

УДК 661.162

ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ И АУКСИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ 4-ГЕТАРИЛФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ

Н.М. ЕВДОКИМОВ, П.Ю. УГЛИНСКИЙ, С.М. ЕВДОКИМОВА,
Н.П. КАРСУНКИНА, И.В. МАГЕДОВ

(Кафедра органической химии,
кафедра сельскохозяйственной биотехнологии)

Основываясь на том, что замещенные феноксиуксусные кислоты (в т. ч. гербициды 2,4-Д; 2М,4Х) обладают сильным ауксиновым эффектом, нами синтезирован ряд новых 4-гетарилфеноксиуксусных кислот. Биологические испытания показали, что некоторые соединения проявляют сильное ауксиновое действие. Так, соединение (I) по активности превосходит ИМК, а полевой опыт на моркови показал, что применение раствора (I) при предпосевном замачивании семян вызывает прирост урожая корнеплодов, превышающий полученный при применении препарата КАРВИТОЛ*.

Природные гормоны и их синтетические аналоги в последнее время заняли прочное и даже центральное место в биотехнологических исследованиях и некоторых других отраслях с.-х. производства. Различные культуры, биотехнологические методики и производственные технологии требуют применения разнообразных природных или синтетических регуляторов роста растений [1, 2] для повышения урожайности, улучшения приживаемости, получения регенераций и т.д. Как правило, в большинство питательных сред наряду с гормонами входят фунгициды и противобактериальные соединения для подавления возможной инфекции. Но соединений, сочетающих в себе ауксиновую, фунгицидную или антибактериальную активности, практически нет.

В связи с этим поиск новых соединений, сочетающих в себе как росторегулирующую, так и противобактериальную или фунгицидную активности, представляется актуальным. Исходя из этого, нами были проведены синтез и биологические испытания новых производных феноксиуксусных кислот, содержащих в четвертом по-

ложении разнообразные гетероциклы, включая кумарины и пиримидины, производные которых проявляют противобактериальную и фунгицидную активности [3, 4, 5].

Методы и материалы

В современных условиях синтез индивидуальных соединений или комбинаторных библиотек без предварительной проверки биодоступности и возможной биологической активности неэффективен [6, 7].

Поэтому вначале нами было проведено компьютерное моделирование молекулярных характеристик различных 4-гетарилфеноксиуксусных кислот с помощью комплекта программ, имеющихся на сайте: www.bioserv.rpbs.jussieu.fr. На основании полученных данных были отобраны структуры, наиболее соответствующие «правилу четырех» — критериям биодоступности, предложенным Тайсом [8] для первичного скрининга агрохимикатов (табл. 1).

4-Гетарилфеноксиуксусные кислоты (I-IV) были получены по разработанным нами методикам [10], в основе которых заложен принцип мультикомпо-

Основные физические характеристики соединений

Физические свойства	По Тайсу	(I)	(II)	(III)	(IV)
Молекулярный вес	<500	390,35	383,36	463,52	340,34
LogP октанол	<5	2,22	0,09	0,78	-0,33
Доноров водородных связей	<3	2	4	2	2
Акцепторов водородных связей	<12	8	9	9	8

нентного синтеза (рисунок). Использованный подход базируется на реакциях: Кневенегеля — конденсация альдегида (1) с метиленактивными реагентами (2, 4); и Михаэля — присоединения по нуклеофильному центру гетероциклов (3, 5, 6, 7) с последующей гетероциклизацией в конечные продукты (I—IV).

Приборы и реагенты. 41 ЯМР спектры сняты на приборе Bruker WP-400SY (400 МГц) с DMSO-d₆ в качестве растворителя. Все исходные реагенты 1 — 7 были приобретены у компании ACROS и использовались без очистки.

