

## 치환 Phenyl Hydrazono-3-Methyl-1, 2-Isoxazol-5-One 유도체의 합성과 살균활성

박광욱 · 김영수 · 박창규

### Synthesis and Fungicidal Activities of Substituted Phenyl Hydrazono-3-Methyl-1, 2-Isoxazol-5-One Derivatives.

Kwang-Wook Park, Young-Su Keum and Chang-Kyu Park

#### Abstract

Fungicidal activity has been examined for a series of substituted phenylhydrazono-3-methyl-1,2-isoxazol-5-one against plant pathogenic fungi.

3-methyl isoxazol-5-one was obtained from ethyl acetoacetate and hydroxyl amine. Final products were prepared by aromatic diazo coupling with 3-methyl isoxazol-5-one.

Fungicidal activities against *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium cucumerinum*, *Pythium ultimum* were tested and *Pythium ultimum* was selected for quantitative measurement of activity.

Methyl, halogen, nitro derivatives possessed high fungicidal activity at p-, o-, p- position, respectively. Methyl, halogen derivatives were much more active than alkoxy, nitro derivatives and the order of activity of halogen derivatives was F > Cl > I. This result implied that the activity was related to the molecular volume of substituents.

**Key word** : Hydrazone, Isoxazolone, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium cucumerinum*, *Pythium ultimum*, Fungicidal Activity, Synthesis

## 서 론

최근 각계의 환경문제에 대한 관심이 집중됨에 따라 농업환경에 소요되는 필수 자재인 농약사용과 관련된 다양한 논란이 증대되고 있다. 따라서 신규농약의 개발에 있어서도 강력한 병해충 방제효과는 물론 방제 대상 해충에 대한 높은 선택성을 지닐 것, 저항성 유발 정도가 낮을 것, 환경중 잔류성이 낮을 것 등의 다양한 조건이 필요하게 되었다.<sup>1)</sup> 따라서 최근 개발되어 사용하고 있는 농약들중에는 병해충에만 존재하는 특정한 생화학기작을 저해 또는 촉진하는 것들이 다수 알려지고 있다. 국내에서 농약사용량중 큰 비중을 차지하고 있는 살균제중 azole계 화합물이 이와 같은 화합물들 중의 하나라고 할 수 있는데, 이 화합물들은 fungi에만 존재하는 ergosterol의 생합성을 저해하여 살균력을 나타내기 때문에 ergosterol을 생합성, 이용하지 않는 인축에 대한 독성은 매우 낮은 편이다.<sup>2)</sup> 그러나 이 화합물들은 *Phytophthora infestans*, *Pythium spp.* 등 ergosterol을 생합성하지 않거나 외부에서 섭취하는 난균강 fungi에 대하여는 효과적 방제가 어렵다는 단점을 지니고 있다. 한편 drazoxolon, metazoxolon 등의 hydrazono 또는 azo 결합을 지닌 화합물은 *Pythium ultimum* 등의 난균강과 기타 토양 fungi의 방제에 이용되었다.<sup>3,4)</sup> 이 밖에 azobenzene 유도체도 난균강 fungi 방제에 이용된 적이 있었으나<sup>5)</sup> 화합물의 carcinogenicity로 인하여 현재는 사용이 중단되어있다. 의약품으로는 nifurazone, nifuroxime 등이 hydrazono 결합을 지닌 것으로서 bacteria 기원 병의 치료에 이용되고 있다.<sup>6)</sup> hydrazono 및 azo 결합을 분자내에 가지고 있는 화합물들은 이와 같이 소수에 한정되어 있기 때문에 이들의 구체적 작용기작에 대한 해명은 매우 미비하며 다만 hydrazono 및 azo 결합의 전자들이 fungi의 proton transfer 와 관련된 효소계에 영향을 미칠 것이라는 추정이 있을 뿐이다.<sup>5)</sup> 그러나 이와 같은 추정은 hydrazono 및 azo기를 다른 치환기의 경우와 비교한 실험이 없고, proton transfer 관련 효소계가 대부분의 생물에 기본적인 구성단위라는 점과

