

丙烷脒衍生物的合成及其抑菌活性测定

冯美杰^{1,2}, 陈安良^{1,2}, 宋 卫^{1,2}, 冯俊涛^{1,2}, 张 兴^{1,2}

(1 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】寻找更高活性的芳香二脒类抑菌化合物。【方法】以对氰基苯酚、1,3-二溴丙烷和1,4-二溴丁烷为原料,合成了A3、B3、B4、C3、C4、D3、D4和E3 8个丙烷脒衍生物,用¹H-NMR和MS鉴定了其结构,用生长速率法和黄瓜真叶法测定了其活性,并与丙烷脒进行了比较。【结果】生长速率法测试表明,8种丙烷脒衍生物对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)菌丝生长均具有较强的抑制作用,其中N,N-二正丙基丙烷脒(B3)、N,N-二正丙基丁烷脒(B4)、N,N-二异丙基丙烷脒(C3)、N,N-二异丁基丁烷脒(D3)对番茄灰霉病菌生长抑制的毒力均高于丙烷脒,其EC₅₀为0.304 3~3.473 0 mg/L;黄瓜真叶法测定表明,50 mg/L剂量下B3、B4、C3的3 d保护效果均在60%以上,优于丙烷脒处理的57.55%;B3、B4的3 d治疗效果分别为71.70%和68.87%,与丙烷脒防效(64.15%)相当。【结论】B3、B4较丙烷脒抑菌活性有较大提高,有望成为丙烷脒产品的更新品种。

【关键词】 丙烷脒;芳香二脒类;番茄灰霉病菌;抑菌活性

【中图分类号】 S482.2;TQ450.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)01-0168-05

Propamidine analogs synthesis and fungicidal bioactivity

FENG Mei-jie^{1,2}, CHEN An-liang^{1,2}, SONG Wei^{1,2}, FENG Jun-tao^{1,2}, ZHANG Xing^{1,2}

(1 Research and Development Center of Biopesticide, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Biopesticide Technology and Engineering Research Center, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The research is to find more compounds with antifungal activity. 【Method】Eight propenaindine analogs A3, B3, B4, C3, C4, D3, D4 and E3 were synthesized from 4-cyanophenol and α , ω -di-bromopane. All compounds were confirmed by ¹H-NMR and MS. The inhibitory effects were studied with the mycelial growth rate method. 【Result】The results showed that four compounds such as N,N-bispropylpropamidine (B3), N,N-bispropylbutylamidine (B4), N,N-diisopropylpropamidine (C3), N,N,-disobutylbutylamidine (D3), had high inhibitory effect on the growth of *Botrytis cinerea*, with EC₅₀ ranging from 0.241 8 mg/L to 3.473 0 mg/L, higher than propamidine; the protective and therapeutical efficacy of B3, B4 and C3 on leaves of cucumber all higher than that of propamidine. 【Conclusion】B3 and B4 own more potent activity than propamidine and can be used to substitute propamidine.

Key words: propamidine; aromatic diamidino; *Botrytis cinerea*; Anti-bacterial activity

丙烷脒是一种新型杀菌剂,具有高效、低毒、作用机理独特等优点,对多种植物病原菌具有独特的预防和治疗作用^[1-6]。以丙烷脒为先导化合物,廉应江等^[3-5]合成了包括脒基成环、烷基取代、苯环取代

的35个化合物,对合成化合物抑菌活性的系统测定表明,脒基取代成咪唑啉环后活性显著降低,苯环脒基甲氧基取代后活性也未得到提高,仅异丙基取代化合物的活性提高,由此认为烷基取代后其生物活

* [收稿日期] 2007-01-25

[基金项目] 国家“十五”科技攻关重大专项(2002BA516A04);西北农林科技大学科研专项

[作者简介] 冯美杰(1982—),男,江西九江人,在读硕士,主要从事农药合成和生物农药研究。E-mail:fengmeijie1982@126.com

[通讯作者] 张 兴(1952—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事农药学研究。E-mail:zhxing1952@126.com

