



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](#)

2013년 8월
석사학위 논문

유해 조류 제어를 위한
naphthoquinone 유도체 합성

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

변 대 흥

유해 조류 제어를 위한
naphthoquinone 유도체 합성

Synthesis of naphthoquinone derivatives
as algicides against harmful algal species

2013년 8월 23일

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

변 대 흥

유해 조류 제어를 위한
naphthoquinone 유도체 합성

지도교수 조 훈

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2013년 4월

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

변 대 흥

변대홍의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	유 지 강 (인)
위 원	조선대학교 교수	이 창 훈 (인)
위 원	조선대학교 교수	조 훈 (인)

2013년 5월

조선대학교 대학원

목 차

List of Tables	iii
List of Figures	iv
Abbreviations	v
ABSTRACT	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	14
1. 재료	14
2. Algae	14
3. Microplate assay	14
4. Measurement of IC ₅₀ value	15
5. Zebrafish (Danio rerio) 급성독성시험	16
6. 방법	17
6.1. Procedure for the synthesis of compounds (2~4, 4a, 4b)	17
6.2. procedure for the synthesis of compounds (NQ1~4)	19
6.3. procedure for the synthesis of compounds (NQ5~6)	22
6.4. procedure for the synthesis of compounds (NQ7~8)	23
6.5. procedure for the synthesis of compounds (NQ9~16)	25
6.6. procedure for the synthesis of compounds (NQ17~23)	28
6.7. procedure for the synthesis of compounds (NQ24~30)	32
III. 결과 및 고찰	36
1. NQ 화합물의 살조능 테스트 결과	36
2. 살조능 테스트 결과 선택된 NQ 화합물의 구조	37
3. 선택된 NQ 유도체에 대한 유해조류의 형태 변화	38

4. 우수한 살조활성을 보인 NQ 유도체의 급성독성평가	40
IV. 결론	41
참고문헌	44
¹H NMR Spectra (부록)	47

List of Tables

Table. 1. Dominant species in major rivers and reservoirs according to season in South Korea.	2
Table. 2. Internal measures for nutrient and algal bloom control.	3
Table. 3. Algicidal effects of the various synthetic naphthoquinones	36

List of Figures

Fig. 1. Harmful algal (<i>Microcystis aeruginosa</i>) blooms.	1
Fig. 2. Poslock being applied to Canning River, Austrailaria (B). Phoslock is bentonite which has been modified through the introduction of the rare earth element lanthanum into its clay structure (A).	9
Fig. 3. Yellow clay sprayed around fish cages for by the sprinkler (B) in South Korea (A).	10
Fig. 4. Chemical structures of (1,4)-naphthoquinone and β (1,2)-naphthoquinone.	11
Fig. 5. Chemical structure of 1,4-benzoquinone (a), 1,4-naphthoquinone (b) and 9,10-anthraquinone (c).	11
Fig. 6. Chemical structures of alkannin and shikonin.	12
Fig. 7. Chemical structures of naphthoquinone.	38
Fig. 8. NQ16 1 μ M 처리 후 <i>microcystis aeruginosa</i> 의 형태 관찰	38
Fig. 9. NQ16 1 μ M 처리 후 <i>anabaena flos-aquae</i> 의 형태 관찰	39
Fig. 10. NQ16 1 μ M 처리 후 <i>stephanodiscus hantzchii</i> 의 형태 관찰	39
Fig. 11. Electron transfer mechanism for DNA damage by anthracyclines	42

Abbreviations

CAN : Cerium (IV) ammonium nitrate

CDCl₃ : d-Chloroform

DMSO-d₆ : Dimethylsulfoxide

DMNQ : Dimethoxy-1,4-naphthoquinone

HABs : Harmful algal blooms

LAH : Lithium aluminium hydride

IC₅₀ : The half maximal inhibitory concentration

NQ : Naphthoquinone

Ppm : Parts per million

THF : Tetrahydrofuran, anhydrous

TMS : Tetramethylsilance

TLC : Thin layer chromatography

ABSTRACT

Synthesis of naphthoquinone derivatives as algicides against harmful algal species

Dae Heung Byeon

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

Department of energy convergence

Graduate School of Chosun University, South Korea

Quinones are widely distributed in nature and play essential biological roles. They also occur as substances of potential toxicological significance in environmental pollutants, and some are used as anticancer drugs. Chronic exposure to quinones is mutagenic to cultures of eukaryotic cells and may cause cell death. Considerable interest has been focused on quinone compounds especially, quinone moieties are present in many drugs a backbone structure, such as anthracyclines and mixtoxantrones used as antitumor agent and algicides.

Harmful algal blooms (HABs) can occur when certain types of microscopic algae grow quickly in water, forming visible patches that may harm the health of the environment, plants, or animals. Green tide algae cause severe problems, such as hindering boat traffic, blocking approaches, obstructing wash processes and catching cavities, creating unattractive foulsmelling loads and killing natural biota. Many scientists have conducted physiological and ecological studies in the hope of reducing the extent of damage to fisheries caused by HABs. The application of clay can treat the environmental problems but the toxins released from flocculated cells and

the adverse effect on other organisms.

Therefore, design of ecological safe and selective algicides has been an evolving research topic. In this research, we synthesized 30 naphthoquinone (NQ) derivatives and invitro inhibitory activity was measured against microalgae. All the synthesized compounds were showed invitro inhibitory activity for harmful algicides (*Microcystic aeruginos*, *Anabaena flos-aquae*, *Cyclotella meneghiniana*, *Stephanodiscus hantzchii*), while nonharmful algae (*Scedesmus obliquus* and *Chlorea vulgaris*) were comparatively less affected by these NQ derivatives. In particular, compounds 3, 4, 14, 15, 16, 19 and 20 were the most potent against 7 categories harmful algicidies with IC_{50} lower than $1\mu\text{M}$. Especially, compound 19 was extremely competent and selective inhibitors against species with IC_{50} values ranging from 0.08 to $0.162\ \mu\text{M}$.

I. 서 론

녹조는 부영양화 된 호소 (호수, 늪, 소택, 습원 등)나 유속이 느린 하천에서 부유성의 조류가 대량 번식하여 수 표면에 막층 또는 플라클을 형성하여 물빛이 현저하게 녹색 또는 적갈색으로 변화하는 현상 (Fig. 1)을 가리키는 말이기도 하고 물색을 녹색으로 변화시키는 원인 담수 조류군을 일컫기도 한다 [1].



Fig. 1. Harmful algal (*Microcystis aeruginosa*) blooms. (Nakdong river, South Korea). Source from <http://www.idomin.com/news/articleView.html?idxno=415900>

녹조현상을 일으키는 조류는 특정한 종만이 존재하는 것이 아니라 다양한 종류의 조류에 의해 발생 된다 [2, 3]. 남조류와 규조류가 녹조현상 발생의 주요 원인이며, 지역에 따라 와편모조나 소형 cryptomonad등이 원인일 수 있다 [4]. (Table. 1)

Table. 1. Dominant algal species in observable major korea's rivers and reservoirs.

Season	Spring	Summer	Autumn	Winter
Station				
Paldang reservoir	Cyclotella (diatom)	Microcystis (cyanobacteria)	Cyclotella (diatom)	Cyclotella (diatom)
	Cryptomonas (chlorophyta)		Melosira (diatom)	
Daechung reservoir	Asterionella (diatom)	Microcystis (cyanobacteria)	Melosira (diatom)	Synedra (diatom)
		Oscillatoria (cyanobacteria)	Synedra (diatom)	Asterionella (diatom)
Nakdong River	Stephanodiscus (diatom)	Oscillatoria (cyanobacteria)	Melosira (diatom)	Stephanodiscus (diatom)
	Synedra (diatom)	Microcystis (cyanobacteria)		
Juam lake	Asterionella (diatom)	Microcystis (cyanobacteria)	Uroglenopsis (Chrysophyta)	Asterionella (diatom)

녹조현상의 발생원인은 다음의 4 가지 주요 원인으로 요약 할 수 있다. (1) 질소 (N)와 인 (P) 등의 과도한 영양염 유입 (녹조현상의 가장 중요한 직접발생 원인은 수체 내 과부하 된 인, 질소 등의 영양염류의 농도, 즉 부영양화 때문이라고 할 수 있다) [5]. (2) 높은 표층 수온 (녹조 원인생물에 따라 최적 성장을 위해 요구되는 빛의 강도나 수온은 제각각이기 때문에 주의를 요할 필요가 있다. 일반적으로 여름철에 우리나라 대부분의 정체성/폐쇄성 수계에서 녹조를 발생시키는 남조류의 경우는 상대적으로 강한 빛과 높은 온도를 요구하지만 저온 갈수기 때 녹조를 일으키는 와편모조류 또는 규조류 의 경우는 상대적으로 낮은 빛과 온도만을 요구하기 때문이다) [6]. (3) 체류시간의 장기화와 수층의 성층화 (수체의 체류시간이 길수록 녹조생물이 대번식할 수 시간을 주기 때문에 체류시간은 중요한 원인이 된다) [7]. (4) 호소 내 과도한 유기물의 양 (하천/호소 내 유기물의 양의 증가는 미생물에 의한 분해 작용으로 잠재적인 영양

염으로 전환이 가능하기 때문에 중요하다) [8]. 녹조현상은 수질 부영양화의 상징적인 현상으로 심한 이취미를 유발시키며 독성물질을 생성하는 등 수자원으로서의 가치는 물론 전체 수중 생태계의 균형과 질서를 파괴한다. 그로 인한 사회적 피해 현상으로는 다음과 같다. 첫째, 착색 또는 스컴 형성, 죽은 물고기 등으로 시각적인 불쾌감 유발 및 레크레이션 활동의 저해. 둘째, 독소에 의한 인체 및 가축의 건강 손상, 악취로 불쾌감 유발 [9]. 셋째 생태계 파괴로 인하 토종 동물의 사멸 또는 서식처 이동, 개체군 변화, 먹이 손실 [4]. 넷째 레크리에이션 활동 및 여행의 저하로 인해 지역 경제적 손실, 농업용수, 산업용수 부족으로 인한 경제적 손실 [10]. 다섯째 독소물질에 의한 가축이나 야생동물의 폐사, 대량 증식한 조류의 분해 동안 수중 용존산소 감소로 인한 물고기 및 수중생물의 폐사 [11]. 여섯째, 경제적 가치가 있는 종들(연어류와 송어류)에 악취 발생 등이 있다 [12].

녹조제어 기술은 크게 기계 · 물리학적, 화학적, 생물학적 제어방법 또는 복합적 제어방법으로 구분할 수 있다. (Table. 2)

Table. 2. Internal measures for nutrient and algal bloom control [3, 4, 9, 13].

Methods	Substances
In-lake phosphorus precipitation	Prerequisites for lasting success are low external loading, sufficient depth to prevent sediment resuspension due to wind events, and adequate choice of flocculants (Sas, 1989). Experiments with precipitation of phosphorus have been undertaken with aluminium sulphate, ferric salts (chlorides, sulphates), ferric aluminium sulphate, clay particles and lime [as Ca(OH) ₂ and as CaCO ₃].
Sediment dredging and phosphorus binding	Options for measures to counteract sediment release are removal of sediment (dredging) or treatment to bind phosphorus. Sediment treatments aim at trapping phosphorus in the sediment, either by oxidation to insoluble iron compounds, or by adsorption onto

calcium carbonate or clay particles. During the past two decades, broad experience collected with numerous failures and a few successful cases has shown that effective treatment requires careful design on the basis of profound understanding of the sediment chemistry and hydrology of the water body to be treated. Oxidisation may be achieved by aeration, artificial mixing, or the introduction of pure oxygen. It appears to be most effective if achieved with nitrate, which transports more oxygen and penetrates more readily into sediments.

Withdrawal of bottom water from the hypolimnion

In thermally stratified eutrophic lakes, phosphorus accumulates in the hypolimnion (cold bottom water layer) during summer stagnation, partly from settled organic material originating in the upper water layers and, in many lakes, largely from the release of sediment-bound phosphorus under anoxic conditions. Although most natural outflows drain surface water, it is often possible to dam the natural outflow and to abstract hypolimnetic water instead (Olzewski, 1961). This is especially easy to apply to reservoirs and can reduce in-lake concentrations significantly. In the Swiss Mauensee the biomass of *Planktothrix rubescens* was reduced from 152 g m^{-3} to 42 g m^{-3} using this approach (Gähler, 1976).

Reduction by flushing

Flushing with water of low phosphorus concentrations can greatly reduce external inputs and will also accelerate recovery from internal loading by removing in-lake phosphorus which would otherwise be recycled for a number of growing seasons.

Successful examples are Veluwemeer in the Netherlands (Sas, 1989) and Moses Lake in the USA (Welch et al., 1972). However, this measure also implies a relocation of the phosphorus to another water body, and this impact must also be evaluated.

Hydrophysical measures

Algae show different "strategies" of survival in competition against other algae. Many of these strategies are adapted to specific hydrophysical conditions. Changing these conditions may therefore substantially reduce the success of these algal "ecostrategists" and allow other phytoplankton species to become dominant. This approach can be an effective temporary, supplementary measure alongside reduction of external inputs of nutrients, particularly if inflake nutrient concentrations have declined to values around the threshold where success may be expected. In some cases, where eutrophication levels cannot be decreased, permanent installation of hydrophysical measures can be a solution (Visser et al., 1996).

A number of mixing projects have been unsuccessful because these principles were neglected. Many systems are now on the market, provided by different engineering companies. Engineering expertise is sufficiently developed to design systems that can meet the hydrophysical requirements. Care must be taken, however, to select competent companies, and to plan the measure to meet the ecological targets set in combating cyanobacterial blooms.

Bio-manipulation

Bio-manipulation includes a range of techniques that

influence algal growth by manipulation of parts of the food web of a lake. Examples are removal of planktivorous and benthivorous fish populations, providing refuges for zooplankton and introducing predatory fish such as pike (*Esox lucius*) in order to decimate planktivorous fish populations, and introducing submerged aquatic plants to compete with phytoplankton in consuming nutrients (Kitchell, 1992). These techniques aim at stimulating the growth or presence of phytoplankton-grazing organisms or of phytoplankton competitors.

A disadvantage of biomanipulation is that not all phytoplankton species are eaten efficiently by predators. Stimulating the predators without reducing concentrations of phytoplankton nutrients may stimulate dominance of inedible phytoplankton species, such as colony-forming (*Microcystis*, *Aphanizomenon*) or filamentous cyanobacteria (*Planktothrix agardhii*), or the green alga, *Enteromorpha*. High nutrient levels may also stimulate the growth of epiphytic algal species which grow on the surfaces of macrophytes and suppress their development.

Algicides

Algicides, especially copper sulphate, have been used rather widely in some regions to kill prevailing cyanobacterial blooms. As a result of the Palm Island catastrophe, it was established that lysine a bloom may exacerbate problems because toxins previously contained within the cells are liberated and pass through drinking water filters far more readily than toxins within intact cells (Lam et al., 1995).

Nevertheless, preventative treatment at the beginning of bloom development has been widely used (Cameron, 1989) and may be necessary.

The use of decomposing barley straw for the control of cyanobacteria and microalgae has been investigated recently (Welch et al., 1990; Jelbart, 1993; Newman and Barrett, 1993; Overall and Lees, 1996). The inhibitory effects were suggested to be due to antibiotic production by the fungal flora or to the release of phenolic compounds such as ferulic acid and coumaric acid from the decomposition of the straw cell walls. A reduction in cyanobacterial populations has also been reported in reservoir trials after applying barley straw (Overall and Lees, 1996) and a recent full-scale field trial has been carried out in a potable supply reservoir and was credited with reducing regular summer cyanobacterial populations (Barrett et al., 1996).

Barley straw

There are conflicting data from Australia on the effects of barley straw. Jelbart (1993) failed to find any inhibitory effects with extracts of rotting straw on *Microcystis aeruginosa* isolates. Cheng et al. (1995) also found no algicidal or algistatic effects from barley straw over a six month period in a comprehensive field trial in six experimental ponds. These contradictory findings and the unknown identity of the inhibitory factors in rotting barley straw indicate that straw-dosing is still too poorly understood to recommend for reliable use as a cyanobacterial control measure.

Other approaches

A market for rapid and cheap water resource protection and restoration methods is evolving. In Europe, poorly validated methods for reduction of cyanobacterial and phytoplankton growth are being advertised, some of which are questionable. In some cases, transient success was actually due to natural seasonal "clear water" phenomena. Although new approaches require field testing as part of development, independent verification of their success can reasonably be requested of their promoters prior to marketing. Public health officers and other public authorities are trained in other fields than environmental sciences and rarely have the expertise to judge restoration proposals. Review by environmental authorities or experts is therefore desirable prior to investment.

기계 · 물리학적 제어방법은 태양광 차단, 산소공급/대류, 여과, 초음파/오존, 전기분해, 녹조생물의 기계적 수거 등 물리적인 방법을 주체로 하는 제어방법이고, 화학적 제어방법은 천연물에서 추출한 물질 또는 화학물질을 첨가하여 질소 (N)와 인 (P) 같은 영양염 또는 녹조생물을 응집 · 침전, 산화제 투입에 의한 유기물 산화 등을 통해 제거하는 제어방법이며, 마지막으로 생물학적 제어방법은 수계 중 미생물을 집적시켜 생물에 의한 유기물의 분해 · 산화, 특정 수생 생물에 의한 수계 중 영양염류의 흡수 제거하는 방법과 녹조생물을 특이적으로 분해 또는 섭식하여 제거하는 미생물과 어패류를 살포하여 제거하는 방법 등으로 구분할 수 있다 [3, 4, 9, 13]. 그 외에도 준설 및 도포의 방법과 영양염의 유입을 차단하거나 과잉의 영양염을 제거 또는 희석 하는 방법을 통해 녹조를 사전예방 할 수 있는 방법 등도 자주 사용된다 [14, 15, 16, 17].

현재 일반적으로 가장 많이 사용되는 방법 중 하나인 응집제를 사용하는 녹조제어 기법은 황토, 세라믹 (ceramic), 점토광물 (claymineral), 보크사이트 (bauxite), 숯 (charcoal), 활성부식토 (active mold), 산화철 (oxidized steel), 산화칼슘 (oxidized Ca),

산화마그네슘 (oxidized Mg), 제올라이트 (zeolite) 등의 원재료를 부영양화 된 수계 또는 녹조가 발생한 수계 내에 살포하여 영양염류, 조류독소 및 녹조생물을 응집/흡착시켜 제거하는 방법이다 [13, 17]. 상기 화학제제는 빠르고 검증된 녹조제어 효과를 나타낸다. 국내에서 구입이 용이하지만 침전슬러지 처분이 요구되고 일회성의 효과만을 보이기 때문에 지속적인 살포 관리가 필요하다. 또한 부유물질 (suspended particles) 및 탁도 (turbidity)가 증가한다. 특히 최근에는 원재료의 단독사용보다는 다양한 무기 재료 또는 화공약품을 처리하여 효율을 높인 개선제를 선보이고 있다. 그 대표적인 예가 미국 Phoslock Water Solution 사에서 만든 Phoslock®제품이다 [18]. (Fig. 2)



Fig. 2. Poslock being applied to canning river, austrailaria (B). Phoslock is bentonite which has been modified through the introduction of the rare earth element lanthanum into its clay structure (A). Source from <http://www.phoslock.com.au/index-usa2.php>, © Phoslock Water Solution.

영양 염, 조류독소, 유해조류 및 세균 등의 제거에 탁월한 효율을 가지고 있지만 상대적으로 가격이 비싼 단점이 있다. 주로 해양 적조/담수녹조 발생 시 그 효과가 입증되었으며 전통적으로 해양에서 가장 많이 사용하는 방법이다. 담수에서는 미국 medical 호, 스웨덴 lang 호 등에 적용사례가 있었다 [19]. 그 외 중국과 일본의 연구자들에 의해 녹조가 발생하는 호수나 기수역을 대상으로 살포한 예들이 있다 [20]. 중국에서 Yu 등이 1994년 이후로 담수 연못과 호소에서 발생하는 녹조를 제어하기위해 clay를 살포하고 있다. 한 예로 m^2 당 clay를 188 kg 씩 총 $48 km^2$ 의 면적에 살포하여 효과를 본 기록이 있다 [21]. 국내 호소와 하천에 황토살포 예는 거의 없으나, 2007년

여름에 발생하여 6년 만에 가장 큰 피해를 준 경남지역의 적조 제어를 위해 해경에서 황토를 살포하였으며 매년 국내 적조를 제어하기 위한 방법으로 황토의 살포가 이루어지고 있다. (Fig. 3)



Fig. 3. Yellow clay sprayed around fish cages for by the sprinkler (B) in South Korea (A). Source from <http://www.nfrdi.re.kr> ©2007, NFRDI (National fisheries Research and Development Institute)

살조제 또한 응집제만큼 많이 사용되고 있는 녹조제어방법 중 하나이다. 녹조생물을 직접 제거하는 화학물질로서 황산구리 (cuper sulfite), 활성알루미나 (active alumina), 중탄산나트륨 (sodium bicarbonate), 이산화티탄 (titanium dioxide), 유황 (sulfer), 클로라인 (chlorine), 수산화마그네슘 (magnesium hydroxide), 산화아연 (zinc oxide) 등의 화공약품을 사용하거나 식물과 과일, 미생물 등 천연물로부터 화학물질을 추출하여 수체에 직접 뿌려 녹조를 제어하는 방법이다 [2, 4, 9, 22]. 상기 방법 또한 빠르고 검증된 녹조제어 효과를 나타낸다. 그러나 상기의 방법은 침전슬러지 처분이 요구되고 일회성의 효과만을 보이기 때문에 지속적인 살포 관리가 필요하다. 일부 약품은 고가이므로 비용이 소요될 뿐 아니라 난분해성 물질일 경우 저니토에 축적되거나 먹이사슬을 통해 생물축적을 발생시켜 독성현상을 발생시키는 등 2차 오염문제를 발생할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 앞에서 제시된 많은 한계점을 극복하여, 실제 녹조현장에 적용하기 위한 기법으로, 미생물 추출 유래물질을 기반으로 생태계에 가장 친환경적인 새로운 녹조제어 기법을 개발을 목표로 하였다.