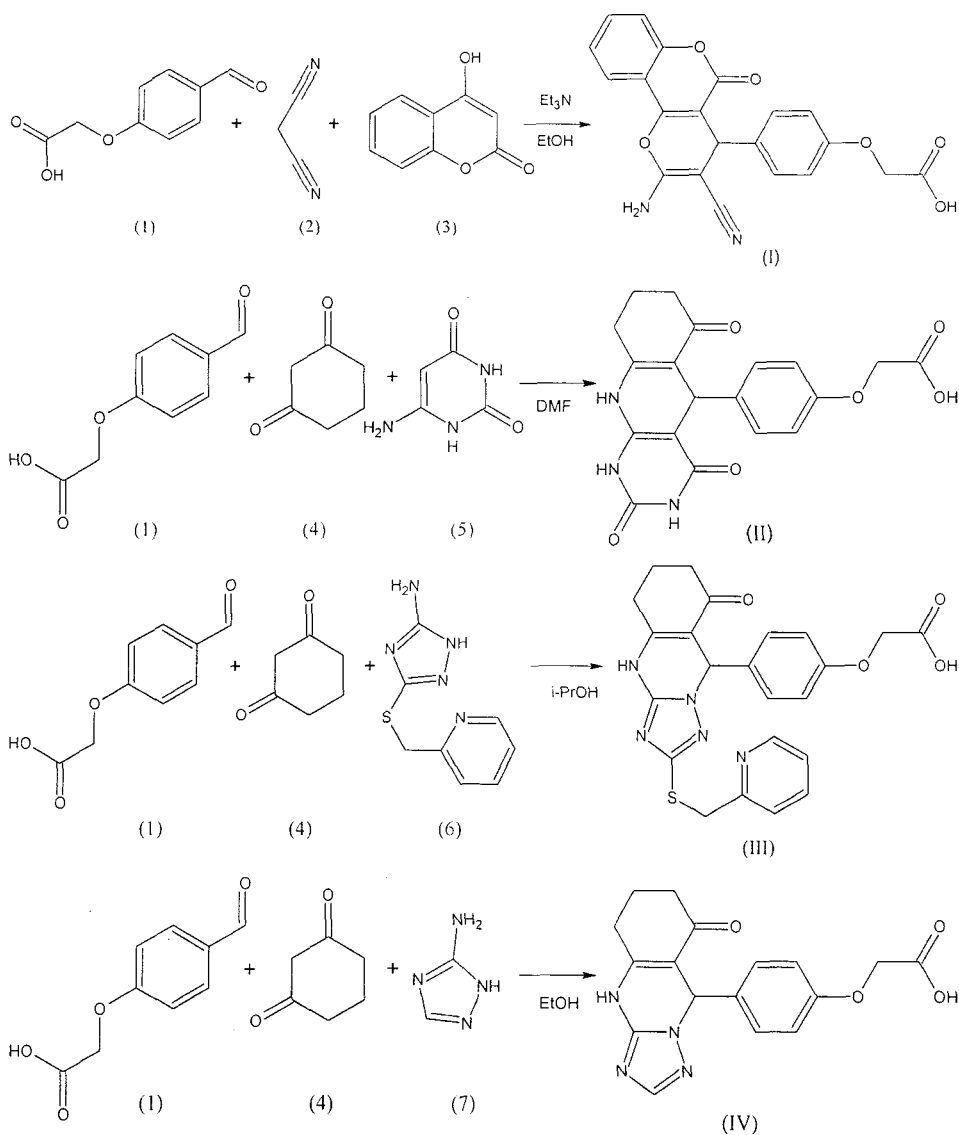
Синтез 2-[4-(2-амино-3-циано-5-оксо-4Н,5Н-пирано [3,2-с] хромен-4-ил) фенокси] уксусной кислоты (I). К раствору 1,428 ммоль (0,25 г) 2-(4-формилфенокси) уксусной кислоты (1) (рисунок) и 1,428 ммоль (0,09 г) малонитрила (2) в 3 мл этилового спирта добавляют 1,428 ммоль (0,23 г) 4-гидроксикумарина (3), нагревают до полного растворения реагентов, прикапывают 1 каплю триэтиламина и кипятят с обратным холодильником 10 мин. Затем охлаждают до комнатной температуры и фильтруют выпавший осадок, промывают его 2 мл этанола. Получают 0,344 г (62%) соединения I с $T_{пл} = 189-19^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H ЯМР (DMSO-d}_6)$ 5 4,41 (с, 1H), 4,61 (т, 2H), 6,85 (д, $J = 8,77$ Гц, 2H), 7,23 (уш, 2H), 7,44 (д, $J = 8,04$ Гц, 1H), 7,48 (д, $J = 7,68$ Гц, $J = 7,31$ Гц, 1H), 7,71 (т, $J = 8,04$ Гц, $J = 7,31$ Гц, 1H), 7,91 (дд, $J = 7,68$ Гц, $J = 1,46$ Гц, 1H).

