

Л. М. Юсупова<sup>1</sup>, С. Ю. Гармонов<sup>1</sup>, И. М. Захаров<sup>1</sup>, А. Р. Быков<sup>1</sup>,  
И. Ф. Фаляхов<sup>1</sup>, Т. В. Гарипов<sup>2</sup>

## ФУНГИЦИДНЫЕ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗАМЕЩЕННЫХ НИТРОБЕНЗОФУРОКСАНОВ

<sup>1</sup> Казанский государственный технологический университет,

<sup>2</sup> Казанская государственная академия ветеринарной медицины

Изучена фунгицидная активность 5-нитро-4,6-дихлорбензофуороксана, 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуороксана, а также смесей на их основе. Установлены основные токсикологические свойства биологически активных функционально замещенных нитробензофуороксанов.

Хлорнитропроизводные бензофуороксанов и их физические смеси запатентованы и достаточно широко используются как антибактериальные, противогрибковые и акарицидные средства [1 – 8].

В проведенных ранее исследованиях [9] изучалась способность ряда производных бензодифуразанов и 4,5-фуороксанбензофуороксанов задерживать рост бактерий, грибов и простейших.

Целью настоящей работы являлось определение фунгицидных и токсикологических свойств 5-нитро-4,6-дихлорбензофуороксана, 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуороксана, а также их смесей.

### Методы исследования

Объектами исследований являются 5-нитро-4,6-дихлорбензофуороксан (I), 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуороксан (II) и смеси на их основе, схемы синтеза и физико-химические свойства которых описаны ранее [2]. Смеси I и II могут быть получены как механическим смешением индивидуальных компонентов в необходимом соотношении, так и синтетическим путем [3]. Были использованы полиядерные соединения бензофуороксанового ряда, полученные под руководством Юсуповой Л. М. путем взаимодействия 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуороксана с соответствующими ароматическими аминами [10].

Фунгицидную активность изучаемых веществ отдельно и в виде различных смесей определяли методом торможения роста мицелия (при экспозиции 3 – 5 сут), в качестве тест-объектов были использованы чистые культуры грибов *Aspergillus niger* ВКМФ-1119, которые, благодаря высокому уровню мутаций, являются наиболее устойчивыми среди грибов плесневения и дереворазрушающий гриб *Caniophora cerebella*. Эффективность рассчитывали по формуле Эббота [11].

Токсичность при введении в желудок смеси изучали на белых крысах массой 170 – 200 г. Соединения I, II и их смесь в соотношении 30:70 % по массе вводили в виде водных суспензий с суммарной концентрацией действующих веществ от 0,25 до 5%. Животным контрольной группы вводили раствор стабилизатора. Наблюдение за состоянием животных проводили в течение 14 дней. Определяли максимально переносимую дозу (МПД); дозу, вызывающую гибель 50% животных (ЛД<sub>50</sub>) и абсолютно смертельную дозу (ЛД<sub>100</sub>). ЛД<sub>50</sub>, доверительные границы вычисляли по методу Литчфилда и Уилкоксона [12].

Токсичность при нанесении на кожу исследовали на белых крысах массой 120 – 160 г, используя водные суспензии смеси I и II в соотношении 30:70 % по массе с

концентрацией 0,25 – 1,0%. Животным первой группы суспензии наносили ежедневно на наружную поверхность ушной раковины, второй – на предварительно выстриженный участок кожи размером 2 × 2 см. Животным контрольных групп наносили дистиллированную воду со стабилизатором. Обработку крыс проводили в течение 10 дней [13].

При исследовании местного действия суспензии инстиллировали однократно в конъюнктивальный мешок кролика в количестве 1 – 2 капель в течение 7 дней.

**Изучение кожно-резорбтивного действия.** Реакцию организма крыс на смесь I и II в соотношении 30:70 % по массе изучали путем часовой экспозиции хвоста в пробирках с суспензиями при температуре 28 °С. Хвосты контрольных животных помещали в пробирки с водой и стабилизатором. О кожно-резорбтивном действии судили по наблюдению за физиологическим состоянием крыс в течение 14 дней [13].

Кумулятивные свойства изучали на белых крысах массой 120 – 160 г с использованием теста субхронической токсичности. Смесь I и II (30:70 % по массе) в дозе ЛД<sub>50</sub> наносили кожно животным опытной группы первые 4 дня. Затем каждые последующие 4 дня дозу повышали в 1,5 раза. Длительность опыта составляла 24 ± 4 дня. К концу опыта доза составила 8,5 ЛД<sub>50</sub>. Результаты исследования оценивали по отношению к средним эффективным дозам острого и подострого действия [13].

