

## N-[1-(benzotriazol-1-yl)aryl]arylamine 유도체의 항균성과 정량적 구조활성 관계(QSAR)

성낙도 · 김경훈 · 최우영 · 김홍기\*

충남대학교 농과대학 농화학과, \*농생물학과

**초록 :** 일련의 새로운 N-[1-(benzotriazol-1-yl)-X-치환-aryl]-Y-치환-arylamine 유도체를 합성하고 *Pyricularia oryzae*, *Fusarium oxysporum f. sp. sesami*, *Valsa ceratosperma* 및 *Botrytis cinerea*에 대한 항균활성( $PI_{50}$ )을 한천 회석법으로 측정하여 정량적인 구조-활성 관계(QSARs)를 분석한 바, X 및 Y-치환기들의  $\pi$ 와  $\sigma$  및  $M_R$  파라미터가 항균 활성을 결정하는 중요한 요소이었다. 4-bromo 치환체(1d 및 2b)가 항균활성이 제일 큰 화합물이었으며, 중성 pH에서 1의 가수분해 반응에 대한 반감기( $T_{1/2}$ )는 약 1.5일 이었다. 기질 화합물의 분자궤도(MO) 함수와 항균 반응에 대한 자유에너지 관계(LFERs) 그리고 분자 설계의 결과들이 검토되었다(1991년 12월 17일 접수, 1992년 2월 6일 수리).

Triazole계 항균제로서 상품화된 Triadimefon,<sup>1)</sup> Hexaconazoles, Flutriafol 및 Triarimolol<sup>2)</sup> 등의 항균활성 반응은 morpholine계 화합물을 제외한 pyridine과 imidazole계 항균제들과 더불어 ergosterol biosynthesis inhibitor(EBI)로서 ergosterol의 C-14 $\alpha$  demethylation을 억제<sup>3)</sup>함으로써 균체내 지질 합성의 저해를 유발<sup>4)</sup>하는 것으로 알려져 있다.

최근에 보고된 triazole계 항균활성 화합물로는 Thio-lane-Triazoles<sup>5)</sup>와 1-치환-1-aryl-2-triazol-1-yl-ethanols<sup>6)</sup> 등이 있으며 2-butyl-2-(4-chlorophenyl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propanenitrile, (RH3866)<sup>7)</sup>은 넓은 영역의 항균제로서 흰 가루병(powdery mildew)이나 녹병(rusts) 등에 특별한 효과가 있고 EBI와 연관되어 있을 뿐 아니라, 식물독성<sup>8,9)</sup>도 밝혀져 있다.

(2RS, 3RS)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-ol, (Diclobutrazol)<sup>10)</sup>도 C-14 $\alpha$  methyl group의 이탈을 차단하는 EBI로 작용하며 1-(2-phenyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl)-1,2,4-triazole<sup>11)</sup>의 경우에는 dioxolane 고리의 작은 alkyl chain과 2,4-dichloro group 치환체가 가장 큰 항균 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다.

근래에는 1-(phenoxymethyl)benzotriazoles 및 1-(thio-phenoxymethyl)benzotriazoles 유도체들의 X치환기와 골격원자(Y=O 또는 S)의 변화에 따른 *P. oryzae* 등의 곰

팡이균에 대한 항균활성이 electronic effect( $\sigma$ )와 hydrophobicity( $\pi$ )에 대하여 포물선 형의 관계가 있다는 사실이 보고 되기도 하였다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 1-(phenoxymethyl)benzotriazole유도체의 methylene group중 H원자 대신에 X-치환-phenyl group을 도입하여 소수성을 증가시키고, 골격원자가 N 원자인 Y-치환-anilino group이 치환된 일련의 새로운 N-[1-(benzotriazol-1-yl)-X-치환-aryl]-Y-치환-arylamine 유도체<sup>13)</sup>를 합성하여 *in vitro*에서 *Pyricularia oryzae*, *Fusarium oxysporum f. sp. sesami*, *Valsa ceratosperma* 및 *Botrytis cinerea* 등 4종의 곰팡이 균들에 대한 항균활성에 미치는 X 및 Y치환기 변화에 따른 기질 분자들의 정량적인 구조-활성관계(QSAR)<sup>14)</sup>와 활성 분자들의 설계에 관하여 검토하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 시약 및 기기

기질 유도체들의 합성에는 Aldrich 및 Fluka(GR)제의 1H-benzotriazole, 4-치환-aniline과 benzaldehyde유도체 그리고 ethanol, ether 및 acetone 등의 용매를 사용하였으며 합성된 화합물의 녹는점은 Fisher-Johns Hot stage MP. App.로 측정하였다.

합성된 화합물의 구조확인엔 사용한 기기로는 JEOL

JMS-DX 303 MS. Spectrometer와 Varian FT 80A model(80 MHz) NMR Spectrometer이었으며 반응속도 상수의 측정시에는 Pye-Unicam PU880 UV/Visible Spectrophotometer를 각각 이용하였다.

**N-[1-(benzotriazol-1-yl)-X-치환-aryl]-Y-치환-arylamine 유도체의 합성**

기질 유도체의 합성은 Mannich 반응<sup>15)</sup>을 이용하여 1-H-benzotriazole(BT)과 X-치환-benzaldehyde와의 aminoarylation 반응으로 1-(hydroxyphenyl)benzotriazole(a)을 합성한 다음에 산-축매하에서 생성된 iminium이온(b)과 Y-치환-aniline을 반응시켜 합성하는 방법(A)과 BT에 Y-치환-aniline과 X-치환-benzaldehyde을 동시에 반응시켜 iminium이온(c)을 경유하는 합성 방법(B)이 있다.<sup>13)</sup>

여기에서는 A와 B의 2가지 방법으로 합성(수율 : 65~88%)하여 구조를 확인하였으며<sup>16)</sup> 전 합성과정은 Fig. 1에 요약하고 유도체 별로 녹는점을 Table 1에 정리하였다.