난균강 fungi에 대한 높은 활성을 고려하여본다면 재고의 여지가 있다고하겠다. 그리고 hydrazono 및 azo 결합은 주로 생체내 대사과정에서 일차적으로 amino 기로 분해되며 특히 drazoxolon의 경우 이와 같은 일차대사물도 상당한 살균력을 지닌다는 보고가 있다는<sup>4)</sup> 점 역시 향후 연구과제일 것이다. 또한 이와 같은 화합물에 대한 구조-활성 상관관계에 관한 연구보고가 극히 제한되어 있으며 본 연구에서는 이 점에 착안하여 substituted phenylhydrazono isoxazolone 유도체 14종을 합성하여 구조-활성 상관관계의 규명을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 분석기기

NMR spectrometer는 Jeol LA400-FT-NMR(Japan)을 이용, 내부 표준 물질로 TMS(tetramethylsilane)를 사용하였고 용매로는 chloroform-d를 사용하여 <sup>1</sup>H-NMR spectra를 얻었다. 용점 측정기는 Electrothermal(UK) 용점 측정기를 사용하여 측정하였으며, 보정하지 않았다.

### 2. 생리활성 검정용 공시 균주

*Cladosporium cucumerinum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* 균주를 PDA(Difco) 배지에서 배양하여 사용하였다.

### 3. 화합물 용액 조제

시험 약제 250mg을 정량하여 100ml acetone에 녹여 2500ppm 용액을 제조하고 이 용액 1ml를 취한 뒤, 50ml PDA 배지와 잘 혼합하여 50ppm 약액 함유배지를 조제하였다. 동일한 방법으로 0.1, 0.5, 1, 5ppm 약액 함유배지를 제조하여 살균 검정에 사용하였으며, 대조약제로는 triadimenol을 이용하였다.

4. 균사 생육 억제 실험

PDA 배지에서 배양된 공시균의 균총원판을 직경 7 mm가 되게 취하여, 약액 배지 중앙에 올려놓고 무처리 배지가 직경 8.5cm가 되는 시점을 기준으로 약액 배지 위에서 자란 균사의 직경을 측정하여 균사 생육 억제 정도를 조사하였다.

균사 생육 억제율은 다음 식으로 산출하였다.

$$\text{균사 생육억제율(\%)} = \frac{a-b}{a} \times 100$$

a : 무처리구의 평균 총 직경(mm)

b : 처리구의 평균 총 직경(mm)

5. 공시 균주 선발

50ppm 약액 배지로 살균 활성을 검정하여 4종의 균주 중 활성이 높은 *Pythium ultimum*을 공시 균주로 선발하여 0.1, 0.5, 1, 5, 50ppm의 균사 생육 억제율을 측정하였다.

6. 합성

Ethyl acetoacetate와 hydroxyl amine을 2시간 가량 환류한 후, 치환된 aromatic diazonium chloride로 coupling하여 치환된 phenyl hydrazone-3-methyl-1,2-isoxazol-5-one을 얻었다(Figure 1). 치환기인 R기에는 alkyl기, alkoxy기, halogen기, nitro기를 치환하였으며

합성 예는 다음과 같다.

Phenyl Hydrazono-3-methyl-1,2-isoxazol-5-one

- 1) 6.25g ethyl acetoacetate, 3.47g hydroxyl amine hydrochloride, 2.65g sodium carbonate anhydrous를 60ml ethanol/water 혼합액(4 : 1, v/v)에 넣은 후 2시간 동안 환류시켰다.
- 2) 2.5g aniline을 6.4g 진한 염산(35%), 6.6g 물, 15g 얼음에 녹인 후 28% sodium nitrite 수용액 5 ml를 5분간 5°C 이하의 온도에서 적하하였다.
- 3) 1)에서 얻어진 용액을 2)의 용액에 5분간 5 이하에서 적하한 후 상온에서 3시간 더 반응시켰다.
- 4) 3)에서 생긴 결정을 여과한 뒤 acetone, water 혼합액으로 재결정하였다.

