

N-치환-5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamide의 합성과 살균력

김용환 · 전원배 · 박창규*

동양화학공업(주) 중앙연구소, *서울대학교 농업생명과학대학 농화학과

초록 : 생리활성을 갖는 신규물질탐색의 일환으로 26종의 N-치환-5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamide 화합물을 합성하고, 이들 구조를 ¹H-NMR로 확인하였다. 이들 유도체들을 *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Pyricularia oryzae* 및 *Colletotricum gleosporiodes*에 대한 *in vitro*에서의 균사생육억제효과를 검정한 결과 electron releasing group으로 *meta* 치환된 aniline의 carboxamide가 *R. solani*에 대해 12.5 ppm 수준에서 70% 이상의 살균효과를 보여주었다(1992년 2월 6일 접종, 1992년 3월 16일 수리).

Pyrazole 고리를 갖는 carboxamide 유도체의 생리활성에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히 N-1, 위치가 phenyl 기로 치환되어 있는 2-치환 aminopyrazole 유도체는 제초력이 뛰어나며,¹⁾ 1,3-dimethylpyrazole-5-carboxamide 유도체는 우수한 살비력을 갖고 있음이 보고되었다.²⁾ 또한 N-phenyl-1,3,5-trimethylpyrazole-4-carboxamide의 경우 벼 문고병(*Rhizoctonia solani*)을 비롯한 *Basidiomycetes* 屬에 높은 살균효과를 보여주며³⁻⁵⁾ 그 화학적 구조가 carboxin(5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathiin-3-carboxanilide)을 위시한 *cis*-crotonanilide 계열의 화합물과 매우 유사한 특징을 갖고 있다.

본 연구에서는 생리활성을 갖는 pyrazole 유도체의 탐색의 일환으로 살균활성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 C-5 위치의 methyl기⁵⁾를 크기가 유사한 C1 원자로 치환시켜(분자중질량 : MR_{C1} = 6.03, MR_{Me} = 5.65), 26종의 pyrazole-4-carboxamide 유도체를 합성하였으며, 일차적으로 이들 화합물들에 대해 *in vitro* 조건에서의 균사 생육억제력을 검정, 비교하였다.

재료 및 방법

분석기기

NMR spectrometer는 Bruker AM 300 LL(W. Germany)을 이용, 내부표준물질로 TMS를 사용하였고 용매로는 DMSO-d₆를 사용하여 ¹H-NMR spectrum을 얻었다.

용점측정기는 Buchi 535(Swiss) 용점측정기를 이용, 모세관에 시료를 넣어 측정하였으며 보정하지 않았다.

HPLC는 Waters 590 EF(USA)에 C-18 역상 column (Waters, 3.9×250 mm, 5 μm pore size)를 부착하여 사용하였으며 용매조성은 methanol : water(8 : 2, v/v), 유속은 0.8 ml/min(1900 psi), 측정파장은 241 nm이었다.

생리활성 검정용 공시균주

Rhizoctonia solani(벼 문고병균)는 일본 IFO에서 구입하였고, *Pyricularia oryzae*(KJ 101, 벼 도열병균), *Botrytis cinerea*(오이 잭빛곰팡이균) 및 *Colletotricum gleosporiodes*(고추 탄저병균)는 농업기술연구소에서 분양받았으며, PDA 배지(Difco 제품)에서 배양하여 공시균주로 사용하였다.

화합물의 조제

시험약제를 30 mg을 정량하여 acetone(6 ml) + 증류수(24 ml)의 용액에 녹여 1000 ppm 용액을 제조하였다. 이 용액 10 ml를 취해 90 ml의 PDA 배지와 잘 혼합하여 100 ppm의 약액함유배지를 조제하였다. 같은 방법으로 50, 25, 12.5 ppm의 약액함유배지를 제조하여 살균력검정에 사용하였으며, 대조약제로 carboxin을 이용하여 동일한 방법을 이용, 살균력을 비교하였다.

균사생육억제 실험

PDA 배지에서 배양된 공시균의 균총원판을 직경 5 mm 되게 취하여 약액배지 중앙에 올려 놓고 26 °C에서 *R. solani*는 2일간, *P. oryzae*, *B. cinerea* 및 *C. gleosporiodes*는 4일간 배양한 후 균사생장의 억제정도를 조사하

Key words : N-Substituted-5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamide, fungicidal activity, electron releasing group, substituent constant

Corresponding author : Y. W. Kim

였다. 이 과정을 4번 반복하여 평균값을 얻은 후 군사생육억제율을 다음식으로 산출하였다.