**가수분해 반응 속도상수의 측정**

25%(v/v)의 methanol 수용액을 pH 7(phosphate buffer)로 조절하고 sodium chloride를 가하여 반응용액의 이온의 세기를 0.1 M로 한 다음에 25 °C의 항온기 속에서 시간에 따르는 기질 화합물의 농도 변화를 UV 분광법

으로 측정하였다.

반응 시간과 농도변화 사이의 직선관계로부터 기질 화합물의 가수분해 반응은 전형적인 1차 반응이었으며 그 기울기로부터 1차반응 속도상수를 구하여 요약(Table 1)하였다. 한 예로 pH 7.0에서 1c(UV(25%(v/v)MeOH) :  $\lambda_{max}(\log \epsilon) : 252 \sim 254 \text{ nm}(4.34)$ )의 1차반응 속도상수 ( $\log k$ )는  $5.30 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ 이고 반감기( $t_{1/2}$ )는 약 1.51일이었다.

**Methylene group의 SCS**

기질 분자내 결합을 통하여 전달되는 X, Y치환기들에 의한 electronic effect를 검토하기 위하여 치환기 변화에 따른 methylene group(C $\alpha$ -H)의 substituent chemical shift(SCS)를 측정하였다. SCS(ppm)는 TMS를 내부 표준물질로 한 실온의 acetone-d<sub>6</sub>용액에 1과 2를 각각 녹이고(0.3~0.5 M/l) C $\alpha$ -H의 chemical shift(8.55~8.85 ppm)를 sweep width 5 ppm으로 확장하여 얻은 NMR spectra로부터 측정(Table 1)하였다.

**항균활성 검정**

항균활성 검정대상 균주는 참깨 시들음병균(*Fusarium oxysporum f. sp. sesami*, FOS), 벼 도열병균(*Pyricularia aryzae*, PO), 사과 부란병균(*Valsa ceratosperma*, VC) 및 잭빛 곰팡이균(*Botrytis cinerea*, BC) 등 이었으며 충남

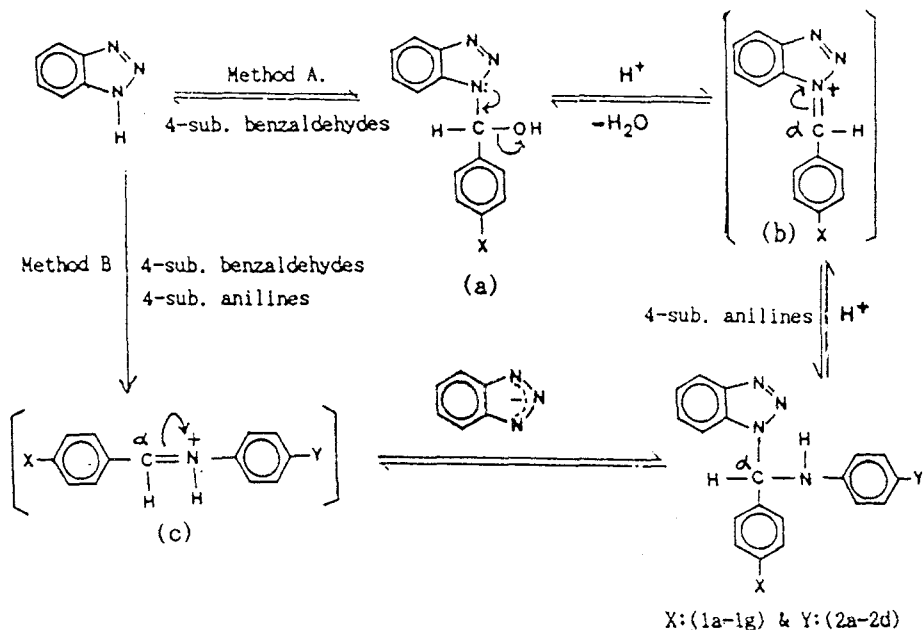


Fig. 1. Synthetic process of N-[1-(benzotriazol-1-yl)aryl]arylamine derivatives.

대학교 농생물학과에서 분리 동정한 것으로 균주별 배양 조건은 앞서의 보고와 같다.<sup>12)</sup>

항균활성은 반경 9 cm의 patri dish에 potato dextrose agar(PDA)와 1과 2를 acetone에 녹인 15~400 ppm의

용액을 가하고 충분히 섞어 만든 PDA배지를 이용하여 한천 회석법<sup>17)</sup>으로 3회 반복 실험하였다. 균사의 생장은  $10^{-3}$  M~ $10^{-4}$  M의 농도범위에서 50%억제( $I_{50}$ )되었으며 이때 물 농도의 역의 대수값을 관측된 항균 활성값(obs.  $pI_{50}$ )으로 정(Table 2)하였다.

Table 1. Observed melting points, hydrolysis rate constants(kobs.  $10^{-6}$ /sec) and SCS( $\alpha$ -H) of N-[1-(benzotriazole-1-yl)-aryl]arylamine derivatives

Compds. No.	X	Y	mp. (°C)	pH 7.0 <sup>a)</sup>	$t_{0.5}$ <sup>b)</sup>	SCS <sup>c)</sup>
1a	4-OCH <sub>3</sub>	4-H	90~92	3.75	2.14D	8.55
1b	4-CH <sub>3</sub>	4-H	90	5.00	1.60D	8.57
1c <sup>d)</sup>	4-H	4-H	87	5.30	1.51D	8.63
1d <sup>e)</sup>	4-Br	4-H	77~87	6.40	1.25D	8.66
1e	4-CN	4-H	90~91	6.55	1.22D	8.75
1f	3-NO <sub>2</sub>	4-H	83	-	-	8.83
1g	4-NO <sub>2</sub>	4-H	78~79	6.50	1.23D	8.84
2a	4-H	4-CH <sub>3</sub>	82~83	8.00	1.00D	8.60
2b	4-H	4-Br	107~108	3.70	2.17D	8.72
2c	4-H	4-CN	127	0.19	42.21D	8.73
2d	4-H	4-NO <sub>2</sub>	116~118	0.11	76.38D	8.77

<sup>a)</sup>The values were obtained by UV spectrophotometrically in 25%(v/v) aqueous methanol at 25 °C.