Naphthoquinone 유도체는 다양한 식물 추출물과 미생물에서 생산된다. quinone은

자연에서 산화-환원반응에 이용되며, $\alpha(1,4)$ -naphthoquinone과 $\beta(1,2)$ -naphthoquinone으로 나뉜다. 두 구조는 색소로서 천연에 많이 존재하는 것은 α 체이다. $\alpha(1,4)$ -naphthoquinone은 고대 이집트부터 색조 화장품으로 식물성 염료로 사용되어 왔으며, 비타민 K와 동일한 기본구조를 가지고 있다. 또한 항암물질로 연구된 의약품의 원료로 사용되고 있다. 또한 살균제로도 이용되며 이 외에 고무 및 폴리에스터수지에 대한 중합조절제로도 사용되고 있다. $\beta(1,2)$ -naphthoquinone은 시약 및 중간체로서 쓰인다.

Naphthoquinone의 분자식은 $C_{10}H_6O_2$ 이며, $\alpha(1,4)$ -naphthoquinone은 노란색 결정으로, 녹는점 $126^{\circ}C$ 이며, $100^{\circ}C$ 이하에서 승화한다. $\beta(1,2)$ -naphthoquinone은 황금색 결정으로 녹는점 $145\sim 147^{\circ}C$ 이고, α 체와 β 체는 모두 피부에 자극성이 있다. (Fig. 4.)

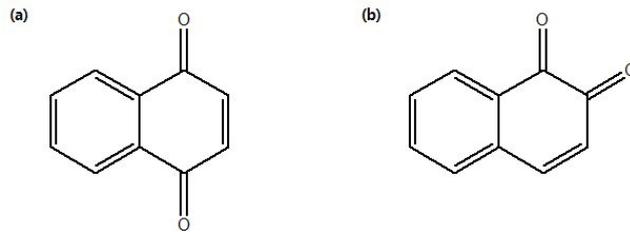


Fig. 4. Chemical structures of $\alpha(1,4)$ -naphthoquinone (a) and $\beta(1,2)$ -naphthoquinone (b).

이 화합물은 두 개의 케톤이 방향족 고리에 치환된다. 독성학적 관점의 생물학적 시스템에서 자신의 반응성에 부여하는 두 가지 주요 화학적 특징을 지닌다. 산화제이고 친전자체 속성의 상대적 기여도는 특정 치환기 효과의 화학 구조에 의해 영향을 받는다. 자연적으로 발생하는 quinone의 항암활동은 benzoquinone, naphthoquinone, anthraquinone 등의 세 가지 그룹에 의해 대부분 보여 진다. (Fig. 5.)

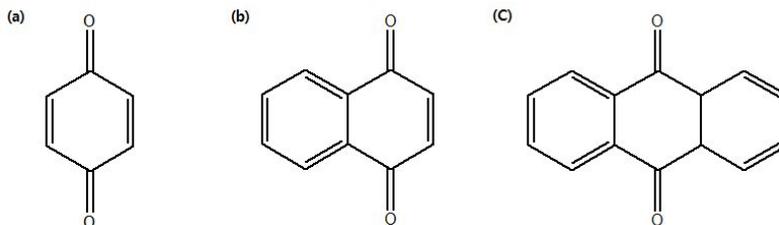


Fig. 5. Chemical structure of 1,4-benzoquinone (a), 1,4-naphthoquinone (b) and 9,10-anthraquinone (c).

Anthraquinone, doxorubicin, daunorubicin은 anthraquinone의 일부로 구성된 반면, mitomycin과 streptonigrin은 헤테로고리기의 p-benzoquinone로 구성되어있다. 이러한 lapachol과 lapinone 같은 일부 naphthoquinone의 항생물질은 종양세포에 강력한 독성을 나타낸다 [23]. 거의 300개의 다른 구조 형태를 가지는 naphthoquinone 유도체는 식물, 박테리아, 균류로 구분할 수 있다. 이러한 자연발생화학물은 오랜 민속의학에서 사용되었으며, 최근의 연구는 기생충과 항암제등 모두 천연 및 합성 naphthoquinone의 치료가치를 입증하였다 [24, 25].

1999년, 천연 naphthoquinone의 이성질체인 alkannin과 shikonin은 항균성, 항염증을 포함한 강력한 약물로 생물학적 활동범위에서 제약 준비를 위한 유효한 구성요소를 갖는다. 식물에서 기원된 이성질체 alkannin과 shikonin은 alkannatinctoria과 lithospermum erythrorhizon의 식물 뿌리에서 주로 발견된다. 또한 그것은 L1210 세포에 대하여 강한 세포독성을 발현함을 알 수 있었다. (Fig. 6.)

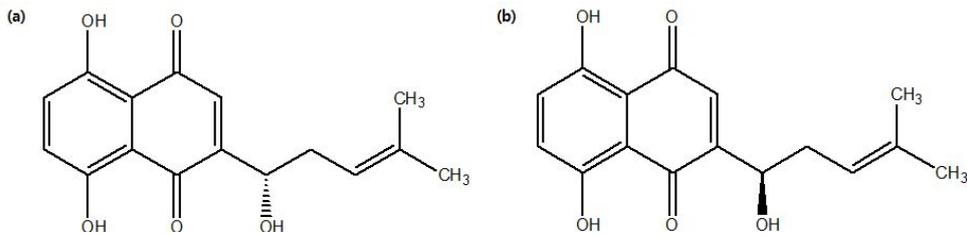


Fig. 6. Chemical structures of alkannin (a) and shikonin (b).

2005년, 현재 미국 환경보호국에 의해 승인된 copper sulphate, chelated copper 화합물 및 diuron (3-[3,4-dichlorophenyl]-1,1-dimethylurea) 등 수생 제초제에 대한 선택제어 기술의 개발절차를 평가 하고 있으며 일부 화학물질은 HABs를 완화시키는데 사용되고 있다 [26]. 그러나 더 안전하고 선택적인 살조제 물질을 찾는 것이 더 많은 HABs를 제어하는데 필요로 하다.

따라서 본 실험에서는 기존의 후보물질인 naphthoquinone (NQ) 기반의 다양한 유도체를 가지는 신규물질을 유기 합성하여 조류 대발생 수준의 유해조류에 농도 별로

접종하여 IC₅₀-120 h 값의 측정을 통해 조류 제어능력을 평가하였다. 이후 살조활성이 크게 개선된 화학적 조절기법의 연구를 위해 살조활성과 화학구조골격 간의 상관관계를 분석하였다. 마지막으로 우수한 살조활성을 보유한 화합물들의 급성생태독성 평가를 통해 안전성 평가를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

합성을 하기 위하여 사용되어진 모든 화학물질들은 sigma-Aldrich, TCI, junsei, merck사의 시약을 사용하였다. 수분에 민감한 화합물들은 N₂ 분위기에서 반응하였다.

각 화합물의 ¹H Nuclear magnetic resonance (이하 NMR) 범위는 300MHz, 296K에서 YH 300 (Oxford, Japan)을 사용하여 측정하였다. NMR 범위에 사용되는 표준시료는 CDCl₃ 또는 DMSO 의 TMS를 사용되었다. ¹H MNR의 화학적 이동량(δ 등급)은 parts per million (ppm, 백만 분율)으로 표시하였으며, J-coupling 결합상수는 Hz (Hertz) 단위로 측정하였다.

컬럼 크로마토그래피는 혼합물 용리제와 슬러리를 함께 준비하고 컬럼 안에 실리카 겔로 충전 후 사용하였다. 시료의 모아진 부분은 얇은 막 크로마토그래피 (Thin Layer Chromatography : TLC)에서 확인하였다.

2. Algae

유해조류종인 남조류 2종 (microcystis aeruginosa, anabaena flos-aquae), 규조류 2종 (stephanodiscus hantzchii, cyclotella meneghiniana)과 무해조류 2종 (scedesmus obliquus, chlorea vulgaris) 총 6종의 조류를 한양대학교 한명수 교수님 연구실에서 기증받아 사용하였다.

녹조류와 남조류는 각각 pH 7과 pH 9로 조절된 100 ml의 BG11 배지에서 25°C, 50 μM photons m⁻² s⁻¹, 12:12 (light:dark) cycle, 정치조건으로 배양되고, 2 주에 한번 씩 신선한 배지로 계대 배양하였다. 규조류 또한, pH 7 조절된 DM배지에서 15°C, 50 μM photons m⁻² s⁻¹, 12:12 (light:dark) cycle, 정치조건으로 배양되고, 위와 동일하게 2 주에 한번 씩 신선한 배지로 계대 배양하였다.

3. Microplate assay

조류 경보 수준의 *m. aeruginosa*를 배양액 0.2 ml을 96-well plate에 준비하고 합성된 NQ 종의 화합물을 다양한 농도로 접종하여 최종농도가 각각 1, 2, 5, 10, 20, 50 μ M이 되도록 처리해 주었다. 처리조건은 접종 후 *m. aeruginosa*의 최적 배양조건 하에서 5일 동안 배양하면서 5일 째 되는 날에 10 μ l을 분취해 neubauer hemocytometer (superior, germany)에 올리고 CX31 inverted microscope (x 400 magnification) (olympus, japan)하에서 온전한 형태의 조류 세포수를 계수해 주었다. 이 때, 각 농도 별 대조구 대비 세포의 감소율 (= 살조활성) (Algicidal activity), 즉 살조활성 (%)은 방정식 1)을 사용해 계산하였다.

$$\text{Algicidal activity (\%)} = (1 - Tt/Ct) \times 100 \quad 1)$$

이때 T (처리구)와 C (대조구)는 각각 NQ 화합물이 접종되었을 때와 접종되지 않았을 때의 조류밀도를 세포수로 표현하여, t는 접종 후 일(day)수를 나타내었다. 향후 추가 선별실험을 위해 접종농도 1 μ M에서 *m. aeruginosa*의 세포수를 100% 제거할 수 있었던 NQ 유도체 1 차 선별하였다.

본 실험은 3회 반복 (triplicate)하여 수행되었으며, 결과의 raw data는 평균과 표준편차 (the mean and standard deviation)로 표현되었다. 이후 특별한 언급이 없을 경우 상기와 같은 방법으로 조류 6종의 살조활성을 측정해 주었다.

4. Measurement of IC₅₀ value

앞선 실험에서 1 μ M에서 *m. aeruginosa*의 세포수를 90% 이상 제거할 수 있었던 NQ 유도체를 대상으로 1 ml의 *m. aeruginosa* 배양액 (5×10^5 cells ml⁻¹)이 포함된 96-well에 접종 후 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 μ M의 농도가 되도록 조절하고 남조 최적 배양조건에서 5일간 정치 배양하였다. 상기에 기술한 방법으로 각 농도 별 대조구 대비 살조활성을 구하였다. NQ 화합물이 접종되고 120 시간 경과 후 상기조류 세포수를 50% 제어할 수 있는 농도 (IC₅₀-120 h)를 standard curve인 four parameter logistic curve를 사용해 sigmaplot version 11.2 softerware에서 계산하였다.

$$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} \quad 2)$$

Y는 화합물 각각의 집중농도에 따른 살조활성 (%)을 나타내며, A는 집중농도에 따른 최대 살조활성 (%), D는 집중농도에 따른 최소 살조활성 (%), C는 집중농도 범위 내의 IC₅₀-120 h 값, B는 - Hillslope (- 기울기) 값을 의미한다. 따라서 상기 식을 사용해 집중농도 별 살조활성의 IC₅₀ 값을 구하였다.

5. Zebrafish (*Danio rerio*) 급성독성시험

Zebrafish (*Danio rerio*)는 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 분포하며 국제적으로 신뢰성 있는 표준시험법의 공시어종으로 생태독성평가에 널리 사용되는 생물종이다. 본 실험은 어류(zebrafish)를 대상으로 급성생태독성을 평가하여 생태계 내 적용 가능한 최적의 살조물질을 선택하기 위한 목적으로 실험을 수행하였다.

어류 zebrafish (*danio rerio*) 급성독성시험에 사용된 zebrafish는 구입하여 실험을 수행하였다. 유리 및 플라스틱수조의 유수식 배양 시스템을 이용하여 6, 60 L로 각각 나누어 25 ± 1°C, pH 7.5 ± 0.2, dissolved oxygen 7~8 mg/L 및 광주기 12 : 12 (L : D cycle) 조건으로 사육하였으며, 먹이로 color charasin을 이틀에 한번 씩 공급하였다. 사육수는 수돗물을 일반 필터로 1차 여과한 후, carbon 필터로 2차 여과하여 활성탄으로 탈염하여 사용하였다. 부화 후 3개월 이상 된 2 ± 1 cm 크기의 개체를 이틀간 절식시킨 후 시험을 수행하였다. 시험시작 전 14일 동안 0 %의 사망률을 확인하고 순응시킨 뒤, 2 ± 1 cm 의 zebrafish (*danio rerio*)를 선별하여 준비하고 최적의 살조 물질로 선별된 NQ 화합물을 농도 별로 접종하여 각각 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 μM이 되도록 준비하였다. 시험 기간 동안에는 시험액을 교환하지 않는 지수식 시험방법 (static nonrenewal test)으로 진행하였다.

시험 조건으로는 최적 배양조건과 동일하게 설정하여 수행하였다. 24시간 간격으로 일주일 동안 지표생물 사망률과 기형을 변화를 관찰하였다.

6. 방 법

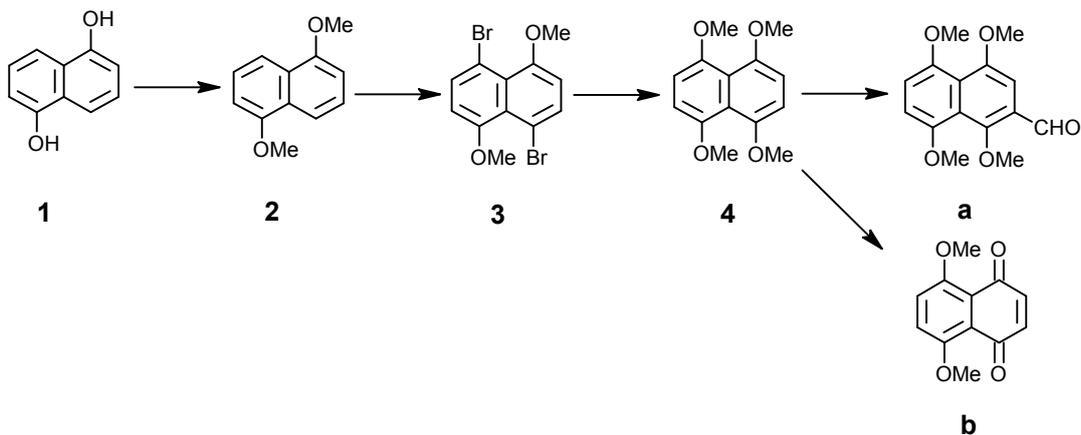


Fig. 7. Chemical structures of naphthoquinone.

1,5-dihydroxynaphthalene (1), 1,5-dimethoxynaphthalene (2), 4,8-dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene (3), 1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4), 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4a) and 5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (4b).

6.1. Procedure for the synthesis of compounds (2~4, 4a, 4b)

6.1.1. 1,5-Dimethoxynaphthalene (2)

1,5-dihydroxynaphthalene 100 g (0.62 mol)을 mechanical stirrer로 10% NaOH 수용액 450 ml에 녹이고, dimethyl sulfate 182 ml를 실온에서 약 30분 동안 적가 하여 6시간 동안 교반하였다. 생성된 갈색 침전물을 5% NaOH 수용액으로 여러 번 세척한 후 약 80 °C에서 12시간 이상 건조하여 탈수시켰다. 80 °C 오일상태에서 건조물 30g을 ethyl acetate에 완전히 녹인 다음 여기에 active carbon을 가하여 약 1시간 30분 동안 교반하였다. 이를 buchner funnel로 여과한 다음 여액을 냉각시켜 노란색의 결정 1,5-dimethoxynaphthalene (2) 23 g 얻었다.

Yield : 65 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.84 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 7.37 (2H, t, $J=8.7$ Hz), 6.86 (2H, d, $J=7.8\text{Hz}$), 3.99 (6H, s)

6.1.2. 4,8-Dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene (3)

1,5-dimethoxynaphthalene (1) 23 g (0.12 mol)을 acetonitrile 용액에 넣은 다음 0 $^\circ\text{C}$ 상태에서 *n*-bromosuccinimide 45 g을 천천히 넣어 교반하였다. 반응물이 갈색상태의 현탁한 상태에 이르러 여과한 다음 acetonitrile와 methanol로 여러 번 씻어준다. 50 $^\circ\text{C}$ 에서 건조시켜 4,8-dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene (3) 36 g 얻었다.

Yield : 80 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (2H, d, $J=8.5$ Hz), 6.75 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 3.95 (6H, s)

6.1.3. 1,4,5,8-Tetramethoxynaphthalene (4)

4,8-dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene 36 g (0.104 mol), copper(I) iodide 67.6 g (0.36 mol)과 sodium methoxide 19.3 g (0.36 mol)을 DMF 50 % methanol 용액 750 ml에 녹이고, 약 28시간 동안 70 $^\circ\text{C}$ 상태에서 환류 하였다. 반응 혼합액을 냉각시킨 다음 얼음물을 첨가하여 생성되는 침전물을 여과, 세척하였다. 얻어진 화합물을 80 $^\circ\text{C}$ 에서 약 12 시간 이상 건조시킨 후, methylene chloride 1 L에 녹여 불용물을 깨끗이 여과하여 제거한 다음 여액을 감압 농축하여 얻은 생성물을 benzene으로 재결정하여 미갈색의 결정 1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene 14 g (4) 얻었다.

Yield: 55 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.93 (4H, s), 3.98 (12H, s)

6.1.4. 2-Formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4a)

250 ml three-neck round bottomed flask에 DMF 8.15 ml (0.1 mol)와 POCl_3 9.78 ml (0.1 mol)를 넣어 혼합한 다음 여기에 1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4) 5.1 g (0.02 mol)을 chloroform 45 ml에 녹여 20분 동안 서서히 적가한 후 환류 하에서 약 6 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 냉각시킨 다음 얼음물 100 ml를 넣고,

methylene chloride로 2~3회 추출하였다. methylene chloride층을 모아 무수 황산마그네슘으로 물을 제거한 다음 감압건조하고, benzene과 n-hexane으로 재결정하여 형광을 띠는 황색의 결정 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene (4a) 5.3 g을 얻었다.

Yield : 96 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 10.89 (1H, s), 7.26 (1H, s), 7.05 (1H, d, $J=8.7$ Hz), 6.94 (1H, d, $J=8.7$ Hz), 4.0 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.92 (3H, s), 3.91 (3H, s)

6.1.5. 5,8-Dimethoxynaphthalene-1,4-dione (4b)

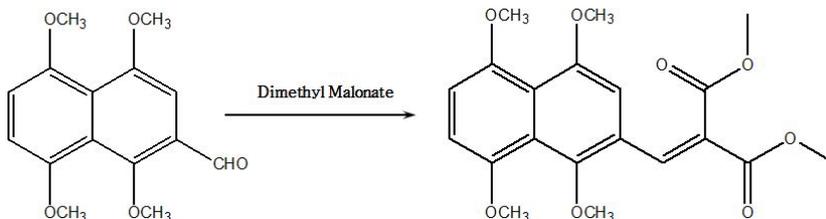
1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene 10g (40.3mol)와 acetonitrile 450ml, chloroform 150ml을 넣어 혼합 시킨 후 cerium ammonium nitrate 54g (98.5 mmol)를 물 300ml에 녹여 서서히 가 한다. 혼합물을 실온에서 한 시간 교반시킨 후 물 600ml과 CHCl_3 600ml로 2~3회 추출 하였다. methylene chloride층을 모아 무수 황산마그네슘으로 물을 제거한 다음 감압건조 하였다. 이 결과물을 MeOH로 재결정하여 5,8-dimethoxynaphthalene-1,4-dione (4b) 4.80 g의 붉은 고체를 얻었다.