Синтез 2-[4-(2,4,6-триоксо-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидропиримидо [4,5-б] хинолин-5-ил) фенокси] уксусной кислоты (II). Смесь 1,428 ммоль (0,25 г) 2-(4-формилфенокси) уксус-

ной кислоты (1) (рисунок), 1,428 ммоль (0,16 г) циклогександиона-1,3 (4) и 1,428 ммоль (0,18 г) аминоурацила (5) кипятят в 3 мл ДМФА в течение 1 ч. Затем добавляют 3~4 мл воды, выпавший осадок фильтруют и промывают 5 мл этанола. Получают 0,42 г (76%) соединения II с $T_{пл} = 273-275^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H ЯМР (DMSO-d}_6)$ 5 1,86 (м, 2H), 2,22 (м, 2H), 2,56 (м, 2H), 4,53 (с, 2H), 4,75 (с, 1H), 6,71 (д, $J = 8,77$ Гц, 2H), 7,10 (д, $J = 8,77$ Гц, 2H), 8,90 (уш, 2H), 10,56 (уш, 1H).

Синтез 2-(4-{8-оксо-2-[(2-пиридинилметил) сульфанил]-4,5,6,7,8,9-гексагидро [1,2,4] триазоло [5,1-б] хиназолин-9-ил} фенокси) уксусная кислота (III). Смесь 1,428 ммоль (0,25 г) 2-(4-формилфенокси) уксусной кислоты (1), 1,428 ммоль (0,16 г) циклогександиона-1,3 (4) и 1,428 ммоль (0,29 г) сульфанилзамещенного-5-амино-1,2,4-триазола (6) (рисунок) кипятят в 4 мл изопропанола до выпадения осадка, после чего охлаждают до комнатной температуры и фильтруют осадок, промывают 3 мл изопропанола. Получают 0,407 г (61%) соединения III с $T_{пл} = 260-262^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H ЯМР (DMSO-d}_6)$ 5 1,95 (м, 2H), 2,26 (м, 2H), 2,65 (м, 2H), 4,26 (д, $J = 13,52$ Гц, 1H), 4,35 (д, $J = 13,52$ Гц, 1H), 4,61 (т, 2H), 6,12 (с, 1H), 6,81 (д, $J = 8,77$ Гц, 2H), 7,11 (д, $J = 8,77$ Гц, 2H), 7,21 (т, $J = 7,31$ Гц, $J = 5,12$ Гц, 1H), 7,29 (д, $J = 7,68$ Гц, 1H), 7,61 (т, $J = 7,68$ Гц, $J = 7,31$ Гц, 1H), 8,44 (д, $J = 5,12$ Гц, 1H), 11,0 (уш, 1H).

