

• 研究论文 •

乙酰水杨酸与杀菌剂的藕合物合成及生物活性

李俊凯^{1,2}, 徐汉虹^{* 1,2}, 谭堂峰², 朱建永²

(1. 长江大学 湖北省涝渍灾害与湿地农业重点实验室, 湖北 荆州 434025; 2. 华南农业大学 农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642)

摘要: 通过乙酰水杨酸 (ASA) 分别与噻菌灵、三唑醇和恶霉灵 3 种杀菌剂拼接, 合成了未见文献报道的 ASA-噻菌灵、ASA-三唑醇、ASA-恶霉灵的藕合物, 并以未藕合的 3 种杀菌剂为对照, 测定了 3 种藕合物对水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 的室内毒力; 以水杨酸 (SA) 为对照, 测定了 ASA-恶霉灵藕合物对大豆叶片过氧化物酶 (POD) 活性的影响。结果表明, 3 种杀菌剂与 ASA 藕合后, 杀菌毒力与藕合前的相当, 同时还具有类似 SA 诱导植物 POD 活性升高的特性。

关键词: 乙酰水杨酸; 杀菌剂; 藕合物; 生物活性

中图分类号: S482.27

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)02-0196-04

Synthesis and Biological Activities of the Conjugates of Acetylsalicylic Acid with Fungicide

LI Jun-kai^{1,2}, XU Han-hong^{* 1,2}, TAN Tang-feng², ZHU Jian-yong²

(1. Hubei Provincial Key Laboratory of Waterlogging Disaster and Wetland Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025 Hubei Province, China; 2. Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642 China)

Abstract The conjugates of acetylsalicylic acid (ASA) with thibendazole, triadimenol and hymexazol were synthesized. These conjugates had higher toxicities against *Rhizoctonia solani* than the initial fungicides. Comparison with SA, the ASA-hymexazol conjugate was applied to soybean foliages to evaluate whether the conjugate could induce the increase of the activity of peroxidase. The results showed the ASA-hymexazol conjugate had the similar inducing POD activity to SA in soybean foliages.

Key words ASA; fungicide; conjugates; bioactivity

水杨酸 (salicylic acid, SA) 普遍存在于植物体内, 具有独特的生理作用, 被认为是一种新的植物内源激素^[1]。其生理功能突出表现在诱导植物产生系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 过程中最主要的信号分子^[2], 并与植物的逆

境生理过程有重要的关系^[3,4]。研究已证明, SA 在植物抗病性的复杂系统中处于中心的地位。而 SA 诱导抗病性的同时, 与抗性相关的酶系统也发生了系列变化^[5]。何水林等^[6]的研究表明, 在 0.5 ~ 4 mmol/L 的浓度范围内, SA 处理辣椒叶片后,

收稿日期: 2008-01-10; 修回日期: 2008-04-28

作者简介: 李俊凯 (1969-), 男, 湖北人, 博士, 副教授, 研究方向为农药学, E-mail: junkai@sina.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 徐汉虹 (1961-), 男, 湖北人, 博士, 教授, 主要从事农药学及昆虫学研究, 联系电话: 020-8528512, E-mail: hhxu@scau.edu.cn