Yield : 55 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.33 (2H, s), 6.79 (2H, s), 3.97 (6H, s)

6.2. General procedure for the synthesis of compounds (NQ1~4)

6.2.1. 2-(1,4,5,8-Tetramethoxy-naphthalen-2-ylmethylene)-malonic acid dimethyl ester



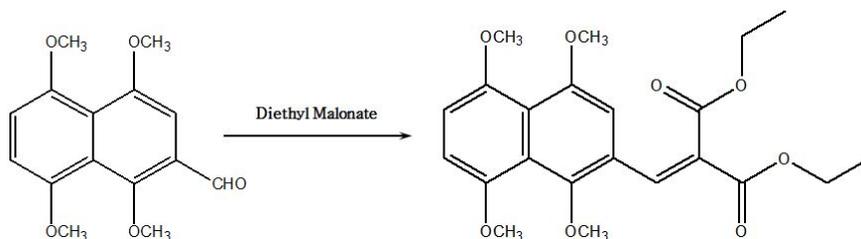
Dean-Stark trap이 장착된 100ml 플라스크에 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene 2 g (7.25 mmol)을 넣고, benzene 30ml 에 녹인 다음 여기에 dimethyl

malonate 0.83 ml (7.25 mmol), piperidine 80 μ l (0.81 mmol) 및 acetic acid 240 μ l (4.2 mmol)를 넣고, 환류하에서 약 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 진행되면서 발생하는 물은 azeotropic distillation에 의해 dean-Stark trap에 제거하였다. 반응의 진행정도는 TLC로 확인하였으며, 반응이 더 이상 진행되지 않을 때까지 반응을 진행시킨 다음 실온에서 냉각시킨 후 반응물을 5% HCl, NaHCO₃, 5% acetic acid 및 물로 충분히 세척하였다. 유기용매 층을 따로 모아 무수 황산마그네슘으로 탈수 시킨 다음 감압 증류하여 얻어진 물질을 ethyl acetate와 ethyl ether로 재결정하여 순수한 2-(1,4,5,8-tetramethoxy-naphthalen-2-ylmethylene)-malonic acid dimethyl ester을 얻었다.

Yield : 71 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (1H, s), 6.89 (2H, q), 6.82 (1H, s), 3.95 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.78 (3H, s)

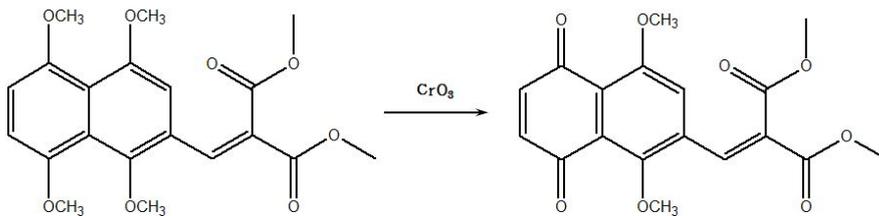
6.2.2. 2-(1,4,5,8-Tetramethoxy-naphthalen-2-ylmethylene)-malonic acid diethyl ester



Yield : 68 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (1H, s), 6.9 (2H, d), 6.88 (1H, s), 4.31 (4H, m), 3.94 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.78 (3H, s), 3.81 (3H, s), 1.35 (3H, t), 1.24 (3H, t)

6.2.3. 2-(1,4-Dimethoxy-5,8-dioxo-5,8-dihydro-naphthalen-2-ylmethylene)-malonic acid dimethyl ester (NQ1)

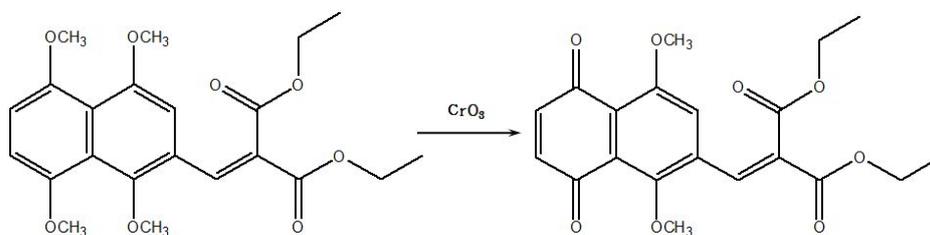


2-(1,4,5,8-tetramethoxy-naphthalen-2-ylmethylene)-malonic acid dimethyl ester 781 mg (2 mmol)을 acetone 10 ml에 녹인 다음 여기에 H₂SO₄ 250 μ l, H₂O 770 μ l, CrO₃ 300 mg (3 mmol)을 넣고, 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 얻어진 반응물을 ethyl acetate, n-hexan의 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔이 충전된 컬럼으로 분리하여 순수한 2-(1,4-dimethoxy-5,8-dioxo-5,8-dihydro-naphthalen-2-ylmethylene)-malonic acid dimethyl ester을 얻었다.

Yield : 56 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.02 (1H, d), 7.37 (2H, s), 6.82 (1H, d), 3.94 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.83 (3H, s), 3.78 (3H, s). (부록, 그림 1 참조)

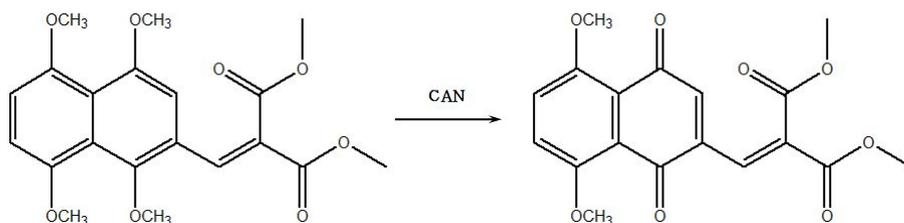
6.2.4. 2-(1,4-Dimethoxy-5,8-dioxo-5,8-dihydro-2-naphthalenyl)-malonic acid diethyl ester (NQ2)



Yield : 59 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.79 (1H, d), 7.33 (2H, s), 6.87 (1H, d), 4.31 (4H, m), 3.96 (3H, s), 3.95 (3H, s), 1.31 (6H, m). (부록, 그림 2 참조)

6.2.5. 2-(5,8-Dimethoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydro-naphthalen-2-ylmethylene)-malonic acid dimethyl ester (NQ3)

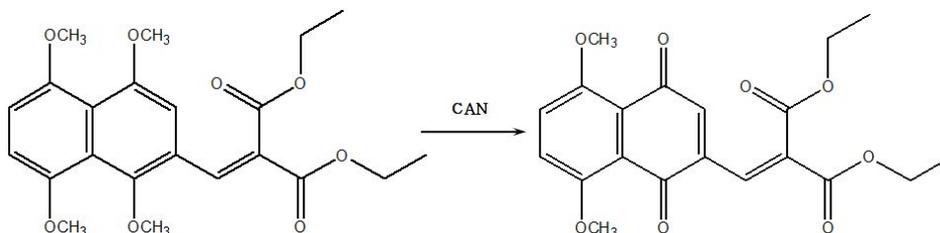


2-(1,4,5,8-Tetramethoxy-naphthalen-2-ylmethylene)-malonic acid dimethyl ester 781 mg (2 mmol)을 acetonitrile 12 ml에 녹인 다음 여기에 CAN 3.29 g (6 mmol)을 물 15 ml에 녹인 용액을 천천히 적가한 다음 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 얻어진 반응물을 ethyl acetate, n-hexan 의 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔이 충전된 컬럼으로 분리하여 순수한 2-(5,8-Dimethoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydro-naphthalen-2-ylmethylene)-malonic acid dimethyl ester을 얻었다.

Yield : 51 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.02 (1H, s), 7.37 (1H, s), 6.82 (2H, d), 3.94 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.78 (3H, s). (부록, 그림 3 참조)

6.2.6. 2-(5,8-Dimethoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydro-naphthalen-2-ylmethylene)-malonic acid diethyl ester (NQ4)

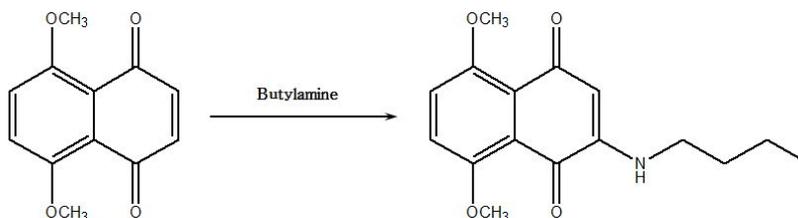


Yield : 55 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.99 (1H, s), 7.41 (1H, s), 6.81 (2H, d), 4.33 (2H, q), 4.23 (2H, q), 1.36 (3H, t), 1.22 (3H, t). (부록, 그림 4 참조)

6.3. General procedure for the synthesis of compounds (NQ5~6)

6.3.1. 2-Butylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (NQ5)

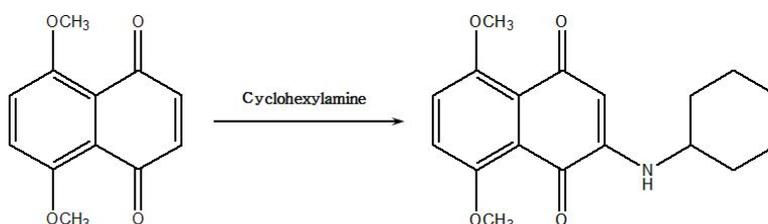


5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone 500 mg (2.29 mmol)을 MeOH 30 ml에 녹인 용액에 butylamine 341 μ l (3.44 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반시키고 반응의 진행도는 TLC로 확인 더 이상 반응이 진행되지 않으면 감압하에서 증발시키고 반응 화합물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 순수한 2-Butyl amino-5,8-dimethoxy-1,4-naphtho quinone을 얻었다.

Yield : 72 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.35 (1H, d, $J=9.51$ Hz), 7.19 (1H, d, $J=9.51$ Hz), 5.60 (1H, s), 3.96 (3H, s), 3.93 (3H, s), 3.12 (2H, q), 1.65 (2H, m), 1.42 (2H, m), 0.95 (3H, t). (부록, 그림 5 참조)

6.3.2. 2-Cyclohexylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (NQ6)

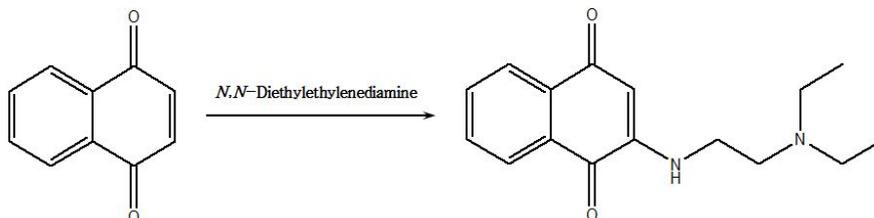


Yield : 65 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.35 (1H, d, $J=9.18$ Hz), 7.19 (1H, d, $J=9.18$ Hz), 5.62 (1H, s), 3.96 (3H, s), 3.94 (3H, s), 3.22 (1H, m), 2.00 (2H, q), 1.76 (2H, q), 1.31 (6H, m). (부록, 그림 6 참조)

6.4. General procedure for the synthesis of compounds (NQ7~8)

6.4.1. 2-(2-Diethylethylamino)-1,4-naphthoquinone (NQ7)

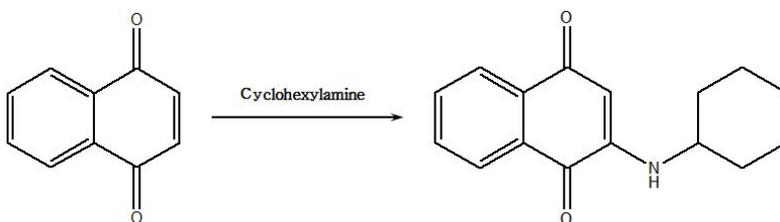


1,4-naphthoquinone 500 mg (3.16 mmol)을 MeOH 30 ml에 녹인 용액에 n,n-diethylethylenediamine 449 μ l (3.16 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반시키고 반응의 진행정도는 TLC로 확인 더 이상 반응이 진행되지 않으면 감압 하에서 증발시키고 반응 화합물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 순수한 2-butylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone을 얻었다.

Yield : 63 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 8.03 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.72 (1H, td), 3.96 (1H, td), 6.61 (1H, s), 5.71 (1H, s), 3.17 (2H, q), 2.74 (2H, t), 2.58 (4H, q), 1.05 (6H, t). (부록, 그림 7 참조)

6.4.2. 2-Cyclohexylamino-1,4-naphthoquinone (NQ8)

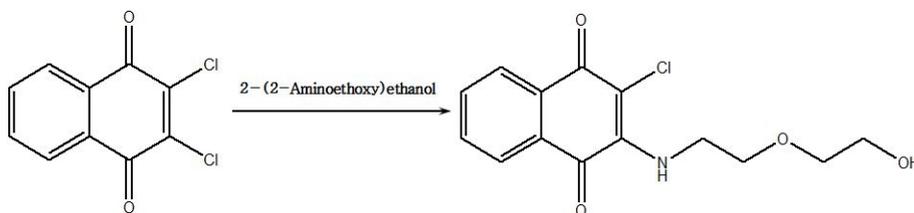


Yield : 70 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.10 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 8.05 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.72 (1H, td), 7.61 (1H, td), 5.75 (1H, s), 3.29 (1H, m), 2.06 (2H, t), 1.80 (2H, m), 1.69 (1H, t), 1.34 (6H, m). (부록, 그림 8 참조)

6.5. General procedure for the synthesis of compounds (NQ9~16)

6.5.1. 2-Chloro-3-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethylamino]-1,4-naphthoquinone (NQ9)



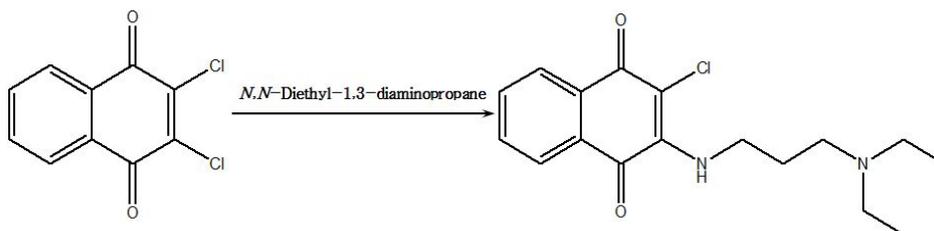
2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone 1 g (4.4mmol)을 diethylether 30 ml에 녹인 용액에 2-(2-aminoethoxy)ethanol 658 μ l (6.6mmol), triethylamine 610 μ l을 첨가하여 실온에서 24시간 동안 교반 하여준다. 반응의 진행 정도는 TLC로 확인하고 더 이상 반응이 진행되지 않으면 감압 하에서 증발시켜준다. 화합물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 순수한 2-chloro-3-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethylamino]-1,4-naphthoquinone을 얻었다.

Yield : 61 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.16 (1H, dd, J=7.68 Hz), 8.05 (1H, dd, J=7.68 Hz), 7.74 (1H, td), 7.63 (1H, td), 6.41 (1H, s), 4.10 (2H, m), 3.77 (4H, m), 3.64 (2H, t).

(부록, 그림 9 참조)

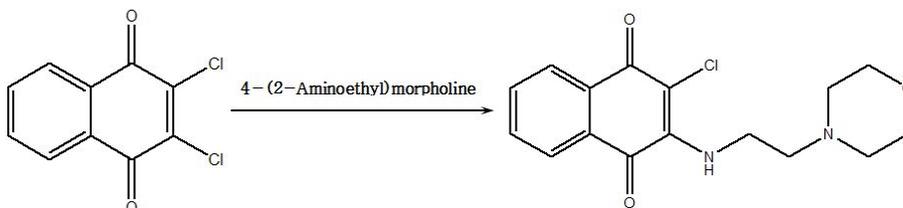
6.5.2. 2-Chloro-3-(3-diethylamino-propylamino)-1,4-naphthoquinone (NQ10)



Yield : 73 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 8.02 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.70 (1H, td), 7.59 (1H, td), 6.41 (1H, s), 4.01 (2H, q), 2.59 (6H, m), 1.82 (2H, m), 1.07 (6H, t). (부록, 그림 10 참조)

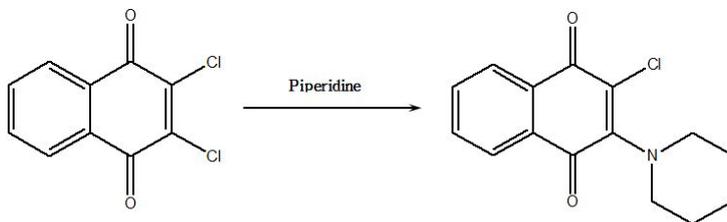
6.5.3. 2-Chloro-3-(2-morpholin-4-yl-ethylamino)-1,4-naphthoquinone (NQ11)



Yield : 62 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 8.04 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.73 (1H, td), 7.63 (1H, td), 6.41 (1H, s), 6.91 (1H, s), 3.97 (2H, q), 3.76 (4H, t), 2.67 (2H, t), 2.52 (4H, t). (부록, 그림 11 참조)

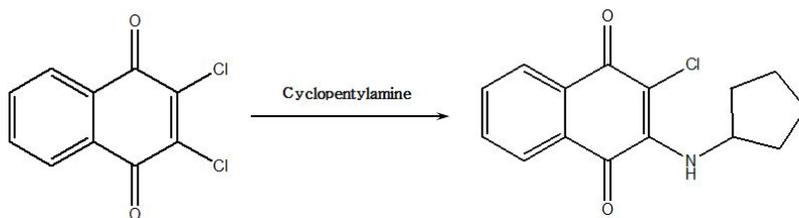
6.5.4. 2-Chloro-3-piperidin-1-yl-1,4-naphthoquinone (NQ12)



Yield : 59 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 8.01 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.67 (2H, m), 3.54 (4H, t), 1.74 (6H, m). (부록, 그림 12 참조)

6.5.5. 2-Chloro-3-cyclopentylamino-1,4-naphthoquinone (NQ13)

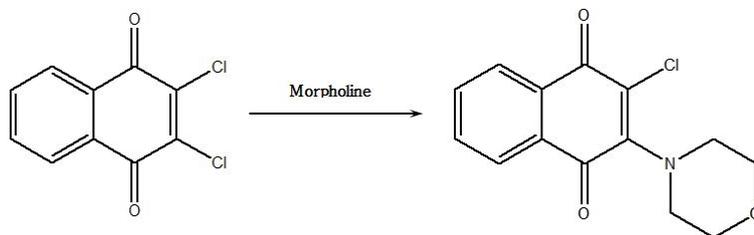


Yield : 59 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 8.04 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.73 (1H, td), 7.62 (1H, td), 6.09 (1H, s), 4.85 (1H, m), 2.10 (2H, m), 1.68 (6H, m).