Синтез 2-[4-(8-оксо-2-4,5,6,7,8,9-гексагидро [1,2,4] триазоло [5,1-б] хиназолин-9-ил) фенокси] уксусная кислота (IV). Смесь 1,428 ммоль (0,25 г) 2-(4-формилфенокси) уксусной кисло-



Схемы синтезов соединений I—IV

ты (1), 1,428 ммоль (0,16 г) циклогександиона-1,3 (4) и 1,428 ммоль (0,12 г) 5-амино-1,2,4-триазола (7) кипятят в течение 3 ч в 4 мл этанола, после чего охлаждают и фильтруют выпавший осадок. Получают 0,25 г (52%) соединения IV с $T_{пл} = 305-307^{\circ}\text{C}$. ^1H ЯМР (DMSO-d_6) 5 1,96 (м, 2H), 2,26 (м, 2H), 2,66 (м, 2H), 4,59 (т, 2H), 6,18 (с, 1H), 6,79 (д, $J = 8,77$ Гц, 2H), 7,11 (д, $J =$

$= 8,77$ Гц, 2H), 7,63 (с, 1H), 10,95 (уш, 1H).

Для биологических исследований использовалась методика, предложенная Полевым и Чирковой [9] для проверки ауксиновой активности соединений на этилированных проростках пшеницы. Об активности соединений судили по увеличению длины и наличию изгиба 5 мм тест-проростков, с помощью срав-

нения с вариантами: замачивание проростков в дистиллированной воде (контроль) и в $1 \cdot 10^{-7}$ М растворе 3-индолмасляной кислоты (эталон).

В предварительных испытаниях использовали растворы соединений в концентрациях: $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^7$ М при 2-кратной повторности. В расширенных испытаниях использовали растворы соединения (I) в концентрациях: $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^7$ М тоже в 2-кратной повторности.

Полевой опыт был заложен на Овощной опытной станции имени В.И. Эдельштейна. В качестве объекта использовали семена моркови сорта Нантская 4. Опыт состоял из 5 вариантов (с контрольным и эталонным) при 3-кратной

повторности и был заложен 19.05, а завершен 22.09.2006. По каждому варианту брали 100 всхожих семян моркови и замачивали на 1 ч в 50 мл раствора испытуемого соединения (I), эталонном и в дистиллированной воде. Соединение (I) испытывали в концентрациях $1 \cdot 10^5$ М, $1 \cdot 10^6$ М, $1 \cdot 10^7$ М. В качестве эталона использовали раствор препарата Карвитолк в концентрации 0,1 мл/л ($1,4 \cdot 10^{-7}$ М). Длина деленки 1 м, защитка — 0,1 м.

Результаты и их обсуждение

Общие предварительные испытания синтезированных соединений дали результаты, приведенные в табл. 2.

Таблица 2

Длина этиолированных проростков пшеницы при замачивании их в растворах испытуемых соединений

Концентрация, М	Средняя длина проростков, мм					
	(I)	(II)	(III)	(IV)	ИМК ($1 \cdot 10^{-7}$ М)	контроль (H ₂ O)
$1 \cdot 10^3$	6,66	7,65	8,32	7,38		
$1 \cdot 10^5$	9,72	10,08	10,13	8,73	8,70	6,31
$1 \cdot 10^7$	10,0	8,15	9,01	8,62		

НСР₀₅ (эталон) 1,28;

НСР₀₅ (контроль) 1,84.

Из кратких сведений об изменении длины можно сделать заключение, что соединение (IV) не проявило сильного ауксинового эффекта, не превысив показатели ИМК. Вещества (II) и (III) показали сходные результаты: в концентрации $1 \cdot 10^3$ М они имеют результат, сопоставимый с эталоном (ИМК $1 \cdot 10^{-7}$ М); в $1 \cdot 10^5$ М превосходят его; а в $1 \cdot 10^7$ М снова наблюдается падение активности. Соединение (I) имеет наилучшие показатели влияния на растяжение растительных клеток. Во-первых, в концентрации $1 \cdot 10^3$ М оно не влияет на растяжение клеток, а показывает цитотоксическое действие (об этом судили по некротическому побурению мест среза проростков). Во-вторых, активность растворов увеличивалась при уменьшении их концентрации, а типичный ауксиновый из-

гиб проростков был наибольшим при $1 \cdot 10^{-7}$ М.

