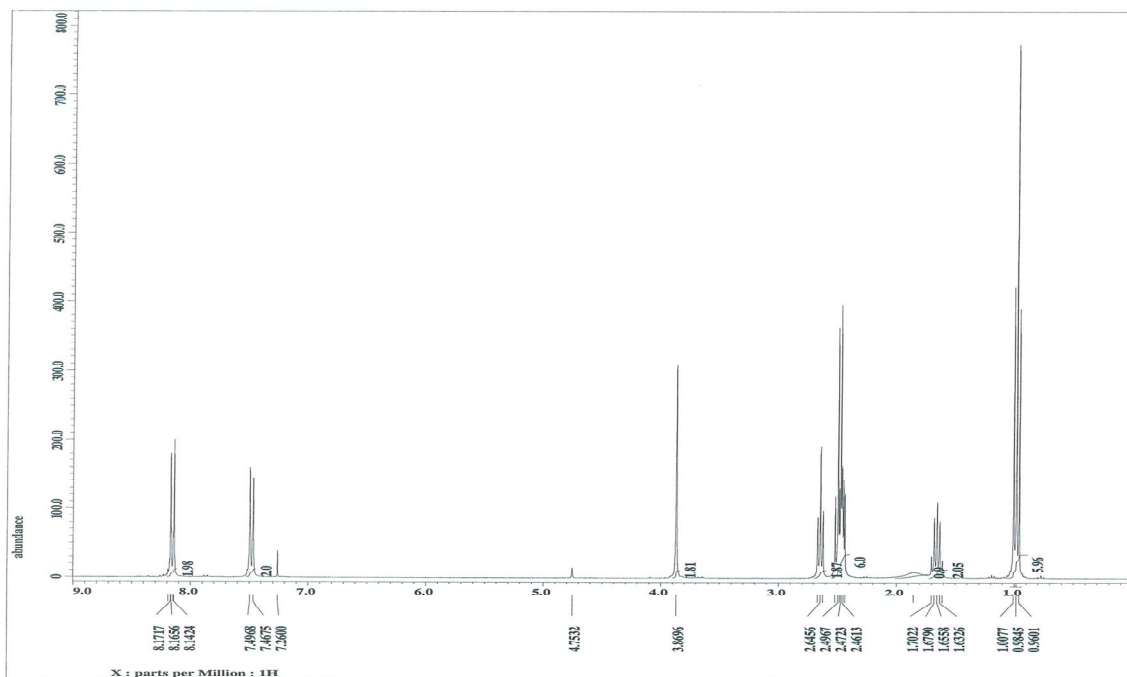
(11) N^1, N^1 -Diethyl- N^3 -(2-fluorobenzyl)propane-1,3-diamine



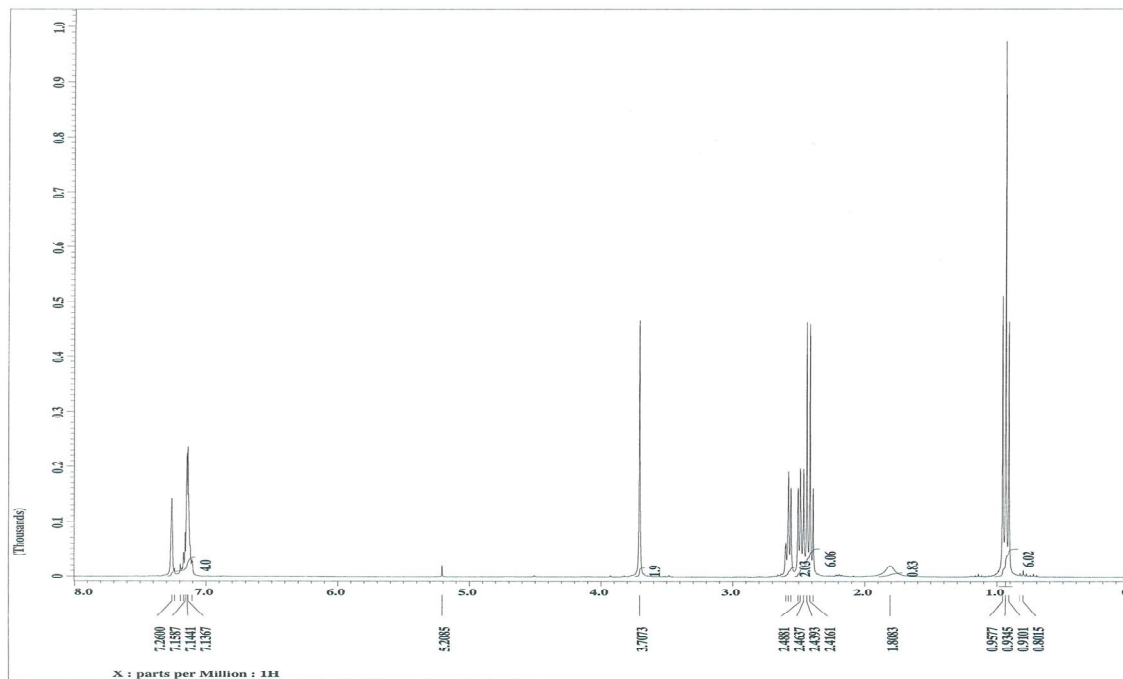
(12) 2-[(3-Diethylaminopropylamino)methyl]phenol



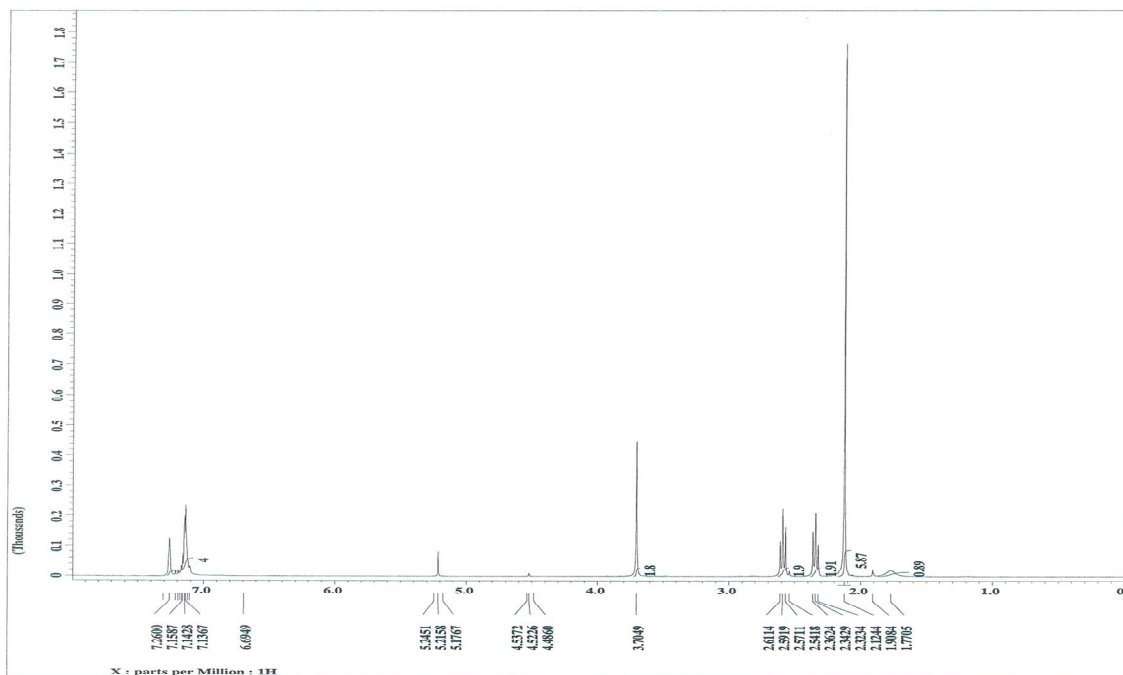
(13) N^1, N^1 -Diethyl- N^3 -(4-nitrobenzyl)propane-1,3-diamine



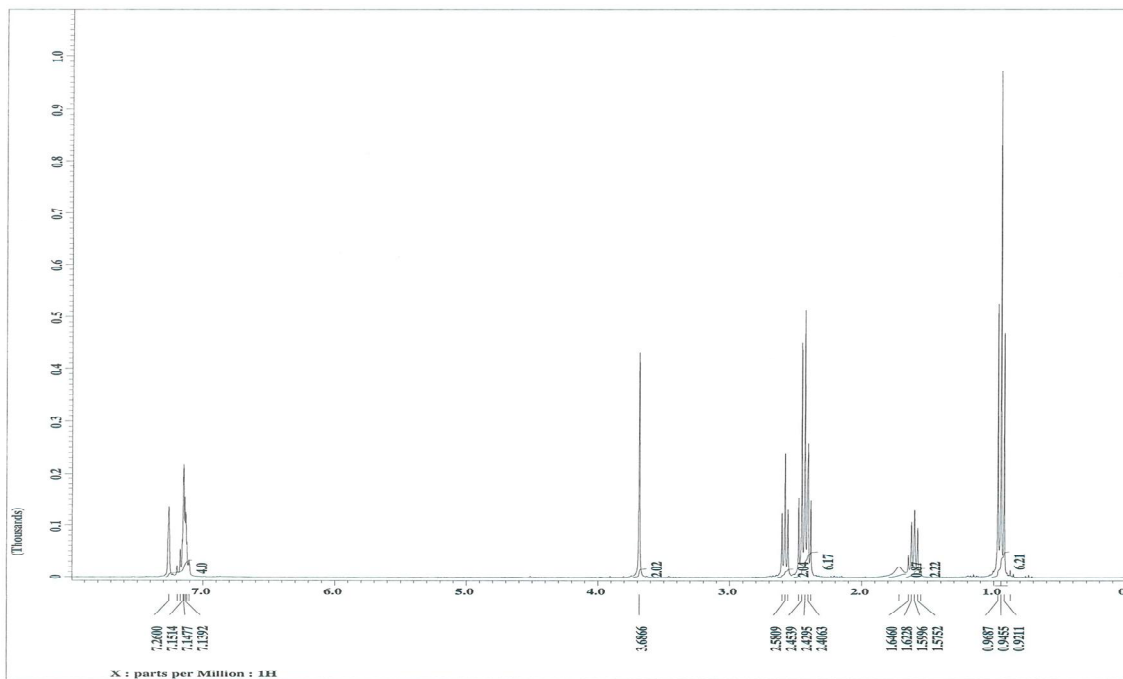
(14) N^1 -(3-Chlorobenzyl)- N^2, N^2 -diethylethane-1,2-diamine



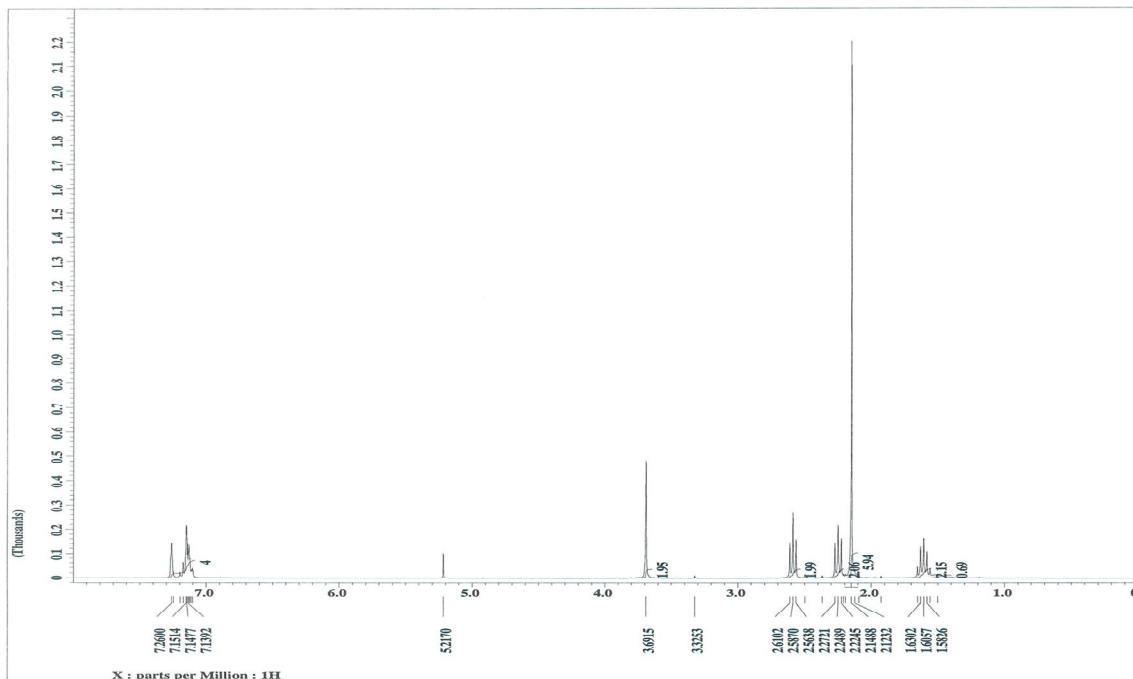
(15) N^1 -(3-Chlorobenzyl)- N^2, N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



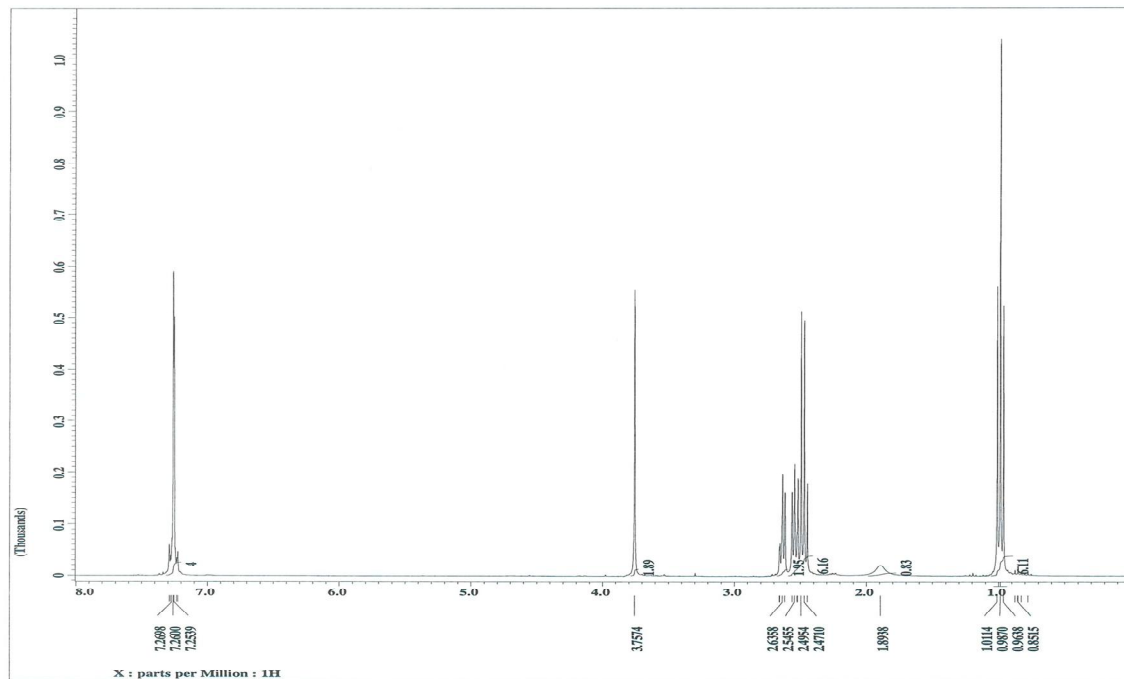
(16) N^1 -(3,4-Dichlorobenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



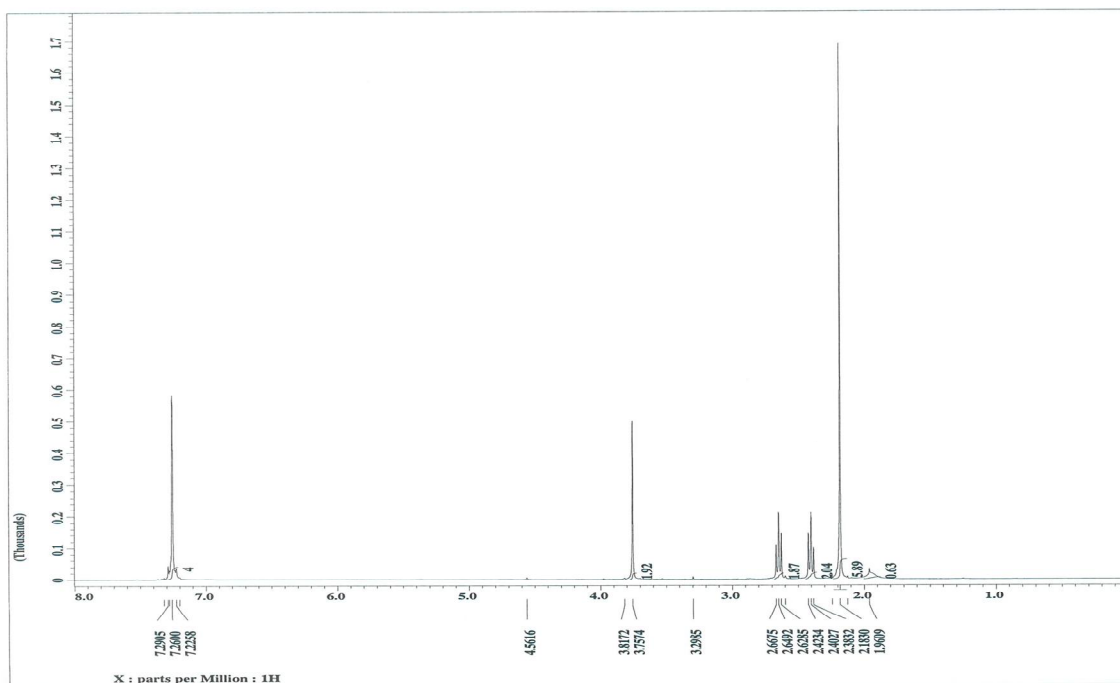
(17) N^1 -(3-Chlorobenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



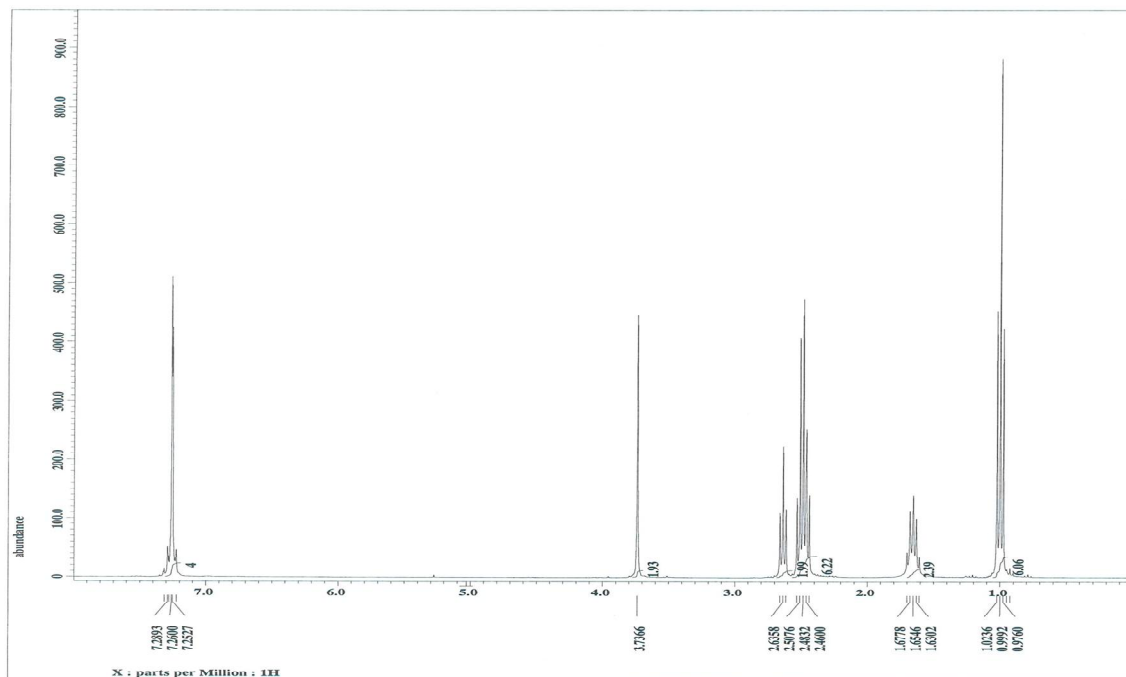
(18) N^1 -(4-Chlorobenzyl)- N^2, N^2 -diethylethane-1,2-diamine