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

a : 무처리구의 평균 균총직경(mm)

b : 처리구의 평균 균총직경(mm)

합성

5-Chloro-1,3-Dimethylpyrazole-4-carboxylic acid(i)는 전보⁶⁾에서와 동일한 Vilsmeier-Haack 방법⁷⁾으로 합성하였으며 thionyl chloride와 반응시켜 acid chloride(ii)⁶⁾를 얻은 뒤, triethylamine 존재하에 anilines(x=0) 또는 benzylamines(x=1)와 반응시켜 대응하는 carboxamides(iii)를 얻었다(Fig. 1). HPLC 분석결과 순도가 낮은 경우는 methanol에서 재결정하였으며 합성 예는 아래와 같다.

N-(3-methoxyphenyl)-5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamide(11)의 합성: 3-Methoxyaniline(1.23g, 10 mmole)과 triethylamine(1.31g, 13 mmole)을 무수 tetrahydrofuran(10 ml)에 넣은 뒤 5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxyl chlorides(1.94g, 10 mmol)을 녹인 무수 tetrahydrofuran(5 ml) 용액을 질소분위기하에서 상온에서 적가하였다. 5시간 동안 상온에서 교반한 다음 반응중 생성된 염을 여과하여 제거하고 얻은 여액을 감압 농축하여 11의 조결정을 얻었다. 이를 methanol에서 재결정하여 무색의 침상결정을 얻었다.

m.p. : 147~148 °C, 수율 : 1.96g(70%), HPLC area % : 98.5, ¹H-NMR(DMSO-d₆) σ , ppm : 2.29(s, 3H), 3.78(s, 3H), 6.65~6.68(m, 1H), 7.21~7.23(m, 2H), 7.37~7.38(m, 1H), 9.83(s, 1H)

결과 및 고찰

합성한 26종의 N-치환-5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-

4-carboxamide의 구조와 ¹H-NMR 결과를 Table 1에 수록하였다.

DMSO-d₆ 용매하에서 N-1 위치의 methyl기는 3.8 ppm 부근에서 proton chemical shift가 일어났으며 C-3 위치의 methyl기는 2.3~2.5 ppm의 chemical shift를 보였다(Fig. 2). 한편 amide의 -NH의 chemical shift는 amine이 aliphatic인 경우에는 5.4~6.1 ppm, aniline계인 경우(x=0)는 8.0~10.5 ppm, benzylamine인 경우(x=1)는 8.1~8.3 ppm의 chemical shift를 보였다. Aniline의 치환기가 electron releasing group이거나 ortho 위치가 치환되어 있는 경우, -NH의 chemical shift가 electron shielding effect에 의해 상대적으로 upfield에 나타났으며⁸⁾ 이 값을 Hammett가 benzoic acid 계에서 측정한 치환상수 σ_{NH} ⁹⁾과 비교한 결과, 아래식과 같은 높은 상관관계를 보여 주었다(여기서 σ_o 는 σ_p 를 사용).

Ortho 치환 $Y = 1.27 \cdot X + 9.43$ (n=5, r=0.89, SD=0.47)
Meta 치환 $Y = 0.75 \cdot X + 9.80$ (n=7, r=0.97, SD=0.27)
Para 치환 $Y = 0.76 \cdot X + 9.85$ (n=8, r=0.98, SD=0.34)

여기서 X는 Hammett의 σ 값을 의미하며, Y값은 ¹H-NMR 상에서의 -NH기의 chemical shift 추정치를 의미한다. 또한 n, r, SD는 각각 자료갯수, 회귀계수 및 표준편차를 의미한다. *Ortho* 치환의 경우, r값이 다른 경우에 비해 낮았는데 이는 steric effect 등을 고려하지 않고 σ_p 를 원용한 결과로 생각된다¹¹⁾ *Meta* 치환 및 *para* 치환의 경우, 기울기와 절편이 거의 일치하는 바, 다시 하나의 함수관계로 표시하여 $Y = 0.74 \cdot X + 9.83$ (n=15, r=0.97, SD=0.32)의 식을 얻었다. 이 결과는 *meta*, *para* 치환의 경우 ¹H-NMR의 chemical shift가 linear free energy 관계에 의존함을 보여주는 것으로써 Hansch analysis 등의 QSAR 방법에 있어서 NMR 결과를 직접적으로 electronic parameter로 이용할 수 있음을 보여준다.⁸⁻¹¹⁾