(부록, 그림 13 참조)

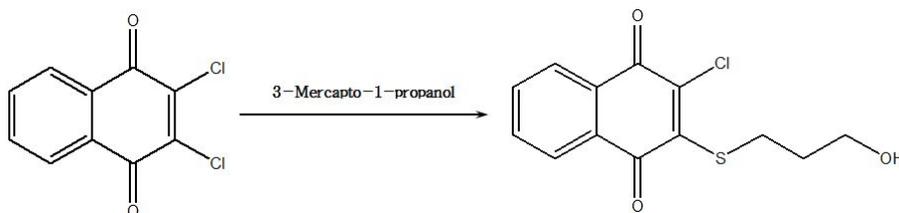
6.5.6. 2-Chloro-3-morpholin-4-yl-1,4-naphthoquinone (NQ14)



Yield : 64 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 8.03 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.70 (2H, m), 3.87 (4H, t), 3.63 (4H, t). (부록, 그림 14 참조)

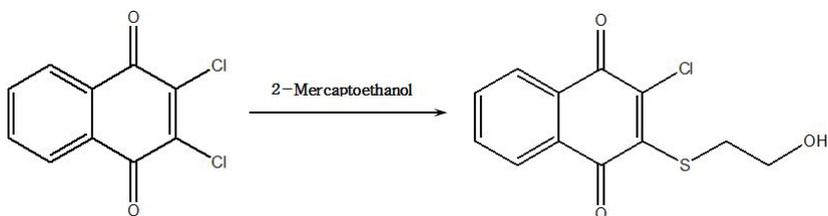
6.5.7. 2-Chloro-3-(3-hydroxy-propylsulfanyl)-1,4-naphthoquinone (NQ15)



Yield : 55 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 8.03 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.70 (2H, m), 3.81 (2H, t), 3.51 (2H, t), 1.94 (2H, m). (부록, 그림 15 참조)

6.5.8. 2-Chloro-3-(2-hydroxy-ethylsulfanyl)-1,4-naphthoquinone (NQ16)

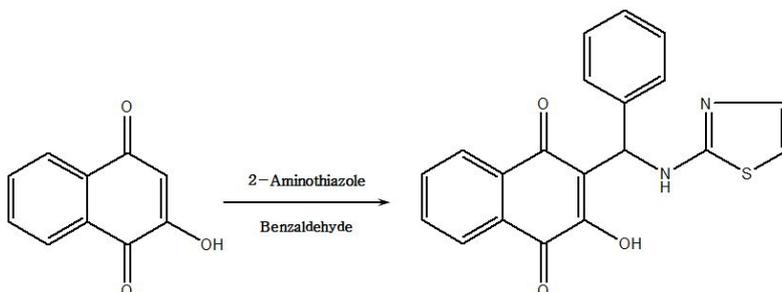


Yield : 58 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 8.06 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.47 (2H, m), 4.53 (2H, t), 3.27 (2H, t). (부록, 그림 16 참조)

6.6. General procedure for the synthesis of compounds (NQ17~23)

6.6.1. 2-Hydroxy-3-[phenyl-(thiazol-2-ylamino)-methyl]-1,4-naphthoquinone (NQ17)



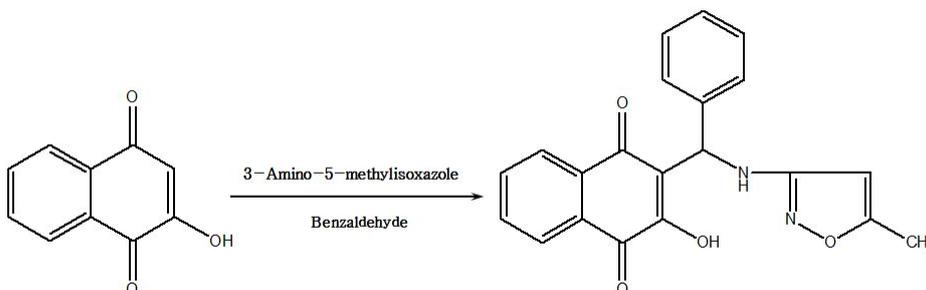
2-hydroxynaphthalene-1,4-dione 500 mg (2.87 mmol), benzaldehyde 300 μl (2.87 mmol), 2-aminothiazole 287 mg (2.87 mmol)과 촉매로 사용되는 InCl_3 를 water에 첨

가하여 6시간 환류 하여준다. 반응의 진행정도는 TLC로 확인하고 더 이상 반응이 진행되지 않으면 반응 생성물을 여과한 후 water와 EtOH로 세척하여 순수한 2-hydroxy-3-[phenyl-(thiazol-2-ylamino)-methyl]-1,4-naphthoquinone을 얻었다.

Yield : 80 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.96 (2H, td), 7.79 (2H, m), 7.42 (2H, d), 7.23 (3H, m), 7.02 (1H, d), 6.65(1H, d), 6.48(1H, s). (부록, 그림 17 참조)

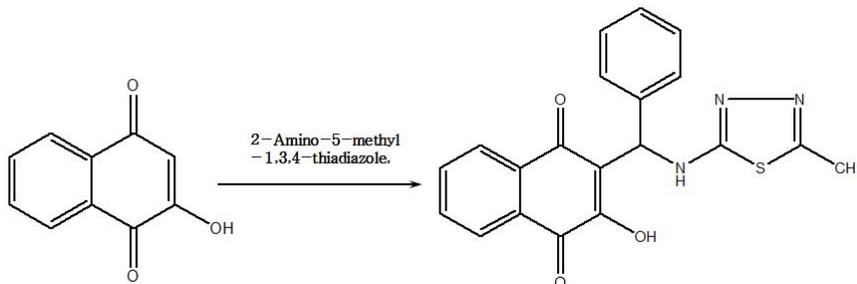
6.6.2. 2-Hydroxy-3-[(5-methyl-isoxazol-3-ylamino)-phenyl-methyl]-1,4-naphthoquinone (NQ18)



Yield : 76 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.96 (2H, m), 7.81 (2H, m), 7.41 (2H, d), 7.28 (2H, t), 7.18 (1H, t), 6.57 (1H, s), 6.17 (1H, s), 5.83 (1H, s), 2.18 (3H, s). (부록, 그림 18 참조)

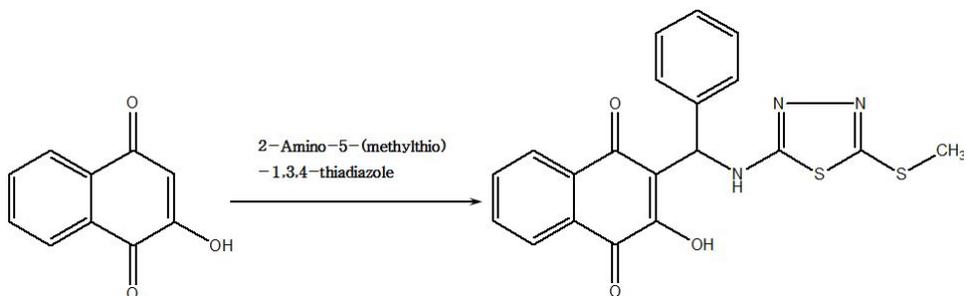
6.6.3. 2-Hydroxy-3-[(5-methyl-[1,3,4]thiadiazol-2-ylamino)-phenyl-methyl]-1,4-naphthoquinone (NQ19)



Yield : 69 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.13 (1H, d), 7.87 (2H, m), 7.72 (2H, m), 7.31 (2H, d), 7.19 (2H, t), 7.10 (1H, q), 6.45 (1H, d), 2.40 (3H, s). (부록, 그림 19 참조)

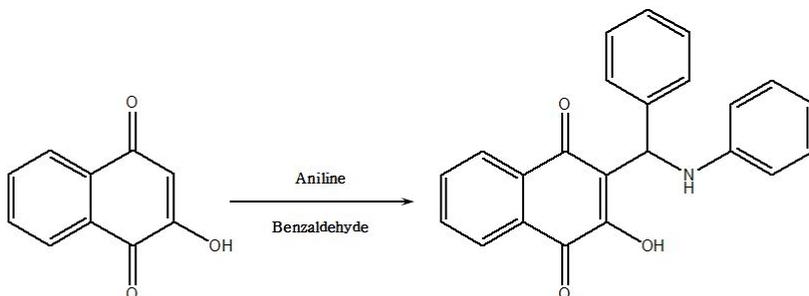
6.6.4 .2-Hydroxy-3-[(5-methylsulfanyl-[1,3,4]thiadiazol-2-ylamino)-phenyl-methyl]-1,4-naphthoquinone (NQ20)



Yield : 66 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.43 (1H, d), 7.97 (2H, m), 7.83 (2H, m), 7.42 (2H, d), 7.23 (3H, m), 6.57 (1H, d), 2.56 (3H, s). (부록, 그림 20 참조)

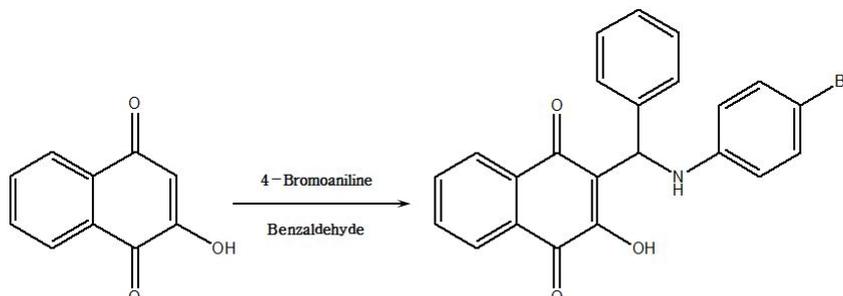
6.6.5. 2-Hydroxy-3-(phenylamino-phenyl-methyl)-1,4-naphthoquinone (NQ21)



Yield : 70 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.95 (3H, m), 7.79 (2H, m), 7.41 (3H, m), 7.27 (1H, q), 7.20 (2H, m), 7.05 (1H, m), 6.83 (1H, t), 6.71 (1H, d), 6.54 (1H, t), 6.03 (1H, s). (부록, 그림 21 참조)

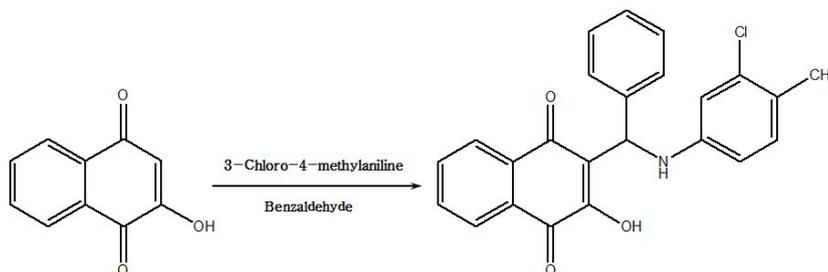
6.6.6. 2-[(4-Bromo-phenylamino)-phenyl-methyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (NQ22)



Yield : 62 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.96 (3H, m), 7.80 (2H, m), 7.58 (1H, m), 7.46 (1H, d), 7.22 (5H, m), 6.57 (1H, s), 6.66 (1H, d), 6.58 (1H, d), 6.17 (1H, s), 5.97 (1H, s).
(부록, 그림 22 참조)

6.6.7. 2-[(3-Chloro-4-methyl-phenylamino)-phenyl-methyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (NQ23)

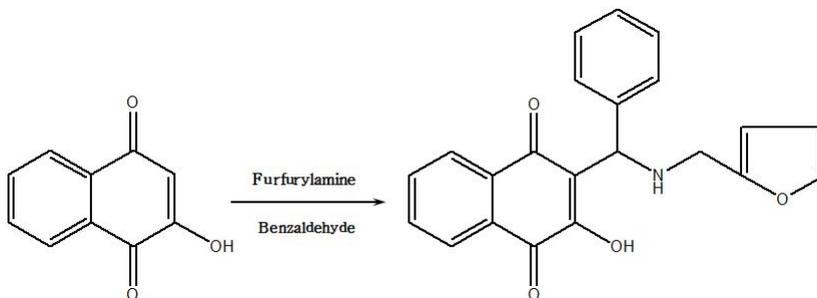


Yield : 71 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.96 (2H, m), 7.78 (2H, m), 7.51 (1H, d), 7.37 (1H, s), 7.30 (1H, t), 7.18 (1H, m), 7.00 (1H, q), 6.75 (1H, d), 6.56 (1H, m), 6.17 (1H, s), 5.96 (1H, s). (부록, 그림 23 참조)

6.7. General procedure for the synthesis of compounds (NQ24~30)

6.7.1. 2-[[{(Furan-2-ylmethyl)-amino]-phenyl-methyl}-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (NQ24)

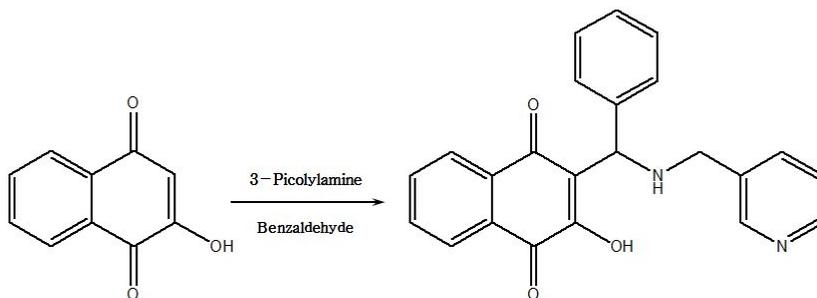


2-hydroxy-1,4-naphthoquinone 871 mg (5.0 mmol)을 ethanol 15ml에 녹인 용액에 furfurylamine 508 mg (5.5 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 5분간 교반시키고 lawsonate 형성 후 benzaldehyde 610 μ M (6.0 mmol) 첨가하고 빛이 들어오지 않도록 호일로 막아 실온에서 24시간 동안 교반 하여준다. 반응의 진행정도는 TLC로 확인하고 더 이상 반응이 진행되지 않으면 반응 생성물을 여과한 후 ethanol와 diethyl ether로 세척하여 순수한 2-[[{(furan-2-ylmethyl)-amino]-phenyl-methyl}-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone을 얻었다.

Yield : 69 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.90 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.82 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.70 (2H, m), 7.57 (3H, q), 7.31 (3H, m), 6.48 (2H, d), 5.48 (1H, s). (부록, 그림 24 참조)

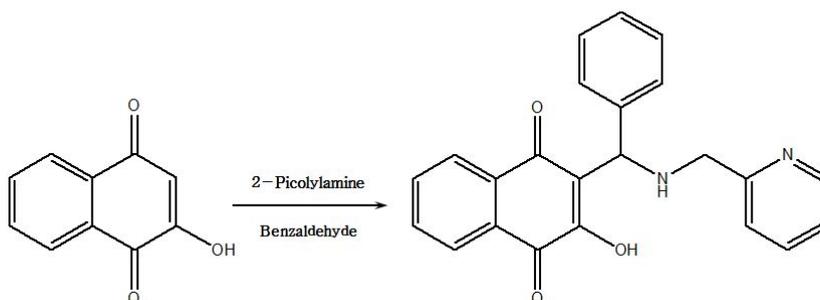
6.7.2 2-Hydroxy-3-{phenyl-[(pyridin-3-ylmethyl)-amino]-methyl}-1,4-naphthoquinone (NQ25)



Yield : 68 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.55 (2H, q), 7.89 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.81 (2H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.70 (1H, td), 7.58 (3H, m), 7.55 (3H, m), 6.48 (2H, d), 5.48 (1H, s). (부록, 그림 25 참조)

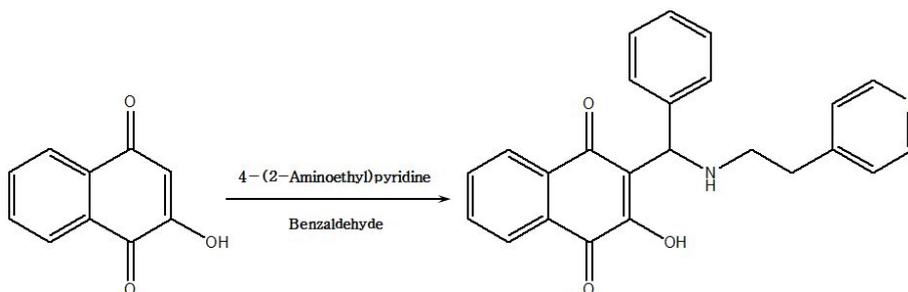
6.7.3. 2-Hydroxy-3-{phenyl-[(pyridin-2-ylmethyl)-amino]-methyl}-1,4-naphthoquinone (NQ26)



Yield : 66 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.55 (2H, d), 7.89 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.81 (2H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.70 (1H, td), 7.58 (3H, m), 7.55 (3H, m), 6.48 (2H, d), 5.48 (1H, s). (부록, 그림 26 참조)

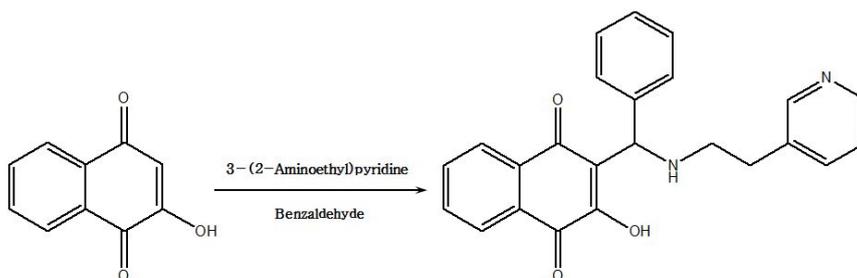
6.7.4. 2-Hydroxy-3-[phenyl-(2-pyridin-4-yl-ethylamino)-methyl]-1,4-naphthoquinone (NQ27)



Yield : 62 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.44 (2H, d), 7.87 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.79 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.69 (1H, td), 7.59 (3H, m), 7.31 (5H, m), 5.57 (1H, s). (부록, 그림 27 참조)

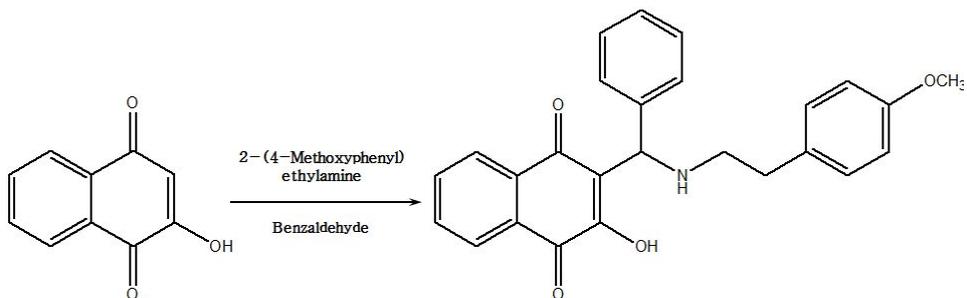
6.7.5. 2-Hydroxy-3-[phenyl-(2-pyridin-3-yl-ethylamino)-methyl]-1,4-naphthoquinone (NQ28)



Yield : 71 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.43 (2H, d), 7.89 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.81 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.64 (5H, m), 7.31 (4H, m), 5.57 (1H, s). (부록, 그림 28 참조)

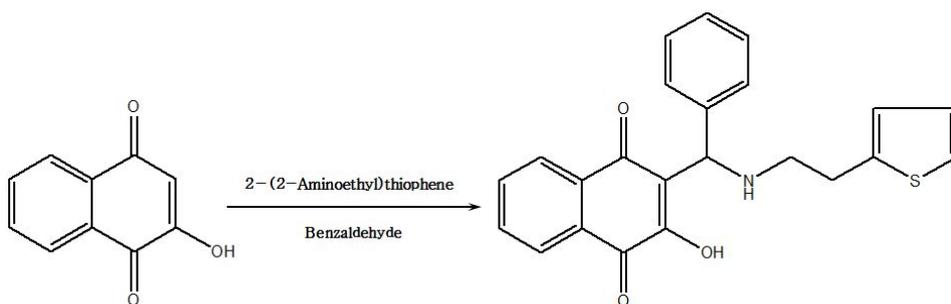
6.7.6. 2-Hydroxy-3-{{[2-(4-methoxy-phenyl)-ethylamino]-phenyl-methyl}-1,4-naphthoquinone (NQ29)



Yield : 64 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.89 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.81 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.69 (1H, td), 7.56 (1H, td), 7.31 (3H, m), 7.10 (2H, d), 6.84 (2H, d), 5.57 (1H, s), 3.72 (3H, s). (부록, 그림 29 참조)

6.7.7. 2-Hydroxy-3-[phenyl-(2-thiophen-2-yl-ethylamino)-methyl]-1,4-naphthoquinone (NQ30)



Yield : 68 %

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.90 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.81 (1H, dd, $J=7.68$ Hz), 7.69 (1H, td), 7.59 (3H, m), 7.32 (4H, m), 6.93 (2H, d), 5.58 (1H, s), 3.14 (4H, m). (부록, 그림 30 참조)

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. NQ 화합물의 살조능 테스트 결과

새로운 살조물질 발견을 위한 효과적인 유해조류 제어 연구를 위해 총 30 종의 naphthoquinone 화합물을 유해조류 4종과 무해조류 2종에 처리하여 살조율 IC₅₀값을 조사하였다. 여러 NQ 화합물 중에서 유해조류에 살조 효과가 높게 나타나며 상대적으로 무해조류에 살조 효과가 낮은 NQ 화합물을 선별하였다. 이들 중 7종의 NQ 화합물들은 유해조류 4종에 대해서는 1 μM 수준의 낮은 농도의 IC₅₀값을 보이며 무해조류에서는 상대적으로 5 μM 이상의 높은 농도의 IC₅₀값이 나타나 선택적으로 유해조류를 제어하는 특징을 알 수 있었다.

선별된 화합물은 7종 (NQ 3, 4, 14, 15, 16, 19, 20)으로서 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone의 골격에 치환된 유도체 3종과 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene의 골격에 치환된 유도체 2종, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone의 골격에 치환된 유도체 2종 중 평균적으로 가장 살조 능력이 높은 화합물은 NQ16 이며, NQ3, NQ4은 *s. hantzchii* 종에만 뛰어난 살조활성을 보였다. (Table. 3.)

Table. 3. Algicidal effects of the various naphthoquinones.