**Аллергенные свойства.** Исследование сенсибилизирующих свойств проводили на белых крысах массой 120 – 160 г и кроликах массой 2,0 – 2,5 кг. Перед опытом оценивали первично-раздражающее действие. У животных предварительно выстригали волосы на участке спины размером 2 × 2 см у крыс, 5 × 5 – у кроликов. Подопытных крыс делили в разных количествах на 8 групп. Первым 3 группам наносили и втирали однократно соответственно 0,25, 0,5 и 1% суспензии смеси I и II (30:70 % по массе) в течение 15 дней, другим 3 группам – двукратно в день в течение того же времени. Всего животным на один и тот же участок кожи наносили 10 – 30 аппликаций. Контрольным группам по той же схеме наносили дистиллированную воду со стабилизатором.

Подопытным кроликам выстригали 2 участка кожи с двух сторон от позвоночного столба и наносили скарификатором царапины. На одну сторону наносили суспензии исследуемых веществ, на другую – 0,01% раствор гистамина гидрохлорида. Наблюдение за состоянием кожи животных проводили через 30 мин, 24, 48 и 72 ч.

Мутагенную активность исходной смеси оценивали при помощи теста Эймса. Метаболические превращения

проводили в слое полужидкого агара, куда вместе с тест-культурой (*Sal. typhimurium*) вносили микросомную фракцию, полученную из клеток печени крыс, предварительно обработанных индукторами монооксигеназ смешанных фракций [12].

Растворы исследуемой смеси готовили в диметилсульфоксиде в стандартных концентрациях (1, 10, 100, 1000 и 10000 мкг/мл).

В пробирку с 3 мл мясного 0,6 % мясопептонного агара вносили 0,1 мл бактериальной суспензии определенного разведения и такое же количество раствора веществ в исследуемой концентрации. Полученный раствор настилали на 2 % питательный агар в чашке Петри. В негативный контроль вместо смеси добавляли 0,1 мл растворителя. После 24 ч термостатирования при 37 °С подсчитывали число колоний в опыте и контроле, “процент выживания” или степень токсичности вещества вычисляли как отношение числа колоний в опыте и контроле.

Для оценки мутагенности препарата в полуобогатенный 0,6 % верхний агар вносили 0,1 мл бактериальной суспензии, 0,1 мл раствора исследуемых веществ, либо растворителя (негативный контроль), 0,5 мл микросомальной активирующей смеси, содержащей кофакторы или дистиллированную воду (при оценке мутагенной активности метаболитов). Полученную смесь настилали на нижний селективный агар. После полного застывания агара проводили термостатирование при 37 °С.

В качестве позитивного контроля использовали препараты, для которых показан мутагенный эффект в анало-

гичных модификациях опыта: нитрозометилмочевину, нитрозогуанидин, циклофосфан и аминифлуорен.

### Результаты и их обсуждение

Установлено, что 5-нитро-4,6-дихлорбензофуросан в индивидуальном виде проявляет большую активность в отношении грибов *Aspergillus niger* и менее эффективен в случае, когда тест-объектом является *Coniophora cerebella*, тогда как для 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуросана характерна обратная зависимость (табл. 1). Изучение фунгицидной активности смесей показало, что концентрации, при которых наблюдается эффективное подавление роста в отношении тест-объектов, в целом ниже, чем у индивидуальных компонентов.

Исследования по определению токсичности при внутреннем введении, при нанесении на кожу, кожно-резорбтивного действия, кумулятивных и аллергенных свойств были проведены для смеси 5-нитро-4,6-дихлорбензофуросана и 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуросана в соотношении 30:70 % по массе.

При внутреннем введении ЛД<sub>50</sub> для индивидуальных соединений I и II составила 600 мг/кг и 300 – 350 мг/кг соответственно, токсичность смеси I и II в соотношении 30:70 % по массе – 450 мг/кг.

Проведенные исследования показали, что однократное нанесение на кожу подопытных животных указанной смеси в дозах 500, 1000, 2500 и 5000 мг/кг не вызывает гибели животных.