Table 2는 4가지 공시 균주에 대한 *in vitro* 조건에서의 군사생육억제 결과이다. 화합물 3~22에서와 같이 ani-

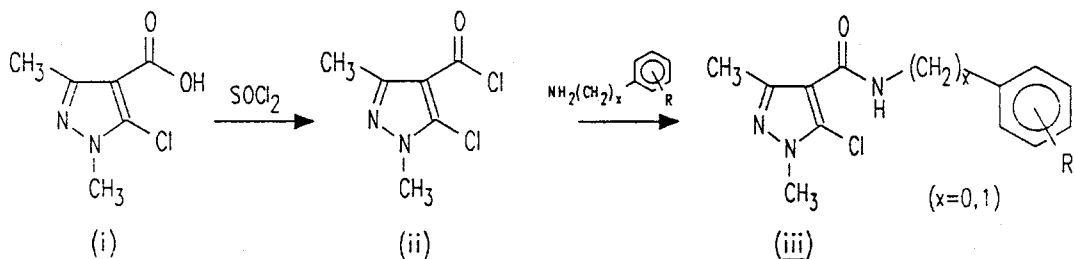


Fig. 1. Synthetic route of N-substituted phenyl 5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamides.

line 계통의 carboxamide 유도체의 경우, 치환기에 따른 group으로 치환되어 있는 4, 5, 11, 12, 16 등의 경우 살균력의 차이가 뚜렷하게 나타났다. Electron releasing R. solani에 대해 12.5 ppm 수준에서 70% 이상의 살균

Table 1. List of N-substituted 5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamides