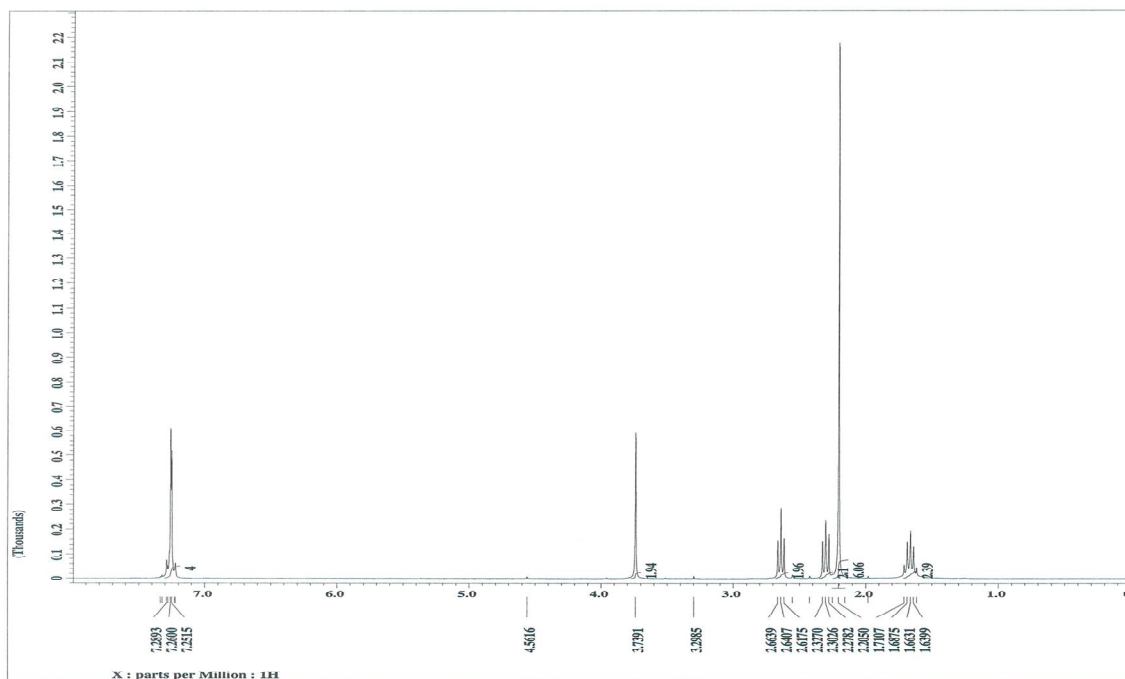
(19) N^1 -(4-Chlorobenzyl)- N^2,N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



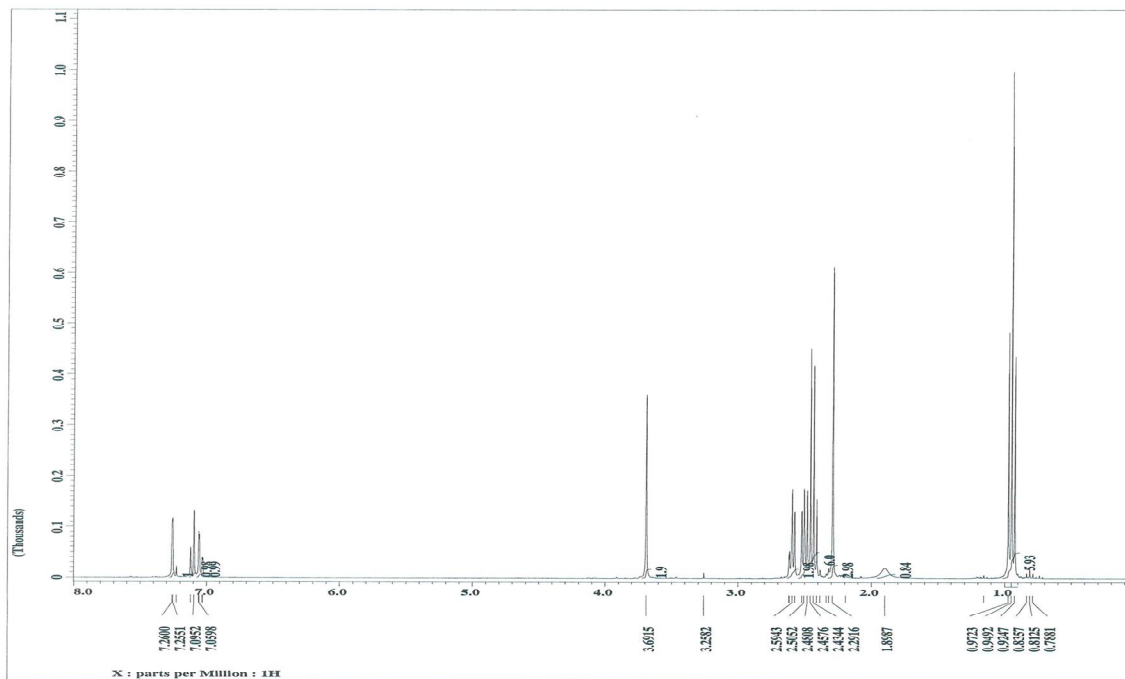
(20) N^1 -(4-Chlorobenzyl)- N^3,N^3 -diethyl-propane-1,3-diamine



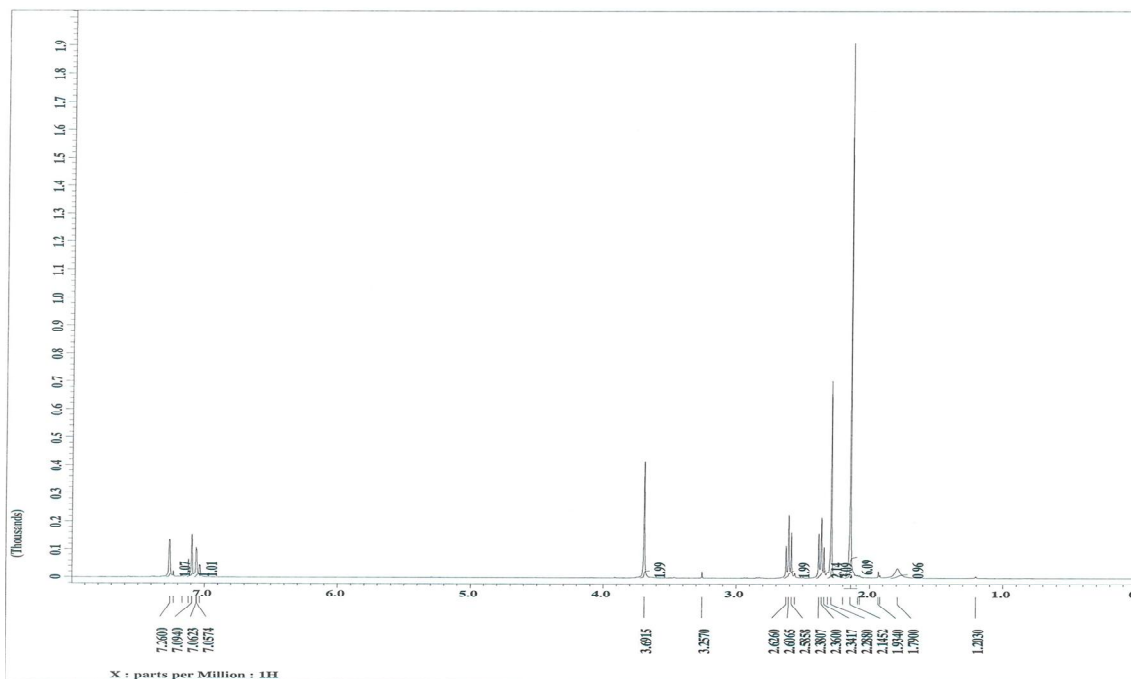
(21) N^1 -(4-Chlorobenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



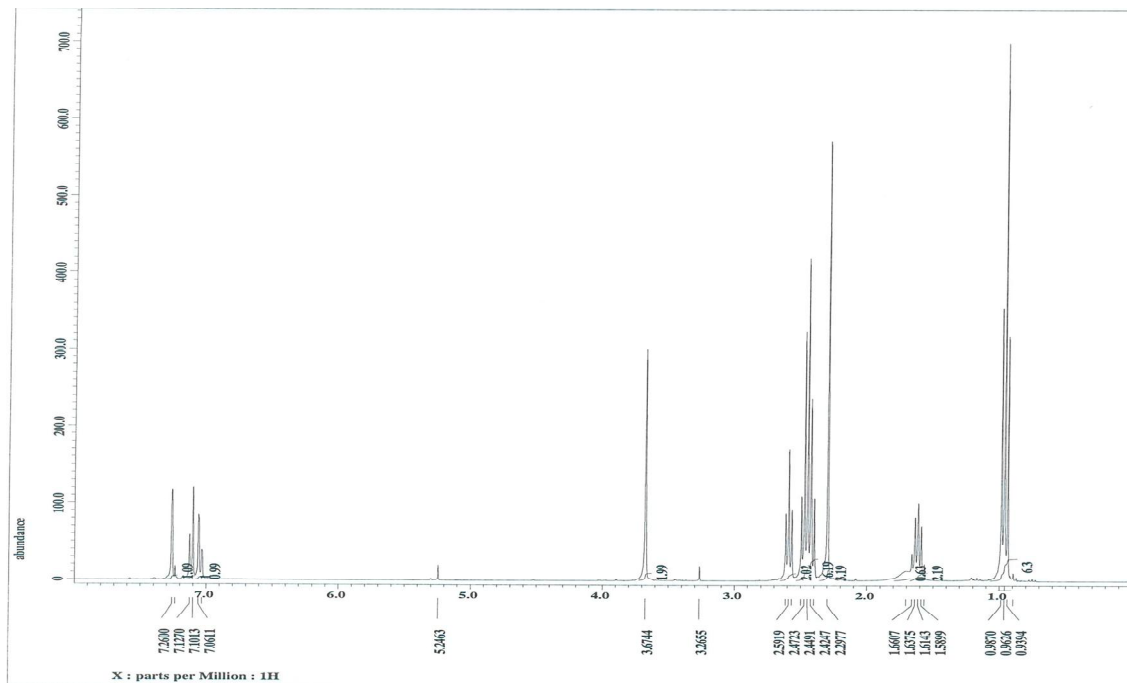
(22) N^1 -(3-Chloro-4-methylbenzyl)- N^2, N^2 -diethylethane-1,2-diamine



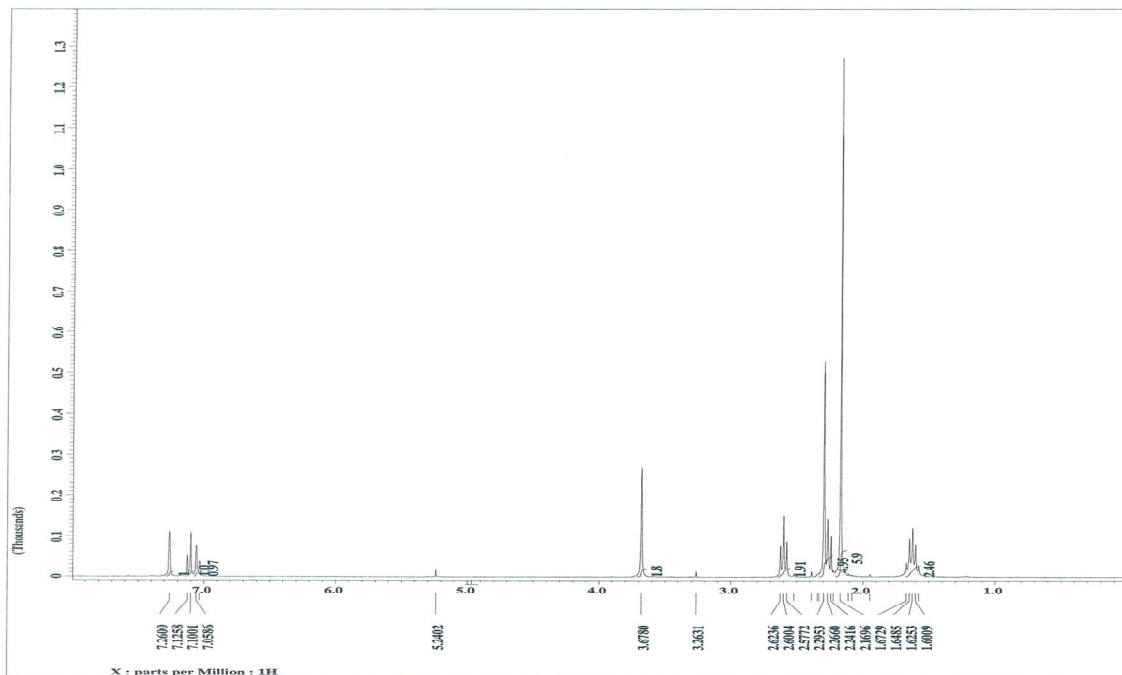
(23) N^1 -(3-Chloro-4-methylbenzyl)- N^2, N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



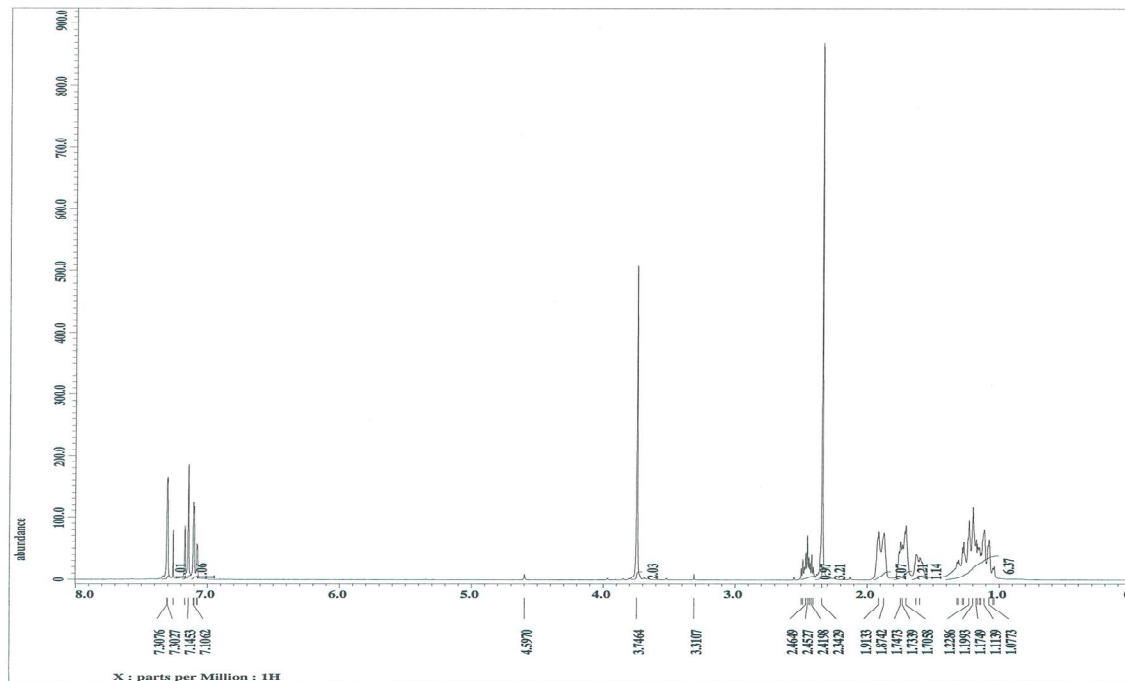
(24) N^1 -(3-Chloro-4-methylbenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



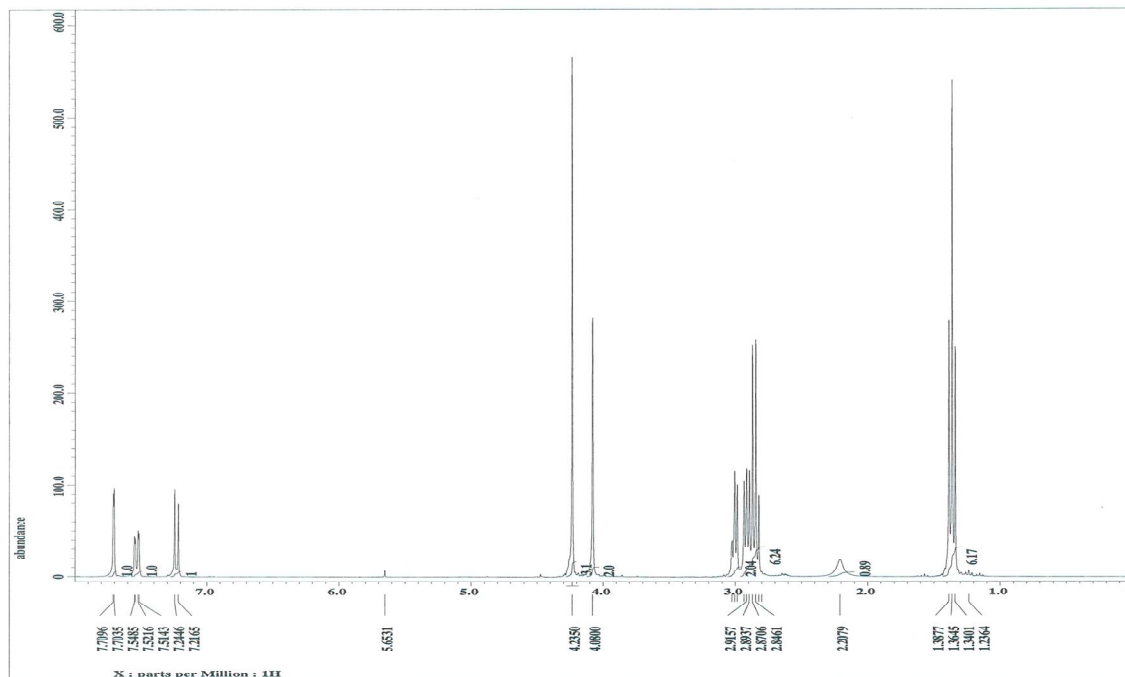
(25) N^1 -(3-Chloro-4-methylbenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



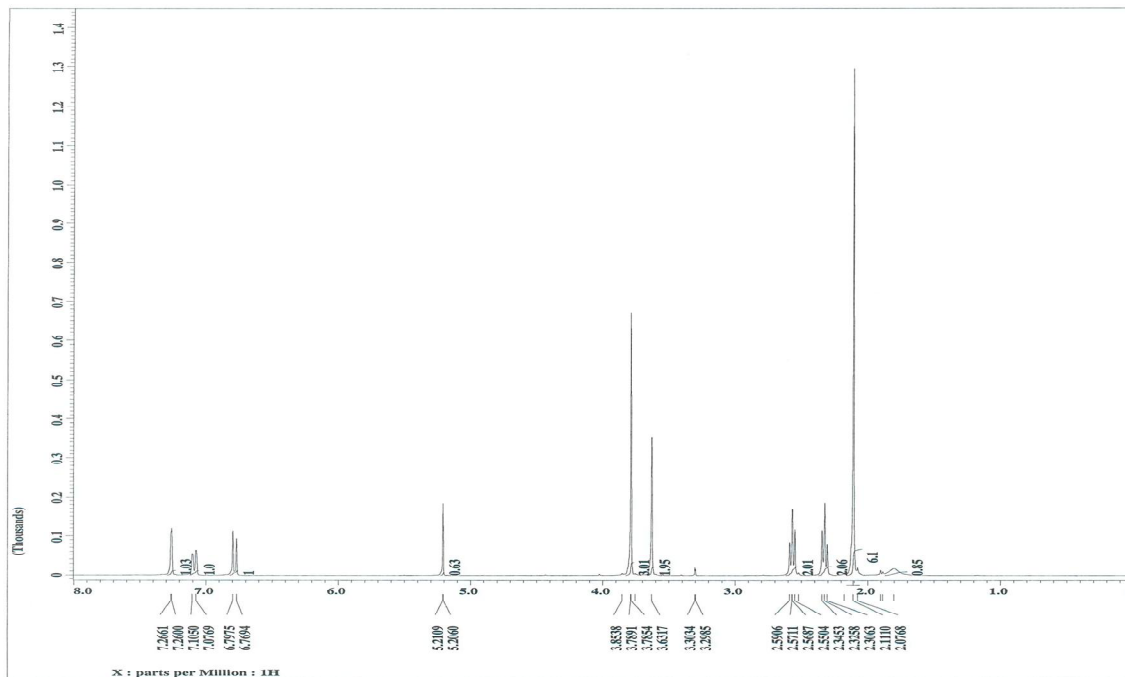
(26) (3-Chloro-4-methylbenzyl)cyclohexylamine