NO. (NQ)	IC ₅₀ (μM)					
	Harmful algal species				Non-harmful algal species	
	Anabaena flos-aquae	Microcystis aeruginosa	C. meneghi niana	S. hantzchii	Scedesmus obliguus	Chlorea vulgaris
1	4.32 μM	> 5 μM	> 5 μM	0.835 μM	> 5 μM	> 5 μM
2	> 5 μM	> 5 μM	> 5 μM	0.861 μM	> 5 μM	> 5 μM

3	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	0.213 µM	> 5 µM	> 5 µM
4	4.39 µM	3.881 µM	> 5 µM	0.285 µM	> 5 µM	> 5 µM
5	> 5 µM	3.76 µM	> 5 µM	4.055 µM	> 5 µM	> 5 µM
6	0.73 µM	> 5 µM	> 5 µM	4.651 µM	> 5 µM	> 5 µM
7	1.58 µM	> 5 µM	> 5 µM	0.409 µM	> 5 µM	> 5 µM
8	1.6 µM	2.23 µM	> 5 µM	2.48 µM	> 5 µM	> 5 µM
9	0.65 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
10	0.58 µM	1.5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
11	1.45 µM	0.8 µM	> 5 µM	1.544 µM	> 5 µM	> 5 µM
12	4.64 µM	> 5 µM	> 5 µM	3.497 µM	> 5 µM	> 5 µM
13	1.4 µM	3.75 µM	> 5 µM	1.53 µM	> 5 µM	> 5 µM
14	0.39 µM	> 5 µM	> 5 µM	0.826 µM	> 5 µM	> 5 µM
15	0.39 µM	> 5 µM	> 5 µM	0.5 µM	> 5 µM	> 5 µM
16	0.04 µM	0.088 µM	> 5 µM	0.157 µM	> 5 µM	> 5 µM
17	1.54 µM	1.89 µM	> 5 µM	3.4174 µM	> 5 µM	> 5 µM
18	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
19	0.08 µM	0.162 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
20	0.198 µM	0.39 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
21	0.568 µM	3.18 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
22	0.533 µM	1.21 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
23	0.732 µM	4.1 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
24	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
25	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
26	> 5 µM	0.88 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
27	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
28	> 5 µM	3.49 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
29	2.57 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM
30	> 5 µM	1.92 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM	> 5 µM

2. 살조능 테스트 결과 선택된 NQ 화합물의 구조

30개의 NQ 유도체 살조능 테스트 결과 2종의 무해조류에는 큰 영향을 미치지 않으며 4종의 유해조류에 선택적 반응을 보이는 NQ 화합물 7종을 선별하여 연구를 진행하였다. 천연상태로 볼 수 있는 형태는 $\alpha(1,4)$ -naphthoquinone의 골격을 기반으로는

2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene, 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone 구조에 치환된 구조가 electro donating group인가 electro withdrawing group에 의해 살조활성의 차이를 보고 대부분의 높은 살조활성을 보이는 NQ 유도체의 치환기 구조는 electro donating group이었고, 보다 간결한 구조를 다시 말해 입체장애가 적을수록 그 살조활성이 높아짐을 IC₅₀값을 통해 확인 할 수 있었다.

3. 선택된 NQ 유도체에 대한 유해조류의 형태 변화

선택된 NQ 화합물의 살조 기작을 밝히고자 우선 형태 변화를 관찰하였다. 가장 살조 효과가 좋은 NQ 16을 이용하였으며 1 µM의 농도를 처리하여 연속된 사멸과정을 확인하였다. NQ16 1 µM을 *microcystic aeruginosa* 종에 처리한 결과 2시간부터 대조구 세포 크기보다 작은 크기의 구형으로 변하고 3시간 안에는 세포막이 터지며 세포질이 사출되는 모습을 확인하였다. 6시간 후 *microcystic aeruginosa* 종은 원래의 형태를 알 수 없을 정도로 세포가 터져 흩어짐을 알 수 있었다. (Fig. 8.)

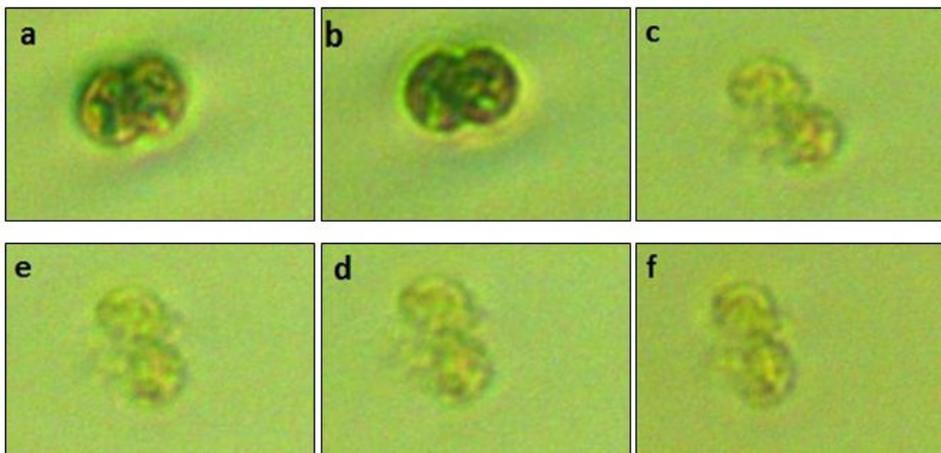


Fig. 8. NQ16 1 µM 처리 후 *microcystic aeruginosa*의 형태 관찰. (a) control, (b)~(f) NQ 16 처리 후 (b: 2hr, c: 3hrs, d: 4hrs, e: 5hrs, f: 6hrs.)

NQ 화합물 2-6 4 μM 을 *anabaena flos-aquae* 종에 처리한 결과 3시간 이내에 세포 chain이 늘어지며 순식간에 세포질이 사출되는 현상을 관찰할 수 있다. 9시간 후 관찰 결과 *anabaena flos-aquae* 종은 100% 사멸되었다. (Fig. 9.)

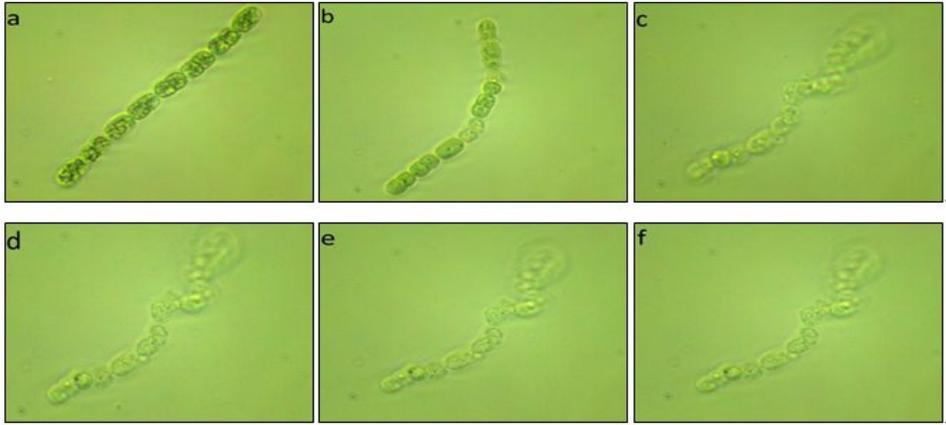


Fig. 9. NQ16 1 μM 처리 후 *anabaena flos-aquae*의 형태 관찰. (a) control, (b)~(f) NQ 16 처리 후(b: 2hr, c: 3hrs, d: 5hrs, e: 7hrs, f: 9hrs.)

NQ 16 1 μM 을 *stephanodiscus hantzchii* 종에 처리한 결과 15시간 이내에 대조구 세포 형태와 다른 모양으로 변형이 시작되고, 24시간 지나 세포 외형이 변형되는 단계를 지나 세포막이 터지며 모습을 확인하였다. (Fig. 10.)

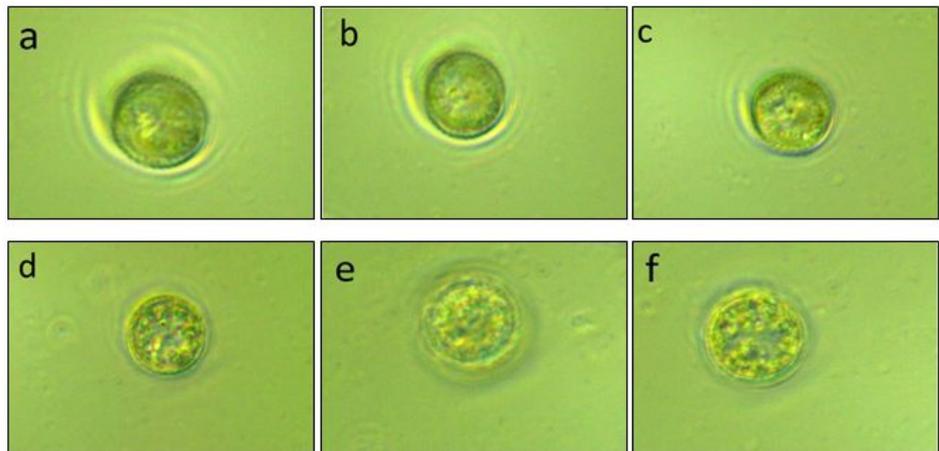


Fig. 10. NQ16 1 μ M 처리 후 *stephanodiscus hantzchii*의 형태 관찰. (a) control, (b) ~ (f) NQ 16 처리 후 (b: 5hr, c: 10hrs, d: 15hrs, e: 20hrs, f: 24hrs)

4. 우수한 살조활성을 보인 NQ 유도체의 급성독성평가

우수한 살조활성을 보이는 NQ 유도체 7종에 생태독성평가에 널리 사용되는 공식어종인 zebrafish (*danio rerio*)를 대상으로 급성생태독성을 평가하여 생태계 내 적용 가능한 최적의 살조물질을 선택하기 위한 목적으로 실험을 수행하였다.

유리 및 플라스틱수조에 배양수 6 L에 10마리의 zebrafish를 각각 나누어 담고 각 수조에 NQ19을 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 μ M이 되도록 약물처리 하였다. 시험 기간 동안에는 시험액을 교환하지 않는 지수식 시험방법 (static nonrenewal test)으로 진행하였으며 시험 조건으로는 최적 배양조건과 동일하게 설정하여 수행하였다. 24시간 간격으로 일주일 동안 지표생물 사망률과 기형을 변화를 육안으로 관찰하였다. 그 결과 2,3-dichloro-1,4-napthoquinone을 사용해 합성된 유도체에서는 대부분 2 μ M의 IC_{50} 을 가졌으며 대부분의 유도체에서 독성이 검출되었다. 하지만 2-hydroxy-1,4-napthoquinone을 사용하여 합성된 유도체에서는 사망과 기형을 찾아 볼 수 없었고, 5 μ M의 고농도에서도 전혀 독성을 나타내지 않았으며, 현재 30 μ M까지 실험을 수행한 결과 독성을 찾아 볼 수 없었다.

IV. 결론

본 연구는 의약품, 제초제, 살균제 등 다양한 용도로 사용되는 naphthoquinone의 기본구조를 근간으로 기존 naphthoquinone 유도체 (1,4-naphthoquinone과 9,10-anthraquinone 등)와는 차별되는 신규 유도체를 합성하여 남조류를 포함한 유해 담수조류에 제어효과를 입증하였다. 그렇다면 NQ 유도체의 조류제거능력은 어떠한 기작을 통해서 이루어질까? NQ 유도체의 세포 또는 생물제거능력은 몇 가지 주요인자 (factor)에 의해 결정된다고 알려져 있다.

첫 번째, 독성효과에 작용하는 인자는 생물의 형태, 크기, 세포내 구조, 생화학적 조성, 화학물질에 대한 민감성 등이다. 사용된 남조 *m. aeruginosa*의 형태는 구형으로 5 μm 정도인 직경을 가지고 있으며, 세균에 가까운 구조와 생화학적 조성을 가지는 광합성 조류이다. 이미 naphthoquinone은 병원성세균 등에 세포독성을 나타낸다고 알려져 있다. 실제로 30 종의 NQ 화합물 중 7 종이 1 μM 의 초기 접종농도에서 90% 이상의 *m. aeruginosa*의 세포를 효과적으로 제어할 수 있었다. 그러나 같은 *anabaena* 속의 남조인 *a. flos-aquae*는 최종 선정된 7 종의 유도체 (NQ14, 15)에 서로 현격한 민감도 차이를 보여주었다. *m. aeruginosa*의 경우 7 종의 유도체에 상대적으로 강한 저항성을 보여준 반면, *a. flos-aquae*는 보다 적은 농도에서도 낮은 저항성을 보였다. 또한 전반적으로 남조류와 규조류는 녹조류에 비해 NQ 유도체에 낮은 저항성을 보였다. 생태계 내에서 무해한 종으로 알려져 있는 녹조류가 NQ에 저항성이 높은 점은 유해종 위주의 선택적 제어가 가능하다는 것을 말해준다.

두 번째, 독성효과에 중요한 작용인자는 NQ 유도체의 화학구조 (중심골격구조의 형태, 주변구조에서 치환기의 형태, 수, 위치 등, 화합물의 charge)이다. 따라서 IC_{50} -120 h 값으로 평가한 살조활성을 화학구조와 상관관계 분석을 수행하였다. 먼저 중심골격인 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene, 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 2,3-Dichloro-1,4-naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone에 치환된 구조가 electro donating group인가 electro withdrawing group에 의해 살조활성의 차이를 보였다. 대부분의 높은 살조활성을 보이는 NQ 유도체의 치환기 구조는 electro donating group 이었고, 보다 간결한 구조를 다시 말해 입체장애가 적을수록 그 살조활성이 높아짐을 확인 할 수 있었다.

세 번째, 살조활성에 중요한 인자는 사용되는 빛의 파장과 강도이다. 강도가 강한 빛은 singlet oxygen의 생산율과 매우 관계가 높기 때문에 상대적으로 더 높은 독성효과를 얻을 수 있다. singlet oxygen에 의한 ROS의 살균능력 (biocidal power)은 1960 년대부터 생물학자와 화학자의 관심의 대상이었다. 많은 연구를 통해서, 다양한 quinone 구조의 화합물들이 세균, 바이러스, 효모, 곰팡이 등에게 우수한 세포독성을 보였으며, 특히 남조류와 매우 유사한 특징을 가지고 있는 세균 등에 작용하는 주요기작이 free radical에 의한 superoxide의 생성이었다. Quinone은 ‘oxidative stress’의 형성을 수반하게 되고, 이어서 flavo-enzyme (NADPH-cytochrom-P-450 reductase)과 mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase에 의해 semiquinone free radical이 형성된다. Semiquinone free radical로부터 다시 quinone으로 되돌아가는 과정에서 superoxide를 생성하게 되고 (Fig. 11.), superoxide로부터 hydroxyl radical이 생성되는데, 이것은 DNA에 작용하여 세포분열을 억제하는 것으로 판단된다. 그러나 우리의 연구에서는 singlet oxygen의 생성에 대한 정량적인 연구를 수행하지 않았다. 다만 명조건 (light condition)과 암조건 (dark condition) 하에서 1 시간단위로 24 시간 동안 *m. aeruginosa*의 세포수의 변화를 계수했을 때 명조건에서 1.5배 남조세포의 사멸율이 높았으나 암조건 하에서도 지속적인 세포사멸이 발생하였다. 따라서 Reddi 등의 결과와 마찬가지로, ROS 이외에도 화합물 자체가 독성을 가지고 있어 남조세포와 직접접촉을 통한 세포사멸을 유도할 것으로 사료되었다.

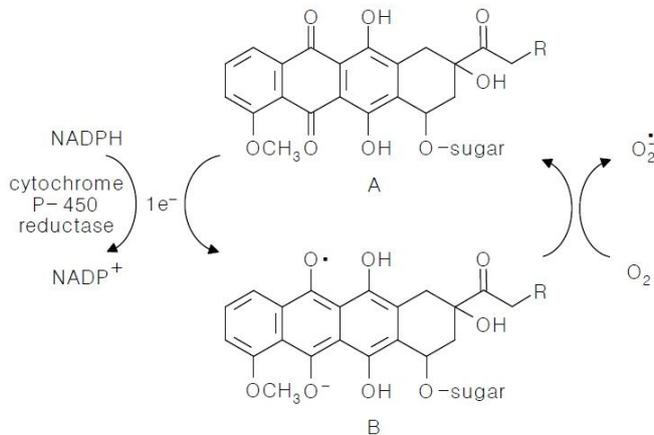


Fig. 11. Electron transfer mechanism for DNA damage by anthracyclines.

그 외에도 naphthoquinone의 골격을 갖고 있는 약물들은 DNA 복제에 관여하는 topoisomerase에 작용하여 세포분열 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

Naphthoquinone계 약물 등 현재 사용되어지고 있는 많은 약물들은 DNA에 결합함으로써 DNA의 복제 및 전사를 억제하는 intercalation 현상에 의해 주로 세포들을 살멸하는 것으로 알려져 왔으나 최근의 연구결과를 보면 intercalation이라는 현상은 세포분열억제효과를 나타내는 여러 단계의 작용 메커니즘 중 단지 첫 번째 단계일 뿐이며, 대부분의 intercalating 약물들은 DNA복제에 관여하는 topoisomerase II라는 효소를 억제함으로써 세포분열억제효과를 나타내는 것으로 밝혀지고 있다. topoisomerase II는 DNA 합성에 이어 다른 DNA를 분리하므로 세포의 proliferation에 밀접한 관련이 있다. 그러므로 이효소의 활성저지는 곧 세포증식의 중지를 뜻한다.

다양한 기작의 세포독성을 보유한 살조물질 naphthoquinone의 살조활성을 개선하여 경제성 높은 화학적 제제를 개발하기 위한 목적으로, 기존 NQ 기반구조를 변형하여 30 종의 NQ 유도체를 합성하였다. 살조활성과 화학구조 간의 상관관계를 입증하여 향후 더욱 우수한 살조활성을 보유한 살조물질의 개발에 도움을 줄 것으로 사료된다. 또한 상기 실험을 통해 1 μ M 이하의 접종농도에서 *m. aeruginosa*, *a. flos-aquae*와 *s. hantzschii*를 각각 효과적으로 제어 가능한 7 종의 NQ 유도체를 선별하였으며, 그 중 NQ 16의 가장 우수한 살조활성을 보였다. 또한 NQ 16의 제어 대상이 국내 호서생태계 내에서 크게 우점하여 문제를 발생시키는 남조와 규조 종들만을 제어 할 수 있기 때문에 생태계 내 안전성 확보가 가능할 것으로 사료된다.

하지만 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone을 이용하여 합성된 유도체를 제외한 나머지 유도체에서 zebrafish을 이용한 생태독성실험을 진행한 결과, 독성이 있는 것으로 나타났다. 특히 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone을 이용하여 합성된 유도체는 대부분 2 μ M 정도의 IC₅₀ 값을 가졌다. 2 μ M은 매우 고농도이긴 하지만 그 독성이 생태계에 어떤 영향을 미칠지는 미지수이기 때문에 독성이 전혀 나타나지 않은 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone의 유도체의 연구가 계속해서 진행되어야 할 것이고 향후, 우수한 살조활성을 보인 유도체의 구조골격을 기반으로 살조활성 관련 구조골격의 상관관계에 대한 연구가 추가로 이루어지고 선별된 우수 유도체에 대한 생태독성평가가 추가로 수행된다면 유해조류 대량발생시 효과적으로 제어 할 있을 것으로 판단된다.