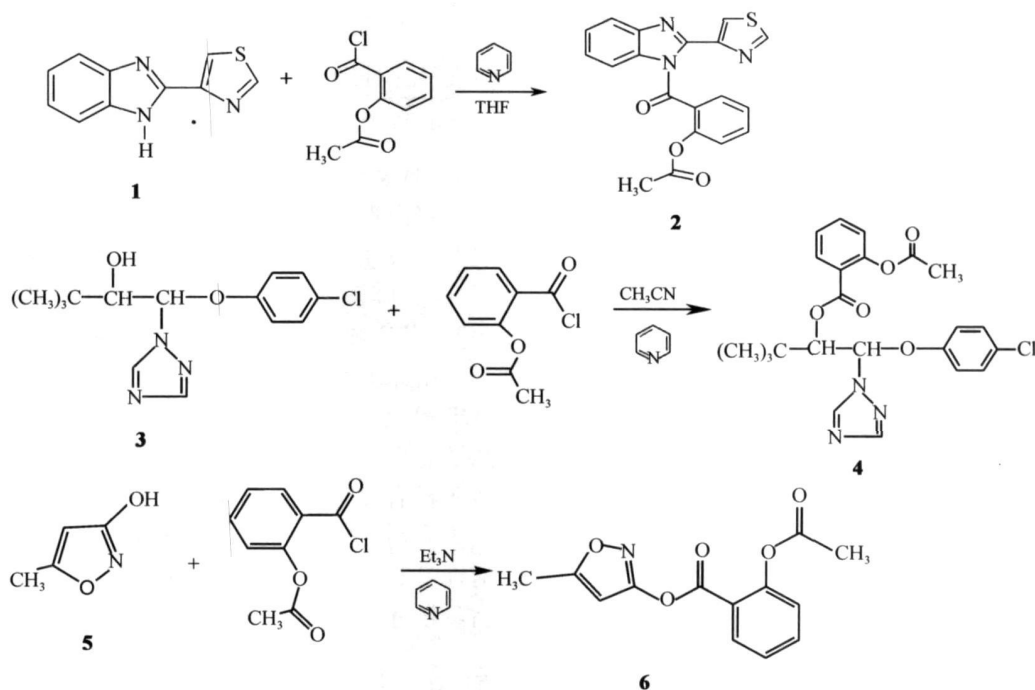
基金项目: 国家自然科学基金资助 (30671386); 教育部科学技术研究重点项目 (208091); 湖北省自然科学基金项目资助 (2007ABA137); 湖北省教育厅科技计划 (Q200712002)。

超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性较对照增高, 相应地, H_2O_2 浓度也升高。 H_2O_2 浓度的升高与 SA 对辣椒叶片抗氧化酶活性的综合影响有关。

外源 SA 与内源 SA 一样能诱导植物产生 SAR^[7], 而且在植物体内既能通过木质部向上传导, 又能通过韧皮部向下传导, 具有良好的双向传导功能。也有研究表明, 外源 SA 处理植物后能进入输导系统, 且以向下输导为主^[8]。除 SA 外, SA 的部分衍生物, 如乙酰水杨酸 (ASA), 也表现出类似的生物活性, 并能在植物体内传导^[9]。若使能

诱导植物产生 SAR 的化合物与杀菌剂进行化学键合, 得到的新化合物可能保留着二者本身的活性, 这一过程被称为“藕合”, 即: 两种物质结合生成一种新物质, 该物质可能同时保持着原反应物各自固有的特性, 是一个能产生多个作用位点的联合体, 该新物质被称为藕合物 (conjugate)^[10]。笔者拟将 ASA 与杀菌剂噻菌灵、三唑醇、恶霉灵进行藕合, 以期获得既能保持原有的杀菌活性, 又具有诱导植物产生抗性的藕合物。

三种藕合物 (2, 4, 6) 的合成路线如下:



1 材料与方法

1.1 供试材料及仪器

1.1.1 供试植物及病原菌 5~6 叶期大豆植株, 盆栽网室栽培, 常规管理。水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 由华南农业大学植物病理系提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 97% 噻菌灵 (thiabendazole) 原粉, 由珠海真绿色技术有限公司提供; 90% 恶霉灵 (hymexazol) 原粉, 由江苏省银邦化工有限公司提供, 经无水乙醇重结晶后使用; 97% 三唑醇 (triadimenol) 原粉, 由江苏省建湖农药公司提供。其他试剂均为分析纯。