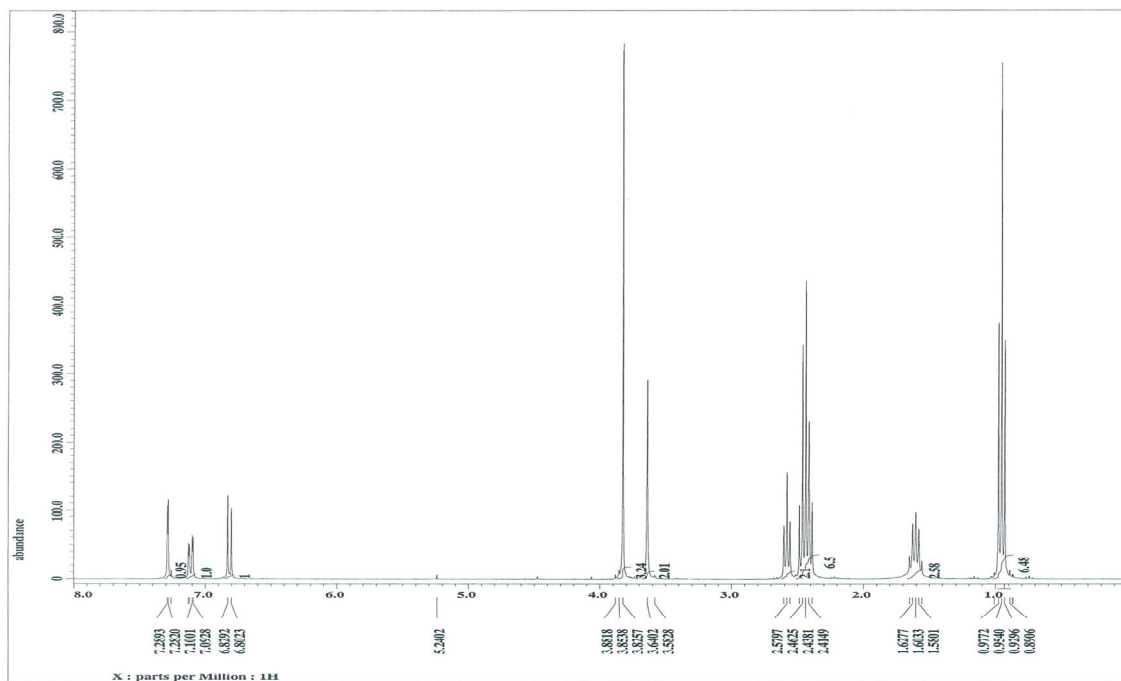
(27) *N*¹-(3-Chloro-4-methoxybenzyl)-*N*²,*N*²-diethylethane-1,2-diamine



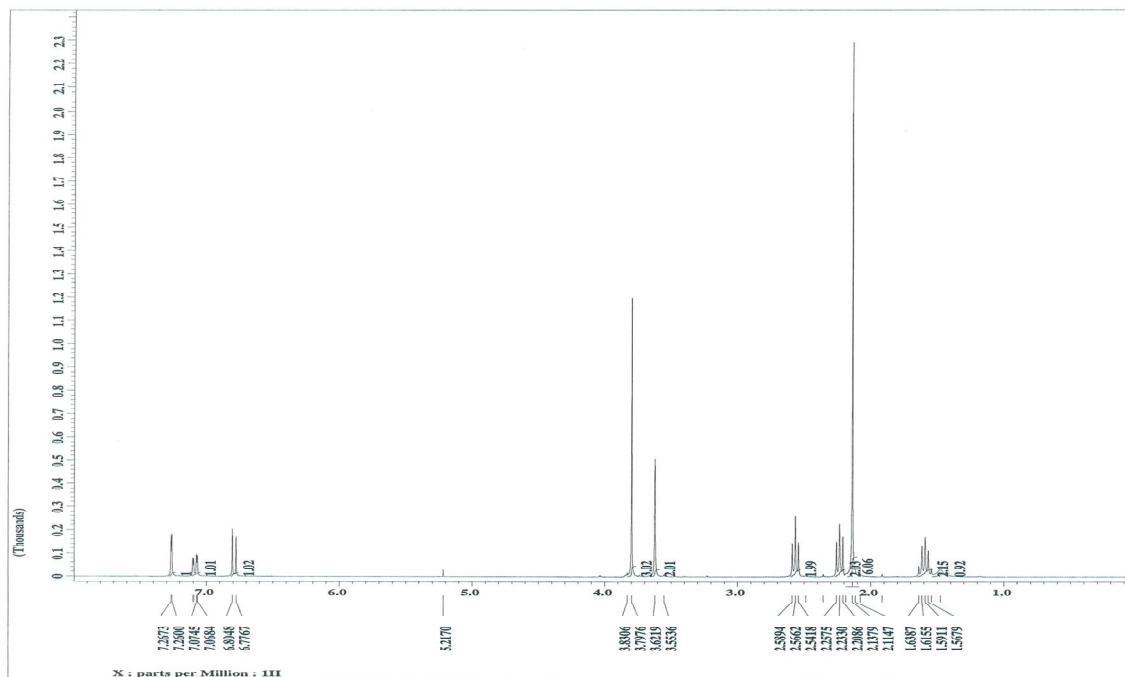
(28) *N*¹-(3-Chloro-4-methoxybenzyl)-*N*²,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine



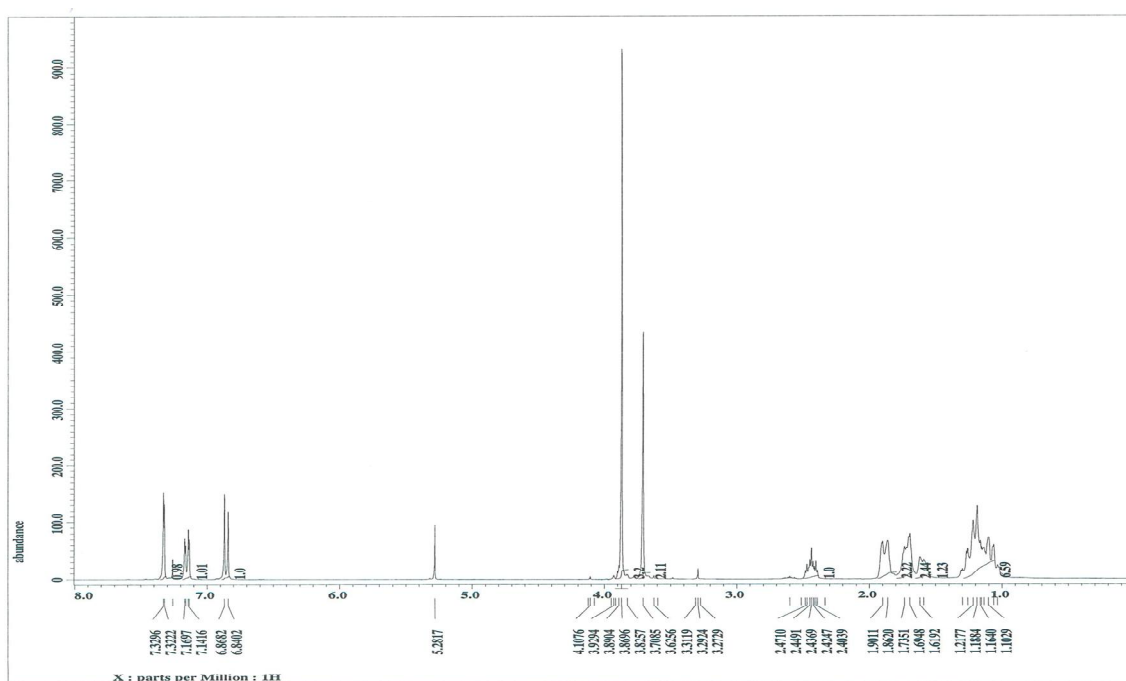
(29) N^1 -(3-Chloro-4-methoxybenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



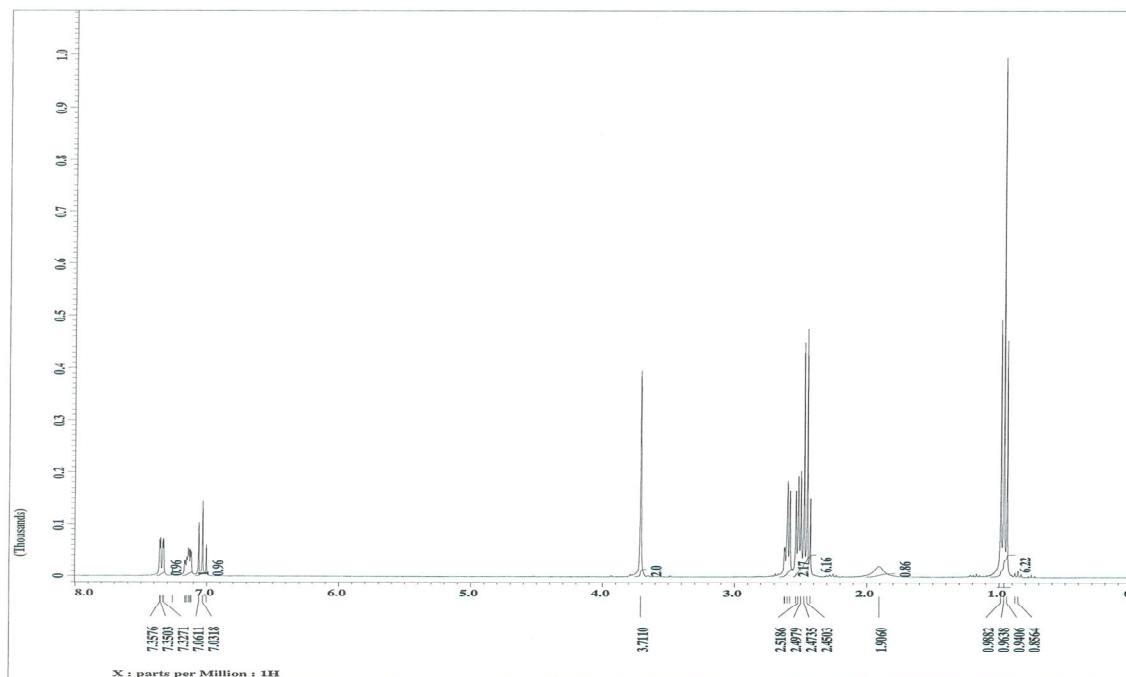
(30) N^1 -(3-Chloro-4-methoxybenzyl)- N^2, N^2 -dimethylpropane-1,3-diamine



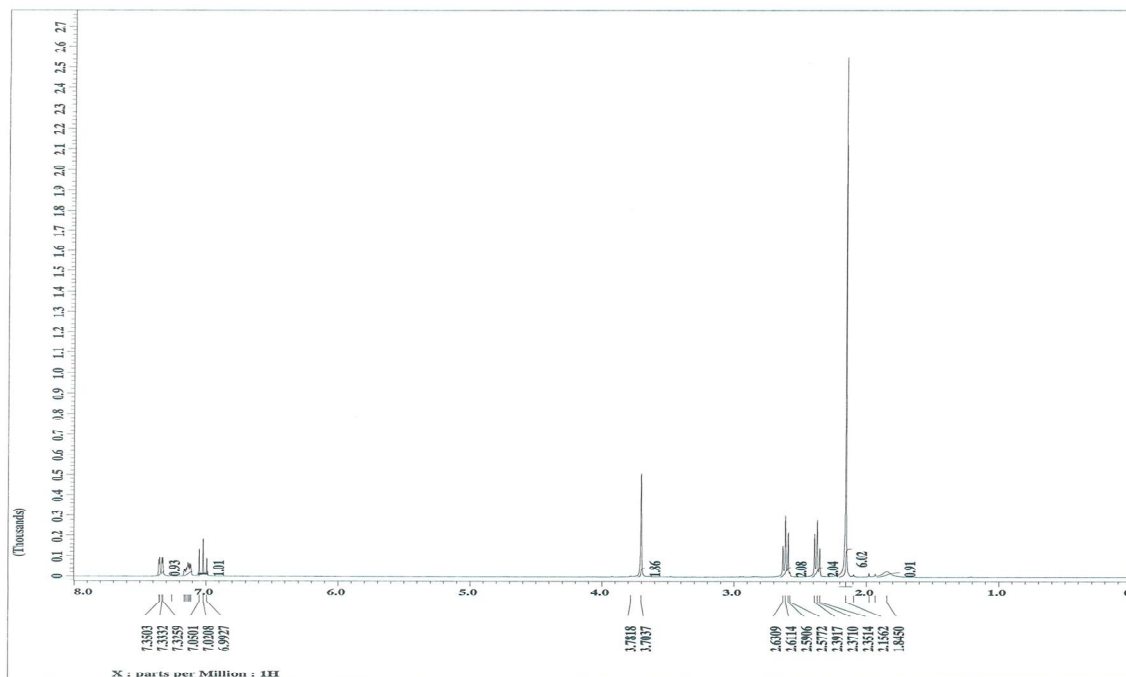
(31) (3-Chloro-4-methoxybenzyl)cyclohexylamine



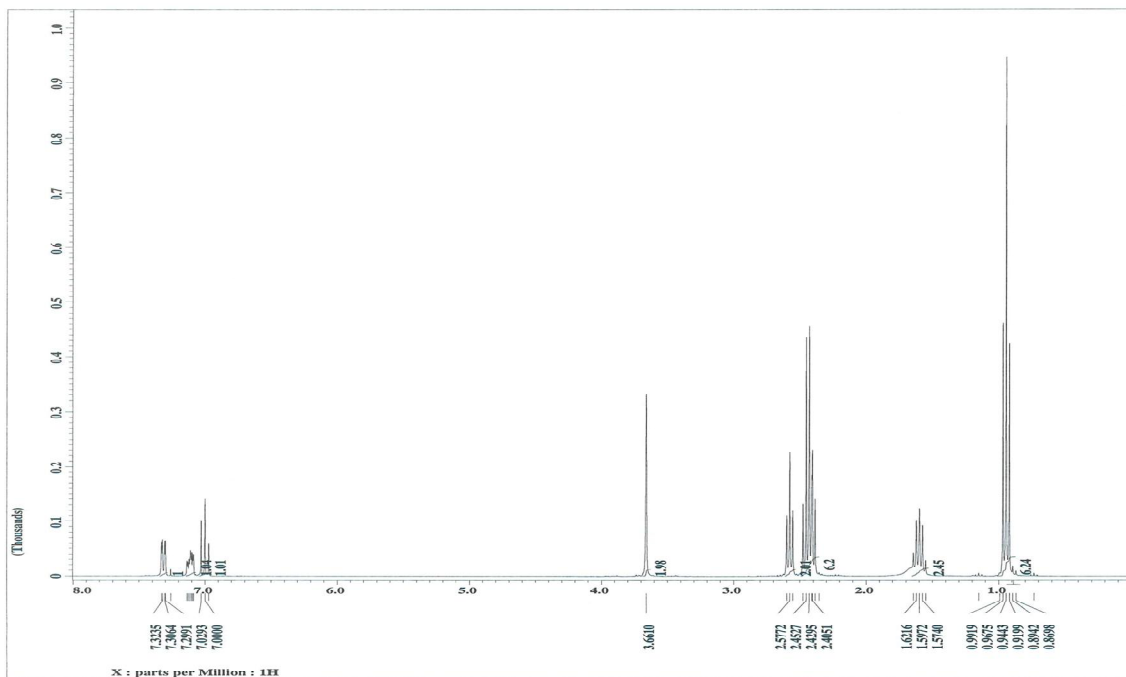
(32) N^1 -(3-Chloro-4-fluorobenzyl)- N^2, N^2 -diethylethane-1,2-diamine



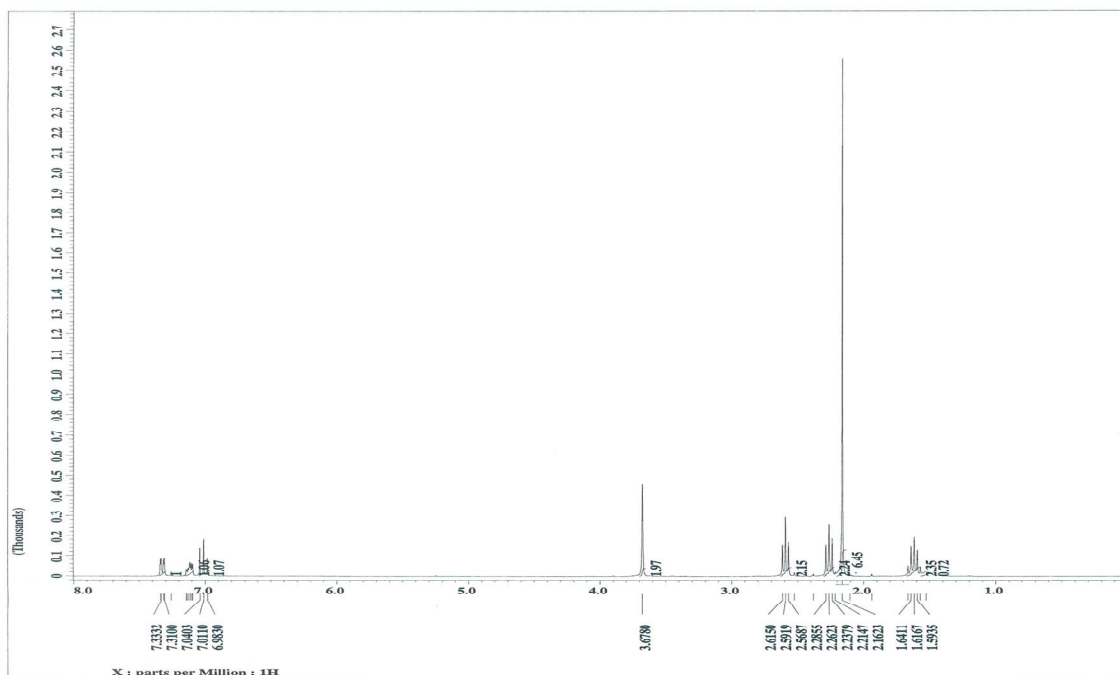
(33) N^1 -(3-Chloro-4-fluorobenzyl)- N^2, N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



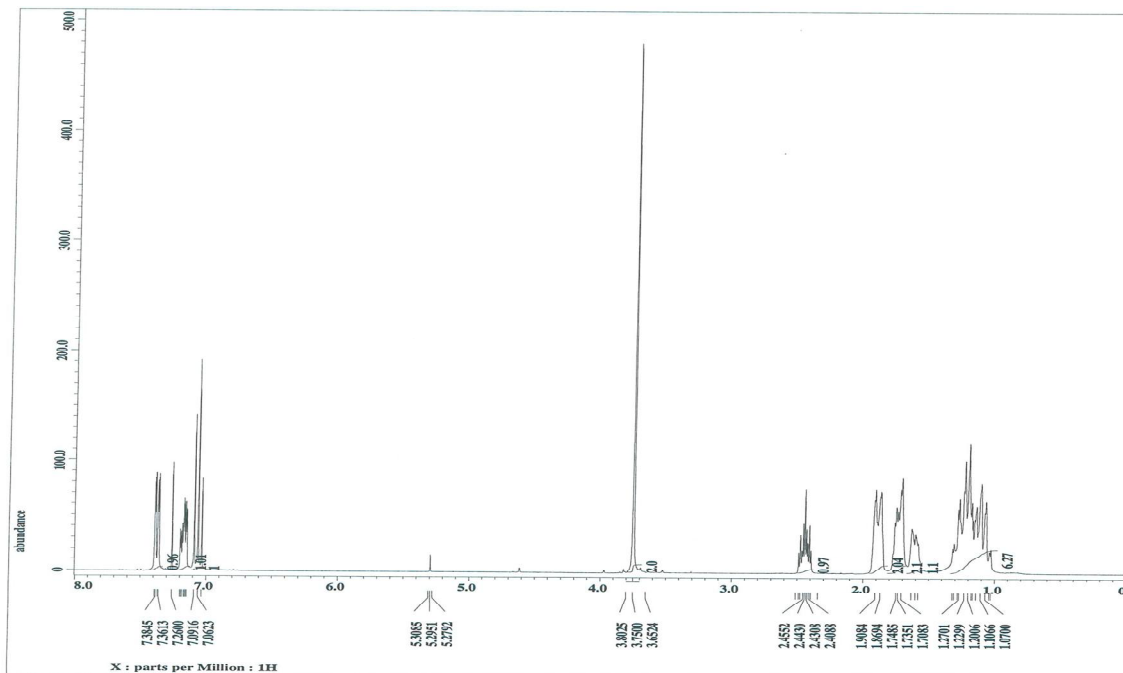
(34) N^1 -(3-Chloro-4-fluorobenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



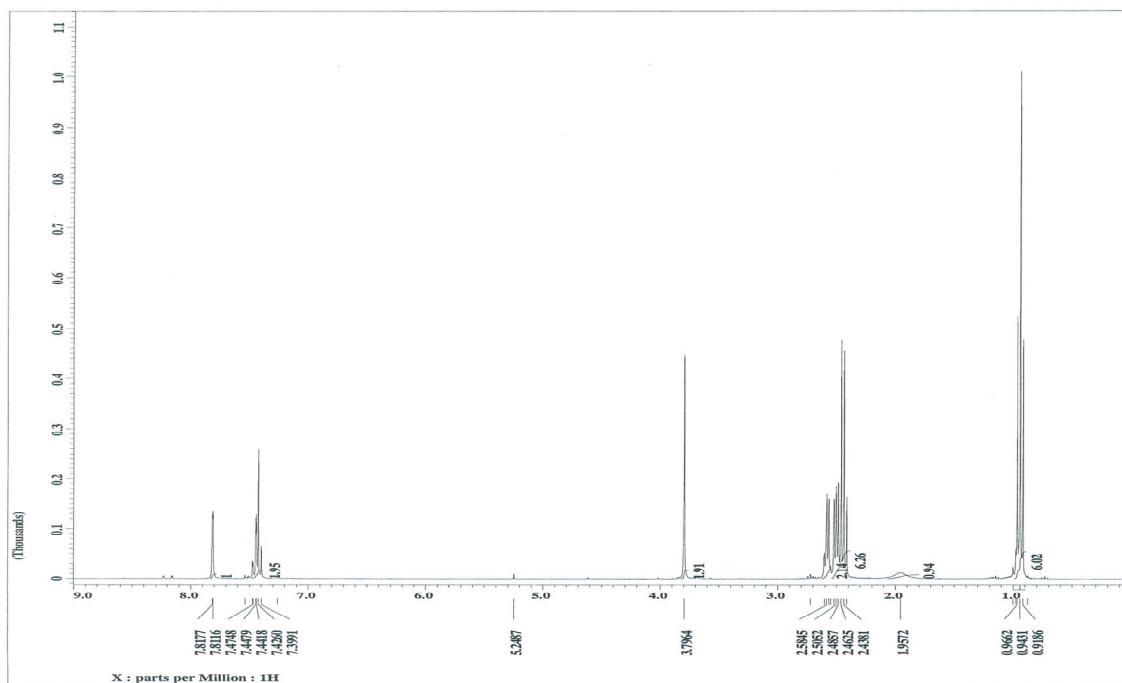
(35) N^1 -(3-Chloro-4-fluorobenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