No	x	R	m.p.(°C)	PMR(TMS, DMSO-d ₆ , ppm)
1 ^{a)}		-CH(CH ₃) ₂	99~100	1.05~1.15(d, 6H), 2.45(d, 3H), 3.80(s, 3H), 4.05~4.45(m, 1H), 5.40(s, 1H)
2		-C ₄ H ₉	98~100	0.90~1.10(t, 3H), 1.40~1.65(m, 4H), 2.45(s, 3H), 3.30~3.60(m, 2H), 3.80(s, 3H), 6.05(s, 1H)
3	0	-H ^{b)}	153~154	2.29(s, 3H), 3.79(s, 3H), 7.09~7.11(t, 1H), 7.31~7.36(t, 2H), 7.65~7.67(d, 2H), 9.87(s, 1H)
4	0	-2-CH ₃	148~149	2.26(s, 3H), 2.33(s, 3H), 3.78(s, 3H), 7.11~7.23(m, 3H), 7.50~7.53(d, 1H), 9.21(s, 1H)
5	0	-3-CH ₃	130~131	2.28(s, 3H), 2.29(s, 3H), 3.78(s, 3H), 6.90~6.92(d, 1H), 7.19~7.21(t, 1H), 7.42~7.44(s, 3H), 7.51~7.52(d, 1H), 9.77(s, 1H)
6	0	-4-CH ₃	162~163	2.26(s, 3H), 2.28(s, 3H), 3.77(s, 3H), 7.11~7.14(d, 2H), 7.53~7.56(d, 2H), 9.75(s, 1H)
7	0	-2-NO ₂	190~192	2.37(s, 3H), 3.80(s, 3H), 7.36~7.40(t, 1H), 7.72~7.78(t, 1H), 7.94~7.97(d, 1H), 8.03~8.06(d, 1H), 10.34(s, 1H)
8	0	-3-NO ₂	195~196	2.32(s, 3H), 3.80(s, 3H), 7.62~7.67(m, 1H), 7.95~8.03(m, 2H), 8.70(s, 1H), 10.35(s, 1H)
9	0	-4-NO ₂	194~195	2.30(s, 3H), 3.79(s, 3H), 7.89~7.92(d, 2H), 8.23~8.26(d, 2H), 10.47(s, 1H)
10	0	-2-OCH ₃	142~143	2.38(s, 3H), 3.78(s, 3H), 3.88(s, 3H), 6.95(m, 1H), 7.07~7.10(m, 2H), 8.18~8.21(m, 2H), 8.82(s, 1H)
11	0	-3-OCH ₃	147~148	2.29(s, 3H), 3.78(s, 3H), 6.65~6.68(m, 1H), 7.21~7.23(m, 2H), 7.37~7.38(m, 1H), 9.83(s, 1H)
12	0	-4-OCH ₃	172~173	2.29(s, 3H), 3.77(s, 3H), 6.89~6.92(m, 2H), 7.56~7.59(m, 2H), 9.70(s, 1H)
13	0	-3-Cl	159~160	2.29(s, 3H), 3.78(s, 3H), 7.15~7.17(d, 1H), 7.33~7.38(t, 1H), 7.54~7.57(d, 1H), 7.84(s, 1H), 10.03(s, 1H)
14	0	-4-Cl	176~177	2.28(s, 3H), 3.78(s, 3H), 7.37~7.40(d, 3H), 7.67~7.70(d, 2H), 9.98(s, 1H)
15	0	-4-Br	187~188	2.30(s, 3H), 3.80(s, 3H), 7.51~7.55(m, 2H), 7.64~7.68(m, 2H), 10.00(s, 1H)
16	0	-3-OC ₂ H ₅	148~149	1.30~1.35(t, 1H), 2.28(s, 3H), 3.77(s, 3H), 3.96~4.03(q, 2H), 6.64~6.66(m, 1H), 7.19~7.21(m, 2H), 7.36(s, 1H), 9.82(s, 1H)
17	0	-4-OC ₂ H ₅	161~162	1.29~1.34(t, 3H), 2.28(s, 3H), 3.77(s, 3H), 3.96~4.00(q, 2H), 6.87~6.90(m, 2H), 7.54~7.57(m, 2H), 9.70(s, 1H)
18	0	-2-OH	160~161	2.50(s, 3H), 3.86(s, 3H), 6.87~7.19(m, 4H), 8.15(s, 1H), 8.71(s, 1H)
19	0	-3-OH	206~208	2.28(s, 3H), 3.77(s, 3H), 6.46~6.50(m, 1H), 7.01~7.11(m, 2H), 7.23~7.24(m, 1H), 9.40(s, 1H), 9.71(s, 1H)
20	0	-2-F	144~145	2.25(s, 3H), 3.90(s, 3H), 7.00~7.20(m, 2H), 7.65~7.85(d, 2H), 9.30(s, 1H)
21	0	-3-F	159~160	2.28(s, 3H), 3.78(s, 3H), 6.91~6.94(m, 1H), 7.35~7.42(m, 2H), 7.60~7.65(m, 1H), 10.08(s, 1H)
22	0	-4-F	155~156	2.20(s, 3H), 3.80(s, 3H), 6.95~7.15(m, 2H), 7.45~7.6(m, 2H), 9.80(s, 1H)
23	1	-H	115~116	2.26(s, 3H), 3.74(s, 3H), 4.41~4.43(d, 2H), 7.32~7.34(m, 5H), 8.25(s, 1H)
24	1	-4-Cl	152~153	2.25(s, 3H), 3.74(s, 3H), 4.39~4.41(d, 2H), 7.31~7.41(m, 4H), 8.27(s, 1H)
25	1	-4-CH ₃	145~146	2.25(s, 3H), 2.27(s, 3H), 3.74(s, 3H), 4.36~4.38(d, 2H), 7.12~7.22(m, 4H), 8.20(s, 1H)
26	1	-4-OCH ₃	111~112	2.25(s, 3H), 3.73(s, 3H), 3.74(s, 3H), 4.33~4.35(d, 2H), 6.83~6.91(d, 2H), 7.23~7.26(d, 2H), 8.17(s, 1H)

^{a)} Aliphatic(1~2)