<sup>b)</sup>Half-life time at pH 7.0, D : Day

<sup>c)</sup>Substituent chemical shifts(ppm) of methylene group ( $\alpha$ -H) were measured by NMR spectrometry in deuterioacetone at 25 °C, MS(m/e%) : M<sup>+</sup>1, 301(5).

<sup>d)</sup>& M<sup>+</sup>, 378(7)<sup>e)</sup>

MO함수와 QSAR식의 계산

기질분자의 구조적인 특성과 반응성을 알아보기 위하여 phenyl group 대신에 vinyl group을 도입한 N-( $\alpha$ -aminobenzoyl)aniline을 모델 분자로 택하여 EHT<sup>18)</sup>(QCPE program #344)방법<sup>19)</sup>으로 CYBER 170 computer를 이용하여 분자궤도(MO) 함수를 계산하였다.

유도체 별 항균 활성값(obs.  $pI_{50}$ )과 physicochemical parameters로부터 기질 유도체의 정량적인 구조와 항균 활성 관계(QSAR)식<sup>14,20)</sup>들을 Hansch approach 방법<sup>21,22)</sup>으로 QSAR-PC : PAR 프로그램을 이용하여 PC로 계산하였다. Physicochemical parameter<sup>23)</sup>로는 electronic effect( $\sigma$ ), molar refractivity(MR, polarizability, cm<sup>3</sup>/M), steric parameter(Es) 및 phenol system에서 얻어진 hydrophobicity( $\pi$ ) 등의 여러가지 파라미터가 검토되었다.

결과 및 고찰

모델 분자의 MO함수

모델 분자인 N-( $\alpha$ -aminobenzoyl)aniline 분자의 X-치

Table 2. Observed and calculated fungicidal activity( $pI_{50}$ )<sup>a)</sup> of (1) and (2) derivatives *in vitro* against the four fungi

Compds. No.	<i>Fusarium oxysporum f.sp. sesami</i>			<i>Pyricularia oryzae</i>			<i>Valsa ceratosperma</i>			<i>Botrytis cinerea</i>		
	Obs.	Calc. <sup>b)</sup>	Dev.	Obs.	Calc. <sup>b)</sup>	Dev.	Obs.	Calc. <sup>b)</sup>	Dev.	Obs.	Calc. <sup>b)</sup>	Dev.
1a	3.00	2.90	0.01	3.29	3.21	0.08	3.82	3.97	-0.15	4.34	4.26	0.08
1b	3.22	3.42	-0.20	3.32	3.48	-0.16	3.72	3.85	-0.13	4.20	4.38	-0.18
1c	3.00	2.95	0.05	3.33	3.34	-0.01	3.60	3.47	0.13	4.18	4.22	-0.04
1d	4.10	3.92	0.08	3.84	3.83	0.01	4.40	4.26	0.14	4.58	4.45	0.13
1e	2.96	2.93	0.03	3.27	3.36	-0.09	3.73	3.73	0.00	4.21	4.11	0.10
1f	3.25	3.25	0.00	3.84	3.51	0.33	3.84	3.93	-0.09	4.14	4.18	-0.04
1g	3.00	3.20	-0.20	3.33	3.49	-0.16	3.84	3.91	-0.07	4.06	4.46	-0.10
2a	3.10	3.15	-0.05	3.50	3.43	0.07	3.54	3.63	-0.09	4.20	4.21	-0.01
2b	3.28	3.28	0.00	3.73	3.73	0.00	3.83	3.74	0.09	4.18	4.19	-0.01
2c	2.94	2.86	0.08	3.34	3.85	-0.01	3.64	3.66	-0.02	4.26	4.22	0.04
2d	2.99	3.94	0.05	3.40	3.45	-0.05	3.58	3.70	-0.12	4.24	4.21	0.03

<sup>a)</sup>The growth inhibiting activity was expressed as the  $pI_{50}$ , negative logarithm of the molar concentration for 50% inhibition of mycelial growth, ( $I_{50}$ ) *in vitro* against *Fusarium oxysporum f. sp. sesami*(Cultivated for a week at 27 °C), *Pyricularia oryzae*(Cultivated for 15 days at 26~28 °C), *Valsa ceratsasperma*(Cultivated for 6 days at 27 °C) and *Botrytis cinerea*(Cultivated for 5 days at 23 °C).

<sup>b)</sup>The values were calculated by equations in Table 4.

환체, (1)은 전자끌개( $\rho > 0$ )일수록 LUMO에너지가 감소하는 치환기 효과(LUMO(eV):  $\rho = -0.790$  및 HOMO(eV):  $\rho = -0.126$ )를 나타내므로 기질분자는 친 전자성을 나타내며 Y-치환체, (2)도 같은 경향이였다. 그러므로 물분자(LUMO(eV) =  $-0.249$  및 HOMO(eV) =  $-14.800$ )와의 가수분해 반응은 기질 분자의 LUMO와 물분자 HOMO사이의 상호작용에 따른 soft-soft한 궤도 조절반응<sup>24)</sup>이 주로 일어날 것이다.

또한, 비 치환체에서 (BT)N-C $\alpha$ -NphY 결합원자의 원자궤도(AO)계수(2 pz) (N = 0.5033, C $\alpha$  =  $-0.0194$  및 N = 0.0184)로부터 nodal property를 검토한 바, 모두 반 결합성인 (BT)N-C $\alpha$  및 C $\alpha$ -NphY결합이 쉽게 분해될 수 있음이 예상되었다. Methylene group C $\alpha$ 원자의 알짜전하(q)에 미치는 치환기 효과(C $\alpha$ q(X):  $\rho = 2.30 \times 10^{-2}$  및 C $\alpha$ q(Y):  $\rho = 1.15 \times 10^{-3}$ )는 전자끌개( $\rho > 0$ )일수록 X가 Y보다 더 크게 C $\alpha$ 원자의 양 하전을 증가시키므로 C $\alpha$ 원자에 대한 물 분자의 친핵성 반응 즉, 가수분해 반응성에 미치는 X의 영향이 Y보다 클 것임을 알 수 있었다.