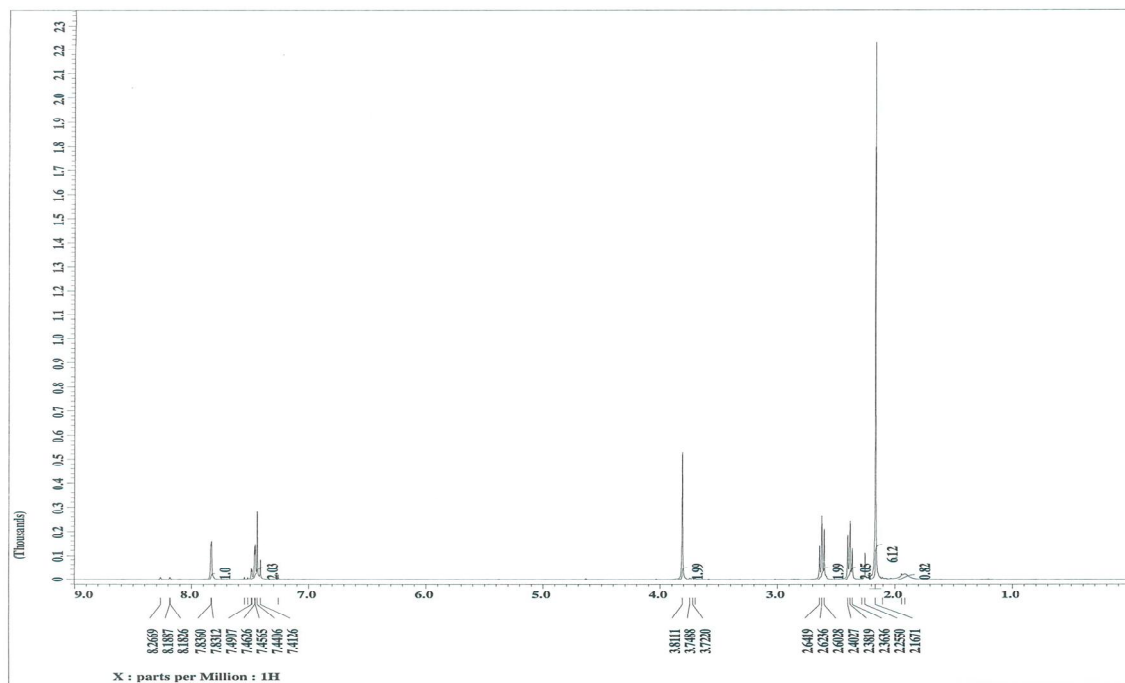
(36) (3-Chloro-4-fluorobenzyl)cyclohexylamine



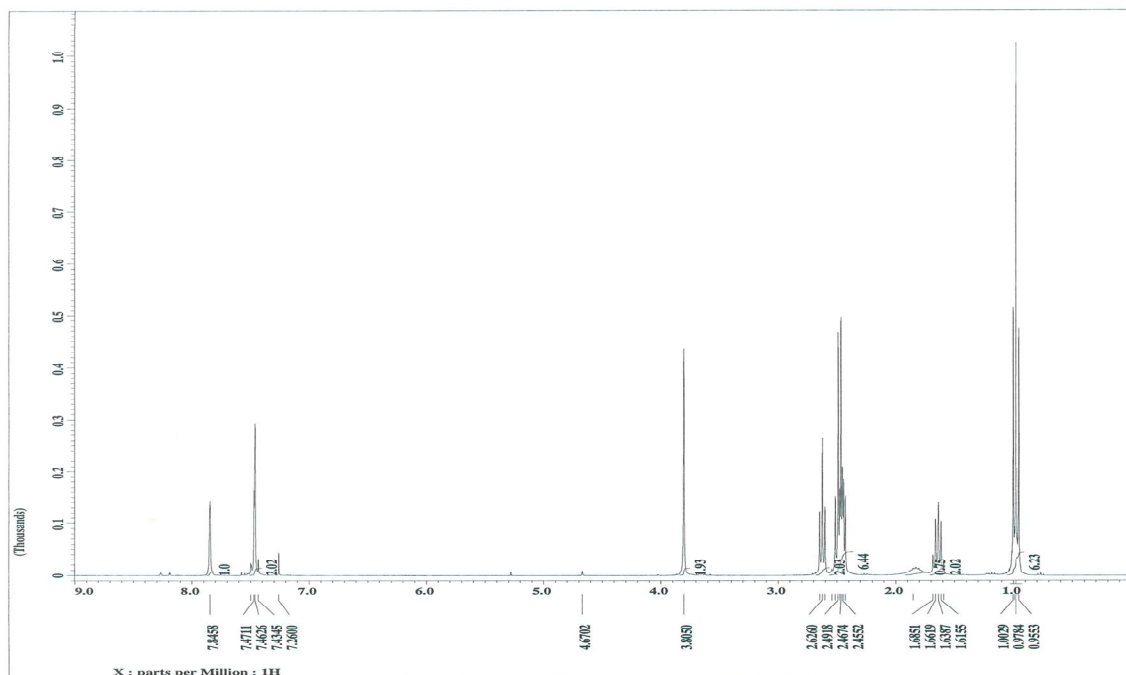
(37) N^1 -(4-Chloro-3-nitrobenzyl)- N^2, N^2 -diethylethane-1,2-diamine



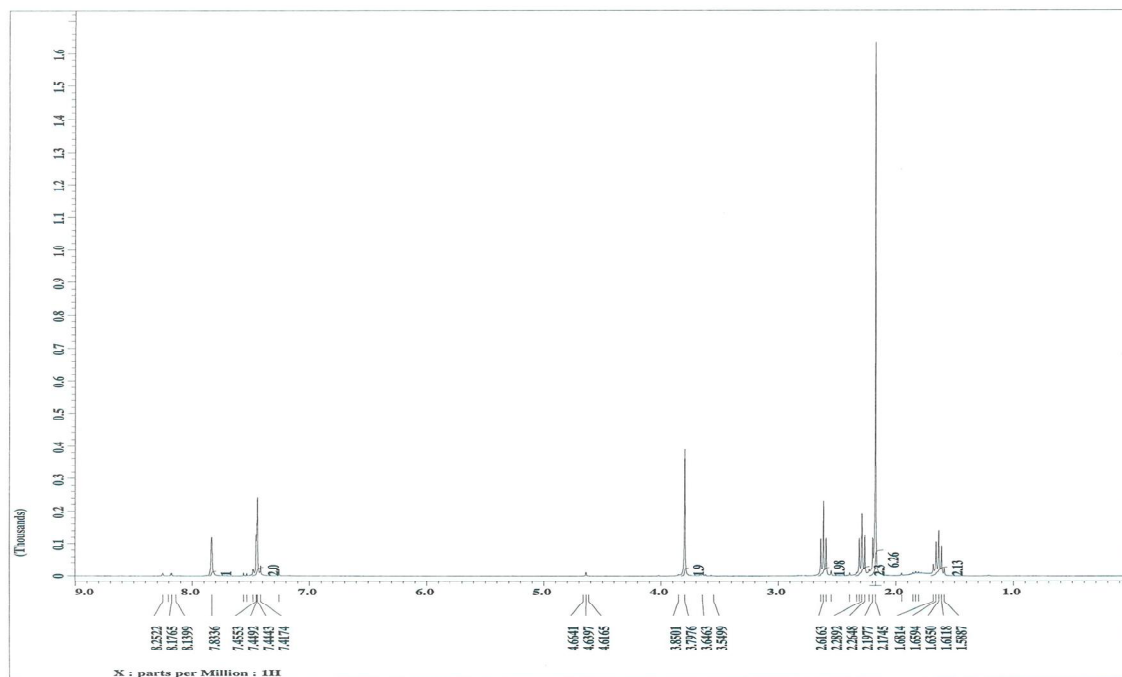
(38) N^1 -(4-Chloro-3-nitrobenzyl)- N^2, N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



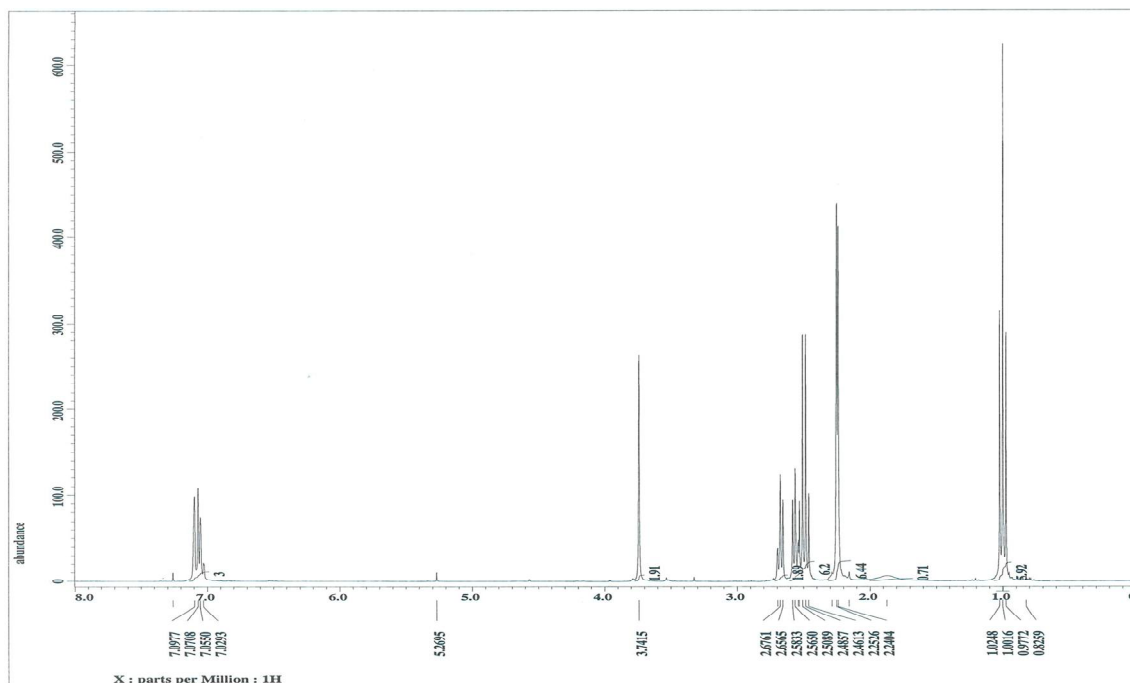
(39) N^1 -(4-Chloro-3-nitrobenzyl)- N^3,N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



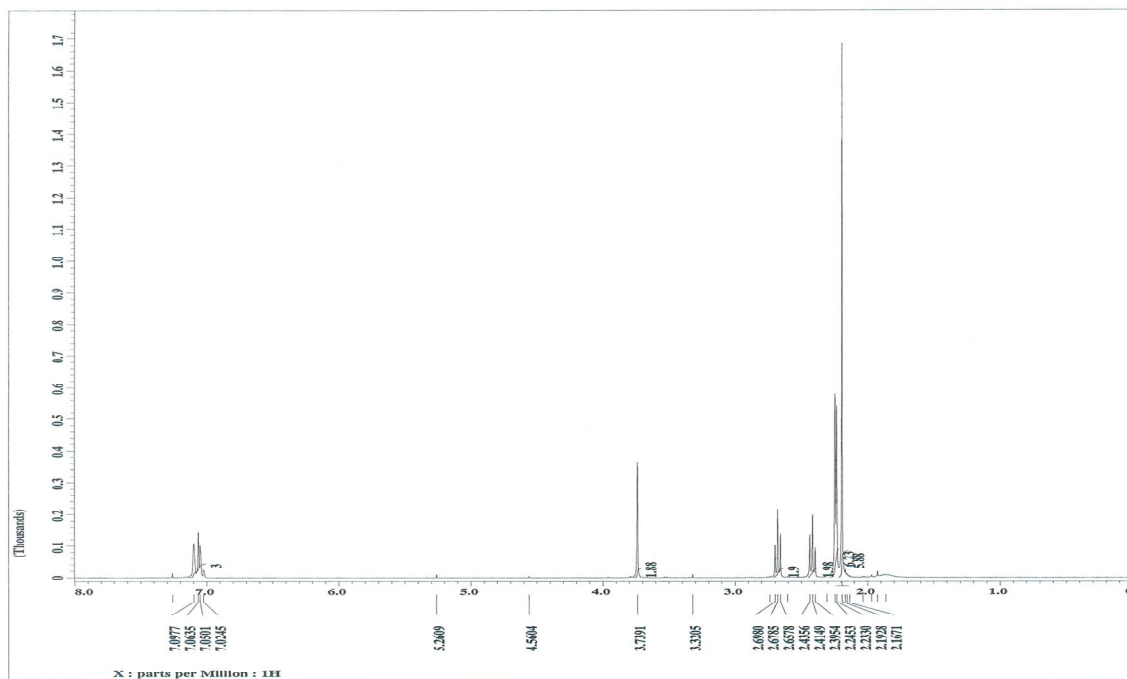
(40) N^1 -(4-Chloro-3-nitrobenzyl)- N^3,N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



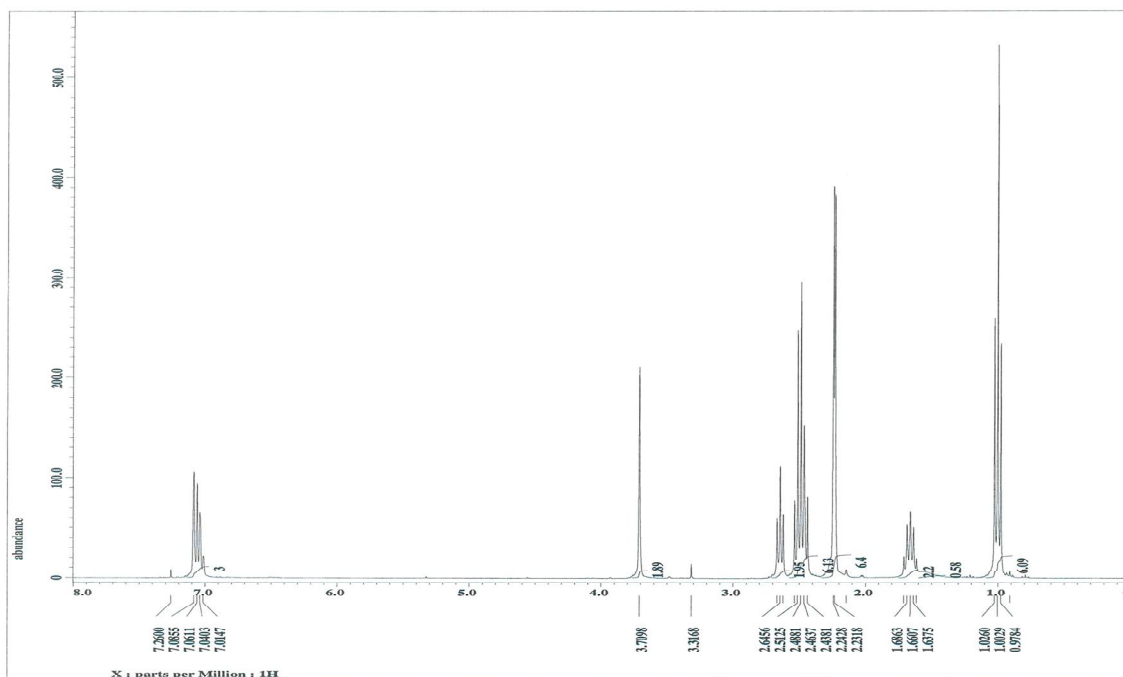
(41) N^1 -(3,4-Dimethylbenzyl)- N^2,N^2 -diethylethane-1,2-diamine



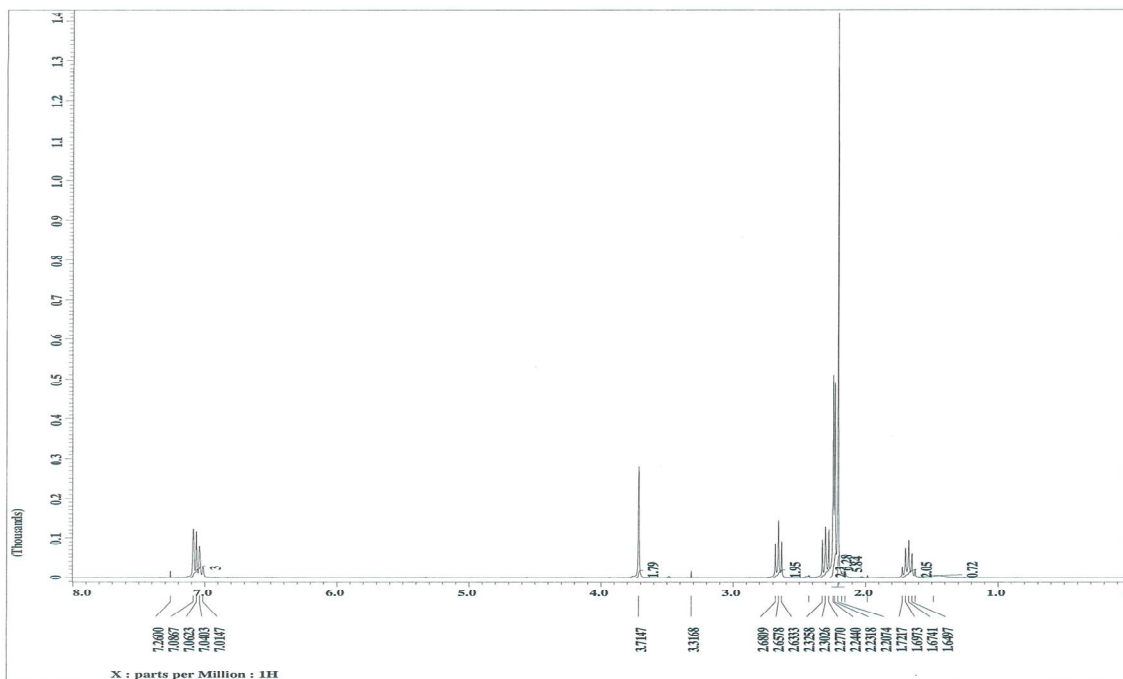
(42) N^1 -(3,4-Dimethylbenzyl)- N^2,N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



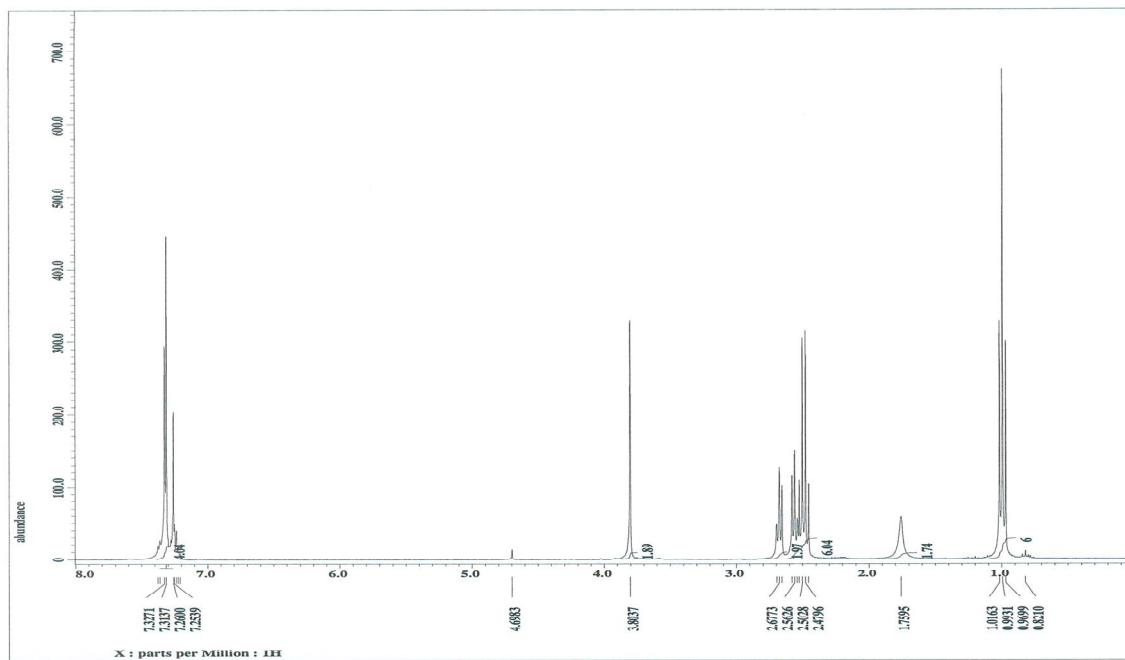
(43) N^1 -(3,4-Dimethylbenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