^{b)} Literature 150~152 °C³⁾

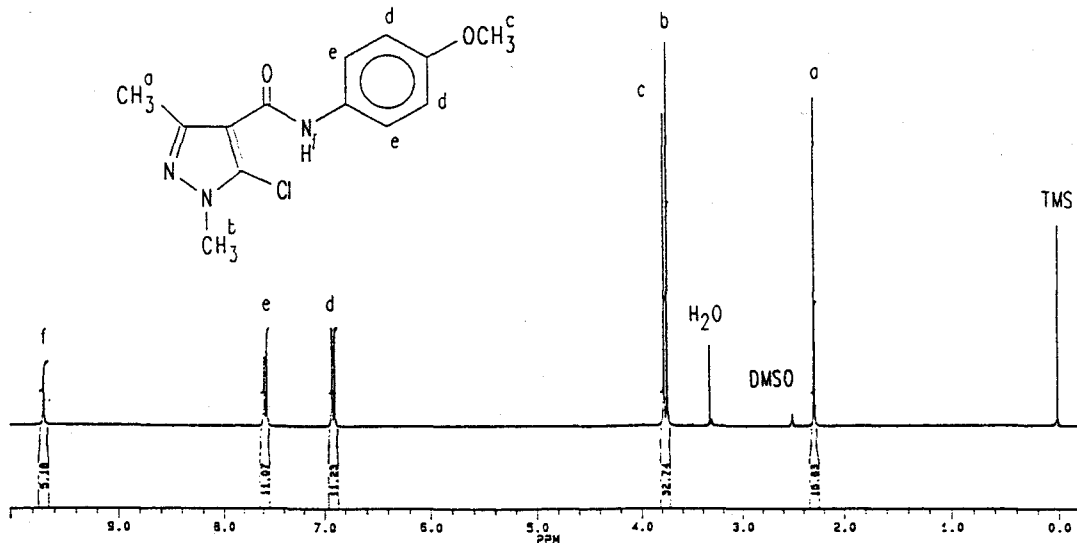


Fig. 2. ¹H-NMR spectrum of N-substituted phenyl 5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamide(12).

Table 2. Mycelium growth inhibition activity of test compounds

Comp. No	<i>R. solani</i>				<i>B. cinerea</i>				<i>P. oryzae</i>				<i>C. gleosporiodes</i>			
	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5
1	7	0	0	0	24	10	10	0	0	0	0	0	4	4	0	0
2	30	14	0	0	29	19	12	0	0	0	0	0	11	10	10	7
3	91	87	84	73	58	40	25	13	83	72	34	7	21	14	0	0
4	100	95	95	95	59	37	19	4	48	30	22	13	22	6	0	0
5	100	95	95	95	82	68	56	40	100	78	65	26	61	22	11	6
6	69	65	40	39	57	48	25	12	73	53	25	14	27	3	3	2
7	26	14	15	13	37	21	15	12	12	10	4	6	6	4	4	0
8	44	36	40	24	12	17	17	5	8	8	4	4	11	14	18	14
9	30	16	12	10	40	16	0	0	15	7	11	7	0	0	0	0
10	64	58	50	23	29	21	5	0	30	26	11	11	8	4	0	0
11	85	79	72	81	50	19	5	0	59	26	11	7	19	8	0	0
12	86	79	75	73	50	29	17	5	36	24	12	6	9	6	0	0
13	72	67	53	50	48	48	40	27	79	79	72	21	38	41	28	10
14	87	57	64	22	46	29	29	12	41	24	21	3	24	14	14	0
15	51	48	43	17	19	15	15	8	14	14	10	3	7	10	7	3
16	95	95	95	95	69	53	31	21	70	48	26	4	39	6	6	0
17	86	48	41	33	46	28	18	9	43	22	17	9	11	0	0	0
18	49	33	20	1	28	25	19	11	16	11	8	5	28	20	17	13
19	45	16	0	0	19	13	11	1	10	4	0	3	8	6	5	6
20	94	91	90	87	76	59	43	27	57	30	12	3	42	26	17	12
21	100	85	76	72	not tested											
22	93	88	88	79	76	61	33	20	39	14	3	1	38	18	13	8
23	29	16	6	6	39	30	14	6	42	18	4	0	22	9	0	0
24	69	58	32	19	52	52	34	23	54	44	33	2	35	29	15	0
25	75	51	19	16	53	34	25	9	55	38	25	7	51	20	8	0
26	32	23	16	2	29	6	3	0	44	25	6	0	9	8	5	0
Carboxin	98	91	91	91	84	74	67	64	100	85	82	72	49	36	30	2