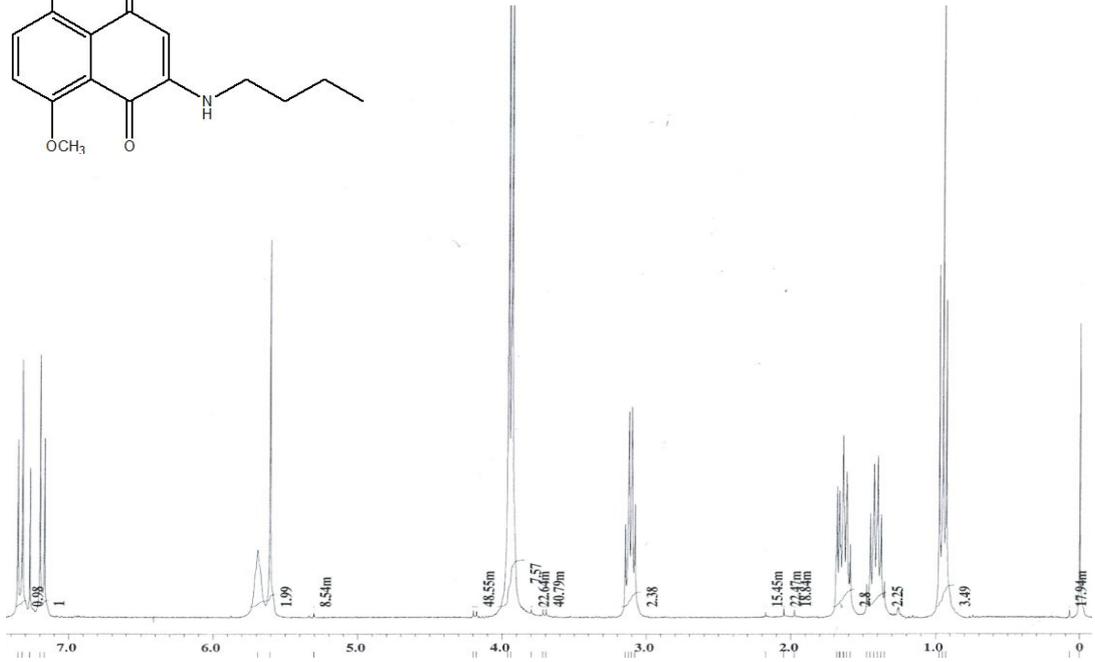
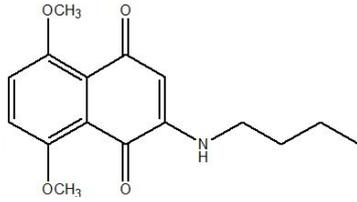
참 고 문 헌

- [1] Kim, B.C., Kim, E.K., Park, H.D., and Cheon, J.G., *Toxic cyanobacteria in lake*. Dong-Hwa Technology, Seoul, 15-35 (1999).
- [2] Cameron, C.D., *Is this a way to run a reservoir? In: Practical Lake Management for Water Quality Control*. Proceedings of a Seminar, Los Angeles, CA, American Waterworks Association, Denver, 63-83 (1989).
- [3] Foflonker, F., *Biological methods to control common algal bloom-forming species*. Basic Biotechnology, 5, 19-24 (2009).
- [4] Sigeo, D.C., Glenn, R., Andrews, M.J., Bellinger, E.G., Butler, R.D., Epton, H.A.S., and Hendry, R.D., *Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities*. Hydrobiologia, 395/396, 161-172 (1999).
- [5] Han, M.-S., Lee, K., and Yoo, K.I. (1995), *Ecological studies on Togyo reservoir in Chulwon, Korea I. A field test for in situ aquatic net-enclosure mesocosm*. Kor. J. Limnol., 28(4), 487-495 (1995).
- [6] Han, M.-S., Lee, H.-R., Hong, S.-S., Kim, Y.-O., Lee, K., Choi, Y.-K., Kim, S., Yoo, K.-I., *Ecological studies on Togyo reservoir system in Chulwon, Korea. V. Seasonal changes of size-fractionated standing crops and chlorophyll a of phytoplankton in Kyunan stream of Paldang river-reservoir systems and Togyo reservoir, Korea*. Kor J Environ Biol, 20 (1), 91-99 (2002).
- [7] Ha K, Jang M-H and Joo G-J., *Spatial and temporal dynamics of phytoplankton communities along a regulated river system, the Nakdong river, Korea*. Hydrobiologia, 470, 235-245 (2002).
- [8] Jeppesen, E., and Sammalkorpi, I., *Chapter 14 "Lake" In: Perrow, M. & Davy, T. [Eds.] Handbook of Restoration Ecology, Cambridge University Press: 297-324 (2002)*.
- [9] Gumbo, R.J., Ross, G., and Cloete, E.T., *Biological control of Microcystis dominated harmful algal blooms*. Afr. J. Biotechnol., 7(25), 4765-4773 (2008).
- [10] Doucette, G.J., McGovern, E.R., and Babinchak, J.A., *Algicidal bacteria active*

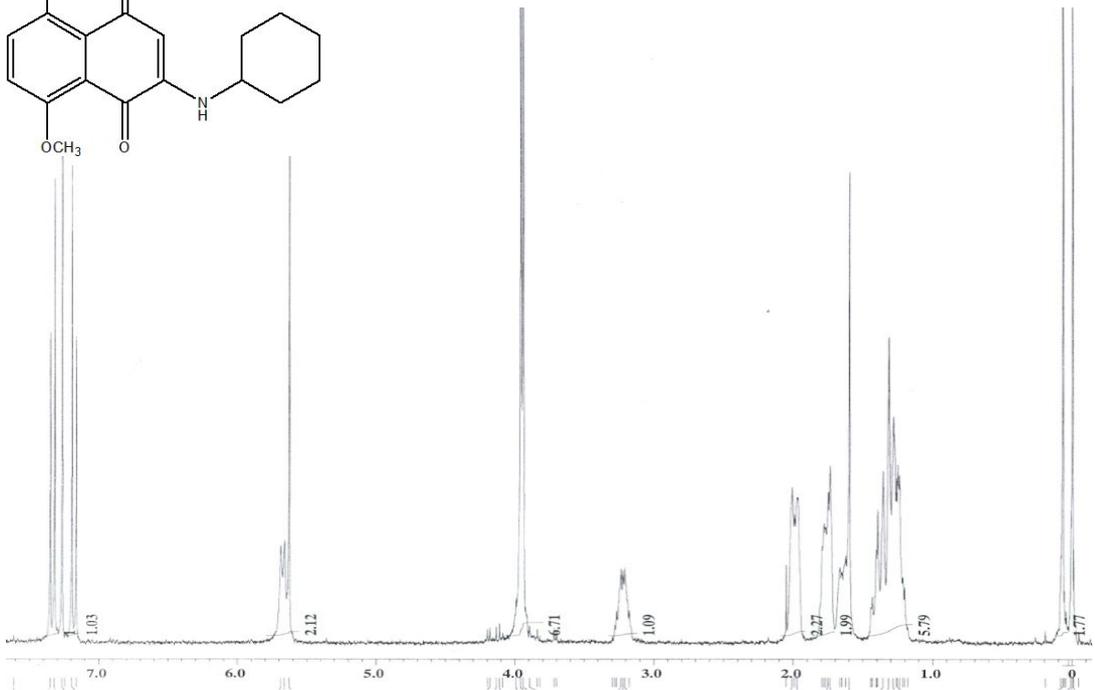
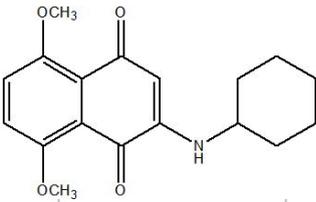
- against Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. J. Phycol., 35, 1447-1454 (1999).
- [11] Choi, H.-J., Kim, B.-H., Kim, J.D., and Han, M.-S., *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters. Biol. Control., 33, 335-343 (2005).
- [12] Walker, H.L., and Higginbotham L.R., *An aquatic bacterium that lyses cyanobacteria associated with off-flavor of channel catfish (Ictalurus punctatus)*. Biological Control, 18, 71-78 (2000).
- [13] Sengco, M.R., *Prevention and control of Karenia brevis blooms*. Harmful Algae, 8, 623-628 (2009).
- [14] Olszewski, P., *Versuch einer Ableitung des hypolimnischen Wassers an einem See*. Ergebnisse des ersten Versuchsjahres. Verh. Int. Ver. Limnol., 18, 1792-797 (1961).
- [15] Welch, E.B., Buckley, J.A., and Bush, R.M., *Dilution as an algal bloom control*. J. Water Poll. Contr. Fed., 44, 2245-2265 (1972).
- [16] Gäächter, R., *Die Tiefenwasserableitung, ein Weg zur Sanierung von Seen*. Schweiz.Z. Hydrolog., 38, 1-28 (1976).
- [17] Sas, H., *Lake Restoration by Reduction of Nutrient Loading: Expectations, Experiences, Extrapolations*. Academia Vlg. Richarz, 479 (1989).
- [18] Robb, M., Greenop, B., Goss, Z., Douglas, G., and Adeney, J., *Application of Phoslock an innovative phosphorus binding clay, to two Western Australian waterways: preliminary findings*. Hydrobiologia, 494, 237-243 (2003).
- [19] Song, M.Y., Hwang, S.J., and Park, C.H., *A Study on Prevention Methods of Algal Blooms - Cases and Strategic Options*. Gyeonggi Research Institute, Gyeonggido, 1-144 (2001).
- [20] Yu, Z.-M., Zou, J.-Z., and Ma, X.-N., *Application of clays to removal of red tide organisms III. The coagulation of Kaolin on red tide organisms*. Chin. J. Oceanol. Limnol., 12(4), 316-324 (1995).
- [21] Yu, Z.-M., Zou, J.-Z., and Ma, X.-N., *Application of clays to removal of red tide organisms II. Coagulation of different species of red tide organisms with*

- montmorillonite and effect of clay pretreatment.* Chin. J. Oceanol. Limnol., 12(4), 316-324 (1994).
- [22] Lam, A.K.Y., Prepas, E.E., Spink, D., and Hrudey, S.E., *Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health.* Wat. Res., 29, 1845-1854 (1995).
- [23] Inbaraj J. J., Grandhidasan R., Murugesan R., *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1072-1078 (1999).
- [24] Munday R., Smith B. L., Munday C. M., *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 759-756 (1995).
- [25] Tandon V. K., Chlor R. B., Singh R. V., Rai S., Yadav B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 1079-1083 (2004).
- [26] Poovey, A. G., Getsinger, K. D., Skogerboe, J. G., Koschnick, T. J., madsen, J. D., & Stewart, R. M. (2004). *Lake and Reservoir Management*, 20, 322-332.

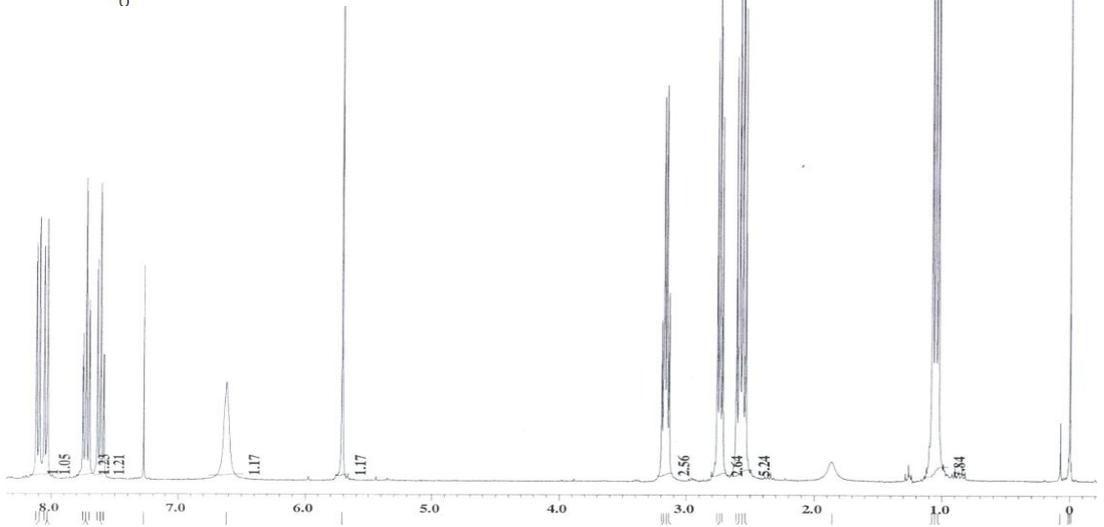
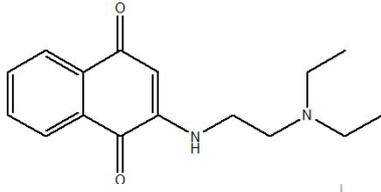
^1H NMR Spectra
(부 록)



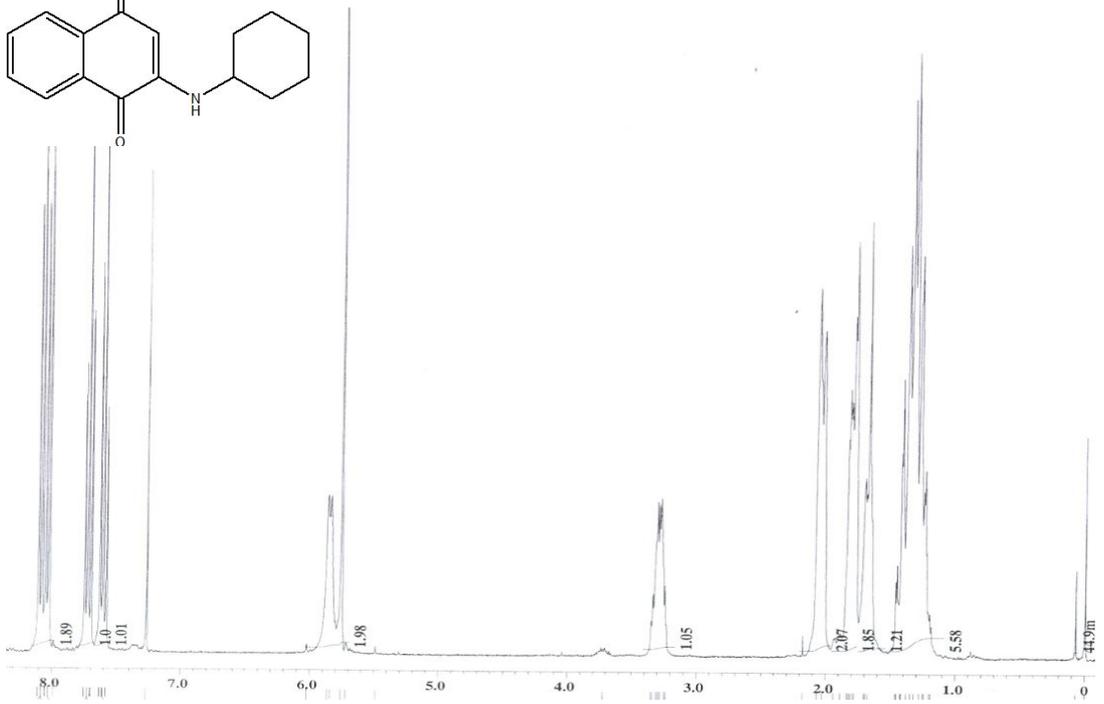
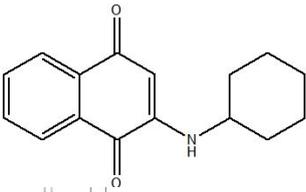
(그림 5.) 2-Butylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone.



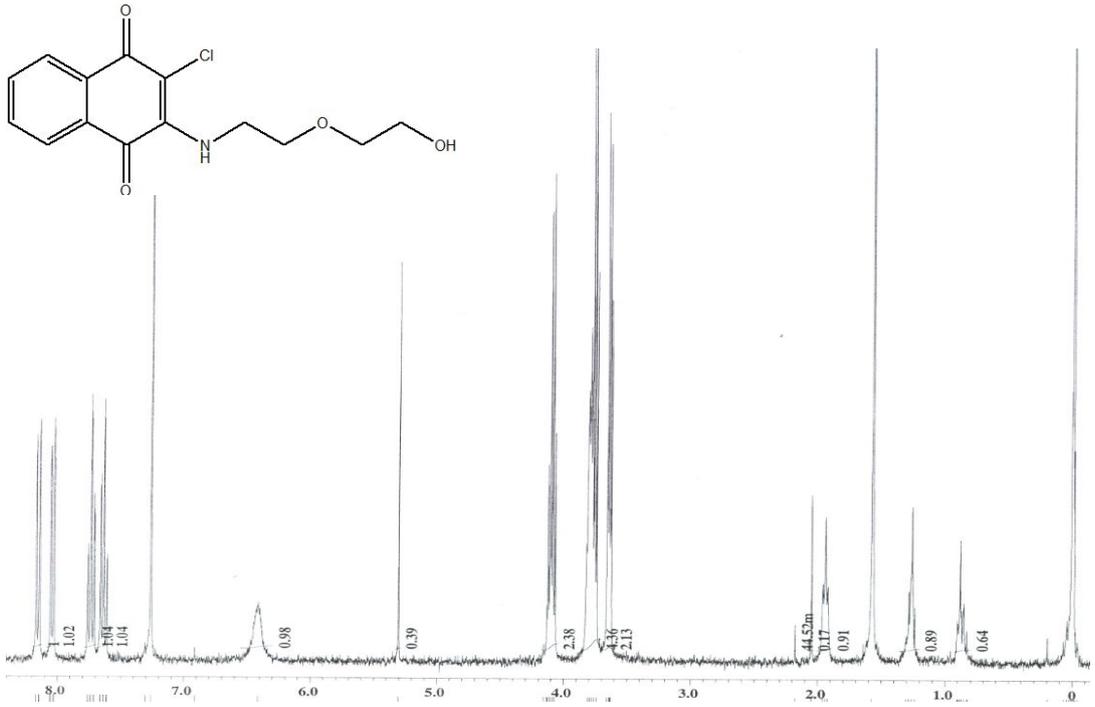
(그림 6.) 2-Cyclohexylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone.



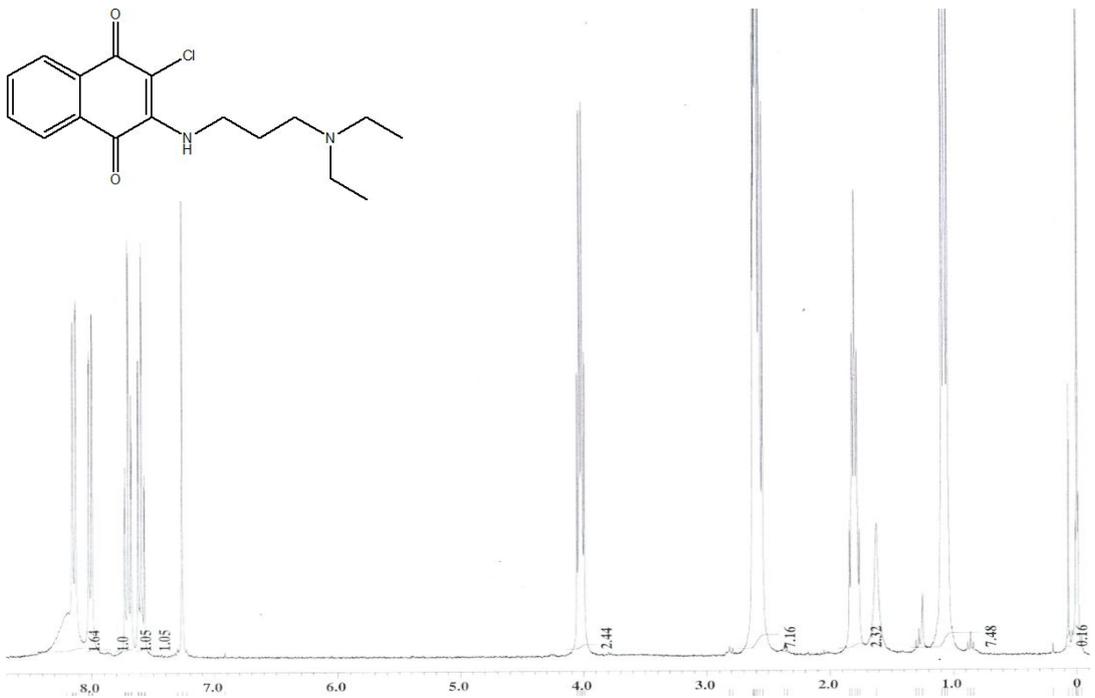
(그림 7.) 2-(2-Diethylamino-ethylamino)-1,4-naphthoquinone.



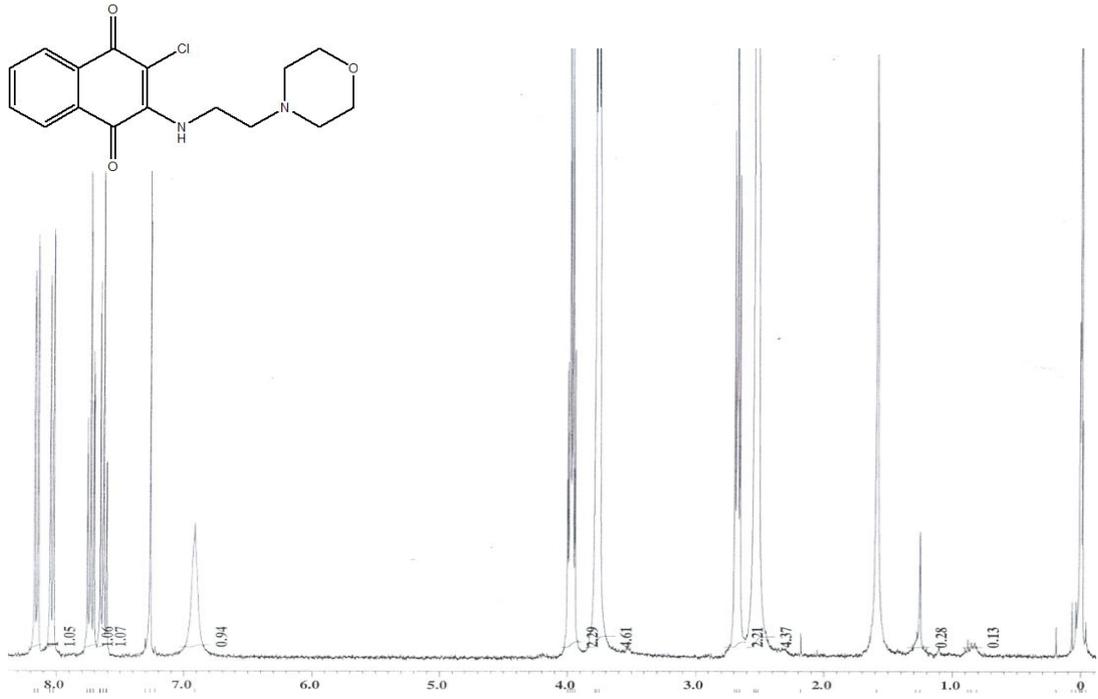
(그림 8.) 2-Cyclohexylamino-1,4-naphthoquinone.