### 가수분해 반응

가수분해 반응 속도상수(log k)를 Hammett식(log k =  $\rho\sigma$ )<sup>25)</sup>에 적용한 결과, X( $\rho = 0.20$ )는 benzotriazolyl group (BT, pK $_a$  = 8.2)과 더불어 전자끌개( $\rho > 0$ )로 작용하지만 Y( $\rho = -0.21$ )는 전자밀개( $\rho < 0$ )로 작용<sup>16)</sup>하는 치환기 효과를 나타내었다. Y가 전자를 밀수록 imide group의 N 원자는 C $\alpha$ 원자에 전자를 제공함으로써 benzotriazolyl group이 이탈되어 ionic dissociation mechanism으로 진행되는 dissociation-recombination process<sup>26)</sup>가 예상된다.

모델 분자의 MO함수 검토 결과로부터 예상되는 바와 같이 가수분해 반응시에는 반응중심인 C $\alpha$ 원자에 대한 물 분자의 친핵성 반응으로 인하여 물 분자와의 결합생성(H $_2$ O-C $\alpha$ )이 benzotriazolyl group의 이탈(C $\alpha$ -BT)보다 우선하는 “회합 S $_k$ 2형” 반응으로 진행<sup>16)</sup>될 것으로 판단된다.

X(1)는 전자를 끌수록 중성 pH에서 가수분해 반응의 반감기( $t_{0.5} = 0.693/k$ )(Table 1)가 평균 1.5일로 빨리 분해하지만, Y(2)는 전자를 끌수록 BT group의 ionic dissociation이 억제되기 때문에 난 분해성이 증가된다.

한편, 항균활성에 미치는 가수분해 반응의 영향<sup>27)</sup>을 검토한 바, 가수분해 반응(log k)은 (FOS)와 (PO)의 항균활성에만 영향을 미치며, 그 이외는 영향을 없음을 알았다. 한 예로, (PO)의 항균활성에 미치는 관계식( $pI_{50}(X) = 0.48\pi - 0.46 \log k + 0.81$  및  $pI_{50} = 0.35\pi + 0.041 \log k +$

3.56,  $r > 0.90$ )으로부터 X에 의한 항균활성은 소수성과 가수분해 반응성이 대동하게 작용하는 반면에, Y에 의한 항균활성은 소수성이 가수분해 반응성보다 우세하다. 그러나 X, Y 두 치환기( $pI_{50}(X, Y) = 0.41\pi + 0.01 \log k + 3.31$ ,  $r > 0.90$ )는 모두 소수성에 의존적으로 항균작용에 더 큰 영향을 미치고 있음을 잘 설명하고 있다.

### 항균활성 상수( $pI_{50}$ )

*P. oryzae* 등 4가지 곰팡이 균에 대하여 측정된 유도체별 항균활성(obs.  $pI_{50}$ )값(Table 2)으로부터 (FOS)(Fig. 2), (PO) 및 (VC)는 X가 Y보다 큰( $X > Y$ ) 항균활성을 나타내었으나 (BC)에 대하여는 반대 경향( $X < Y$ )이었다. 또한 calc.  $pI_{50}$ 값은 Table 4의 QSAR식으로 계산한 것인데 obs. $pI_{50}$  값과 잘 일치하므로  $\pi$ 와  $\sigma$  및  $M_R$ 상수를 변수로한 식들이 기질 화합물의 구조와 항균활성 관계를 잘 설명하고 있음을 알 수 있다.

화합물, 1과 2는 (BC)에 대하여 가장 큰 항균활성을 나타내었고 (VC) > (PO) > 및 (FOS)의 순으로 감소하는 경향이였다. 특히, (BC)에 대한 1의 항균활성( $pI_{50}$ )값은 평균 4.24로 비교적 우수하였고 4-Br치환체(1d)는 가장 큰 항균활성( $pI_{50} = 4.58$ )을 나타내는 화합물<sup>12)</sup>이었으며 (BC)이외에도 큰 항균활성을 보였다. 이는 azole계 화합물의 4-halogen 치환체가 큰 항균성을 보이는 경우와 같이<sup>28)</sup> 1d와 2b도 sterol의 c-14 $\alpha$ 탈 메틸화 반응을 비교적 크게 저해하는 EBI로 작용하기 때문으로 믿어진다.<sup>4)</sup>

### 자유에너지 관계

C $\alpha$ -H의 SCS에 미치는 X, Y치환기에 의한 자유에너지 관계<sup>29)</sup> (linear free energy relationship, LFER)를 검토

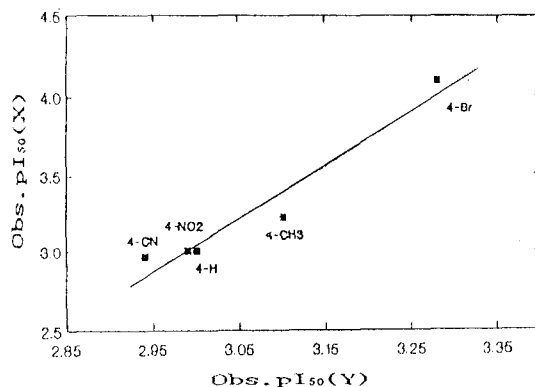


Fig. 2. Relationship between obs. $pI_{50}(X)$  values and obs.  $pI_{50}(Y)$  values *in vitro* against *Fusarium oxysperum* f. sp. *sesami*, obs. $pI_{50}(X) = 3.47$  obs. $pI_{50}(Y) - 7.37$ ,  $r = 0.97$ .