性可能有很大的提高。为了寻找具有更高杀菌活性的化合物,本研究以对氰基苯酚、1,3-二溴丙烷和1,4-二溴丁烷为原料合成了 8 个丙烷脒衍生物,并测定了其离体和活体的抑菌活性,现将研究结果报道如下。

1 合成试验

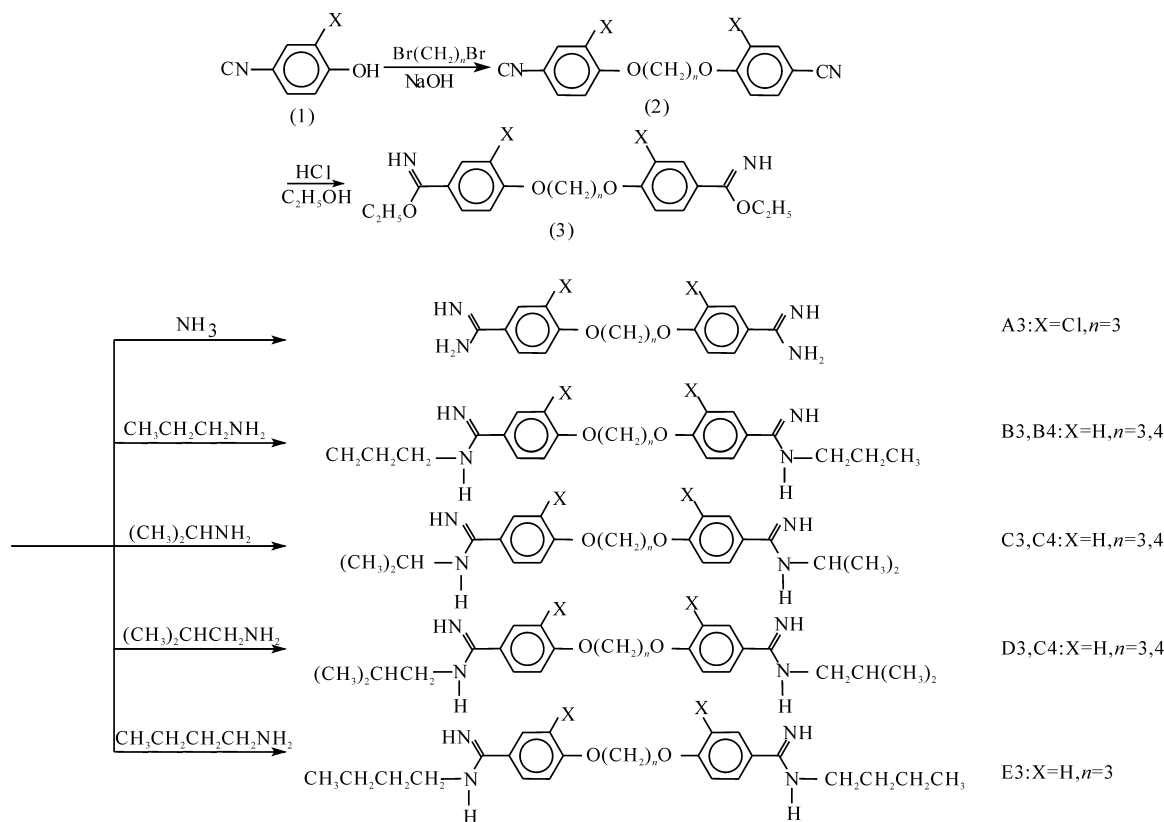
1.1 仪器与试剂

所用的主要仪器有 X-6 型数字熔点仪、FAB 快原子轰击质谱仪、Bruker AM-400 超导核磁共振仪

(以 CD_3OD 为溶剂, TMS 为内标);所用试剂有对氰基苯酚、1,3-二溴丙烷、1,4-二溴丁烷、正丙胺、异丙胺、正丁胺等,均为国产分析纯,另有进口试剂异丁胺。