결과 및 고찰

1. 합성 및 구조확인

치환된 phenylhydrazone-3-methyl-1,2-isoxazol-5-one의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR 및 GC/MS로 확인하여 화합물의 용점과 함께 Table 1, Table 2에 나타내었다. Chloroform-d 용매하에서 hydrazone 결합의 proton의 chemical shift는 12.5~12.9ppm에서 관찰되었으며, isoxazole 고리 내의 3-methyl proton은 2.3~2.4ppm, phenyl 고리의 proton은 6.9~7.8ppm에서 전형적인 alkyl, aromatic ring proton의 chemical shift를 보였다.

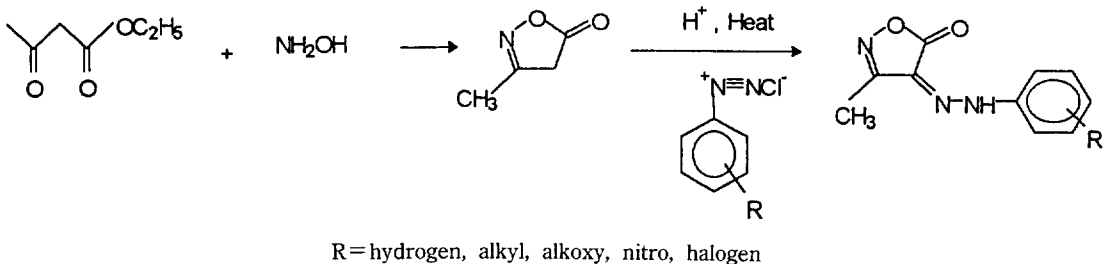


Fig. 1. Synthetic strategy of substituted phenyl hydrazone-3-methyl-1, 2-isoxazol-5-one

Table 1. Electron-impact (EI) mass spectra of substituted phenyl hydrazone-3-methyl-1, 2-isoxazol-ones.

No.	Substituten(R)	m/z values(intensity, %)
1	H	203(M <sup>+</sup> , 67), 91(100), 60(46)
2	o-methoxy	233(M <sup>+</sup> , 100), 120(91)
3	p-isopropyl	245(M <sup>+</sup> , 600), 230(100), 133(44), 118(66), 91(44)
4	p-methyl	231(M <sup>+</sup> , 100), 216(72), 119(71)
5	2,6-dimethyl	231(M <sup>+</sup> , 54), 186(27), 118(100), 91(56)
6	3,4-dimethyl	231(M <sup>+</sup> , 79), 213(15), 119(100), 91(38)
7	p-nitro	248(M <sup>+</sup> , 55), 230(69), 136(99), 90(100)
8	o-fluoro	221(M <sup>+</sup> , 63), 203(22), 109(100), 83(23)
9	m-fluoro	221(M <sup>+</sup> , 23), 230(20), 109(100), 83(30)
10	o-chloro	237(M <sup>+</sup> , 67), 219(18), 125(100), 90(26)
11	m-chloro	237(M <sup>+</sup> , 61), 219(18), 125(100), 90(26)
12	p-iodo	329(M <sup>+</sup> , 100), 217(60), 90(41)

Table 2. Melting points and <sup>1</sup>H-NMR chemical shift of substituted phenyl hydrazone-3-methyl-1, 2-isoxazol-5-ones.