하기 위하여 Hammett식<sup>25)</sup>에 적용한 결과, X( $\rho=0.27$ )가 Y( $\rho=0.18$ )보다 큰 치환기 효과를 나타내고 있음을 알았다. 이는 benzotriazolyl 및 X-치환-phenyl group의 anisotropic effect와 delocalized shielding effect 및 Y-치환-anilino group의 N원자에 의한 local diamagnetic effect에 의하여 methylene 양성자의 전자밀도 감소 정도에 따라 SCS에 미치는 X의 영향이 Y보다 크다는 것을 설명한다.

SCS(C $\alpha$ -H),  $\log k$  및  $pI_{50}$ (BC)에 미치는 치환기들에 의한 LFER의 조성을 알아보기 위하여 Taft식(SCS =  $\rho_1\sigma_1 + \rho_{R\alpha}\sigma_{R\alpha}$ )에 적용하여 얻은 medium function( $\epsilon = \rho_R/\rho_1$ )을 Charton식( $\%R = 100\epsilon/1 + \epsilon$ )에, 그리고 Swain-Lupton (SL)(SCS =  $fF + rR$ )식의  $f$  및  $r$ 값을 SL식( $\%R = 100(\Psi |r| / \Phi |f| + \Psi |r|)$ ) 및  $\%F$ (또는  $\%L$ ) =  $100 \cdot \%R$ 에 적용<sup>30)</sup>한 결과(Table 3)에 따르면, X가 SCS(C $\alpha$ -H)에 미치는 공

명효과(resonance effect, R)와 유발효과(localized effect, L) 및 장 효과(field effect, F)는 비슷(R=F(L))하지만, Y는 F-효과의 영향을 현저히 크게(R<<F(L)) 미치고 있다.

왜냐하면, C $\alpha$ -H와 Xph group이 거의 평면성이므로 X는 C $\alpha$ -H에  $\pi$ -결합을 통한 conjugation effect가 미치도록 하는 반면에, Y는 N-phY group의 N(sp<sup>3</sup>)원자에 결합되어 약간 비틀리어 있는 형태를 취하기 때문이다. 그러나 가수분해 반응( $\log k$ )과 항균활성( $pI_{50}$ (BC))에는 X, Y 두 치환기에 의하여 모두 R-효과의 영향이 더 크게 미치고 있음을 보여주고 있으며 그 경향은 항균활성에서 더 크게(R>>F(L))나타나 있다.

실제 triazole계 EBI화합물들의 C-14 $\alpha$  탈 메틸화 반응의 저해<sup>3)</sup>는 주로 benzotriazole의 N-4원자와 cytochrome p-450의 protoheme 철 원자와의 공유결합에 기인<sup>4)</sup>

Table 3. LFER analysis on each cases of N-[1-((benzotriazol-1-yl)-aryl)]arylamines derivatives

Cases	Sub.	Charton			SL		
		%R	%L	ratio <sup>c)</sup>	%R	%F	ratio <sup>c)</sup>
SCS <sup>a)</sup>	X	59.00	41.00	1.44	40.37	59.63	0.68
	Y	7.40	92.60	0.08	5.02	94.98	0.05
	X & Y	54.75	45.25	1.21	37.36	62.84	0.59
$\log k$ <sup>b)</sup>	X	69.42	38.58	2.27	64.29	35.71	1.80
	Y	62.29	37.31	1.68	58.23	41.77	1.40
	X & Y	51.69	48.31	1.09	45.73	54.27	0.84
$pI_{50}$ (BC)	X	76.58	23.42	3.27	70.13	29.87	2.35
	Y	71.10	28.90	2.46	72.34	27.66	2.62
	X & Y	73.47	26.53	2.77	63.57	36.43	1.74

<sup>a)</sup> Substituent chemical shift(ppm) of methylene group(C $\alpha$ -H) were measured by NMR spectrometry in acetone-d<sub>6</sub> at 25 °C.

<sup>b)</sup> The values were hydrolysis rate constant of (1c) at pH 7.0 and at 25 °C.

<sup>c)</sup> %R/%L(or %F)

Table 4. Correlation equations<sup>a)</sup> on the fungicidal activity of N-[(benzotriazol-1-yl)aryl]arylamines *in vitro* against the four fungi

Fungi	Eq.No.	$\pi(X)$	$\pi(Y)$	$\Sigma M_R$	$\Sigma \sigma$	const	n	s	F	r
(FOS)	1	0.901 (0.129)	0.338 (0.133)		-0.214 (0.106)	2.954 (0.070)	11	0.140	16.60	0.936
(PO)	2	0.544 (0.205)	0.456 (0.208)	0.100 <sup>b)</sup> (0.190)		3.335 (0.124)	11	0.160	4.15	0.800
(VC)	3	0.450 (0.139)	-0.011 (0.143)	0.037 (0.023)		3.394 (0.159)	11	0.130	8.46	0.885
(BC)	4	0.245 (0.107)	-0.028 (0.106)		-0.230 <sup>c)</sup> (0.104)	4.224 (0.051)	11	0.110	2.67	0.730

<sup>a)</sup> Figures in parameters are 95% confidenced interval.

<sup>b)</sup>  $\Sigma E_s$

<sup>c)</sup> X-substituent's value( $\sigma_x$ ), n: the number of data are used in the correlation, s: standard deviation, F: calculated F-values, r: multiple correlation coefficient

하므로 치환기와 N-4원자간의 결합거리는 너무 멀기 때문에 N-4원자의 결합성에 미치는 분자내 결합을 통한 X와 Y 치환기의 영향은 고려 할 수 없다. 그러나 두 반응점 사이의 공간을 통한 electronic effect가 용매 system에 따라  $\pi$ -결합성이면 R-효과,  $\sigma$ -결합성이면 유발효과(L)가 나타나는 용매 의존적이라는 사실<sup>30)</sup>에 따라 항균 반응성에서 R-효과가 F(또는 L)-효과보다 크다( $R \gg F(L)$ )는 것은 치환기와 수용체사이의 소수성 결합에 어떤 형태론적  $\pi$ -system이 관여하고 있음을 예상할 수 있다.