Elementar Vario 元素分析仪; Bruker 500 型核磁共振仪; ESI-MS/HPLC 联用仪; WRR 熔点测

定仪。

1.2 试验方法

1.2.1 藕合物的合成

1.2.1.1 ASA-噻菌灵藕合物 (2) 的合成 在 50 mL 三颈瓶中加入 2.00 g (0.01 mol) 噻菌灵 (1) 原粉、25 mL 的四氢呋喃和 1.00 g (0.012 mol) 吡啶, 在冰浴中滴加 2.00 g (0.01 mol) 乙酰水杨酰氯的四氢呋喃溶液, 回流反应 16 h。反应体系脱溶后将其溶于二氯甲烷中, 依次用饱和碳酸氢钠水溶液、0.1 mol/L 的盐酸溶液洗涤, 水洗至中性, 有机层用无水硫酸钠干燥, 脱溶。以硅胶柱层析纯化 (石油醚和乙酸乙酯, 梯度洗脱), 得目标产物 (1-(2-乙酰氧基) 苯甲酰基-2-(噻唑-4-基)-1H-苯并咪唑) (2) 2.54 g 收率 70%, 熔点 203.0~205.2℃。

1.2.1.2 ASA-三唑醇藕合物 (4) 的合成 称取 3.01 g (0.01 mol) 三唑醇 (3) 原粉, 以 15 mL 无水乙腈为溶剂, 1.00 g (0.012 mol) 吡啶作缚酸剂, 在冰浴中缓慢滴加 2.00 g (0.01 mol) 乙酰水杨酰氯的无水乙腈溶液, 缓慢升温至室温, 回流反应 12 h 左右。蒸干溶剂, 剩余物溶于 50 mL 二氯甲烷中, 按 1.2.1.1 节方法进行柱层析纯化, 得白色固体 (2-乙酰氧基苯甲酸-[1-(4-氯苯氧基)-1-(1H-1,2,4-三唑-1-基)]-3,3-二甲基]-2-丁酯) (4) 3.24 g 收率 71%, 熔点 96.3~99.0℃。

1.2.1.3 ASA-噁霉灵藕合物 (6) 的合成 称取 2.00 g (0.02 mol) 噁霉灵 (5) 原粉溶于 10 mL 二氯甲烷中, 加入 2.02 g (0.02 mol) 三乙胺。在冰

浴中滴加 4.00 g (0.02 mol) 乙酰水杨酰氯的二氯甲烷溶液, 滴毕后回流反应 3 h。加入 50 mL 二氯甲烷, 按 1.2.1.1 节方法进行柱层析纯化, 得白色固体 (5-甲基-3-(2-乙酰氧基) 苯甲酰氧基异噁唑) (6) 4.23 g。收率 81%, 熔点 40.6~41.9℃。

1.2.2 室内毒力测定 采取菌丝生长速率法^[11], 在室内分别测定 3 种藕合物抑制水稻纹枯病菌的活性, 药液浓度分别为 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 mg/L。每处理重复 3 次, 取平均值。同时以 3 种杀菌剂的原粉为对照, 按式 (1) 计算药液对菌丝生长的抑制率, 并计算每种药剂对水稻纹枯病菌的 EC₅₀ 值。

$$\text{菌丝生长抑制率}(\%) = \frac{\text{空白对照菌丝生长的直径} - \text{处理组菌丝生长的直径}}{\text{空白对照组菌丝生长的直径} - \text{接种菌块的直径}} \times 100 \quad (1)$$

1.2.3 植物 POD 活性的测定 准确称取藕合物 ASA-噁霉灵用少量乙醇溶解, 加少量吐温-80 后用水稀释至浓度为 50 mg/L, 涂抹在大豆叶片的两面, 分别于 24, 48 和 72 h 后取处理过的大豆叶片, 按周远明等^[12]的方法测定大豆叶片中 POD 活性, 平行 3 次测定。以相同物质的量浓度的 SA 溶液和噁霉灵溶液处理为药剂对照, 以清水为空白对照。