1.2 N-烷基-4,4'-二脒基- α,ω 二苯氧基烷及 N-烷基衍生物的合成

目标化合物中, n 分别为 3~4 时, 对应化合物分别为 A3、B3、B4、C3、C4、D3、D4 和 E3。其合成路线如下:



1.2.1 中间体(1)4-羟基,3-氯基苯甲氰的合成

将 2.05 g (17 mmol) 氯酸钾溶于 100 mL 水中。向含 5.95 g 对氰基苯酚、200 mL 浓盐酸和 70 mL 水的混合液中滴加上述氯酸钾溶液, 室温搅拌 90 min。过滤沉淀, 经水重结晶, 得产物 7.06 g, 产率为 91.44% (文献[7]为 68%), 其熔点为 153~155 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 中间体(2)的制备 参考文献[8-9]的方法进行合成。

1.2.3 中间体(3)的制备 参考文献[8-9]的方法进行合成, 熔点及产率见表 1。

1.2.4 目标化合物的制备 在配有磁力搅拌、导气管、温度计和回流冷凝管的 500 mL 三口瓶中, 加入

10.0 g (0.025 mol) 中间体(2)和 100 mL 甲醇, 搅拌, 待固体溶解后, 冷却至 10 $^{\circ}\text{C}$ 以下, 通入 6.4 g (0.325 mol) 无水氨气, 并控制反应温度为 10~15 $^{\circ}\text{C}$ 。通气完毕后, 缓慢加热至室温, 保持温度在 25~30 $^{\circ}\text{C}$, 15 h 后, 缓慢加热回流 9 h, 反应完毕后, 常压蒸除溶剂, 将残余物用 100 mL 体积分数 25% 盐酸加热溶解, 趁热抽滤, 冷却至室温即可析出白色固体, 待固体析出完全后, 过滤, 干燥, 得白色固体粉末, 即 A^[5]。当将通入的氨气更换为滴加正丙胺、异丙胺、异丁胺和正丁胺时可合成其他目标化合物。所有目标化合物的物理常数及 MS 数据见表 2, $^1\text{H-NMR}$ 数据见表 3。

表 1 各中间体的熔点及产率

Table 1 Melting point and yield of intermediates

n	X	中间体(2) Intermediates (2)				中间体(3) Intermediates (3)			
		熔点/℃ m. p.		产率/% Yield		熔点/℃ m. p.		产率/% Yield	
		实际值 Actual value	文献值 ^[7] Document	实际值 Actual value	文献值 ^[7] Document	实际值 Actual value	文献值 ^[7] Document	实际值 Actual value	文献值 ^[7] Document
3	Cl	149~150	147~148	80.55	40	212~213	—	84.28	—
3	H	250~251	249~250	83.70	75	241~243	241~242	82.00	72
4	H	142~143	—	84.05	—	175~177	—	82.25	—

注:“—”表示无记录。

Note: “—”Mean no found.

表 2 各目标化合物的物理化学常数及其 MS 数据

Table 2 Physical and MS data analysis of target compounds

化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Mw	熔点/℃ m. p.	产率/% Yield	质谱数据 MS (Positive ion)
A3	C ₁₇ H ₁₈ O ₂ N ₄ Cl ₂	382	267~268	56.6	382.5(M)
B3	C ₂₃ H ₃₂ O ₂ N ₄	396	157~158	72.8	396.2(M), 397.2(M+1), 398.2(M+2)
B4	C ₂₄ H ₃₄ O ₂ N ₄	410	272~273	80.5	410.2(M), 411.3(M+1)
C3	C ₂₃ H ₃₂ O ₂ N ₄	396	197~198	60.7	396.2(M), 397(M+1)
C4	C ₂₄ H ₃₄ O ₂ N ₄	410	>300	73.4	410.2(M), 412.4(M+2)
D3	C ₂₄ H ₃₄ O ₂ N ₄	410	167~168	72.5	424.3(M+1),
D4	C ₂₅ H ₃₄ O ₂ N ₄	438	268~269	73.1	438.3(M), 439.1(M+1)
E3	C ₂₄ H ₃₄ O ₂ N ₄	424	197~198	73.4	424.3(M), 425.3(M+1)