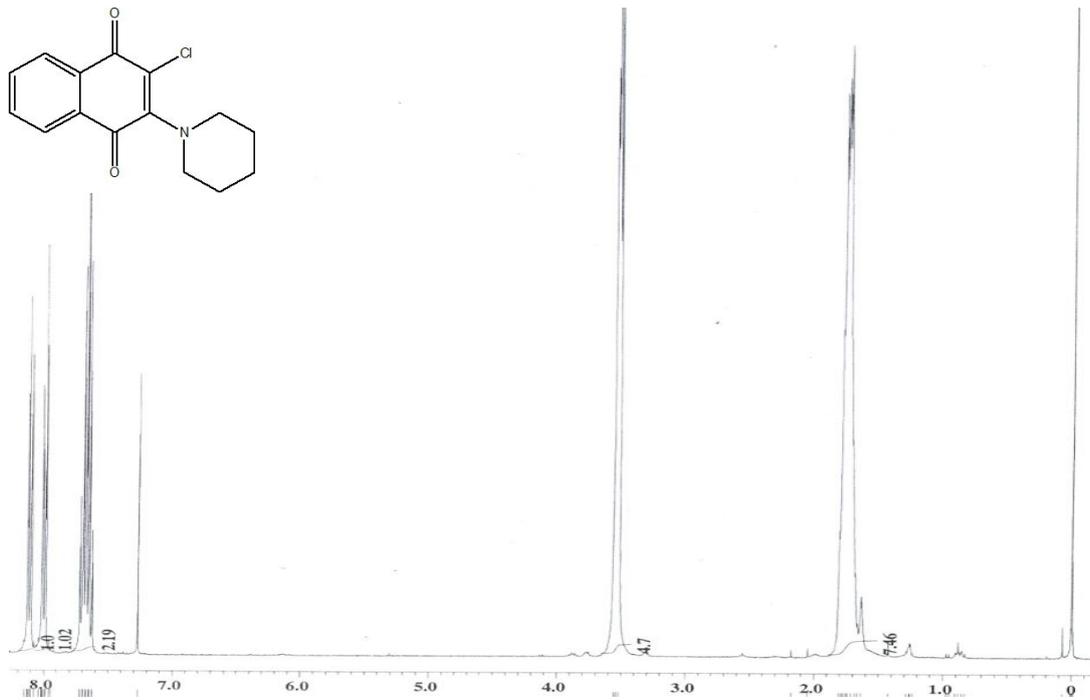
(그림 9.) 2-Chloro-3-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethylamino]-1,4-naphthoquinone.



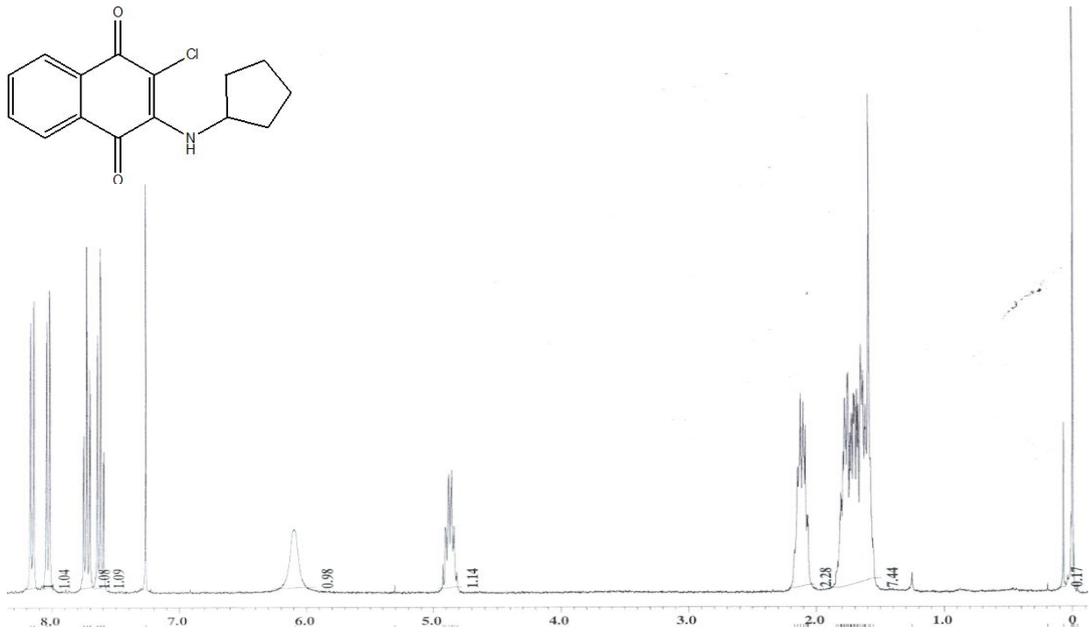
(그림 10.) 2-Chloro-3-(3-diethylamino-propylamino)-1,4-naphthoquinone.



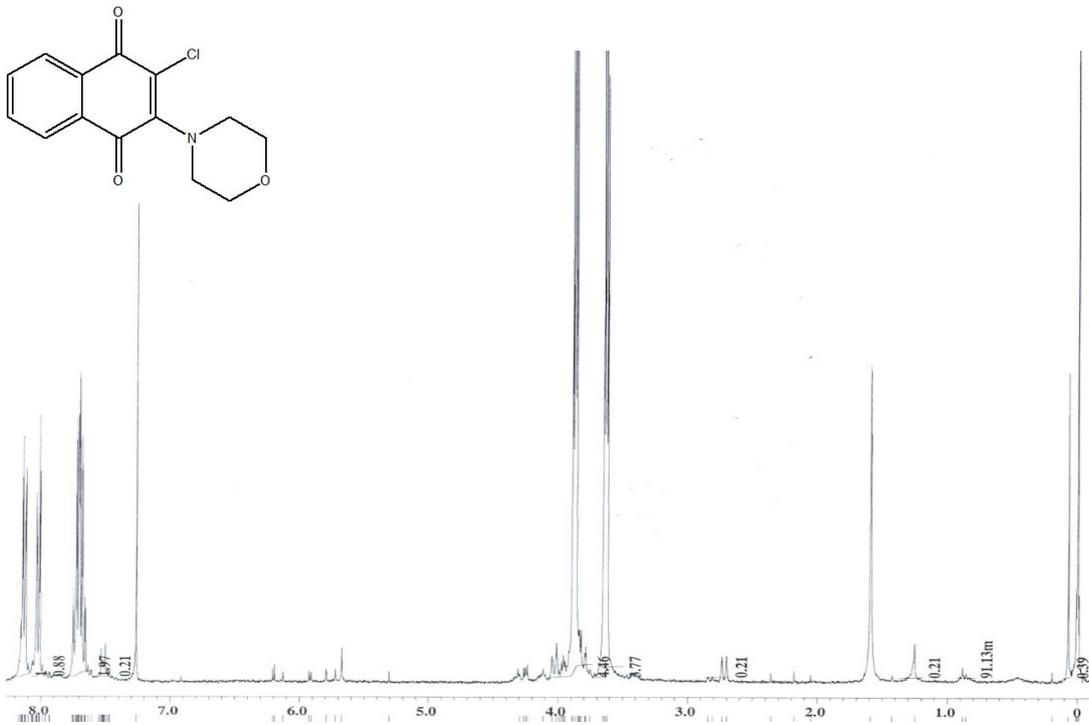
(그림 11.) 2-Chloro-3-(2-morpholin-4-yl-ethylamino)-1,4-naphthoquinone.



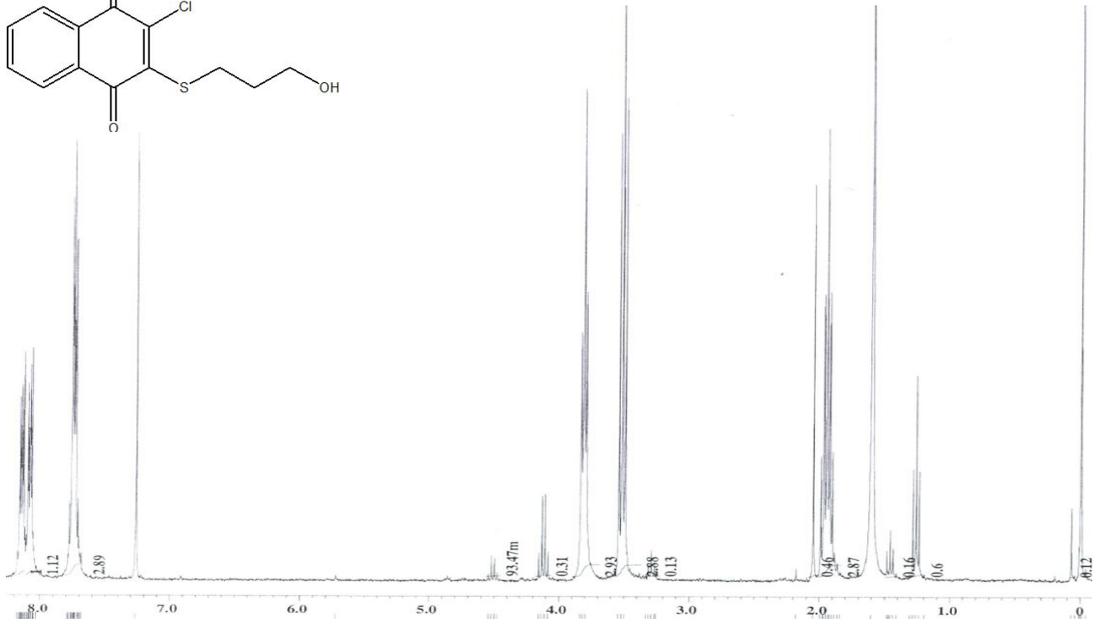
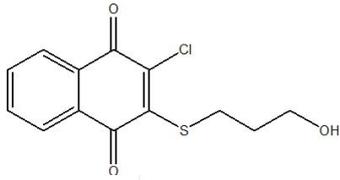
(그림 12.) 2-Chloro-3-piperidin-1-yl-1,4-naphthoquinone.



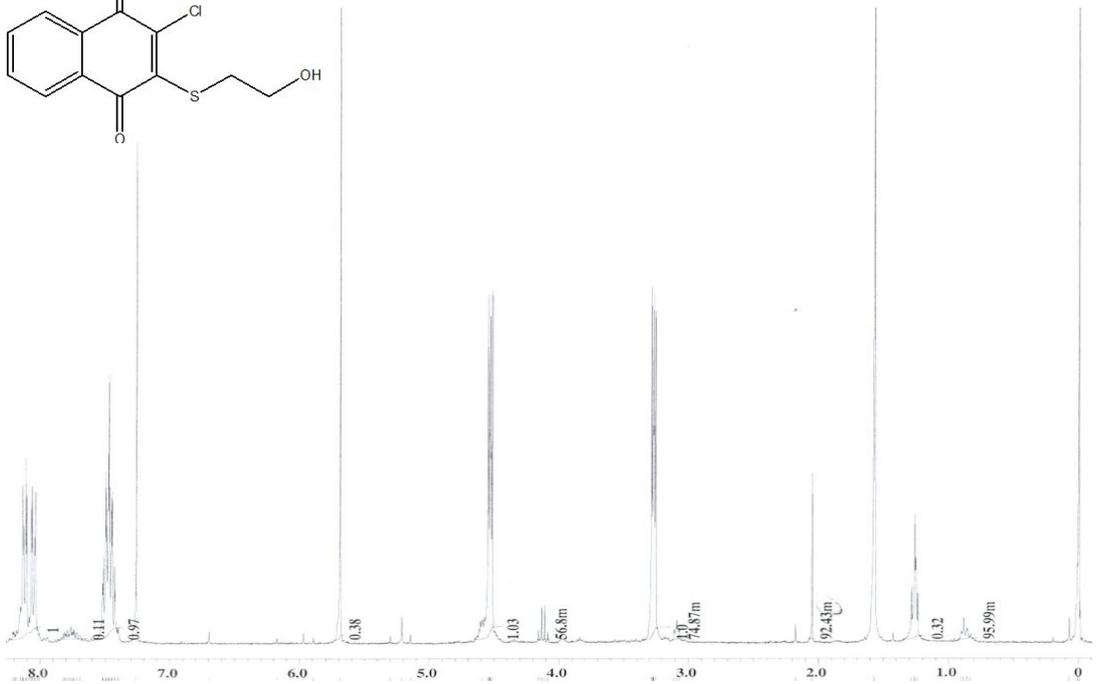
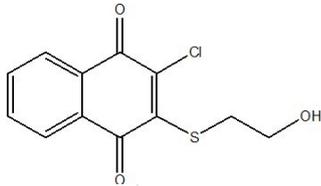
(그림 13.) 2-Chloro-3-cyclopentylamino-1,4-naphthoquinone.



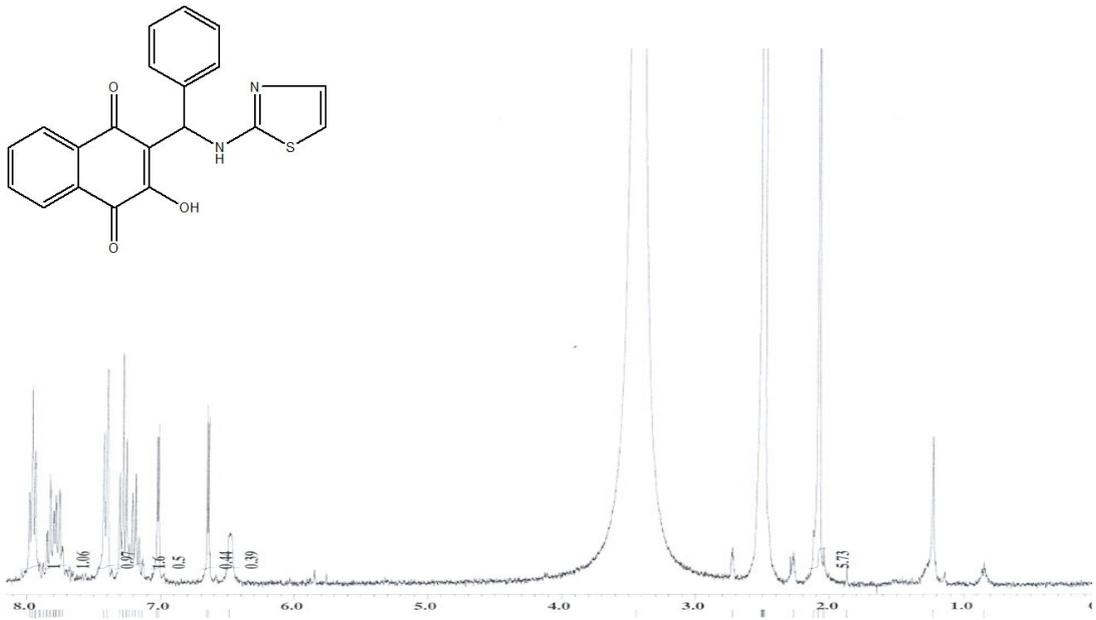
(그림 14.) 2-Chloro-3-morpholin-4-yl-1,4-naphthoquinone.



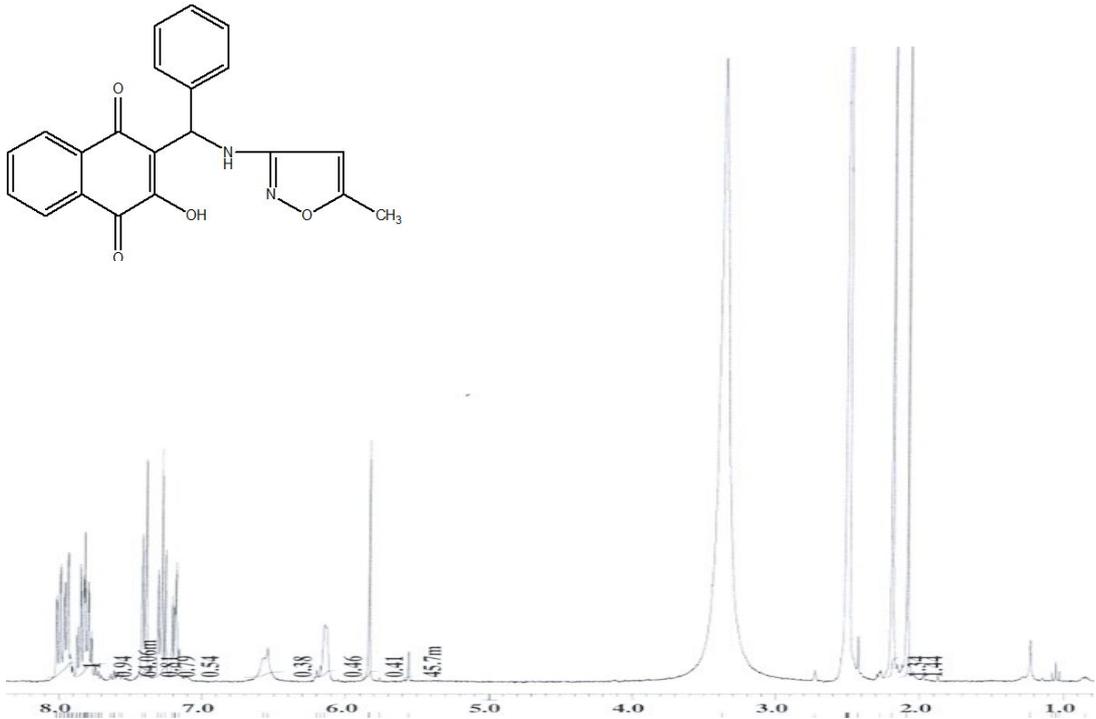
(그림 15.) 2-Chloro-3-(3-hydroxy-propylsulfanyl)-1,4-naphthoquinone.



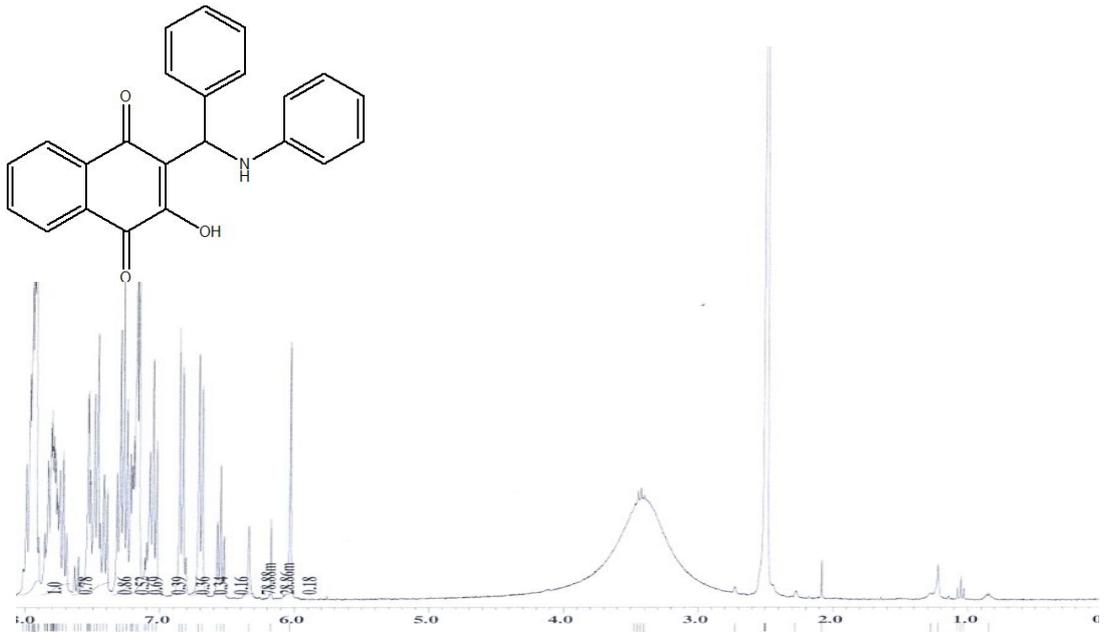
(그림 16.) 2-Chloro-3-(2-hydroxy-ethylsulfanyl)-1,4-naphthoquinone.