2 结果与分析

2.1 化合物的鉴定

目标化合物元素分析数据、核磁共振氢谱和质谱数据见表 1。

2.2 抑菌活性

室内毒力测定结果 (表 2) 显示, 噁菌灵和噁霉灵与 ASA 藕合后, 其对水稻纹枯病菌的毒力增强了, 而三唑醇与 ASA 藕合前后毒力相当。

2.3 藕合物对植物 POD 活性的影响

结果 (表 3) 表明, 藕合物处理大豆叶片后 POD 活性在所试验的 72 h 内均比 SA 处理的叶片酶活有所提高, 单独用噁霉灵处理的结果和清水对照没有显著差异。说明 ASA 与噁霉灵藕合后仍然具有与 SA 相同的效应, 即能使大豆叶片的 POD 活性升高, ASA 与杀菌剂藕合后仍然保持着诱导植物抗性的潜在可能性。

表 1 藕合物的核磁共振及质谱数据
Table 1 The data of the elemental analysis, ¹H NMR and the ESI-MS of the conjugates

藕合物 Conjugates	元素分析 Elemental analysis (Calcd %)			¹ H NMR, δ(400 MHz, CDCl ₃)	ESI-MS, m/z
	C	H	N		
2	62.84 (63.31)	4.50 (4.52)	10.89 (11.07)	1.90 (s, 3H, CH ₃), 7.00-8.52 (m, 10H, 2C ₆ H ₄ , 2H-thiazol)	759 [2M + H] ⁺ , 402 [M + Na] ⁺ , 380 [M + H] ⁺ , 217 [M - C ₉ H ₇ O ₃] ⁺
4	63.01 (63.31)	5.21 (5.28)	8.95 (9.18)	0.99 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 2.08 (s, 3H, CH ₃), 5.15 (d, J = 5.0 Hz, 1H, CH-tert-butyl), 5.36 (d, J = 5.0 Hz, 1H, CH-triazol), 6.32~7.92 (m, 8H, 2C ₆ H ₄), 7.97 (s, 1H, H-triazol1C5), 8.23 (s, 1H, H-triazol1C3)	915 [2M + H] ⁺ , 480 [M + Na] ⁺ , 458 [M + H] ⁺ , 295 [M - C ₉ H ₇ O ₃]
6	59.86 (59.77)	4.19 (4.24)	5.33 (5.36)	2.37 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.45 (s, 3H, CH ₃ -isoxazol), 6.23 (s, 1H, CH, H-isoxazol), 7.18~8.22 (m, 4H, C ₆ H ₄)	545 [2M + Na] ⁺ , 523 [2M + H] ⁺ , 284 [M + Na] ⁺ , 262 [M + H] ⁺ , 163 [M - C ₄ H ₄ NO ₂] ⁺

表 2 藕合物的杀菌活性

Table 2 The fungicidal activities of the ASA-fungicides conjugates (n = 3)

化合物 Compounds	毒力曲线方程 Toxicity regressive equation	相关系数 Correlation coefficient	EC ₅₀ ±SE /(mg/L)	95% 置信限 95% CL
1	y = 5 735 6+ 2 631 3x	0 923 3	0 53±0. 03	0. 47~ 0. 59
2	y = 6 071 1+ 2 814 6x	0 986 6	0 42±0. 02	0. 37~ 0. 47
3	y = 4 641 9+ 1. 735 4x	0 971 6	1 71±0. 15	1. 34~ 1. 93
4	y = 4 383 7+ 1. 731 2x	0 993 2	2 27±0. 19	1. 93~ 2. 67
5	y = 3 500 6+ 0. 937 3x	0 961 4	39 78±6. 32	29. 14~ 54. 13
6	y = 3 295 1+ 1. 135 4x	0 967 4	31 74±3. 89	24. 96~ 40. 37

表 3 ASA-恶霉灵藕合物处理大豆叶片后不同时间的 POD 活性

Table 3 The activities of the POD in soybean foliages treated with the ASA-hymexazol conjugates in different time/(U · g⁻¹ · min⁻¹) (n = 3)

化合物 Compounds	处理时间 Treatment time /h		
	72	24	48
6	18. 56 ±0. 57 a*	23. 50±0. 94 a	27. 11 ±1. 36 a
水杨酸 Salicylic acid(SA)	15. 47 ±1. 32 b	21. 65±2. 01 ab	23. 41 ±1. 87 a
5	13. 21 ±0. 07 c	20. 84±1. 06 b	20. 67 ±1. 72 b
对照 CK	13. 05 ±0. 24 c	21. 54±1. 24 b	19. 53 ±1. 30b

* 表中纵列数据后字母相同者表示在 5% 水平上差异不显著 (DMRT)。
* The data followed with the same letters in the column were not significantly different at the level of 5% (DMRT).