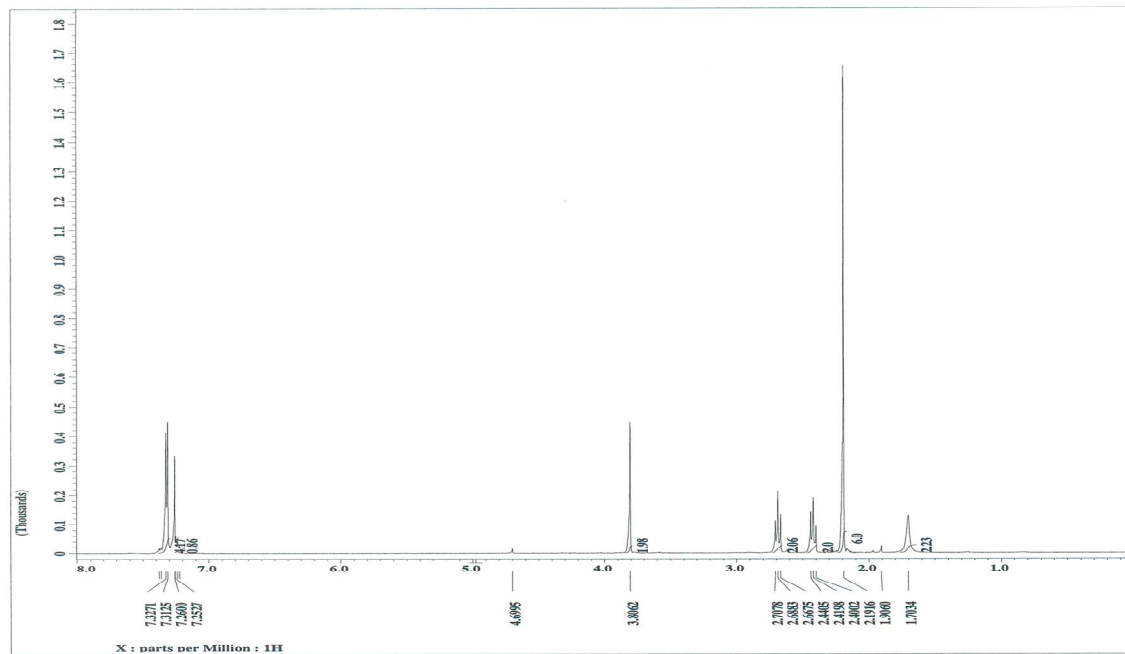
(44) N^1 -(3,4-Dimethylbenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



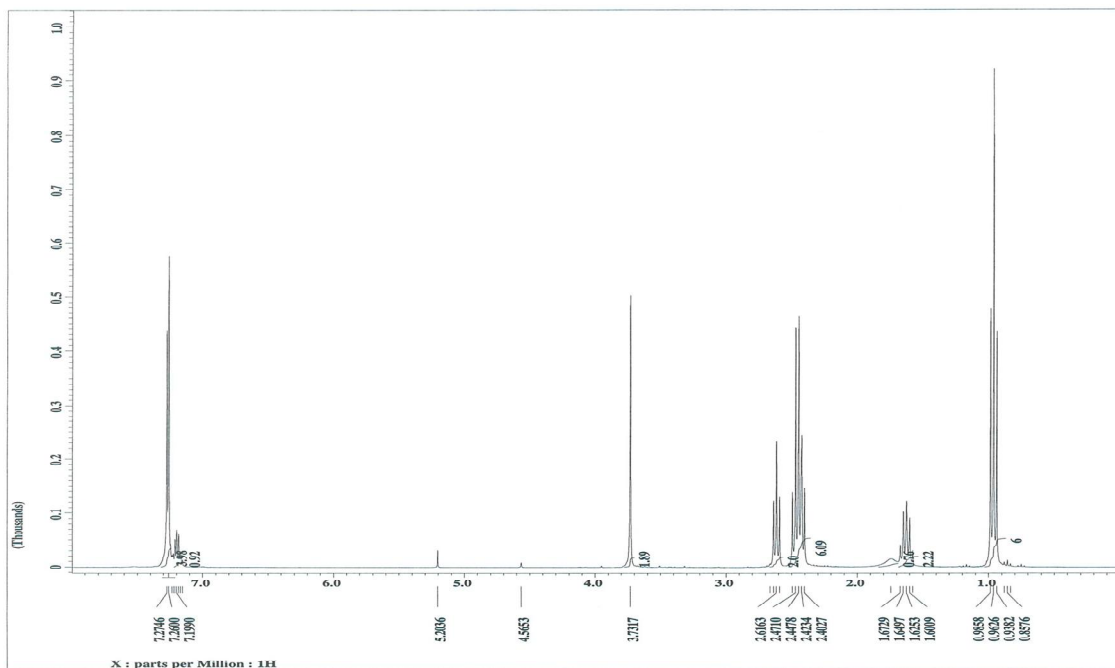
(45) N^1 -Benzyl- N^2,N^2 -diethylethane-1,2-diamine



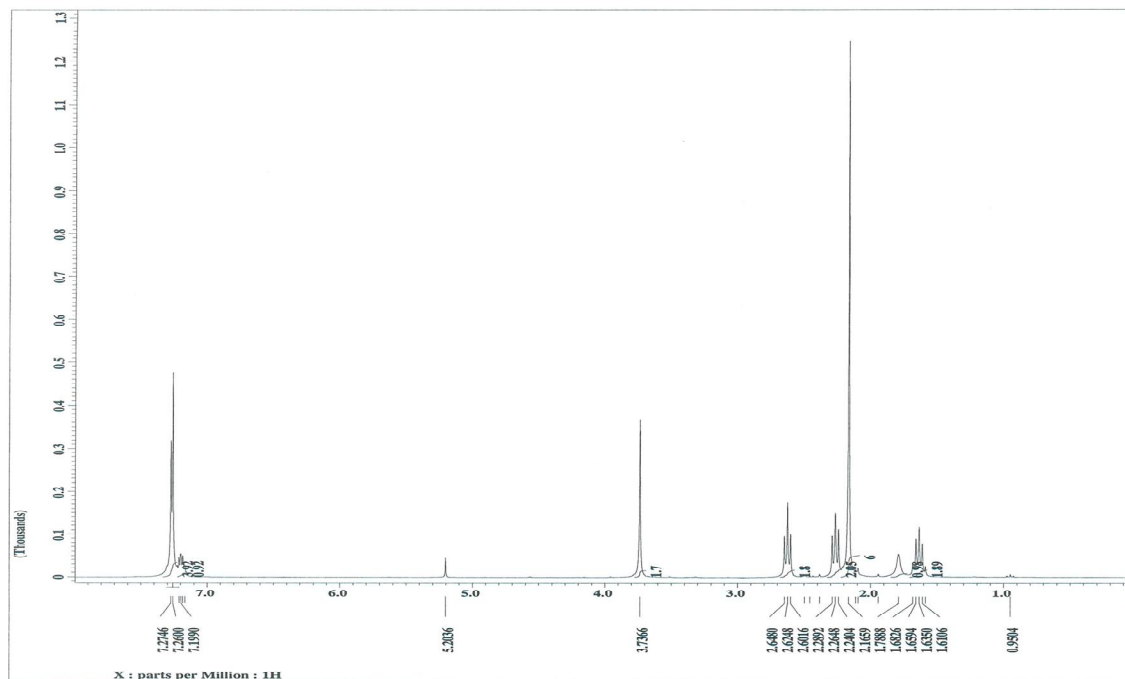
(46) N^1 -Benzyl- N^2,N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



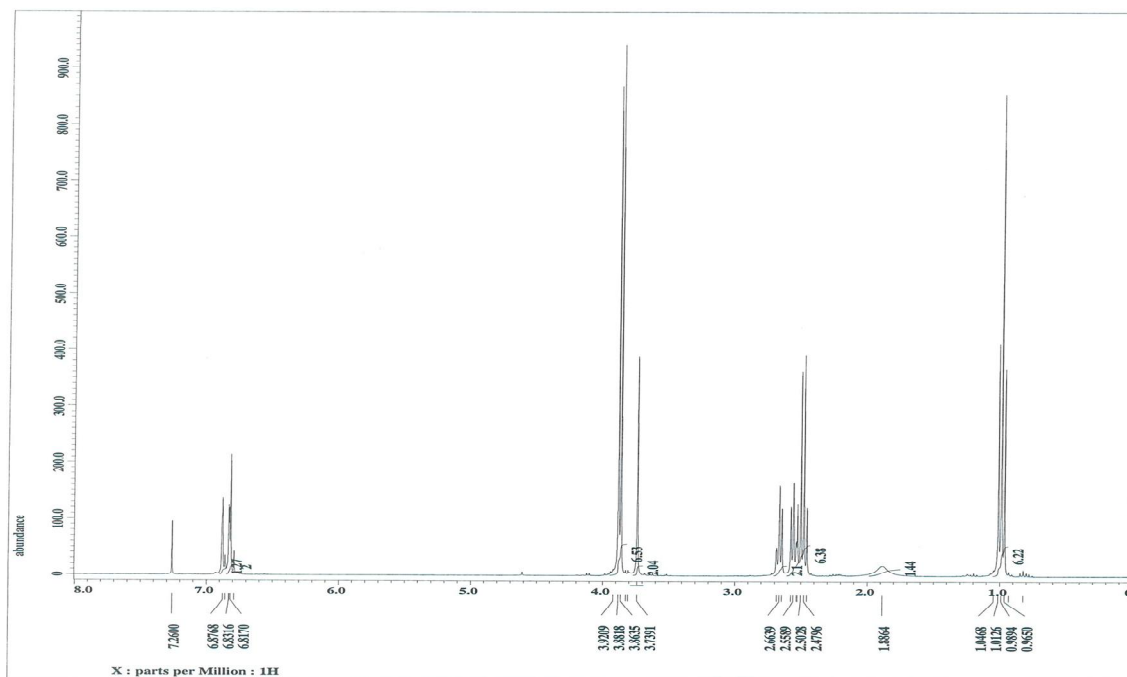
(47) N^1 -Benzyl- N^3,N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



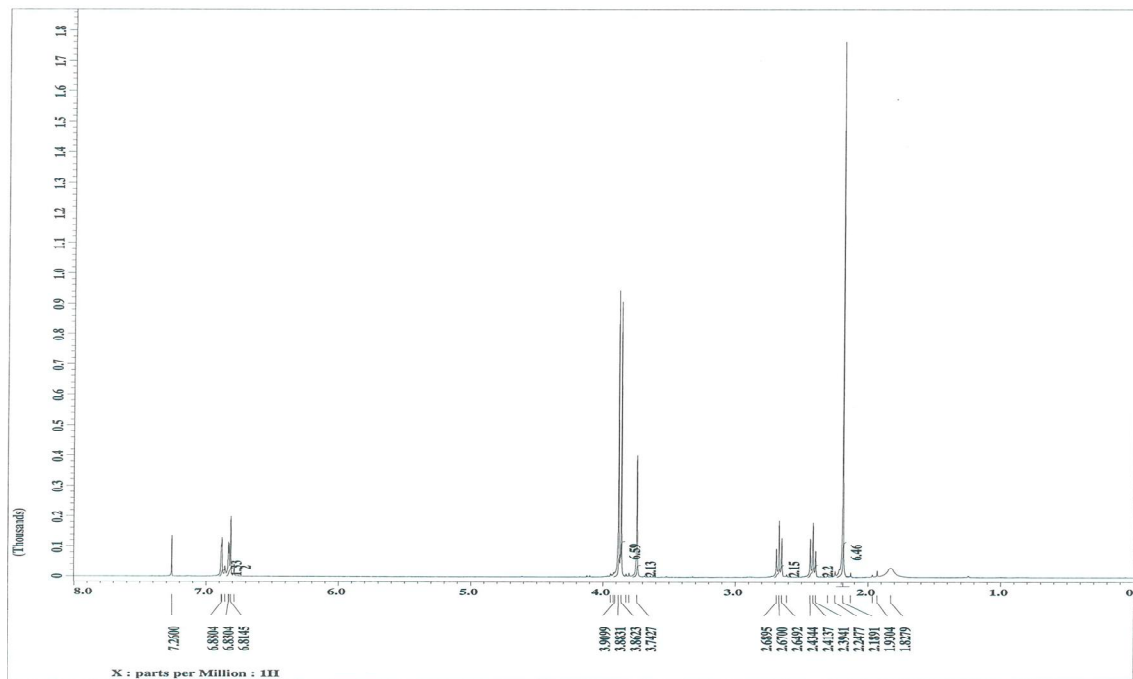
(48) N^1 -Benzyl- N^3,N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



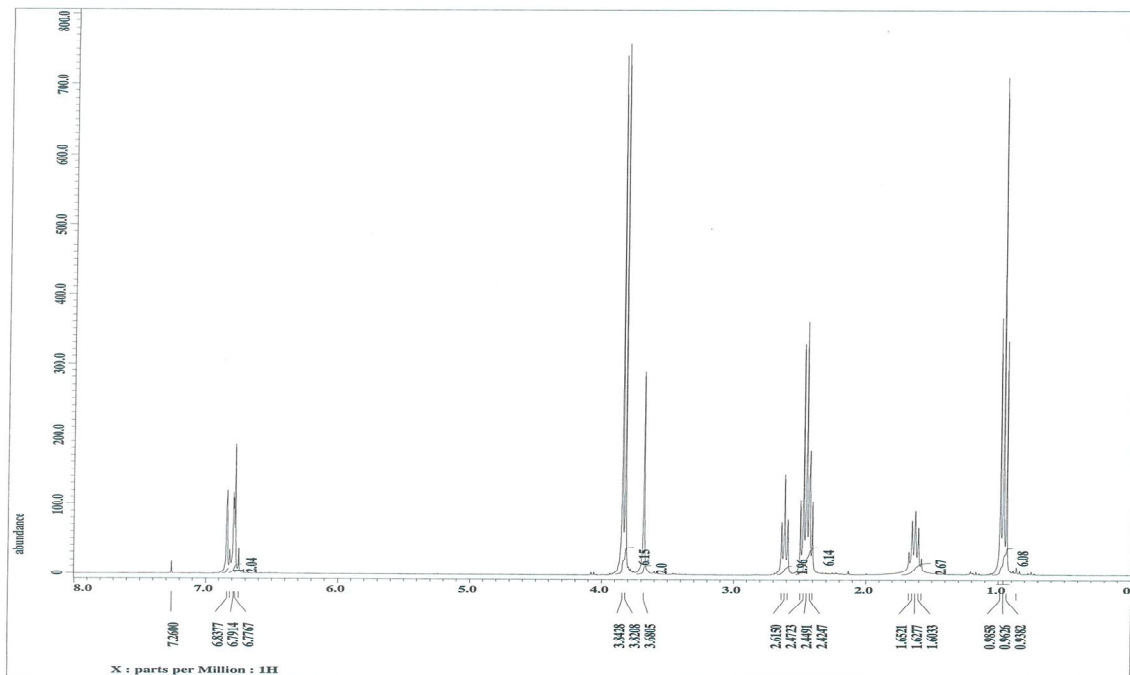
(49) N^1 -(3,4-Dimethoxybenzyl)- N^2,N^2 -diethylethane-1,2-diamine



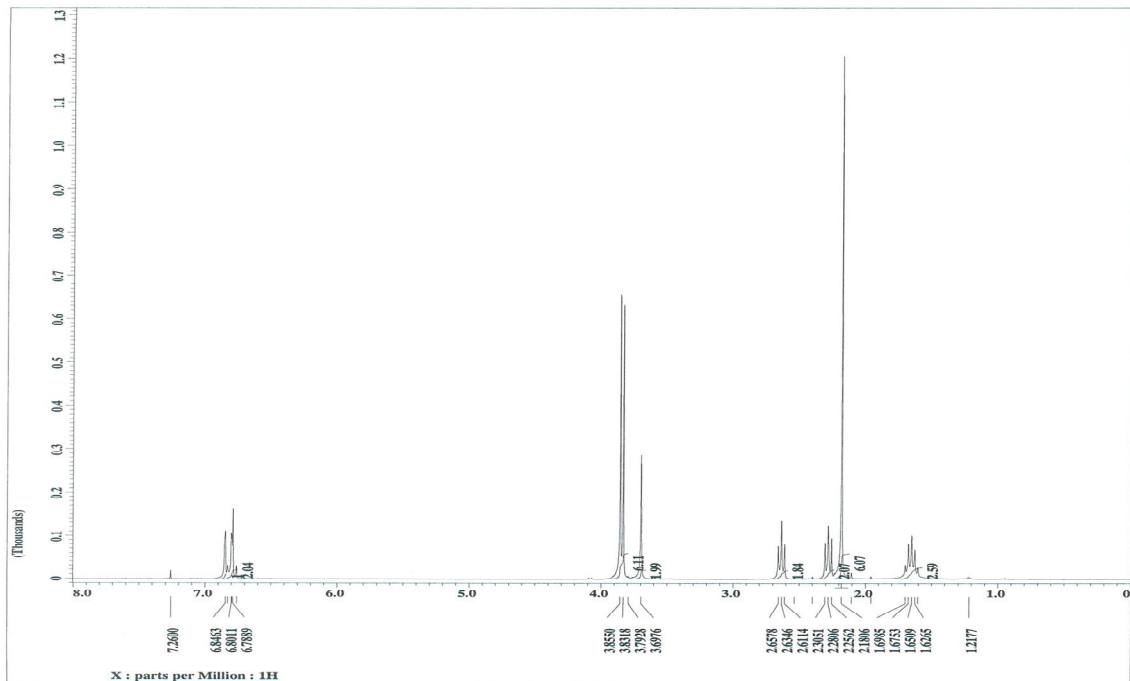
(50) N^1 -(3,4-Dimethoxybenzyl)- N^2,N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



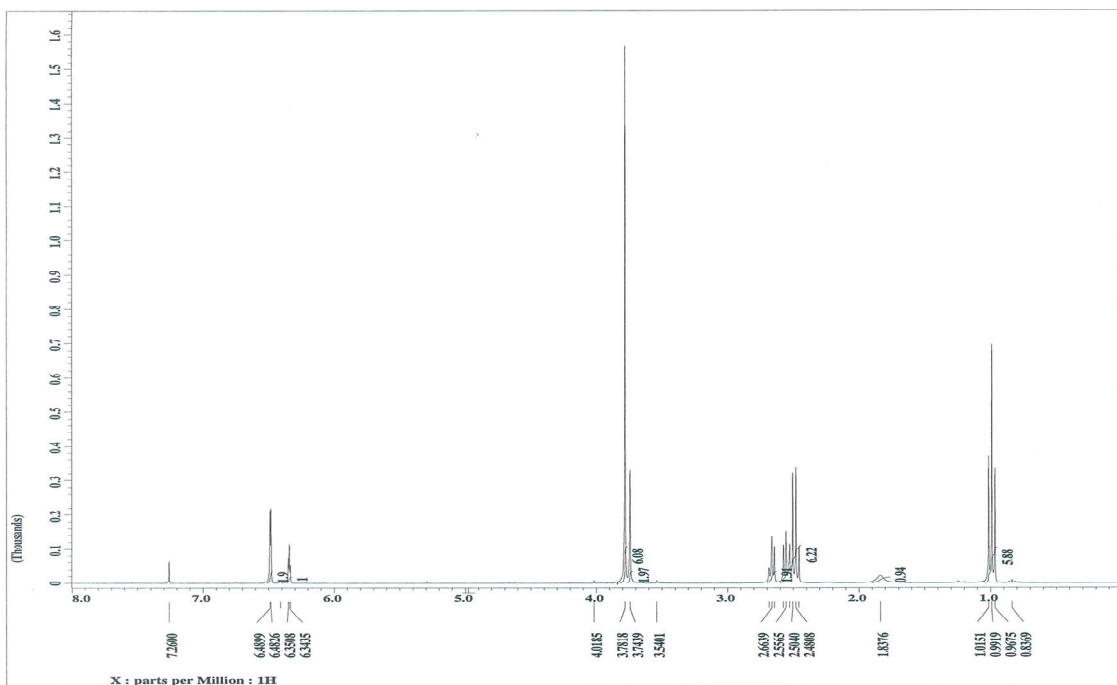
(51) N^1 -(3,4-Dimethoxybenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