Далее были проведены расширенные испытания растворов соединения (I) на ауксиновую активность по методике, аналогичной предварительной, данные приведены в табл. 3.

Таблица 3

Изменение длины проростков пшеницы сорта Иволга при действии растворов соединения (I)

Концентрация, М	Средняя длина проростков, мм		
	(I)	эталон (ИМК $1 \cdot 10^{-7}$ М)	контроль (H ₂ O)
$1 \cdot 10^3$	6,71		
$1 \cdot 10^4$	7,1		
$1 \cdot 10^5$	9,76	8,93	6,49
$1 \cdot 10^6$	10,22		
$1 \cdot 10^7$	10,56		

НСР₀₅ (эталон) 1,43;

НСР₀₅ (контроль) 2,07.

В концентрации $1 \cdot 10^{13}$ М соединение (I) не проявляет ауксинового эффекта, так как показатель растяжения проростков на уровне контрольного варианта, а небольшое потемнение проростков, возможно, говорит о цитотоксическом действии при этой концентрации.

В концентрации $1 \cdot 10^{14}$ М побурения проростков не наблюдалось — все проростки выглядят как в контрольном варианте. Эту концентрацию мы приняли за максимальную нецитотоксическую. Однако ауксинового действия она не оказывает — практически нет изгиба проростков в месте контакта с раствором, а ненамного больший показатель средней длины в сравнении с контролем находится в пределах ошибки выборки.

При начальной концентрации $1 \cdot 10^{15}$ М соединение начинает оказывать ауксиновый эффект на проростки, о чем свидетельствует изгиб растительного материала в месте контакта с раствором, к тому же превышение показателя длины контрольного варианта достоверно.

Концентрация $1 \cdot 10^{16}$ М вызвала еще более сильное растяжение клеток проростков, чем предыдущая, но превышение эталонного варианта не достоверно — разность между выборочными средними в пределах НСР₀₃.

Раствор соединения (I) в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М показал наилучший результат: проростки очень сильно изогнулись, места срезов имеют белый

цвет (в отличие от других концентраций с побуревшими срезами), их измеренная длина достоверно больше эталонного варианта (ИМК) при 95%-м уровне значимости.

После проведения ряда лабораторных исследований нами был заложен полевой опыт на моркови, целью которого было изучение влияния на продуктивность растений предпосевного замачивания семян моркови в растворах соединения (I) различных концентраций. Кроме учета основных элементов структуры урожая был сделан биохимический анализ корнеплодов (табл. 4, 5).

По средней массе корнеплодов, убранных с делянки, можно судить как о приживаемости на начальных этапах развития растений, так и об интенсивности роста и накопления пластических веществ в течение вегетации. В нашем опыте с наилучшей стороны себя показал вариант замачивания семян перед посадкой в $1 \cdot 10^{17}$ М растворе соединения (I) — он превзошел контрольный и стандартный варианты. Хотя в лабораторных испытаниях соединение (I) в концентрациях $1 \cdot 10^{15}$ М и $1 \cdot 10^{16}$ М оказывало ауксиновое действие, в полевом опыте это не подтвердилось. Варианты обработки семян этими концентрациями дали наименьший урожай корнеплодов, что свидетельствует о проявлении ингибирующего действия на развитие растений.

По содержанию сухих веществ урожай, полученный из семян моркови,

Т а б л и ц а 4

Послеуборочные данные о структуре урожая моркови при предпосевном замачивании семян

Вариант	Масса корнеплодов с делянки, кг	Отношение ботва / корни	Среднее число листьев, шт.	Длина наибольшего листа, см	Длина / толщина корнеплода, см (в среднем)
$1 \cdot 10^{-5}$	1,31	0,36	10,1	49,7	15,7 / 2,8
$1 \cdot 10^{-6}$	1,34	0,48	13,5	53,6	14,1 / 3,1
$1 \cdot 10^{-7}$	2,30	0,41	15,2	56,7	16,7 / 3,6
Карвитол (стандарт)	1,73	0,50	13,5	50,0	16,0 / 3,2
Вода (контроль)	1,84	0,32	13,4	52,6	16,0 / 3,3

НСР₀₅ (по урожайности) = 0,39.