No.	Substituten(R)	m.p(°C)	<sup>1</sup> H-NMR(TMS <sup>a</sup> , chloroform-d, ppm)
1	H	196-198	2.4(s, 3H) 7.2-7.3(m, 2H) 7.4-7.5(m, 3H) 12.7(s, 1H)
2	o-methoxy	168-170	2.4(s, 3H) 4.0(s, 3H) 6.9-7.1(m, 2H) 7.15-7.3(m, 1H) 7.7-7.8(m, 1H) 12.9(s, 1H)
3	m-methoxy	171-173	2.4(s, 3H) 7.15-7.3(m, 1H) 7.7-7.8(m, 1H) 12.9(s, 1H)
4	p-isopropyl	119	1.25(m, 6H) 2.5(m, 3H) 3.0(m, 1H) 7.2-7.5(m, 4H) 12.75(s, 1H)
5	o-methyl	168-170	2.35(s, 3H) 2.6(s, 3H) 7.2-7.4(m, 4H) 12.85(s, 1H)
6	p-methyl	167-169	2.36(s, 3H) 2.43(s, 3H) 7.15-7.19(m, 1H) 7.2-7.25(m, 1H) 7.3-7.35(m, 1H) 7.70-7.75(m, 1H) 7.29(s, 1H)
7	2,6-dimethyl	129-130	2.34(s, 3H) 2.5(s, 6H) 7.13(m, 2H) 7.26(m, 1H) 12.7(s, 1H)
8	3,4-dimethyl	186	2.25(s, 3H) 2.24(s, 6H) 7.1-7.4(m, 3H) 12.6(s, 1H)
9	p-nitro	178	2.25(s, 3H) 7.25(s, 2H) 7.5(m, 1H) 8.4(m, 1H) 12.6(s, 1H)
10	o-fluoro	137	2.4(s, 3H) 7.0-7.3(m, 4H) 12.6(s, 1H)
11	m-fluoro	215	2.4(s, 3H) 7.1-7.3(m, 3H) 7.7-7.9(m, 1H) 12.8(s, 1H)
12	o-chloro	172-173	2.4(s, 3H) 6.85-7.0(m, 1H) 7.1-7.19(m, 1H) 7.2-7.25(m, 1H) 7.3-7.5(m, 1H) 12.6(s, 1H)
13	m-chloro	168	2.4(s, 3H) 7.12-7.22(m, 1H) 7.32-7.48(m, 2H) 7.75-7.82(m, 1H) 12.9(s, 1H)
14	p-iodo	205	2.4(s, 3H) 7.18-7.28(m, 2H) 7.32-7.42(m, 1H) 7.46-7.52(m, 1H) 12.6(s, 1H)

a. Tetramethylsilane

**Table 3. Fungicidal activities<sup>a</sup> of substituted phenyl hydrazone-3-methyl-1,2-isoxazol-5-one against four fungi.**

No.	Substituent	Inhibition(%)			
		C.C <sup>b</sup>	C.G <sup>c</sup>	R.S <sup>d</sup>	P.U <sup>e</sup>
1	H	NI <sup>f</sup>	NI	41	100
2	o-methoxy	20	NI	71	90
3	m-methoxy	30	NI	NI	90
4	p-isopropyl	45	34	44	97
5	o-methyl	NI	NI	46	90
6	p-methyl	30	48	70	100
7	2,6-dimethyl	NI	NI	38	99
8	3,4-dimethyl	NI	NI	NI	81
9	p-nitro	90	80	65	100
10	o-fluoro	95	63	86	100
11	m-fluoro	30	32	61	97
12	o-chloro	78	53	80	97
13	m-chloro	50	60	84	100
14	p-iodo	NI	32	52	78
15	ferimzone	90	47	66	84
16	triadimenol	97	68	78	84

- a. Concentration of teasted compound solution-50 ppm
- b. C.C—*Cladosporium cucumerinum*
- c. C.G—*Colletotrichum gloeosporioides*
- d. R.S—*Rhizoctonia solani*
- e. P.U—*Pythium ultimum*
- f. No Inhibition

**2. 생리활성 검색**

합성한 화합물 14종과 대조약제인 triadimenol을 50ppm 수준으로 *Cladosporium cucumerinum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*에 처리, 한천평판상에서의 균사생육 억제 실험을 실시한 결과를 Table 3에 나타냈다. 4종의 fungi 중 *Pythium ultimum*에 대한 생육억제효과가 가장 강한 것으로 나타났으며 다른 종에 대한 저해효과는 없거나 최대 95%로 나타났다. 주로 halogen 치환체들은 4종의 균주에 대하여 비교적 광범위하게 활성이 나타난

반면 alkyl 및 alkoxy 치환체의 활성은 *Pythium ultimum*에 제한되어 있었다. 따라서 *Pythium ultimum*을 공시균주로 선발하였으며 0.1, 0.5, 1, 5, 50ppm 수준의 농도에서 균사생육억제율을 구하여 EC<sub>50</sub>을 계산하였다.(Table 4).