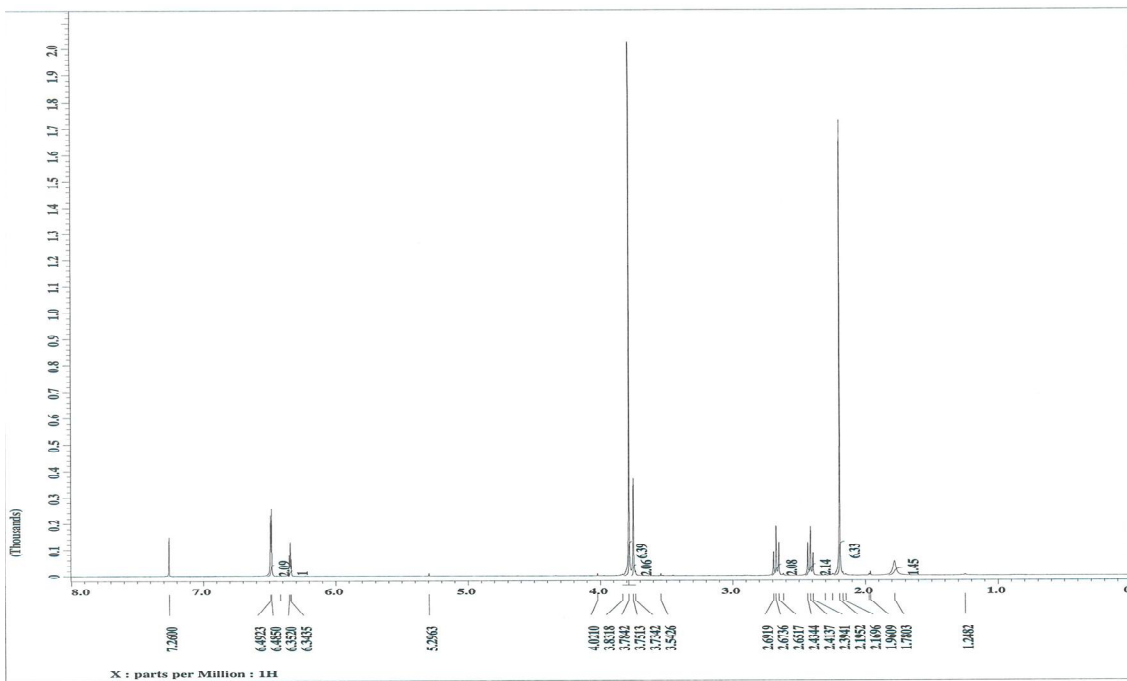
(52) N^1 -(3,4-Dimethoxybenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



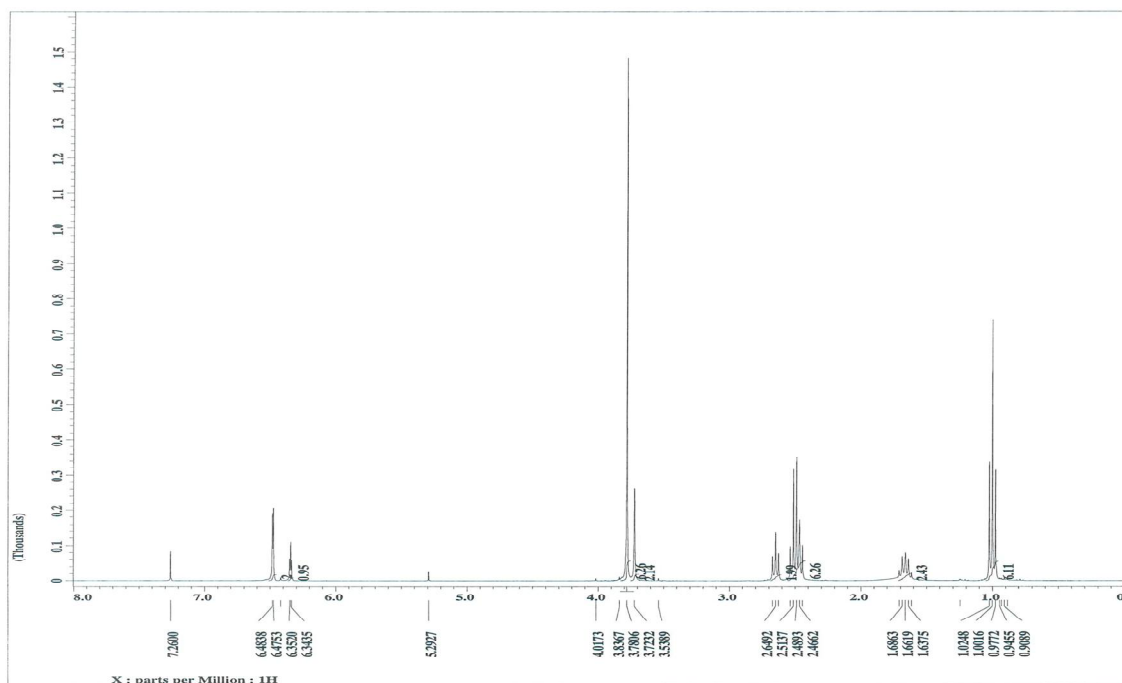
(53) N^1 -(3,5-Dimethoxybenzyl)- N^2,N^2 -diethylethane-1,2-diamine



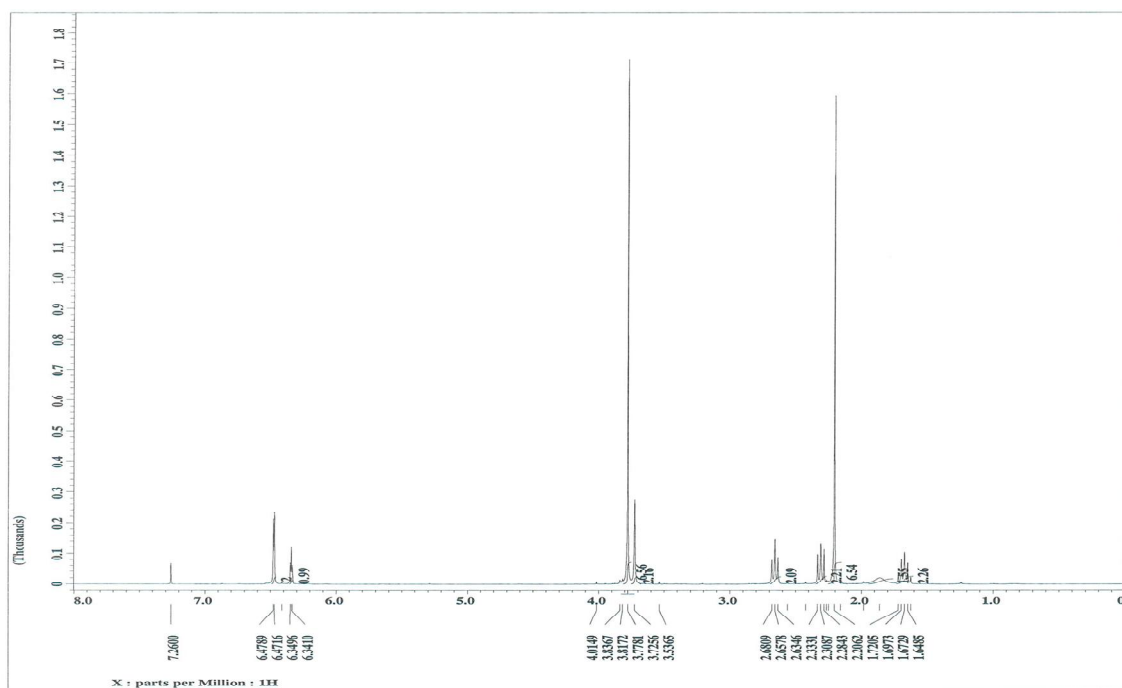
(54) N^1 -(3,5-Dimethoxybenzyl)- N^2,N^2 -dimethylethane-1,2-diamine



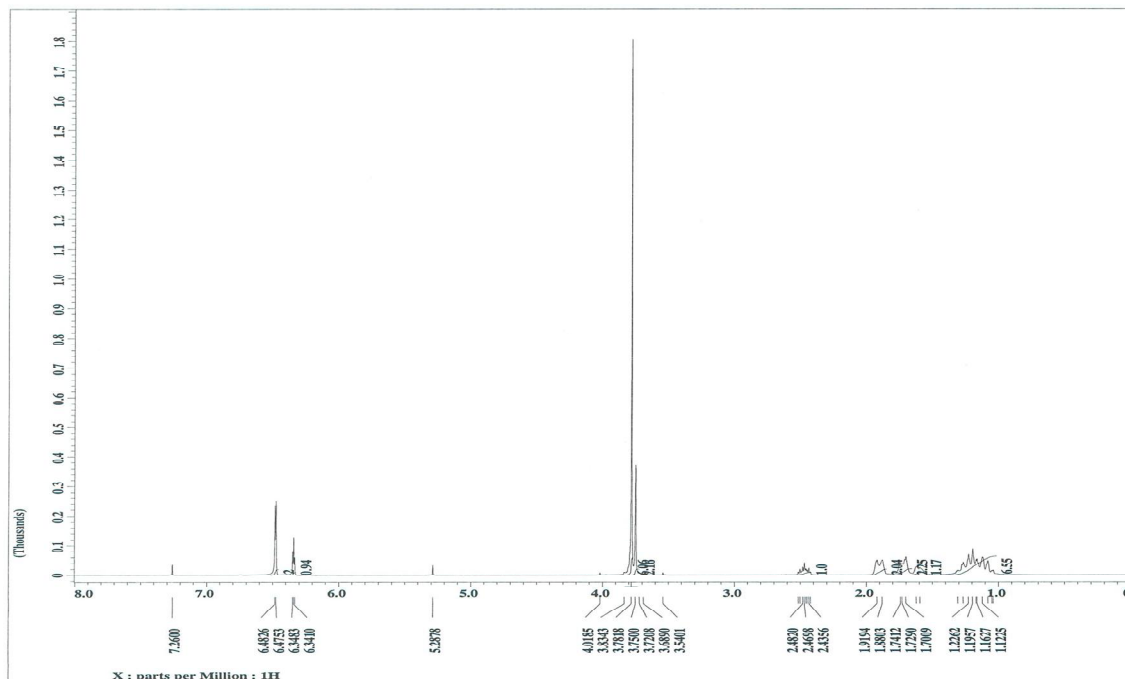
(55) N^1 -(3,5-Dimethoxybenzyl)- N^3, N^3 -diethylpropane-1,3-diamine



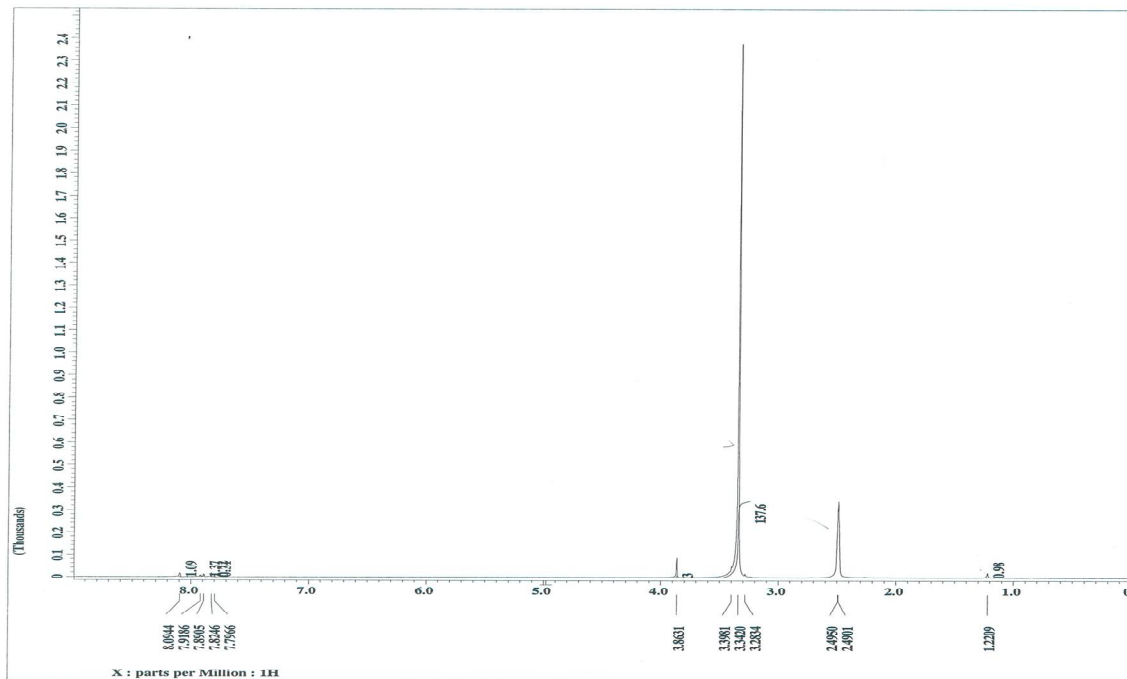
(56) N^1 -(3,5-Dimethoxybenzyl)- N^3, N^3 -dimethylpropane-1,3-diamine



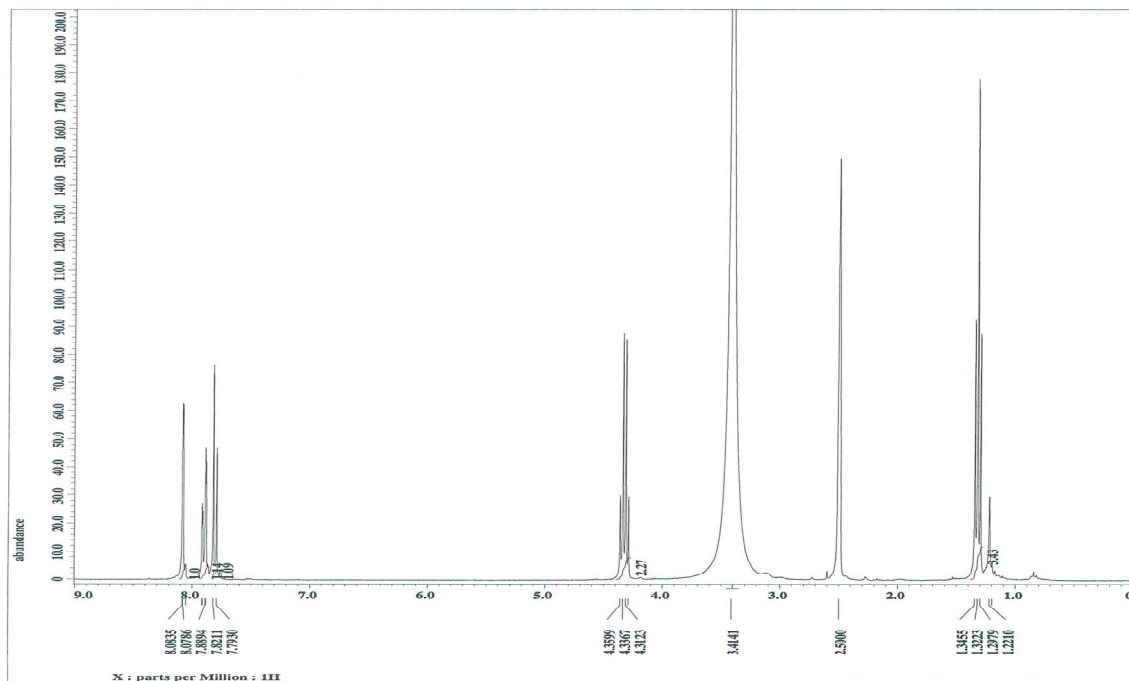
(57) Cyclohexyl-(3,5-dimethoxybenzyl)amine