表 3 各目标化合物的¹H-NMR 数据

Table 3 ¹H-NMR data of target compounds

化合物 Compound	¹ H-NMR, δ
A3	2.203(t, 2H, —CH ₂ —), 4.212~4.234(t, 4H, 2×—OCH ₂ —), 7.178~7.631(m, 6H, ArH), 9.324(s, 4H, 2×=NH), 9.372(s, 2H, 2×—NH ₂)
B3	1.033(t, 6H, 2×—CH ₃), 1.743~1.797(m, 4H, 2×—NH ₂ CH ₂ CH ₂ —), 2.309~2.340(m, 2H, —OCH ₂ CH ₂ —), 3.386~3.423(m, 4H, 2×—NH ₂ CH ₂ —), 4.281~4.312(t, 4H, 22×—OCH ₂ —), 7.132~7.734(m, 8H, ArH)
B4	1.035(t, 6H, 2×—CH ₃), 1.745~1.800(m, 4H, 2×—NH ₂ CH ₂ CH ₂ —), 2.016~2.022(t, 4H, 2×—OCH ₂ CH ₂ —), 3.386~3.423(m, 4H, 2×—NH ₂ CH ₂ —), 4.173(m, 4H, 2×—OCH ₂ —), 7.113~7.721(m, 8H, ArH)
C3	1.299~1.372(d, 12H, 4×—CH ₃), 2.160~2.336(m, 2H, —CH ₂ —), 3.301~3.344(m, 2H, 2×—CHCH ₃), 4.276~4.306(t, 4H, 2×—OCH ₂ —), 7.131~7.707(m, 8H, ArH)
C4	1.358~1.374(d, 12H, 4×—CH ₃), 2.014(m, 4H, 2×—OCH ₂ CH ₂ —), 3.986~4.018(m, 2H, 2×—CHCH ₃), 4.170(t, 4H, 2×—OCH ₂ —), 7.101~7.701(m, 8H, ArH), 9.208(s, 2H, 2×=NH), 9.228(s, 2H, 2×—NH)
D3	1.039~1.063(d, 12H, 4×—CH ₃), 2.086~2.104(m, 2H, 2×—CHCH ₃ —), 2.354~2.313(m, 2H, —CH ₂ CH ₂ O—), 3.247~3.309(m, 4H, 2×—NHCH ₂ —), 4.288~4.320(t, 4H, —OCH ₂ O—), 7.147~7.737(m, 8H, 2×ArH), 8.718(s, 2H, 2×=NH), 9.199(s, 2H, 2×—NH)
D4	1.040~1.057(d, 12H, 4×—CH ₃), 2.018~2.096(m, 6H, 2×—OCH ₂ CH ₂ —, 2×—CHCH ₃), 3.257~3.275(d, 4H, 2×—NHCH ₂ —), 4.175(t, 4H, ×—OCH ₂ —), 7.121~7.723(m, 8H, 2×ArH)2
E3	0.988~1.024(t, 6H, 2×—CH ₃), 1.451~1.526(m, 4H, ×—NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ —), 1.690~1.765(m, 4H, 2×—NHCH ₂ —), 2.310~2.341(t, 4H, 2×—OCH ₂ CH ₂ —), 3.417~3.453(t, 4H, 2×—NHCH ₂ —), 4.278~4.390(t, 4H, 2×—OCH ₂ —), 7.140~7.722(m, 8H, 2×ArH)

注: B3、B4、C3、D4、E3 5 个化合物的—NH—, =NH 峰较弱, 未观察到其对应的峰。

Note: The peaks about “—NH—”and “=NH”of B3、B4、C3、D4、E3 was weak, and not be given.