Таблица 5

Результаты биохимического
исследования корнеплодов

Вариант	Сухие вещест- ва, %	Раство- римые сухие вещест- ва, %	β-ка- ротин, мг%	Нитра- ты, мг/кг
$1 \cdot 10^{-5}$	12,08	8,60	16,0	116,7
$1 \cdot 10^{-6}$	10,46	7,65	22,60	96,42
$1 \cdot 10^{-7}$	15,36	9,90	20,0	101,2
Карвитол	13,61	9,45	13,60	83,05
Вода	11,50	7,15	12,80	94,57

обработанных $1 \cdot 10^{-7}$ М раствором (I), имел самые высокие показатели в опыте, превышающие результаты варианта с обработкой семян карвитолом (стандартный). Все другие варианты имели низкие показатели накопления сухого вещества.

Такой важный показатель для моркови, как содержание β-каротина также имел высокое значение в варианте $1 \cdot 10^{-7}$, который только немного уступил варианту $1 \cdot 10^{-6}$. Корнеплоды, убранные с делянок других вариантов, содержали намного меньше β-каротина. На накопление нитратного азота влияние практически не оказывалось: содержание не увеличилось и находилось в пределах нормы.

Заключение

Проведенные исследования показали, что введение гетероцикла в четвертое положение феноксиуксусной кислоты позволяет получить ее производное, обладающее росторегулирующим действием. Полученные данные свидетельствуют о том, что из ряда синтезированных

нами 4-гетарилзамещенных феноксиуксусных кислот соединение (I) проявило типичный ауксиновый эффект (в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М его активность превысила активность ИМК в той же концентрации). Применение раствора соединения (I) в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М для предпосевного замачивания семян моркови позволяет получить увеличенные урожаи корнеплодов в среднем на 20%, а также повысить его качественные показатели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шевелуха В.С., Калашикова Е.А., Дегтярев С.В. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. Учеб. / Под ред. В.С. Шевелухи. М.: Высшая школа, 1998. — 2. Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы. Т. I / Под ред. В.С. Шевелухи. М.: Воскресенье, 2000. — 3. Kotharkar S.A., Shinde D.B. // Bioorg & Med. Chem. Lett, 2006. 16. 6181-6184. — 4. Amjad Ali et al. // J. Med. Chem, 2003. 46. 1824-1830. — 5. Chengxin Zhi et al. // J. Med. Chem., 2003. 46. 2731-2739. 6. Clarke E.D., Delaney J.S. // Chimia, 2003. 57. 731-734. — 7. Teague S.J. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl, 1999. 38. 3743-3748. — 8. Tice M. // Pest Manag. Sci., 2001. 57. 3-16. — 9. Практикум по росту и устойчивости растений. Учеб. пос. / В.В. Полевой, Т.В. Чиркова, Д.А. Лутов и др. / Под ред. В.В. Полевого, Т.В. Чирковой. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2001. — 10. Угличский П.Ю., Магедов И.В. Тезисы докладов. Международная Конференция по химии гетероциклических соединений, посвященная 90-летию со дня рождения проф. А.Н. Коста. Россия, Москва, 17-21 октября 2005 г. С. 230, 231.

SUMMARY

Based on the strong auxin effect of substituted phenoxyacetic acids (include herbicides 2,4-D and 2M,4C), some novel 4-hetarylphenoxyacetic acids were synthesized. The bioassay tested showed that some of the compounds exhibited high activity as an auxin. Especially, compound (I) showed high auxin effect (outdo 3-indolylbutyric acid). Using solution of (I) improved productivity of carrot in the field experiment more than to use solution of CARVITOLA