3 结论

本研究结果表明,噻菌灵、三唑醇和恶霉灵分别与 ASA 藕合后,其对水稻纹枯病菌的毒力均有所增强;将藕合物 ASA-恶霉灵施用于大豆叶片后,对叶片中过氧化物酶活性均比 SA 单独处理的叶片酶活有所提高,意味着它仍具有诱导植物产生抗性的活性。

由于杀菌剂与 ASA 藕合后毒力更强,且诱导植物产生抗病和抗逆性,这为合成新型植物“保护诱抗剂”提供了新的研究思路。而这种藕合物是否具有水杨酸那样在植物韧皮部传导性将作深入研究。

参考文献:

[1] RASKIN I Role of Salicylic Acid in Plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Mol Biol 1992, 43: 439-463
[2] CHARLES EM, ALLISON G P. Release of Invasive Plants from Fungal and Viral Pathogens [J]. Nature, 2003, 421: 625-627
[3] ZENG Qing-ping(曾庆平), GUO Yong(郭勇). 植物细胞对环境胁迫的适应性应答 I : 水杨酸对大蒜培养细胞中超氧化物歧化酶的增效诱导 [J]. Chinese J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报), 1999, 5(2): 152-155.
[4] LI Guo-jing(李国婧), ZHOU X ie(周燮). 水杨酸与植物抗非生物胁迫 [J]. Chinese Bulletin of Botany (植物学通报), 2001, 18(3): 295-302

[5] LIU Feng-quan(刘凤权), WANG Jin-sheng(王金生). 水杨酸对水稻防卫反应酶系的系统诱导 [J]. Plant Physiology Communications(植物生理学通讯), 2002, 38(2): 121-123
[6] HE Shui-lin(何水林), LIN Wen-xiong(林文雄), CHEN Ru-kai(陈如凯). 外源水杨酸对辣椒倍半萜环化酶基因表达及抗氧化酶系的作用 [J]. Chinese J Appl Ecol (应用生态学报), 2002, 13(5): 569-572
[7] XU Jian-ming(徐建明), ZHU Yun-lin(朱云林), WANG Wei-zhong(王伟中), et al 外源诱导植物获得抗病性的研究进展 [J]. Jiangsu Agric Sci (江苏农业科学), 2001, (4): 7-10
[8] WANG Li-jun(王利军), YU Feng-yi(于风义). 高温胁迫对¹⁴C-水杨酸在葡萄苗中运转分配的影响 [J]. Acta Phytophysiologica Sinica(植物生理学报), 2001, 27(2): 129-134
[9] LOPEZ-DELGADO H, DAT J F, FOYER C H, et al. Induction of Thermotolerance in Potato Microplants by Acetylsalicylic Acid and H₂O₂ [J]. J Exp Bot, 1998, 49: 713-720
[10] LIU Bo(刘波), ZHU Yu-jing(朱育菁), SENGONCA C, et al 害虫抗药性治理策略——多位点杀虫毒素的研究 [J]. Pesticides(农药), 2004, 43(11): 492-496.
[11] CHEN Nian-chun(陈年春). Pesticide Bioassay Technology(农药生物测定技术) [M]. Beijing(北京): Beijing Agricultural University Press(北京农业大学出版社), 1991: 180-245.
[12] ZHOU Yuan-ming(周远明), ZHANG Yuan-yuan(张媛媛), LIU Jun-hong(刘均洪). 利用苯胺检测过氧化物酶活力的方法 [J]. J Qingdao Univ SciTech (青岛科技大学学报), 2003, 24(5): 401-404

(Ed JN SH)