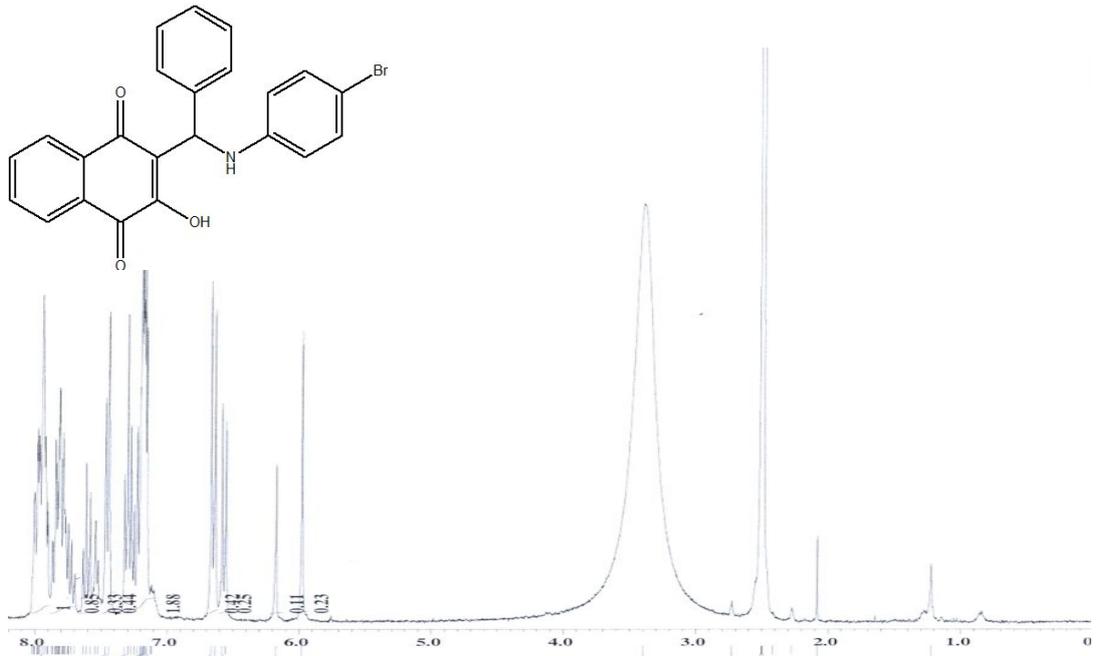
(그림 17.) 2-Hydroxy-3-[phenyl-(thiazol-2-ylamino)-methyl]-1,4-naphthoquinone.



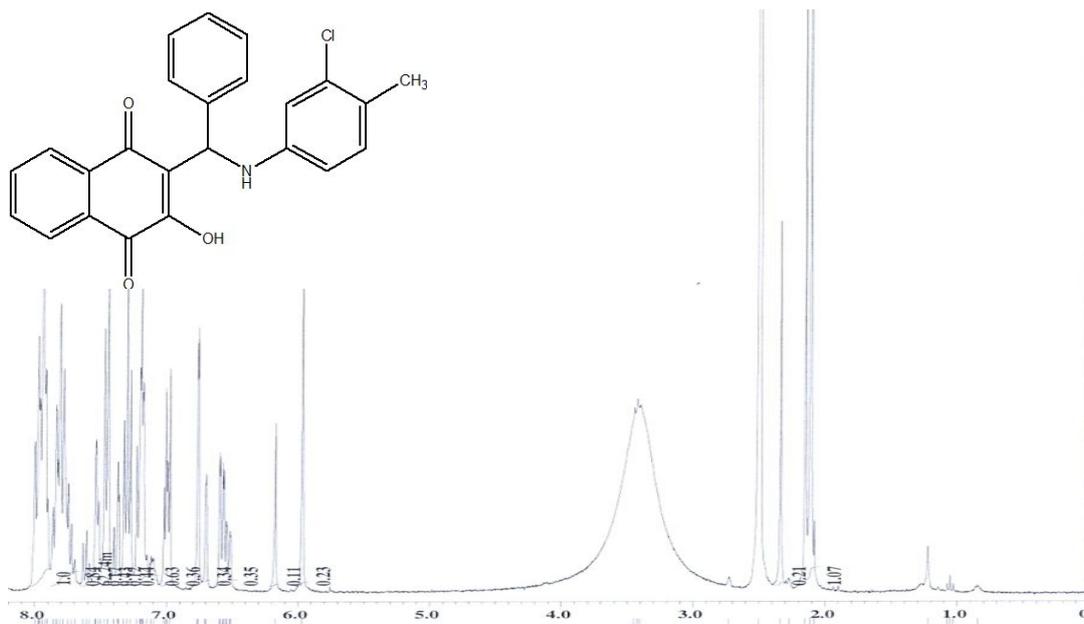
(그림 18.) 2-Hydroxy-3-[(5-methyl-isoxazol-3-ylamino)-phenyl-methyl]-1,4-naphthoquinone.



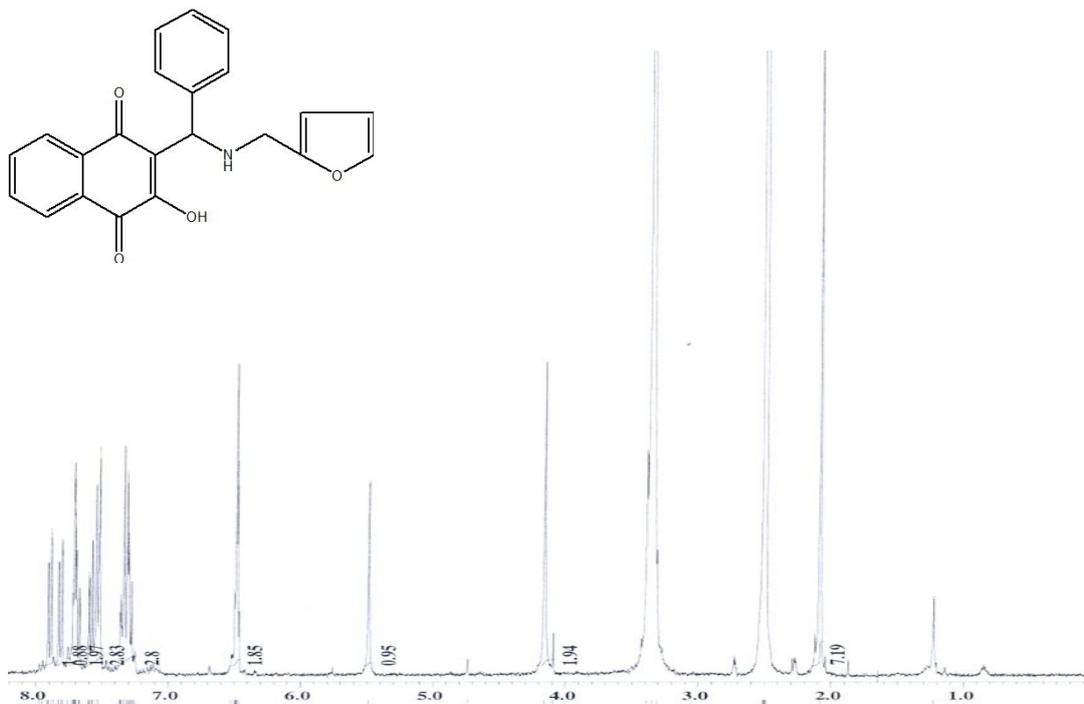
(그림 21.) 2-Hydroxy-3-(phenylamino-phenyl-methyl)-1,4-naphthoquinone.



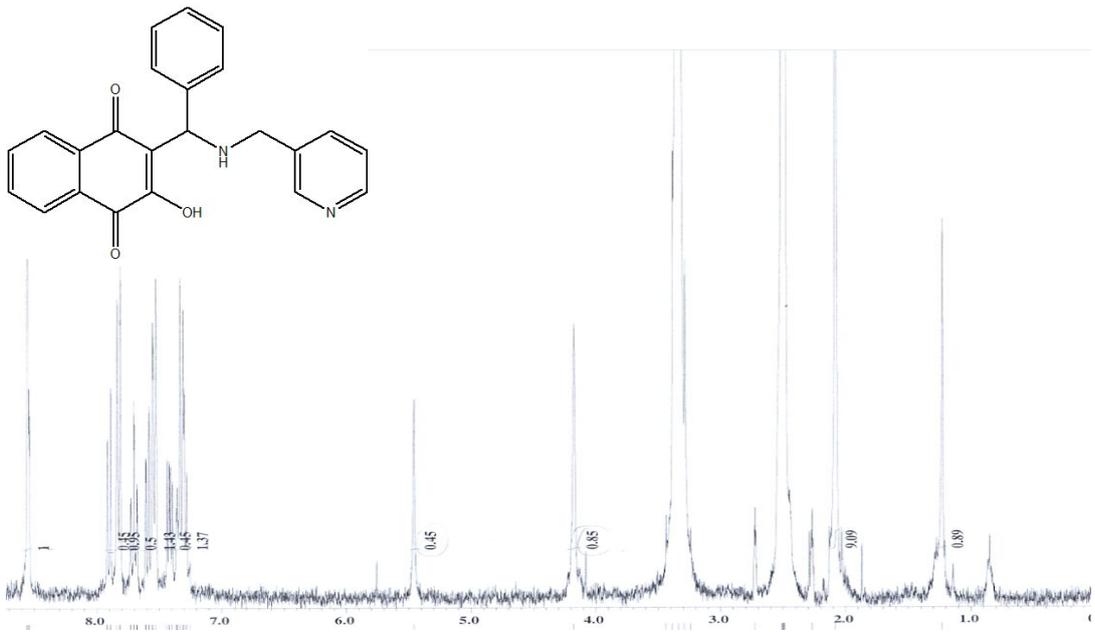
(그림 22.) 2-[(4-Bromo-phenylamino)-phenyl-methyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone.



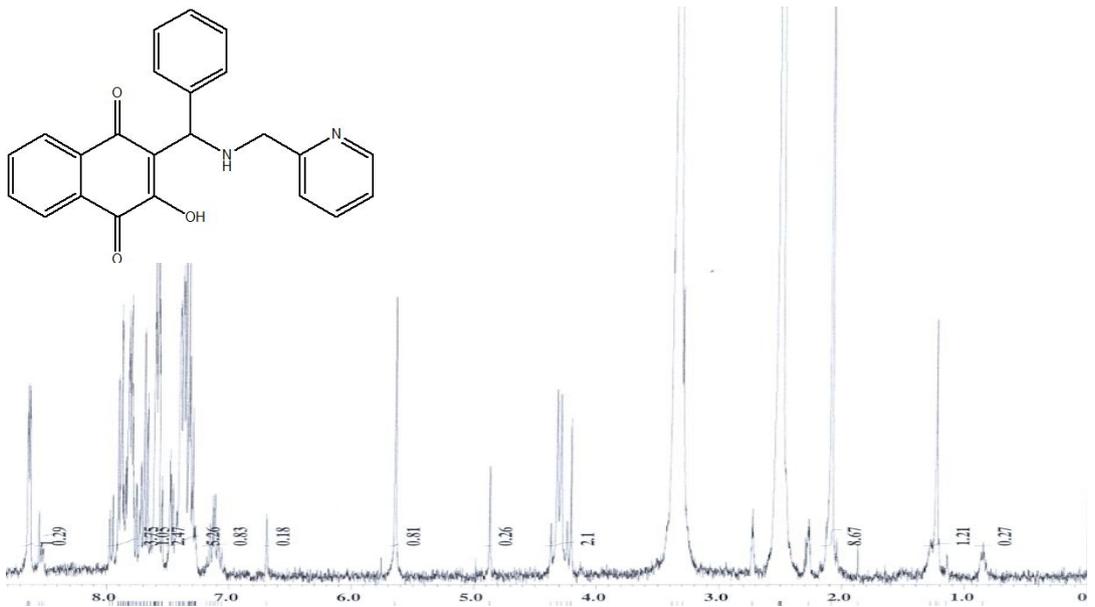
(그림 23.) 2-[(3-Chloro-4-methyl-phenylamino)-phenyl-methyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone.



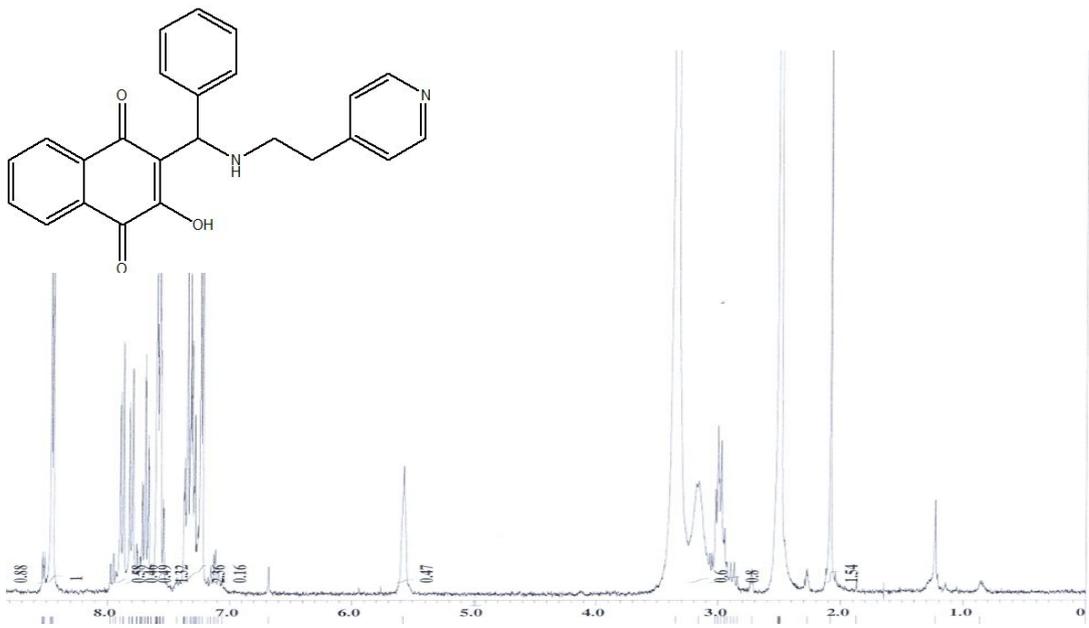
(그림 24.) 2-[(Furan-2-ylmethyl)-amino]-phenyl-methyl-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone.



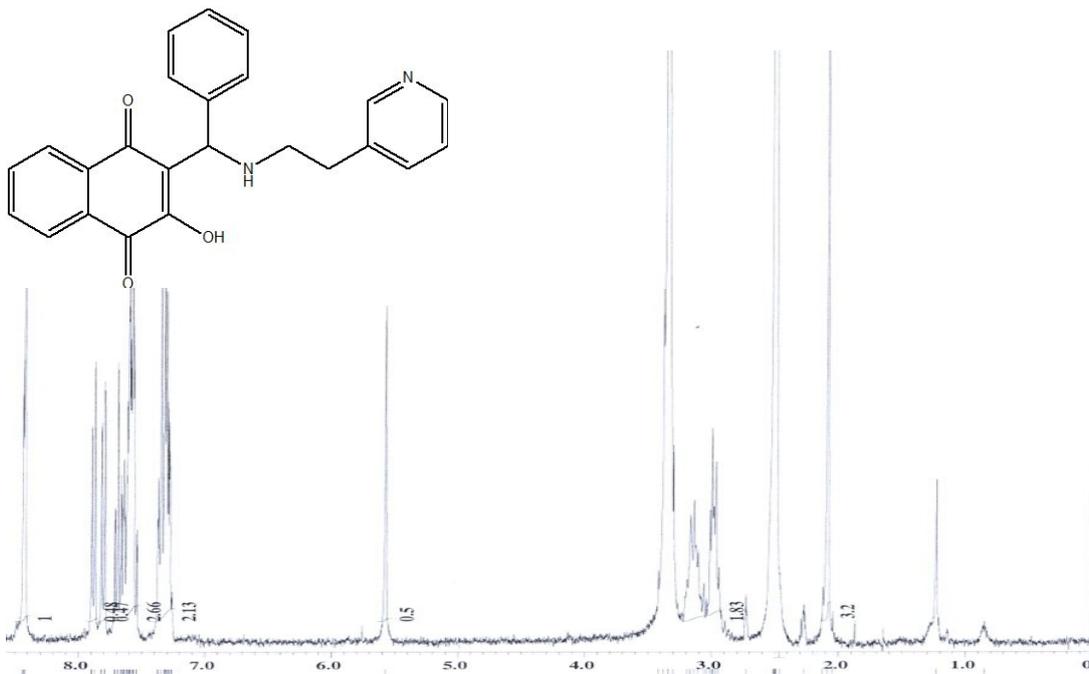
(그림 25.) 2-Hydroxy-3-(phenyl-[(pyridin-3-ylmethyl)-amino]-methyl)-1,4-naphthoquinone.



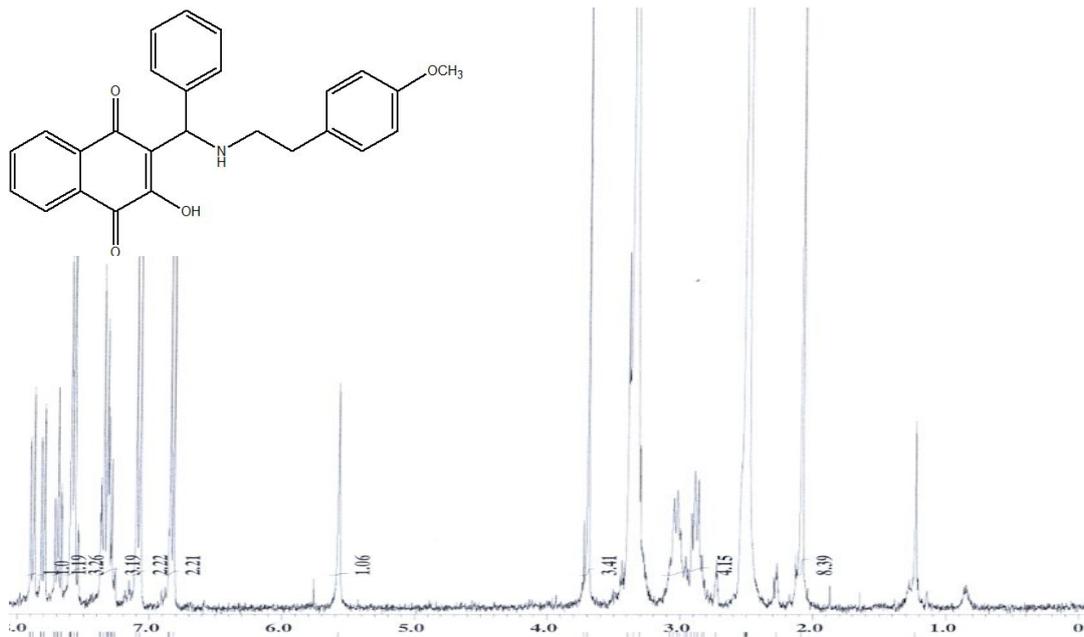
(그림 26.) 2-Hydroxy-3-(phenyl-[(pyridin-2-ylmethyl)-amino]-methyl)-1,4-naphthoquinone.



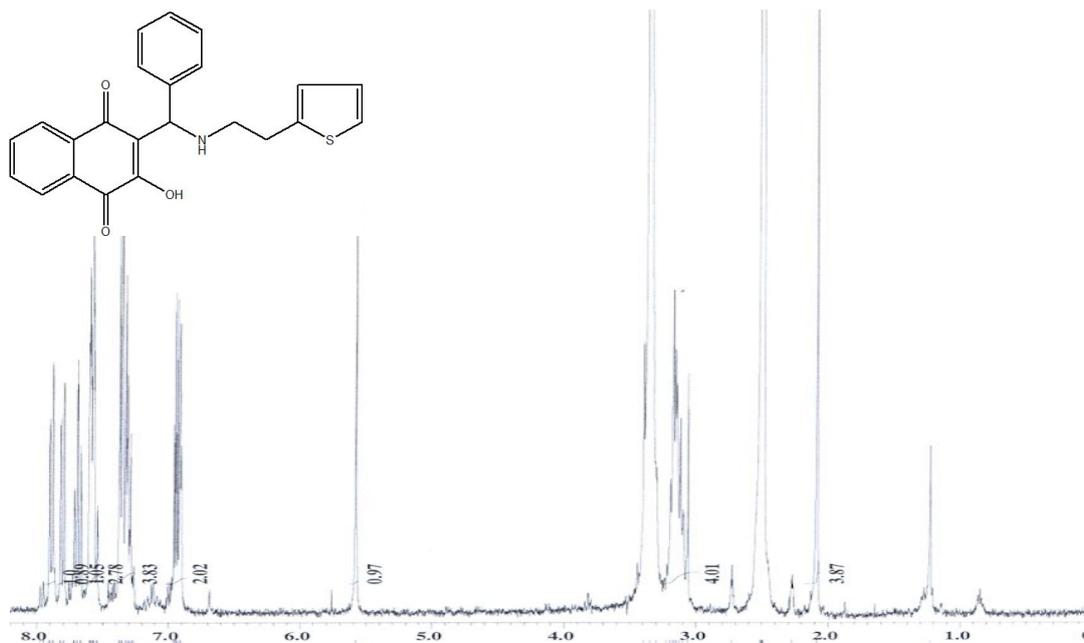
(그림 27.) 2-Hydroxy-3-[phenyl-(2-pyridin-4-yl-ethylamino)-methyl]-1,4-naphthoquinone.



(그림 28.) 2-Hydroxy-3-[phenyl-(2-pyridin-3-yl-ethylamino)-methyl]-1,4-naphthoquinone.



(그림 29.) 2-Hydroxy-3-([2-(4-methoxy-phenyl)-ethylamino]-phenyl-methyl)-1,4-naphthoquinone.



(그림 30.) 2-Hydroxy-3-[phenyl-(2-thiophen-2-yl-ethylamino)-methyl]-1,4-naphthoquinone.