대조약제인 triadimenol의 EC<sub>50</sub> 값은 2.05μM로 합성한 유도체 중 H, nitro, alkoxy 치환 화합물은 이보다 낮은 활성을 나타내었으며, alkyl, halogen 치환 유도체는 대조약제와 비슷하거나 강한 활성을 나타내었다.

Phenyl ring의 ortho 위치는 치환기의 부피(V<sub>eff</sub>)<sup>9</sup> 보다는 전자적 영향(σ)<sup>10</sup>을 강하게 받는 것으로 나타났다. 이와같은 점은 methyl기와 chloro기는 치환기의 부피를 나타내는 QSAR parameter의 일종인 V<sub>eff</sub>는 각각 0.55와 0.52로 유사하지만 chloro 치환체의 활성이 더 강한 활성을 보인다는 관찰결과와 강한 활성을 보인 fluoro 치환체의 경우 V<sub>eff</sub>는 0.27로 methyl기, chloro기보다는 매우 작지만 치환기의 전자적 영향을 반영하는 parameter인 σ값은 chloro기에 가깝다는 점을 통하여 알 수 있다. 그리고 일반적으로 수용액상의 fluoro 치환기의 부피는 H와 유사하다는 보고가 있다는 점을 고려하면 fluoro 치환체의 활성은 주로 강한 전자-끌개 효과(electron withdrawing effect)에 기인한다고 볼 수 있을 것이다.

한편 meta 위치의 치환기에 의한 균사 생육억제효과는 주로 치환기의 입체효과에 의한 것으로 추정되며 이와 같은 사실은 meta 치환 유도체중 강한 활성을 보인 methyl 및 chloro 유도체의 치환기의 σ<sub>m</sub>은 각각 0.37과 -0.07로 큰 차이가 있지만 V<sub>eff</sub>는 매우 유사하다는 점을 통하여 알 수 있다.

para 위치의 치환기의 물리화학적 성질중 균사 생육억제효과에 영향을 미치는 것은 주로 전자적 영향인 것으로 보인다. 즉 iodo, isopropyl 기의 V<sub>eff</sub>는 각각 0.78, 0.76으로 유사하지만 σ<sub>p</sub>는 0.18, -0.20으로 큰 차이가 있고, 한편으로 methyl기는 V<sub>eff</sub>가 0.52이지만 σ<sub>p</sub>는 -0.17로 isopropyl기와 유사하다는 점으로 위와 같은 추정을 할 수 있었다.

Nitro 치환체의 EC<sub>50</sub> 값은 5.39~7.18μM로 활성이 매우 약한 것으로 나타났는데 이 점은 비치환체인

Table 4. Inhibition(%) and EC<sub>50</sub> of substituted phenyl hydrazono-3-methyl-1, 2-isoxazolone against *Pythium ultimum*.

No.	Substituent	FW <sup>a</sup>	Inhibition(%)					EC <sub>50</sub>		
			50 ppm	5 ppm	1 ppm	0.5 ppm	0.1 ppm	ppm	μM	R <sup>2</sup>
1	H	203.20	100	79	43	35	21	1.009	5.400	0.97
2	m-methyl	217.22	99	80	53	56	29	0.500	2.302	0.97
3	p-methyl	217.22	100	78	64	68	26	0.333	1.533	0.89
4	m-methoxy	233.22	90	71	49	41	11	1.369	5.870	0.97
5	o-fluoro	221.19	100	83	64	48	32	0.423	1.912	0.97
6	o-chloro	237.64	96	80	50	39	35	0.665	2.798	0.94
7	m-chloro	237.64	100	84	56	44	37	0.461	1.940	0.95
8	m-nitro	248.19	91	83	40	21	12	1.728	6.962	0.90
9	o-nitro	248.19	93	62	39	47	21	1.337	5.387	0.95
10	p-nitro	248.19	100	59	46	25	15	1.782	7.180	0.97
11	triadimenol	295.76	84	39	— <sup>b</sup>	41	0	0.607	2.052	0.86