2 合成化合物的抑菌活性测定

2.1 材料与方法

2.1.1 供试材料 番茄灰霉病菌 (*Botrytis cirea-re*), 由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。黄瓜品种为津研 4 号。

2.1.2 生长速率法^[10-15] 用无菌水溶解药剂, 并配

制成 5 个浓度梯度备用。无菌条件下将药剂与培养基按 1 : 9 的比例加入 55~60 ℃ 的培养基中, 制成系列浓度的带毒培养基, 每处理重复 3 次, 用直径 4 mm 的打孔器从培养 3 d 的供试病菌边缘切取病菌, 用挑针将带有菌丝的一面接到带药培养基上, 27 ℃ 培养 3 d 后, 十字交叉法测量菌落直径 (mm), 计算抑菌率。用几率值法计算毒力回归式并求出

EC₅₀。

疗效果的计算公式为：

2.1.3 黄瓜真叶法^[2,12-14] 将药剂配制成 50 mg/L,以清水为空白对照。采摘叶龄相同的黄瓜真叶,洗净放于吸水纸上晾干。

治疗效果/%=(对照菌落直径增长量—处理菌落直径增长量)/对照菌落直径增长量×100%。

2.2 结果与分析

(1)保护作用。每叶喷雾 1 mL 药液,晾干后用接种针将直径为 4 mm 的 *B. cinerea* 菌饼接于叶子正面,每皿 1 片正面朝上放于培养皿中,然后于人工气候培养箱[L/D=10 h : 14 h,RH=95%,TL(光照条件下温度)=20 ℃,TD(黑暗时温度)=18 ℃]内培养,每处理 3 次重复。3 d 后测量保护效果。计算公式为：

合成化合物抑菌活性的生长速率法和黄瓜真叶法测定结果见表 4 和表 5。由表 4 可见,在 50 mg/L 剂量下,所有化合物对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)均有一定的抑菌活性,化合物 B3、B4、C3、D3 和丙烷脒的 EC₅₀ 分别为 0.304 3,1.680 7,2.875 1,3.473 0和 4.357 7 mg/L,其中 B3 的 EC₅₀ 明显低于母体化合物丙烷脒,B4、C3、D3 的 EC₅₀ 也均较丙烷脒低。化合物 A3、C4、D4、E3 的活性也均低于丙烷脒,但仍然具有一定的活性。由表 5 可见,所有化合物在 50 mg/L 剂量下,均对番茄灰霉病表现出一定的保护和治疗作用。其中 B3、B4、C3 的 3 d 保护效果分别为 81.13%,66.04%和 63.21%,显著高于丙烷脒(57.55%);B3、B4、C3 的治疗效果分别为 71.70%,68.87%和 58.92%,与丙烷脒(64.15%)相当。

菌落直径(mm)= 测量直径—4;

抑制率/%=(对照菌落生长直径—处理菌落生长直径)/对照菌落生长直径×100%。

(2)治疗作用。先于真叶上接种菌饼,放入人工培养箱中培养 1 d,测量各真叶上的菌落直径后施药,再置于培养箱中培养(培养条件及施药方法与保护作用相同)。3 d 后,测量各处理的菌落直径,治

表 4 供试化合物对番茄灰霉菌的毒力(生长速率法)

Table 4 Toxicity effect of target compounds against *Botrytis cinerea* (Growth rate method)