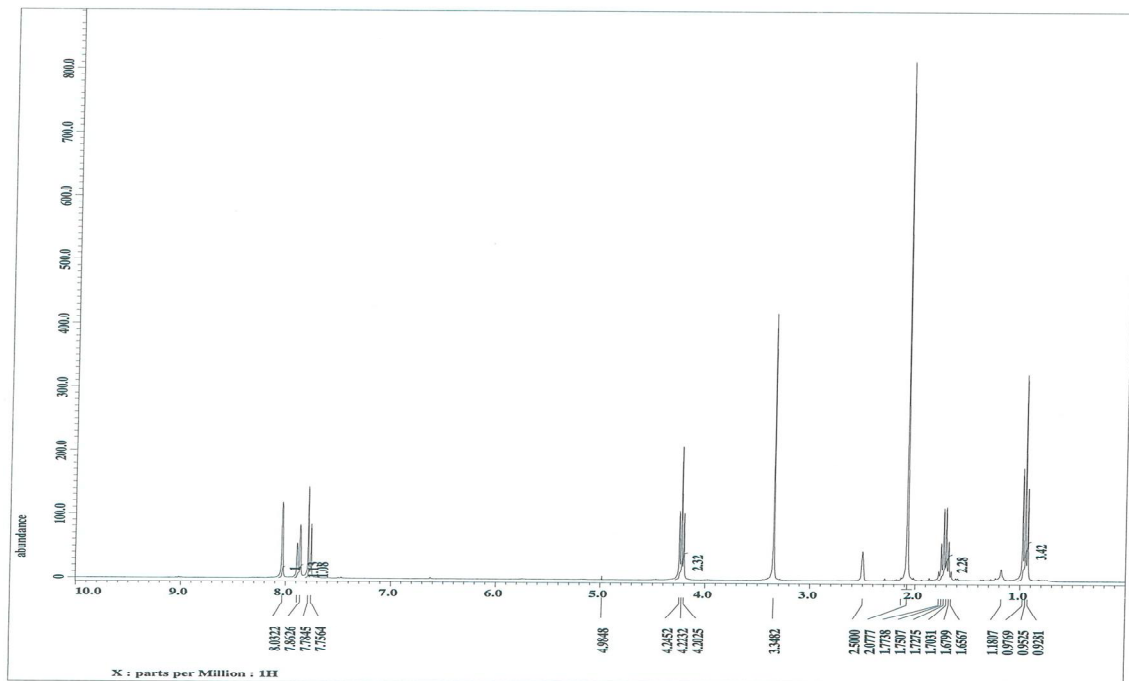
(58) Methyl 3,4-dichlorobenzoate



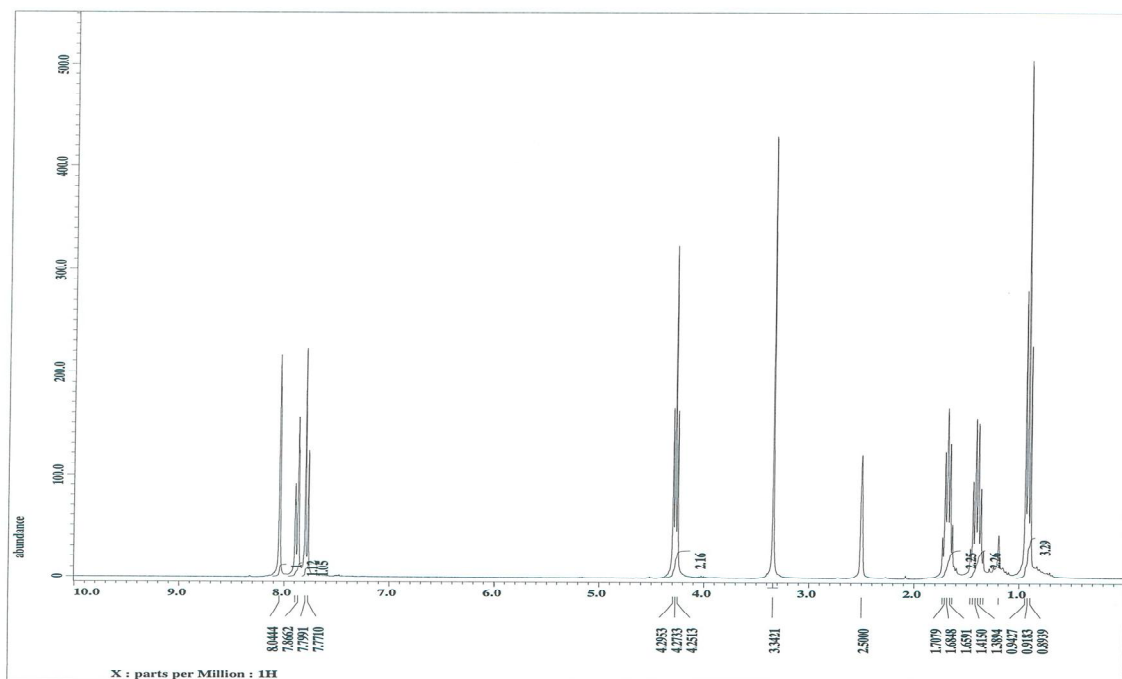
(59) Ethyl 3,4-dichlorobenzoate



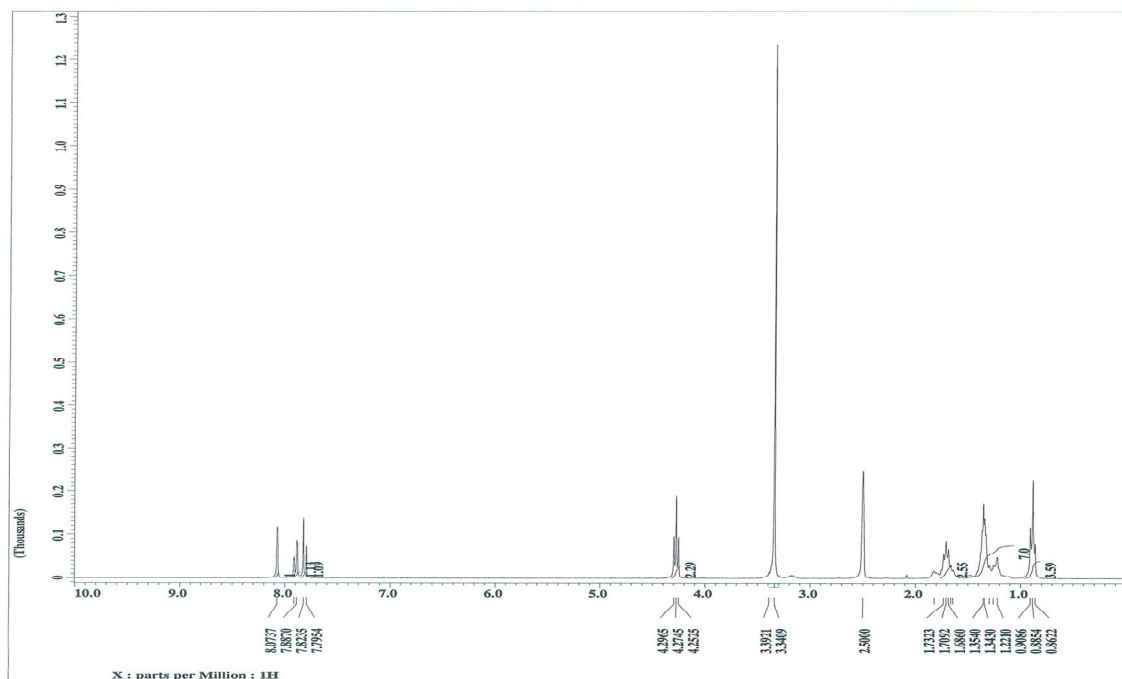
(60) Propyl 3,4-dichlorobenzoate



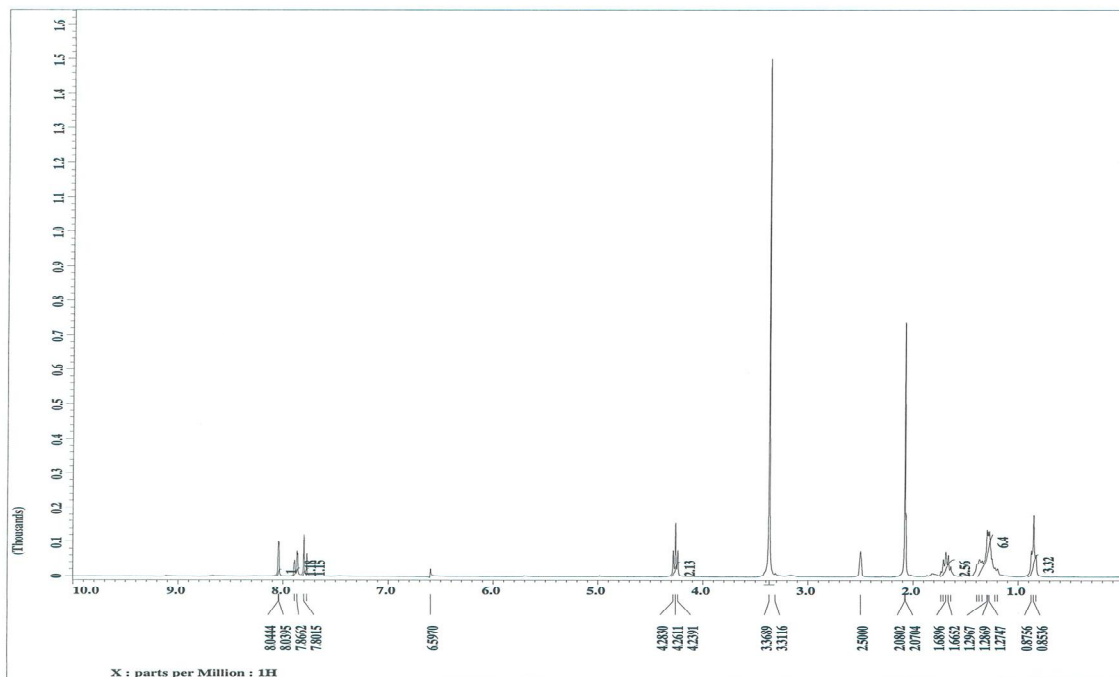
(61) Butyl 3,4-dichlorobenzoate



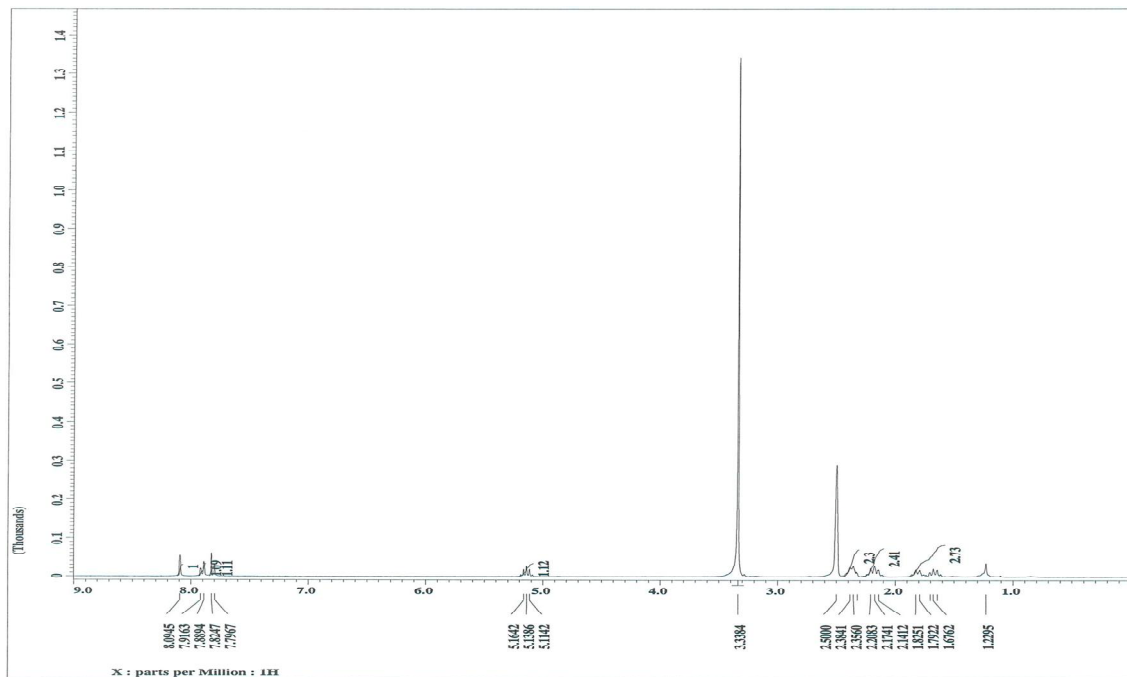
(62) Pentyl 3,4-dichlorobenzoate



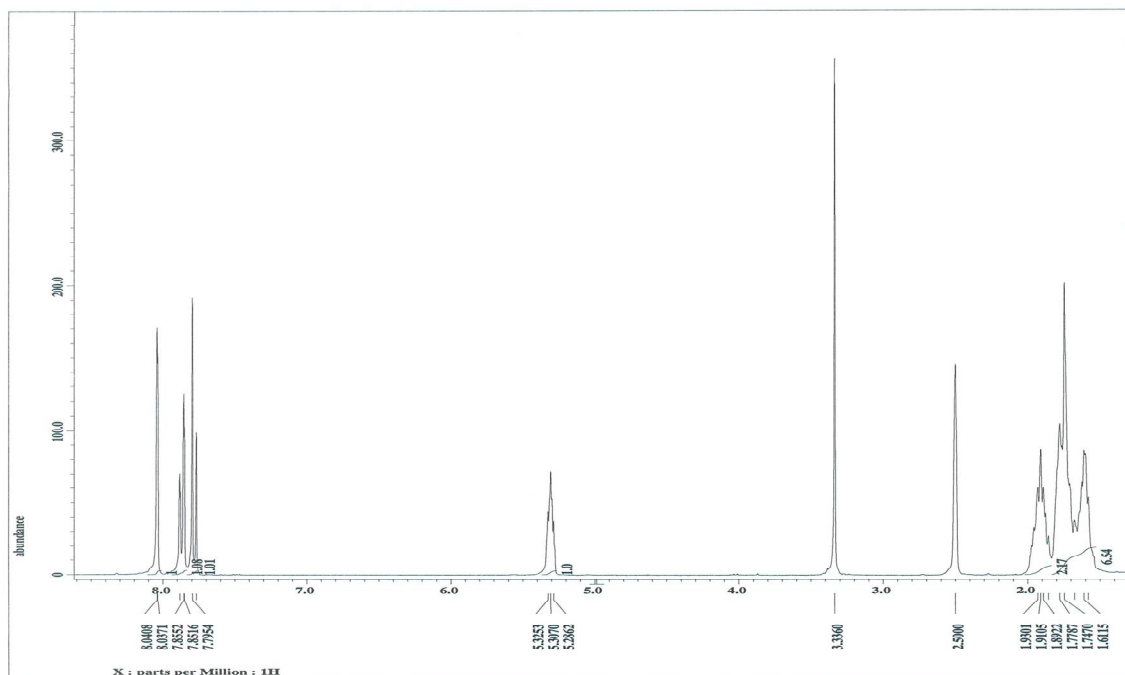
(63) Hexyl 3,4-dichlorobenzoate



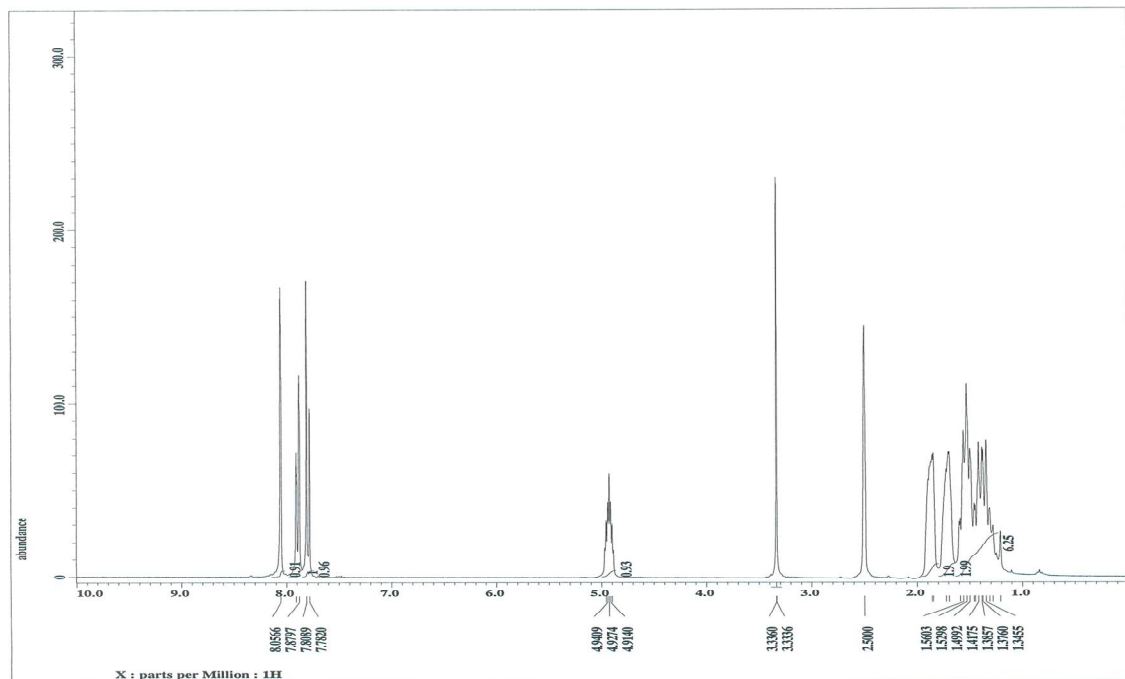
(64) Cyclobutyl 3,4-dichlorobenzoate



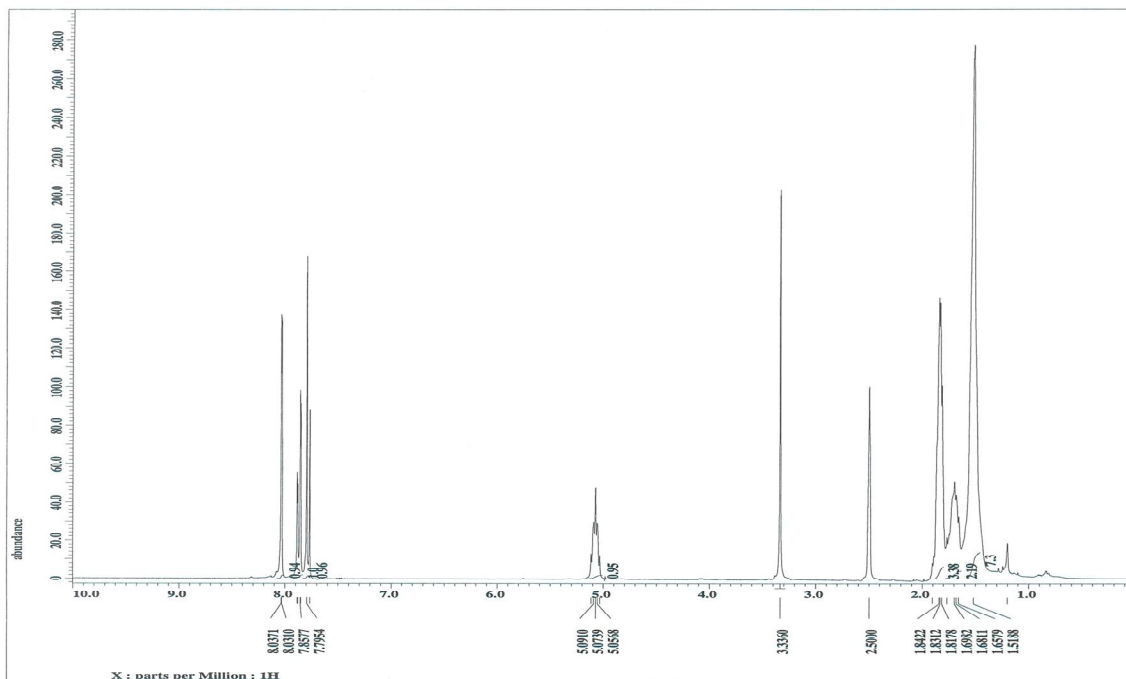
(65) Cyclopentyl 3,4-dichlorobenzoate



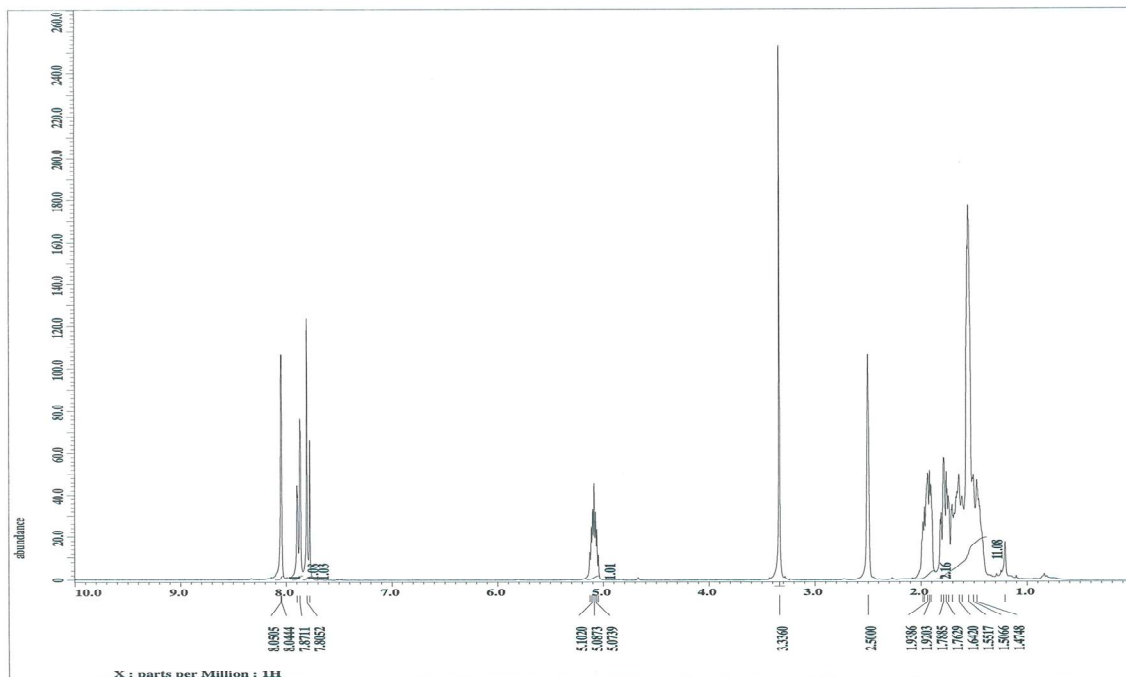
(66) Cyclohexyl 3,4-dichlorobenzoate



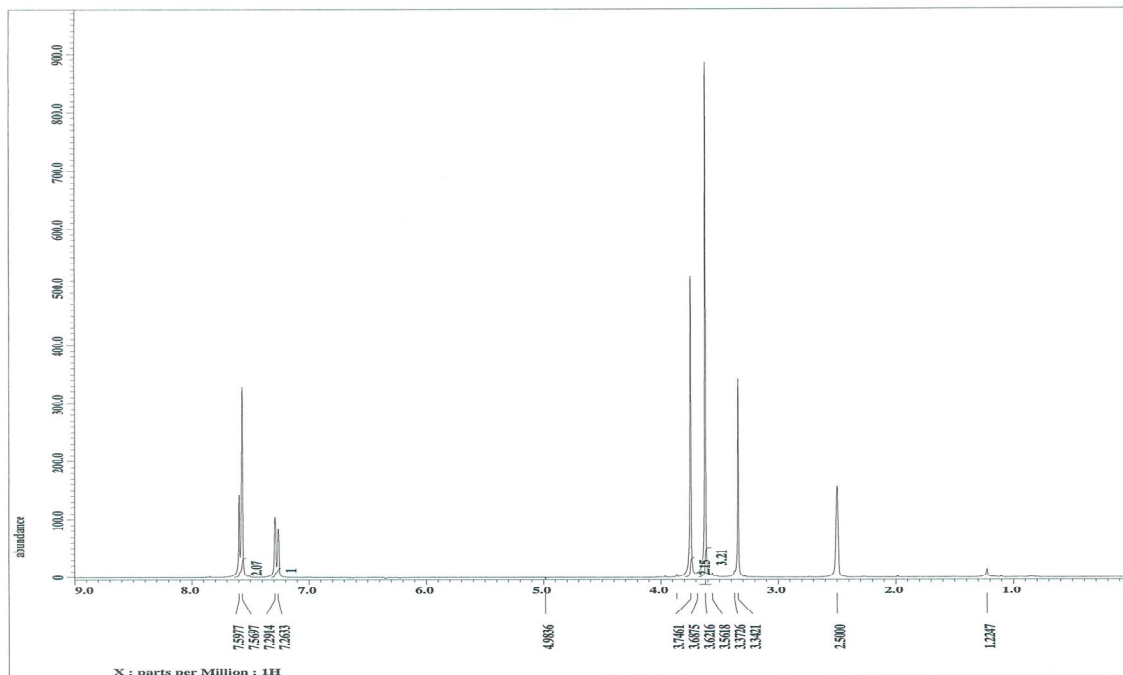
(67) Cycloheptyl 3,4-dichlorobenzoate



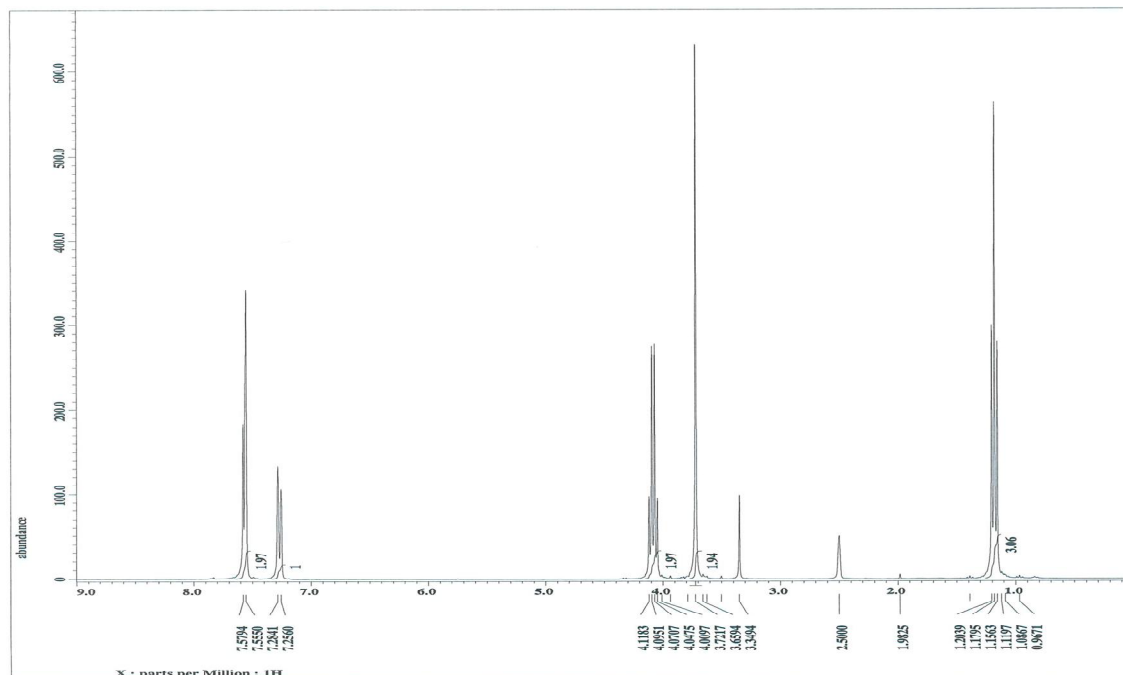
(68) Cyclooctyl 3,4-dichlorobenzoate



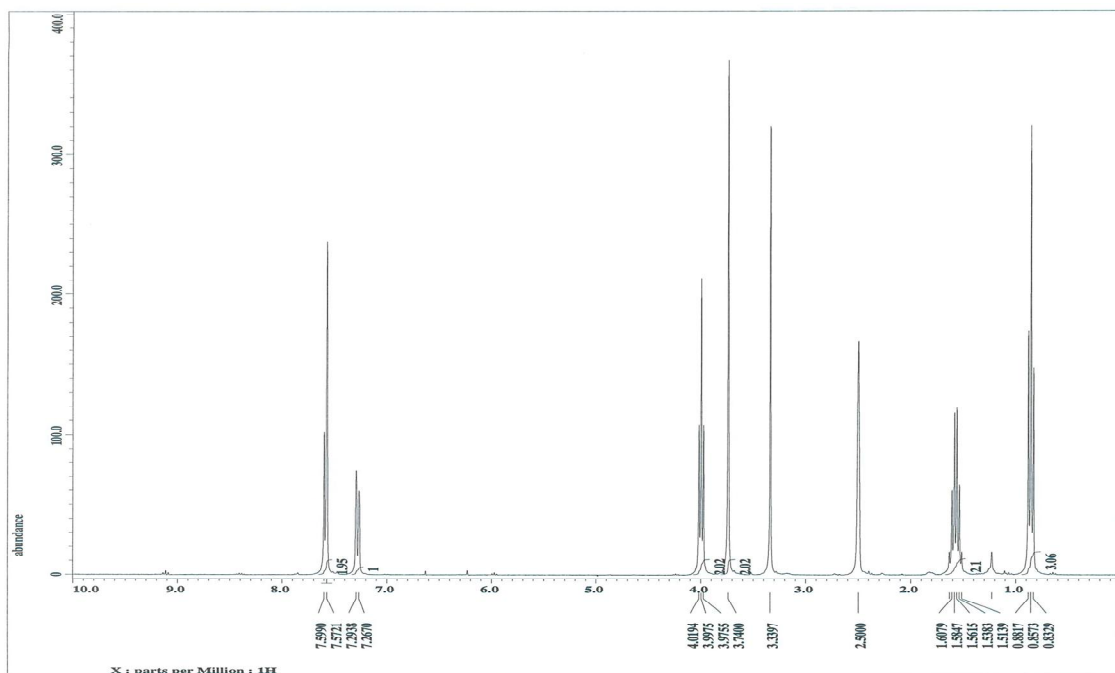
(69) Methyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