력을 보여 주었으며 5의 경우는 *P. oryzae*에 대해서도 50 ppm 수준에서 80% 정도의 균사생육 억제능력을 보여 주었다. 반면에 F로 치환되어 있는 20~22의 경우, 치환되지 않은 3과 유사한 결과를 보여 주었는데 이는 F와 H의 원자부피가 유사한 점을 고려할 때⁹⁾(MR 값 : F=0.92, H=1.03) 흥미있는 결과이다. 또한 *ortho* 치환인 경우가 *meta* 치환인 경우보다 상대적으로 낮은 살균력을 보여주고 있는데 이는 *ortho* 치환의 경우 치환된 *ortho* group이 steric hindrance에 의해 amide group을 shielding 하기 때문으로 생각된다.⁸⁾ 이 경우 polar한 amide기가 가리워지므로 hydrophobicity의 증가를 예상할 수 있으며 한 예로 methoxy 기가 각각 *ortho*, *meta* 치환된 10, 11의 경우 molecular modeling software인 PCMODEL¹²⁾을 이용하여 계산한 극성표면적이 46.4 Å² (10)에서 49.7 Å²(11)로 증가함으로도 확인된다. *Para* 치환의 경우, -NH의 ¹H-NMR의 chemical shift가 *meta* 치환과 큰 차이가 없는 것으로 볼 때, steric parameter가 영향을 미친 것으로 사료된다.

한편 benzylamine에서 얻어진 23~26의 경우, 4종의 공시균주 모두에서 주목할 만한 생리활성을 보이지 못했으며 치환기에 따른 살균력의 차이가 뚜렷하게 나타나지 않았다. Aliphatic amine에서 만들어진 1~2의 경우에도 뚜렷한 살균력이 인정되지 않았다. Benzylamine과 aliphatic amine에서 유래한 carboxamide의 -NH chemical shift가 5.4~8.3 ppm으로 aniline계의 8.0~10.5 ppm과 비교할 때 amide의 수소 원자의 전자밀도가 살균력에 영향을 미치는 중요한 변수임을 배제할 수 없다.¹³⁾

이상에서 볼 때 N-치환-5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamide는 *R. solani*에 대해 electron releasing group이 *meta* 치환되어 있는 경우 12.5~100 ppm 수준에서 높은 생육저해효과를 보여 주었으며 *B. cinerea*, *P.*

oryzae 및 *C. gleosporiodes*에서는 뚜렷한 효과가 없었다. 본 실험실에서는 추후로 pyrazole 각 위치에서의 치환기 크기, 소수성 및 전자적 특성을 고려한 유도체를 합성하여 *in vitro* 및 *in vivo* 시험을 거친 결과를 바탕으로 구조-활성관계를 규명, 구조최적화를 시도할 예정이다.

참 고 문 헌

- Gehring, R., et al. : DE 3420958(1985)
- Okada, I., Okui, S., Takahashi, Y. and Fukuchi, T. : J. Pesticide Sci., 16 : 623(1991)
- Huppatz, J. L. : Aust. J. Chem., 36 : 135(1983)
- Yamamoto, S., et al. : Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 60-34949(1985)
- Huppatz, J. L., Phillips, J. N. and Witzens, B. : Agric. Biol. Chem., 48 : 45(1984)
- 김용환, 박치현, 최원석, 권영철, 박창규 : 한국농화학회지, 32 : 401(1989)
- Porai-Koshits, B. A., et al. : Khim. Farm. Zh., 4 : 19 (1970) [CA, 73 : 3844(1970)]
- Chang, G., et al. : J. Med. Chem., 31 : 1141(1988)
- Hansch, C., Leo, A., Unger, S. H., Kim, K. H., Nikaitani, D. and Lien, E. J. : J. Med. Chem., 16 : 1207(1973)
- Gasteiger, J., et al. : QSAR and strategies in the design of bioactive compounds(ed. by Seydel, J.K.), VCH, Bad Segeberg, FRG(1984)
- Kubota, T., Yamakawa, M., Tetrada, H. and Yoshimoto, M., "藥物の構造活性相關"(構造活性相關懇話會編), 南江堂, 東京(1988)
- PCMODEL, version 3.0, Serena software (1990)
- Schonenberg, H., et al. : Arzneim-Forsch., 12 : 1162(1962)

Synthesis and antifungal activity of N-substituted-5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamide

Yong-Whan Kim, Won-Bae Jeon and Chang-Kyu Park*(OCI Research Center, Incheon 402-040, Korea, *Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : Twenty-six N-substituted-5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamide were synthesized and their antifungal activity against *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Botrytis cinerea* and *Colletotricum gleosporiodes* was compared. N-phenyl-5-chloro-1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamides having electron releasing group at the *meta* position of phenyl ring demonstrated good fungicidal activity against *R. solani*.