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	卡方值 Chi-square data	相关系数 Correlation coefficient
A3	Y=2.154 4+2.114 2X	22.179 6	0.649 8	0.944 5
B3	Y=5.508 1+0.983 3X	0.304 3	1.076 8	0.940 3
B4	Y=4.780 5+0.973 3X	1.680 7	0.216 8	0.960 5
C3	Y=4.380 5+1.350 7X	2.875 1	0.031 1	0.997 8
C4	Y=2.793 9+2.044 8X	11.991 2	0.339 7	0.983 0
D3	Y=4.377 9+1.150 6X	3.473 0	0.071 2	0.994 3
D4	Y=3.403 2+1.366 3X	14.745 8	1.719 7	0.890 3
E3	Y=2.701 4+2.225 1X	10.790 7	0.156 9	0.988 4
丙烷脒 Propamidine	Y=4.243 5+1.183 4X	4.357 7	0.144 2	0.988 0

表 5 供试化合物对番茄灰霉菌的保护和治疗作用(黄瓜真叶法,50 mg/L)

Table 5 Protective and therapy effectiveness of target compounds against *Botrytis cinerea* (On cucumber leaf,50 mg/L)

化合物 Compound	保护作用 Protective effectiveness		治疗作用 Therapy effectiveness	
	菌落直径增加量/mm Colony diameter	防效/% Control effective	菌落直径增加量/mm Diameter	防效/% Control effective
A3	13.3	37.26 ef	15.2	28.30 d
B3	4.0	81.13 a	6.0	71.70 a
B4	7.2	66.04 b	6.6	68.87 a
C3	7.8	63.21 b	8.7	58.92 b
C4	13.0	38.68 g	11.5	45.75 c
D3	10.7	49.53 d	11.7	44.81 c
D4	12.3	41.98 e	14.5	31.60 d
E3	13.7	35.38 fg	11.7	44.81 c
丙烷脒 Propamidine	9.0	57.55 c	7.6	64.15 ab
CK	21.2	—	21.2	—

注:(1)CK 为不加药剂的空白对照;(2)表中同列数据后标不同字母者表示方差分析(DMRT 法)在 0.05 水平上差异显著。

Note:(1)CK is treated with no compounds;(2)The same column followed by different letters indicate significant difference at 0.05 level (DMRT method).

3 讨 论

丙烷脒结构新颖,关于其结构与活性的关系前

期已作了大量研究,并得出一定的结论。陈安良^[1]对其衍生成和活性的研究认为,丙烷脒结构中n=3 或 4 时活性最佳。廉应江等^[3-6]研究认为,脒基成

环、苯环脒基甲氧基取代后活性明显降低,但脒基异丙基取代后活性得到了提高。

本研究合成了 8 个化合物,试验表明,脒基对位 C 取代后活性降低明显,脒基烷基取代具有很好的修饰潜力。以 $n=3$ 和 4 的正丙基取代丙烷脒,取代化合物的抑菌活性均高于母体。 $n=3$ 时,异丙基和正丁基取代丙烷脒的取代化合物,均具有与母体相当的活性;而 $n=4$ 时,各化合物均低于相应 $n=3$ 时的活性。脒基烷基取代化合物中, $n=3$ 和 4 的正丙基取代活性,均高于相应的异丙基取代。由此可以认为,对丙烷脒母体结构中可能存在 $n=3$ 的衍生物,其抑菌活性高于 $n=4$ 的衍生物,且直链烷基取代活性高于支链烷基取代活性。因此,有关丙烷脒衍生物抑菌活性的构效分析,还有待进一步研究。

B3、B4 较丙烷脒活性有较大提高,其合成工艺较丙烷脒简单,成本低,产率高,有望成为丙烷脒产品的更新品种,后期的大田药效试验将决定其市场开发的潜力。

[参考文献]

[1] 陈安良. 丙烷脒杀菌剂开发研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2004.
Chen A L. Research and development of the novel bioarational fungicide-propamidine[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2004. (in Chinese)

[2] 陈安良,廉应江,叶海洋,等. 丙烷脒防治番茄灰霉病效果初报[J]. 中国农学报,2005,21(11):301-303.
Chen A L, Lian Y J, Ye H Y, et al. The bioactivity of novel fungicide propamidine against *Botrytis cinerea*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(11): 301-303. (in Chinese)