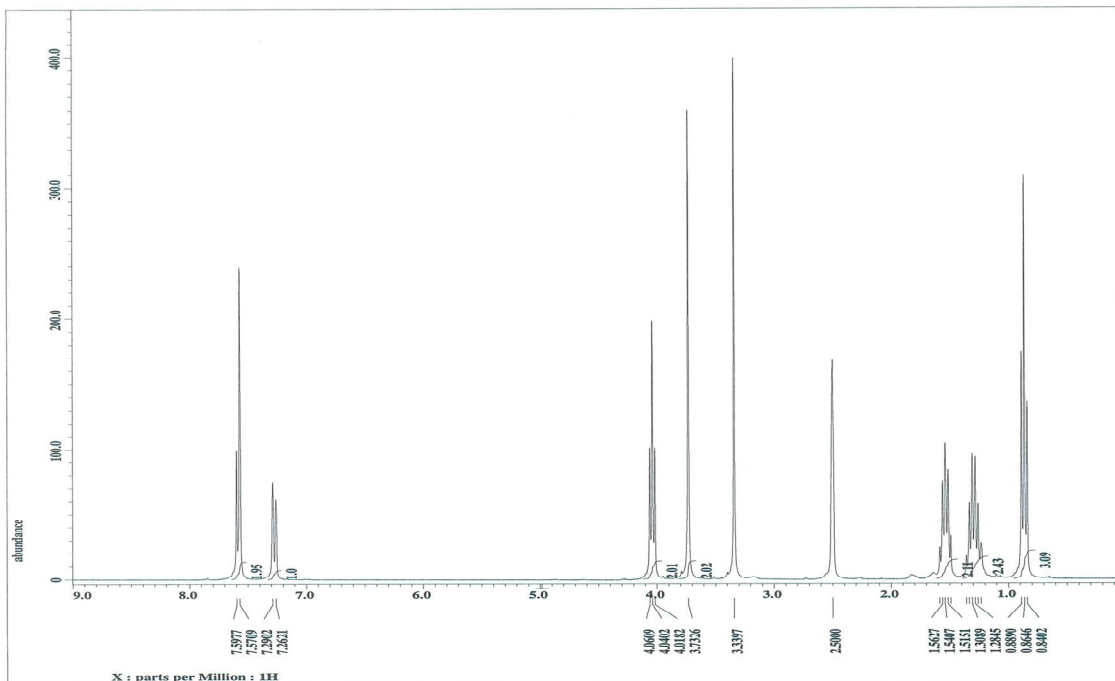
(70) Ethyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



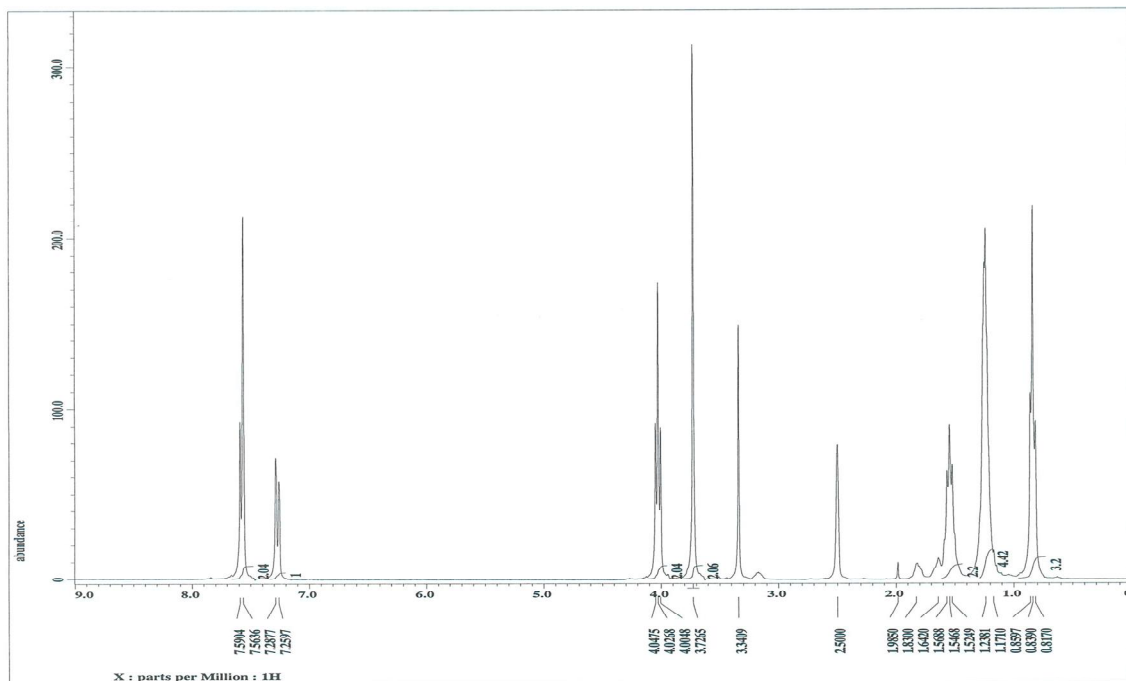
(71) Propyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



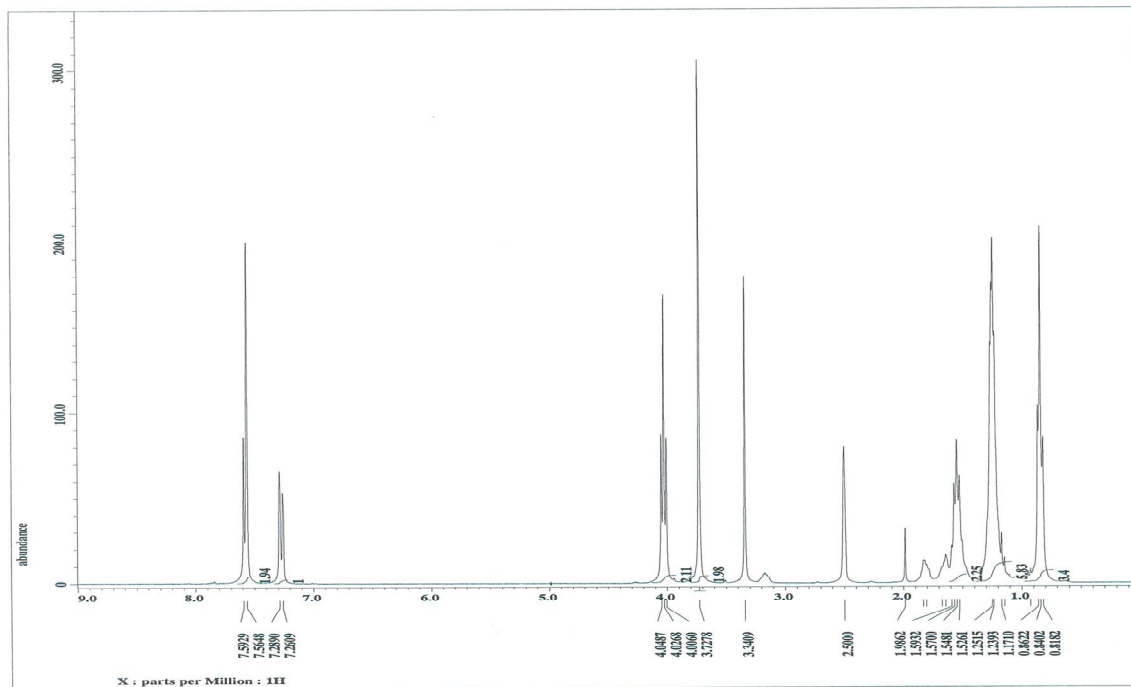
(72) Butyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



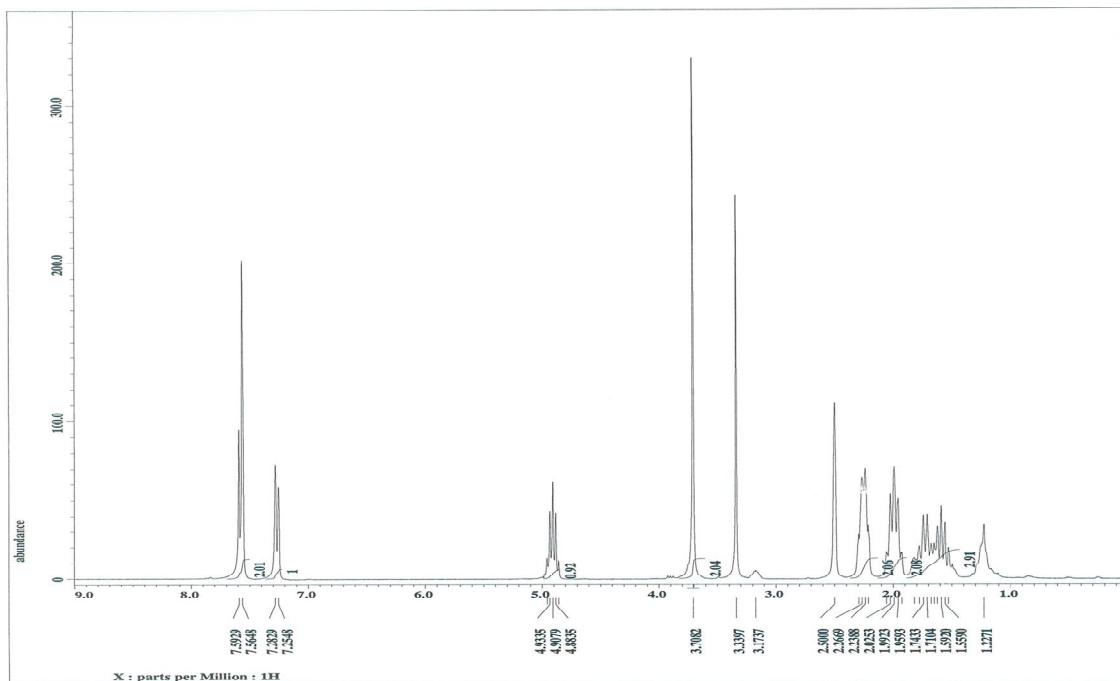
(73) Pentyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



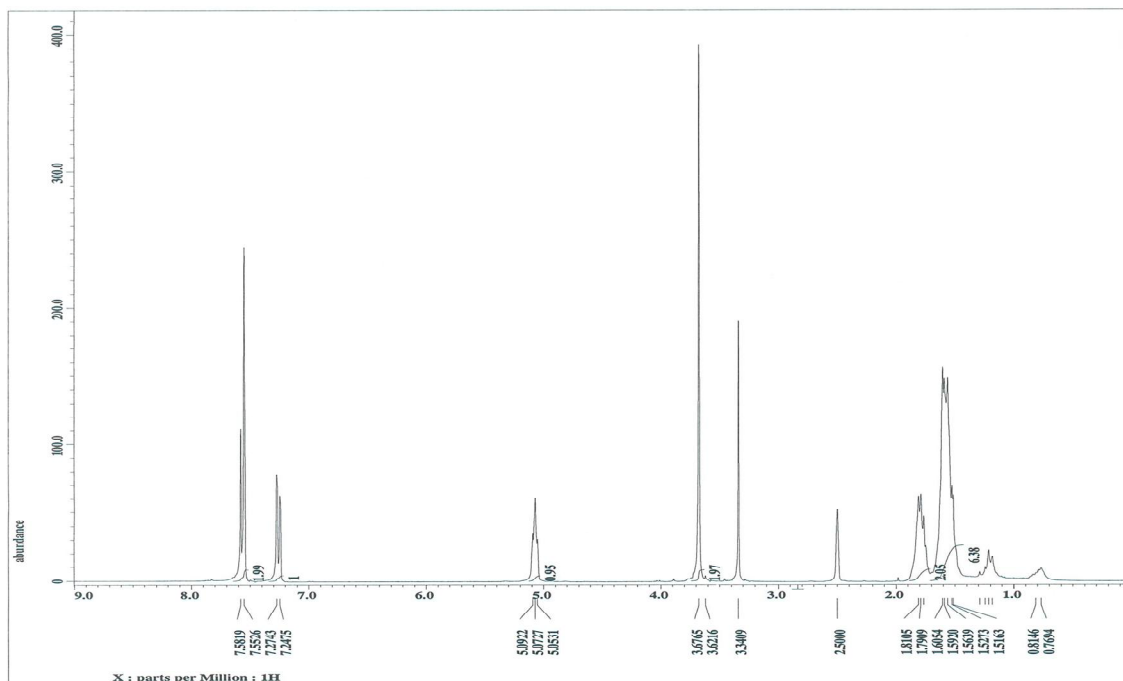
(74) Hexyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



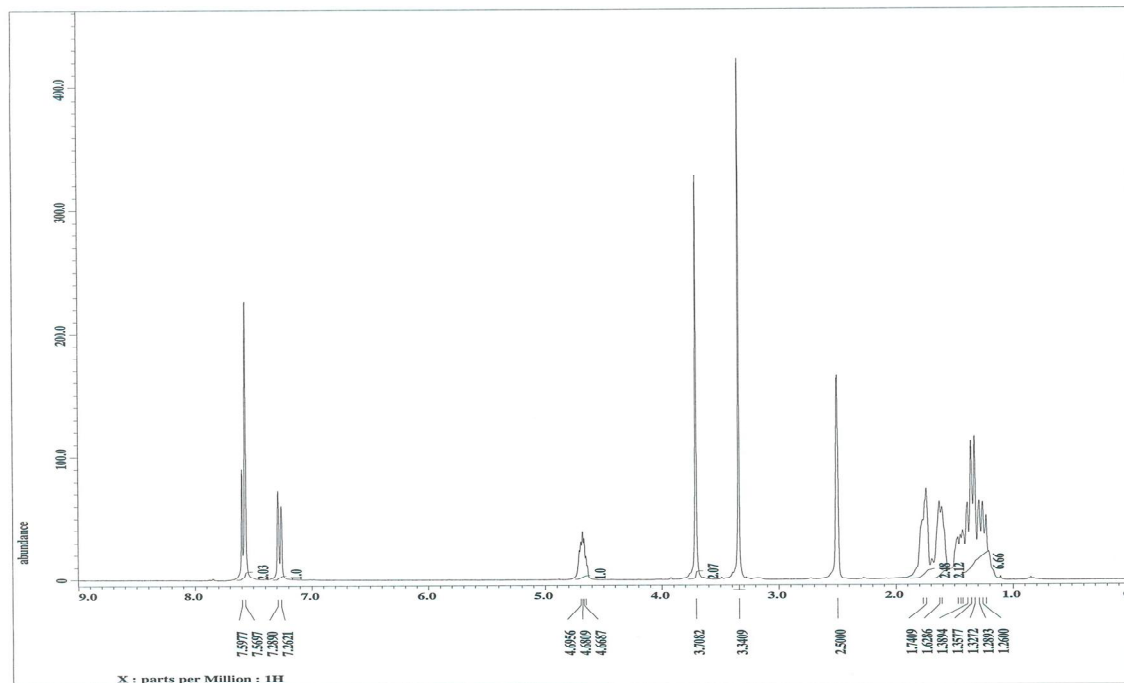
(75) Cyclobutyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



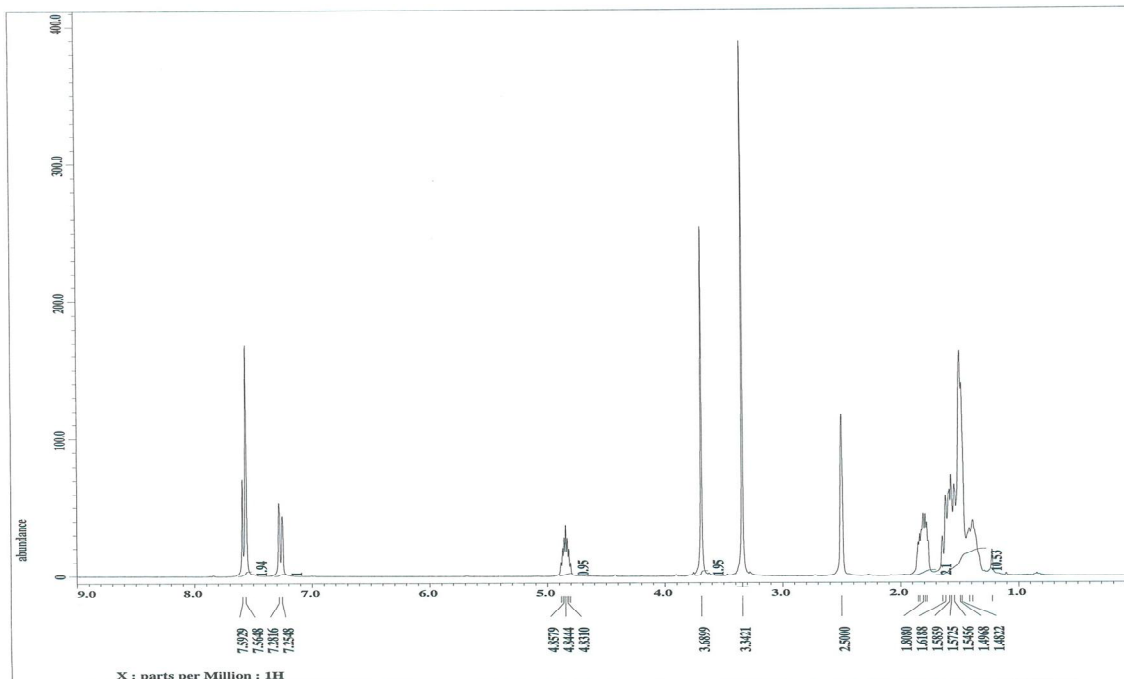
(76) Cyclopentyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



(77) Cyclohexyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



(78) Cycloheptyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate



(79) Cyclooctyl 2-(3,4-dichlorophenyl) acetate