**정량적인 구조와 항균 활성관계(QSAR)**

일련의 화합물에 대한 정량적인 구조와 항균활성 관계(QSAR)<sup>11)</sup>는 존재하는 화합물은 물론, 존재하지 않는 화합물들의 생물활성을 예측하고 mode of action을 이해 하는데 있다.<sup>20)</sup> 이러한 예측은 관련된 화합물의 구조에 대한 물리 화학적인 성질이나 또는 molecular descriptor와 화합물에 의한 생물활성사이의 관계에 근거한다.

QSAR를 검토하기 위한 방법에는 Free-Wilson approach와 몇가지 유형의 recognition technique<sup>14)</sup>이 있으나 여기에서는 잘 알려진 Hansch approach 방법<sup>20)</sup>을 이용하고자 한다. 1960년대 초에 Hansch는 biological response의 하나 또는 그 이상의 성질이 hydrophobic( $\pi$ ), electronic( $\sigma$ ) 및 steric( $E_s$ ) parameter의 선형 함수임을 가정하였다.<sup>21)</sup>

본 연구에서 기질 화합물들의 항균 활성에 대한 의존성은 hydrophobicity( $\pi$ )가 제일 컸으며  $E_s$  상수와  $M_R$  상수 보다는  $\sigma$  상수의 영향이 비교적 크게 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

한 예로, (VC)에 대한 obs.pI<sub>50</sub>과  $\pi$  상수와의 관계(Fig. 3)

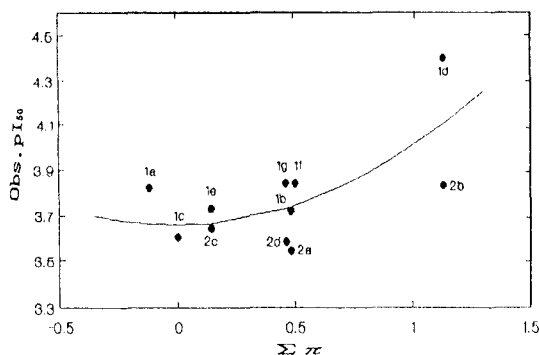


Fig. 3. Relationship between hydrophobic parameters( $\pi$ ) of X & Y substituents and the antifungal activity(obs.pI<sub>50</sub>) *in vitro* against *Valsa ceratosperma*, Obs.pI<sub>50</sub>=0.350 (0.117) $\Sigma\pi^2(X, Y)$ +3.658(0.266), n=11, s=0.176, F=8.78 & r=0.705.

로부터 X(1)가 Y(2)보다 항균활성이 크며(X>Y) 치환체 별로 독자적으로 영향을 미치고 있음을 나타내고 있다.

대개의 경우  $\pi$ 파라미터는 화합물이 생체내 작용점에 이르는 수송과정의 확률에 관련된 중요한 역할을 하는 것<sup>31)</sup>으로 화합물이 한 phase에서 다른 phase로의 이동에 따른 자유에너지 관계의 척도이다. Benzoic acid, phenoxycetic acid, benzamides, phenyl N-methylcarbamates, benzene 및 phenol system 등에서 얻어진  $\pi$ <sup>32)</sup>값에 대한 항균 활성값과의 의존성을 검토한 바, 기질 유도체와 구조적으로 유사한 일련의 benzene과 phenol system에 대한 의존성이 가장 좋았으며 전체적으로는 phenol system의  $\pi$ <sup>22)</sup>값에 대한 의존성이 가장 우수하였다.

군주별 기질 화합물들의 구조와 항균활성 관계를 설명하기 위하여 유도된 QSAR식(Table 4)들은 phenol system의  $\pi$ 와 electronic factors의 영향에 대한 척도로써 화합물의 이온화 정도와 그에 관련된 영향에 관한 요소인  $\sigma$  상수와 입체효과를 나타내는  $E_s$  상수 그리고 분자의 additive-constitutive property를 나타내므로써 입체효과인 molar 부피(cm<sup>3</sup>/M)와 분산력을 뜻하는  $M_R$  parameter로 구성되어 있으며 correlation matrix로부터 physicochemical parameter들이 각각 독립적임을 확인하였다.

QSAR 식에서  $\pi^2$ 항의 부호가 양( $\pi < 0$ )인 경우에는 pI<sub>50</sub>과  $\pi$ 가 역 포물선의 관계를 나타내는 것으로 최저값(minimal value)이상의 소수성이 클수록( $\pi < 0$  또는  $\pi > 0$ ) 항균활성이 증가할 것임을 나타낸다. 여기에서는  $\pi$ 값이 양( $\pi > 0$ )의 값이므로 비극성 치환체 일수록 곱팡이균 세포속에서 침투가 촉진되거나 수용체의 작용점과 소수성 결합의 형성에 기여함으로써 항균활성이 증가됨을

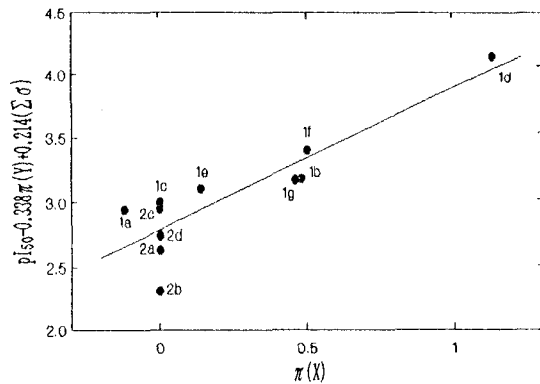


Fig. 4. Plots of sum(obs.pI<sub>50</sub>-0.338 $\pi(Y)$ +0.214 $\Sigma\sigma$ ) versus hydrophobicities( $\pi$ ) of X-substituents on the antifungal activity(eq.1) *in vitro* against *Fusarium oxysporum f. sp. sesami*, Sum=1.107(0.196) $\pi(X)$ +2.790(0.084), n=11, s=0.231, F=31.88 & r=0.883.