[3] 廉应江,陈安良,冯俊涛,等. 芳香二脒类化合物合成及抑菌活性的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(7):45-48.
Lian Y J, Chen A L, Feng J T, et al. Synthesis and fungicidal activity of aromatic diamidines[J]. Jour of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For; Nat Sci Ed, 2005, 33(7): 45-48. (in Chinese)

[4] 廉应江. Pentamidine 类似物合成及其生物活性研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2005.
Lian Y J. Studies on bioactivity and quntitative strcture activity relationship(QSAR) of analogues of pentamidine[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest Sci-Tech Univ of Agriculture and Forestry, 2005. (in Chinese)

[5] 廉应江,陈安良,朱海云,等. 丙烷脒类似物抑菌活性研究初报[J]. 西北农业学报,2005,14(2):112-114.

Lian Y J, Chen A L, Zhu H Y, et al. Preliminary sudies on fungicidal activities of propamidine analogs in vitro[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis, 2005, 14(2): 112-114. (in Chinese)

[6] 陈安良,何 军,廉应江,等. 4 种戊烷脒同系物对灰霉病的防治效果[J]. 植物保护学报,2006,33(1):68-72.
Chen A L, He J, Lian Y J, et al. The fungicide activity of analogs of pentamidine against *Botrytis cinere*[J]. Acta Phytophy-lacica Sinica, 2006, 33(1): 68-72. (in Chinese)

[7] Thoms W, Leo A, Maureen B, et al. Orally active fibrinogen receptor antagonists amidoximes as prodrugs of amidines[J]. J Med Chem, 1996, 39: 3139-3147.

[8] Tidwell R R, Kilgore S G, Dieter J G, et al. Analogues of 1,5-Bis(4-amidinophenoxy)pentane in the trentment of experimen-tal *Pneumocystis carinii pneumonia* [J]. J Med Chem, 1990, 33: 1252-1257.

[9] Maurizio D P, Wiley A S, Christine C D, et al. Structure-in vitro activity relationships of pentamidine analogues and dication-substituted Bis-benzimidazoles as new antifungal agents[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, 42(10): 2459-2502.

[10] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京:中国农业出版社, 1994:71-85.
Mu L Y. Plant chemical protection research method[M]. Bei-jing, Chinese Agricultural Press, 1994: 71-85. (in Chinese)

[11] 陈春年. 农药生物技术测定[M]. 北京:北京农业大学出版社, 1991:161-162.
Chun C N. Pesticide bioassay[M]. Beijing: Beijing Agricul-tural University Press, 1991: 161-162. (in Chinese)

[12] 李树正,张素华,刘淑芬,等. 子叶法筛选蔬菜灰霉病杀菌剂的研究[J]. 华北农学报,1991,6(3):94-99.
Li S Z, Zhang S H, Liu S F, et al. Simple bioassay method of new fungicide against *Botrytis cinerea*-cucumber cotyledon method[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1991, 6(3): 94-99. (in Chinese)

[13] 张 穗. 杀菌剂生物测定技术[J]. 植物保护,1999,25(3):35-37.
Zhang S. Fungicidal bioassay technology[J]. Plant Protec-tion, 1999, 25(3): 35-37. (in Chinese)

[14] 张素华. 杀菌剂生物测定方法的研究[J]. 南开大学学报:自然科学版,2000,33(4):37-40.
Zhang S H. The study on fungicidal bioassay method[J]. Journal of Nankai University: Natural Science Edition, 2000, 33(4): 37-40. (in Chinese)

[15] 袁高庆,赖传雅,黎起秦. 杀菌剂生物测定技术的发展[J]. 广西农业生物科学,2001,20(3):211-214.
Yuan G Q, Lai Q Y, Li Q Q. Development on fungicidal bioas-sary method[J]. Journal of Guangxi Agricultural and Biologi-cal Science, 2001, 20(3): 211-214. (in Chinese)