a. Formula Weight

b. Not Tested

phenylhydrazo 화합물이 낮은 활성을 보인다는 결과를 고려해 보면 각 위치별 치환기의 물리화학적 성질의 제한치를 나타내는 것으로 보인다. 일반적으로 QSAR 식에 도입된 다양한 parameter와 생물활성간에는 parabolic 형태의 관계식이 관찰되어 일정한 최적치를 지니는 경우가 다수인데, 본 연구에서도 nitro기의 경우  $\sigma_m$ ,  $\sigma_p$ , MR<sup>7,9)</sup>는 각각 0.71, 0.78, 7.4로서 phenyl ring의 ortho, meta, para 치환체중 강한 활성을 보인 화합물과 비교하면 매우 큰 값을 지니며, 역시 활성이 낮았던 비치환체인 H 유도체는 각각 0.00, 0.00, 1.00로 매우 작은 점을 고려할 때, 위치별로 도입될 치환기의 물리화학적 성질과 균사 생육억제 효과간에도 이와 같은 parabolic 형태의 관계가 존재함을 유추할 수 있었다.

그러나 이와 같은 추정을 확정하기 위해서는 다양한 물리화학적 성질의 측정과 다양한 화합물의 자료가 더 필요할 것으로 사료되며 앞으로 phenyl ring을 포함하여 heterocycle, hydrazo기를 다양한 형태로 변환하여 난균강 fungi 방제에 요구되는 최적 구조의 확인을 시도해보고자 한다.

## 요 약

Hydrazone 결합을 지닌 화합물 중 농용으로 사용되는 것은 ferimzone, drazoxolon, metazoxolon 등으로 그 수가 매우 제한되어 있다. 본 연구에서는 hydrazone 결합 및 유사 결합구조인 formamidine, triazene 등의 toxophore로서 작용 여부를 규명하고자 하는 시도의 일환으로 일차적으로 hydrazone계 화합물 중 isoxazolone 유도체를 합성, 살균력을 검정하였다.

Ethyl acetoacetate와 hydroxyl amine에서 합성된 isoxazolone에 aromatic diazonium coupling을 통하여 최종 산물을 얻었다.

합성된 16종 화합물들의 항균 활성을 *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium cucumerinum*, *Pythium ultimum*에 대하여 검정한 결과, 난균강에 속하는 *Pythium ultimum*에 강한 활성을 보였으며 이를 공시 균주로, EC<sub>50</sub>을 계산하여 그 활성 정도를 비교하였다. p-methyl, o-fluoro, m-chloro 치환체가 강한 활성을 보였다.

### 참고문헌

1. Steven O. Duke, Julius J. Menn and Jack R. Plimmer(1993) : Pest Control with Enhanced Environmental Safety, American Chemical Society, pp.1-15
2. Kenneth A. Hassall(1990) : The Biochemistry and Uses of Pesticide, 2th ed. VCH publisher Inc. pp.335-344
3. Clive Tomlin ed(1994) : The Pesticide Manual, 10th ed., Crop Protection Publications, p.1081, p. 1104
4. Gyorgy Maltolcsy, Miklos Nadasy, Viktor Abdri-ska(1988) : Pesticide Chemistry, Elsevier, New York, p.411
5. Fox H. M., Geoghegan M. J., Silk J. A. and Summers L. A.(1963) : Ann. appl. Biol, 52, pp.33-44
6. Corwin Hansch ed.(1990) : Comprehensive Medicinal Chemistry, vol 6, Pergamon Press, pp.708-710
7. Summers L.A., Freeman P. F. H. and Shields D. J.(1965) : J. Chem. Soc., pp.3312-3318
8. Marshall Sittig ed.(1982) : Pesticide Manufacturing and Toxic Material Control Encyclopedia, Noyes Data Co., pp.355-356
9. Corwin Hansch(1990) : Comprehensive Medicinal Chemistry Vol 4, Pergamon Press, pp.196-198
10. Hansch C., Leo A., Unger S. H., Kim K. H., Nikaitani D. and Lien E. J.(1973) : J. Med.Chem, 16, p.1207