뜻한다.<sup>33)</sup> 그러나 항균활성은 주로  $\pi$  상수에 의존적 일 것이지만, QSAR식을 구성하고 있는  $\pi$  이외의  $\sigma$ 와  $E_s$  및  $M_R$ 상수로 인하여 제한적으로 주어지는  $\pi$ 값의 범위를 만족하는 치환체들에 의하여 영향을 받게 된다.

한편,  $\pi^2$ 항의 부호가 음( $\pi < 0$ )인 포물선 관계로부터  $\pi$ 값이 최적값(optimal value)을 나타내는 경우에는 화합물이 항균활성을 나타내기 위하여 임계 지점에 도달하는데 수 많은 lipoidal-aqueous 공유 접촉영역을 가로질러 통과하는 정도가 크지 않음을 의미한다.<sup>34)</sup>

전체적으로 항균활성에 미치는  $\pi$ 의 영향은 Y보다 X가 크므로 Y보다 X의 소수성이 크게( $X > Y$ ) 항균활성에 영향을 미치고 있으며(VC)와 (BC)의 경우, (3)과 (4)식에서 Y는 소수성에 기여하지 않음을 알 수 있다. 또한, (FOS)와 (BC)의 경우, (1)과 (4)식에서 X와 Y는 전자 밀게로서 소수성이 큰 치환기이어야 할 것임을 잘 설명하고 있다. 특히, (1)식과 같이 X의  $\pi$ 계수가 1에 가까운 것은,  $\pi$ 가 유도된 model system에서 균체내 이동의 자유 에너지에 한 치환기 효과가 aqueous phase로부터 저해 지점까지 이동하는 자유 에너지에 대등하게 근접함을 뜻하며 이는 저해체들이 소수성이 큰 구획이나 효소 또는 이들 두 구획상에서 작용함을 나타낸다.<sup>33)</sup>

한편 (PO)의 경우, (2)식에서는 치환기의 부피가 클수록 나쁜 영향( $E_s > 0$ )을 준다는 사실을 나타내고 있으며<sup>35)</sup> (3)식에서  $M_R$ 상수는 양( $M_R > 0$ )의 값을 가지므로 기질의 치환기가 ligand macromolecule과의 상호작용에 있어서 입체효과가 존재하지 않고 분산력이 작용함을 암시하며<sup>36)</sup> 음( $M_R < 0$ )의 값은  $M_R$ 상수의 증가에 따른 입체효과로 인하여 항균활성이 감소될 것임을 뜻한다.<sup>37)</sup> 그러나  $M_R$ 상수의 역할은 분산력( $M_R \geq 0$ )으로 작용하는 경향이 약간 우세할 것이다.

(1)식의 관계(Fig. 4)에서 알 수 있는 바와 같이 azole계 할로겐 치환체(1d)가 제일 큰 항균 활성을 나타내며 X에 의존적인 dual effect에 의하여 생체내 수송과정과 수용체와의 소수성 적 상호작용에 모두 영향을 미치고 있음을 잘 설명하고 있다.

이상과 같은 QSAR 분석결과, N-[1-(benzotriazole-1-yl)-X-치환-aryl]-Y-치환-aryamine 유도체들의 항균활성 반응은 치환기를 포함한 back born의 소수성( $\pi$ )과 치환기의 이온화 정도( $\sigma$ )에 의존적이므로 기질분자의 heterocyclic portion(N)과 protoheme의 Fe원자 사이의 공유 결합 뿐만 아니라, 기질화합물이 균체내 침투나 이행하는 데는 물론, X, Y의 non-heterocyclic portion과 cytochrom p-450의 lipophilic site<sup>38)</sup>에 대한 소수성 결합<sup>32)</sup> 등이 항균활성 반응에 있어서 절대적으로 중요한 요소로 작

용하고 있음을 잘 알 수 있었다.

### 활성 분자의 설계<sup>38)</sup>

특정한 고활성 화합물을 탐색하기 위하여 QSAR식 (Table 4)으로부터 항균활성을 증가시킬 수 있는 공통적인 조건은 소수성<sup>32)</sup>이 큰 치환기로서 (FOS)와 (BC)의 경우에는 센 전자밀게( $\sigma < 0$ )이어야 하고 (PO)와 (VC)의 경우에는 전자끌게( $\sigma > 0$ )로써 모든 경우에  $E_s$ 가 양( $E_s > 0$ )의 값을 보였으므로 치환기가 클수록 활성에 나쁜 영향을 미칠 것이기 때문에<sup>38)</sup> 앞서의 조건을 만족하는 mono치환체가 큰 활성을 나타낼 것으로 기대되었다.<sup>39)</sup> 그러나 기타 침투 이행성, 선택성, 동물독성 및 환경독성<sup>40)</sup> 등의 여러조건도 고려되어야 할 것이므로 이후의 연구는 이들 문제점들의 원만한 해결을 위한 QSAR방법의 다양한 응용성<sup>41)</sup>에 관하여 보고하고자 한다.

## 사 사

본 연구는 2년(1990. 3. 1~1992. 2. 28) 동안 한국과학재단의 연구비지원(901-1502-033-2)으로 이루어진 것으로 이에 깊은 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Grewe, F. and Buchel, K.H. : Mitt. Bio. Bundesanst. Land-Forstwirsh., Berlin, 151 : 208(1973)
2. Ragsdale, N.N. and Sisler, H.D. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 46 : 2048(1972)
3. Magee, P.S., Kohn, G.K. and Menn, J.J., eds. : Pesticides Synthesis through Rational Approaches, p. 65-82. ACS., Washington, D.C. 1984
4. Baker, D.R., Fenyas, J.G., Moberg, W.K. and Cross, B. eds. : Synthesis and Chemistry of Agrochemicals, Ch. 27., p. 302, ACS., Washington, D.C. 1987
5. Konosu, T., Takeda, N., Tajima, Y., Yasuda, H. and Oida, S. : Chem. Pharm. Bull., 38 : 1258(1990)
6. Cohllet, J-F., Bonnemain, J-L., Miginiac, L. and Rohr, O. : Pestic. Sci., 29 : 427(1990)
7. Quinn, J.A., Fujimoto, T.T., Egan, A.R. and Shader, S.H. : Pestic. Sci., 17 : 357(1986)
8. Buchenauer, H. and Röhner, E. : Pestic. Biochem. Physiol., 15 : 58(1981)
9. Lever, B.G., Shearing, S.J. and Batch, J.J. : Proc. Br. Crop. Protect Conf. Weeds, 1 : 3(1982)
10. Baldwin, B.C. and Wiggins, T.E. : Pestic. Sci., 15 : 156(1984)

11. Gestel, J.V., Heeres, J., Janssen, M. and Reet, G.V. : *ibid.*, 11 : 95(1980)
12. Sung, N.D., Lim, C.H., Choi, W.Y., Ko, T.S. and Kwon, K.S. : *J. Korea Agri. Chem. Soc.*, 33 : 231 (1990)
13. a) Katritzky, A.R., Rachwal, S. and Rachwal, B. : *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* : 791(1987), b) *ibid.*, 799(1987)
14. Fujita, T. : *Structure-Activity Relationships, Quantitative Approach(I) & (II)*, Nankodo, Tokyo, 1982
15. Adams, R. eds. : *Organic Reactions.*, 1 : 303, John Wiley & Sons., Inc. New York, 1942
16. Sung, N.D., Park, C.K. and Kwon, K.S. : Unpublished, 1990
17. Fukami, J., Yesungi, Y., Ishizu, K. and Tonizawa, : *Methods in Pesticide Science*, Soft Science, Tokyo, 1978
18. Yates, K. : *Hückel Molecular Orbital Theory.*, Academic Press., New York, 1978
19. Quantum Chemistry Program Exchange(QCPE), Dept. of Chem., Indiana Univ., Bloomington, IN, 47404, U.S.A.
20. Hansch, C. : *Structure-Activity Relationship*(Lavalito. C.J. ed.), p. 75-165., Pergamon, Oxford., 1973
21. Hansch, C. and Fujita, T. : *J. Am. Chem. Soc.*, 86 : 1616(1964) & *ibid.*, 85 : 2817(1963)
22. Hansch, C. : *Accounts Chem. Res.*, 2 : 232(1969)
23. Hansch, C. and Leo, A. : *Substituent Constant for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, John Wiley, New York, 1979
24. Fleming, I. : *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*, Ch. 3, p. 37., John Wiley & Sons., Toronto, 1980
25. Johnson, C.D. : *The Hammett Equation*, Cambridge Univ., Press. Cambridge, 1973
26. Kartritzky, A.R., Skarjune, R. and Yannan Kopoulou, K. : *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 2673(1987)
27. Gozzo, F., Masosro, M., Quadrelli, L. and Zagni, A. : *Pestic. Sci.*, 11 : 314(1980)
28. Sasaki, M., Kato, T., Yamamoto, S. and Mukai, K. : *J. Pestic. Sci.*, 9 : 717(1984)
29. Shorter, J. : *Correlation Analysis of Organic Reactivity*, Ch. 5., p. 167, Research Studies Press., 1982
30. Sung, N.D. : *J. Korea Chem. Soc.*, 33 : 538(1989)
31. Esser, H.O. : *Pestic. Sci.*, 17 : 265(1986)
32. Fujita, T. : *Substituent Effects in the Partition Coefficient of Disubstituted Benzene*, *Prog. Phys. Org. Chem.*, 14 : 75(1983)
33. Hansch, C. and Deutsch, E.W. : *Biochimica. Et Biophysica Acta.*, 112 : 381(1966)
34. Pennistone, J.T., Beckett, L., Bentley, D.L. and Hansch, C. : *Mol. Pharmacol.*, 5 : 333(1969)
35. Kirino, O., Takayma, C. and Inoue, S. : *J. Pesticide Sci.*, 12 : 79(1987)
36. Ref. 32, *ibid.*, 14 : 143(1983)
37. Hansch, C., Yoshimoto, M., Doll, M.H. : *Med. Chem.*, 19 : 1089(1976)
38. Hansch, C., Sammes, P.G., Taylor, J.B. ed., *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol. 4., Ch. 21., Pergamon press, 1990
39. Sung, N.D. and Kwon, K.S. et. als., Patent Pending (1991)
40. Kaiser, K.L.E., Ed., *QSAR in Environmental Toxicology*, Riedel, Dordrecht(Holland) 1984
41. Tichy, M. ed., *QSAR in Toxicology and Xenobiochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1985



---

**Antifungal activity of N-[1-(benzotriazol-1-yl)aryl]arylamine derivatives and quantitative structure-activity relationships(QSAR)**

Nack-Do Sung, Kyoung-Hoon Kim, Woo-Young Choi and Hong-Ki Kim\*(Department of Agricultural Chemistry, \*Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea)

**Abstract :** A series of new N-[1-(benzotriazol-1-yl)aryl]arylamine derivatives were synthesized and their antifungal activities ( $pI_{50}$ ) *in vitro* against *Pyricularia oryzae*, *Fusarium oxysporum f. sp. sesami*, *Valsa ceratosperma* and *Botrytis cinerea* were determined by the agar medium dilution method. From the results of the quantitative structure-activity relationships (QSAR<sub>s</sub>) analysis, hydrophobicity( $\pi$ ), electronic( $\Sigma\sigma$ ) and molar refractivity( $\Sigma M_R$ ) parameter of X & Y-substituents on the phenyl group were also shown to be important factor in determining the variation in the antifungal activity. 4-Bromo group substituents (1d & 2b) were the most effective compounds and the half-life( $T_{1/2}$ ) on the hydrolysis of X(1) at neutral pH was about 1.5 day. Molecular orbital(MO) functions of substrate compound, linear free energy relationships(LFER<sub>s</sub>) on the antifungal reactivity and the results of molecular design were also discussed.