В целом, данные токсикологических исследований позволяют отнести изучаемую смесь к третьему классу умеренно опасных веществ при внутреннем введении и к четвертому классу малоопасных веществ при наружном применении [14].

Результаты по изучению кожно-резорбтивного действия показали, что исследуемая смесь в концентрациях 0,25, 0,5 и 1 % не оказывает токсического действия на состояние животных.

В опытах по определению кумулятивных свойств смеси не удалось вызвать гибели ни одной крысы, хотя каждое животное получило суммарную дозу 3813 мг/кг массы тела.

Изучение аллергенных свойств смеси показало отсутствие контактного дерматита у крыс при нанесении исследуемых веществ в концентрациях 0,25 – 1 % в течение опыта. В опытах по определению аллергенной реакции кроликов в ответ на 0,25 – 0,5 % концентрации смеси не наблюдалась реакция. После аппликации 1 % концентрации через 24 ч появляется незначительное уплотнение по ходу царапины, которое исчезает на вторые сутки.

На предварительном этапе определения мутагенности выявили, что исследуемая смесь в концентрациях 100 и 1000 мкг/чаш полностью подавляла рост тесторных бактерий, поэтому для дальнейших исследований в тесте Эймса были использованы следующие диапазоны концентраций: 0,1; 1; 10 мкг/чаш.

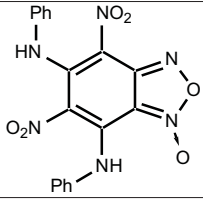
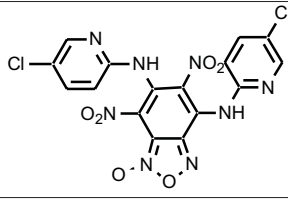
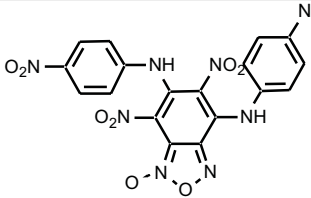
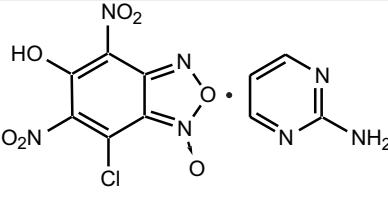
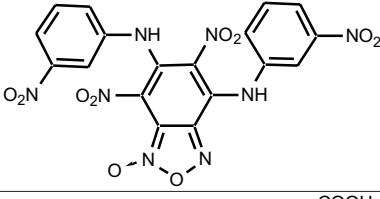
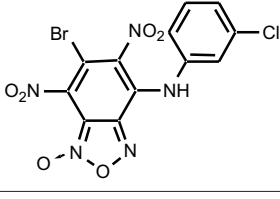
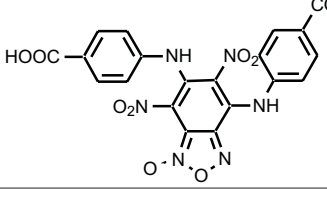
Оказалось, смесь является промутагеном – проявляет слабый мутагенный эффект в присутствии ферментов микросомной фракции млекопитающих, тогда как без метаболической активации при данных концентрациях исследуемые вещества не обладают мутагенной активностью.

Таким образом, смесь 5-нитро-4,6-дихлорбензофуросана и 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуросана в соотношении 30:70 % по массе в исследованных концентраци-

Таблица 1  
Фунгицидная активность смесей 5-нитро-4,6-дихлорбензофуросана (I) и 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуросана (II)

Тест-объект	Соотношение компонентов в смеси, %		Концентрация состава (J <sub>50</sub> , %), вызывающая 50 % ингибирование роста мицелия грибов	
	I	II	Индивидуальные компоненты	Смеси
<i>Aspergillus niger</i>	100	0	0,0013	–
	90	10		0,0002
	80	20		0,0005
	70	30		0,0007
	60	40		0,0007
	50	50		0,00064
	40	60		0,0056
	30	70		0,0012
	20	80		0,0013
	10	90		0,0015
<i>Conifora cerebella</i>	0	100	0,05	–
	100	0	0,0126	–
	90	10		0,0017
	80	20		0,0014
	70	30		0,0013
	60	40		0,00056
	50	50		0,0006
	40	60		0,00064
	30	70		0,00058
	20	80		0,00058
10	90		0,00062	
0	100	0,001	–	

Зависимость фунгицидной активности от структуры полиядерных бензофуороксанов (тест-объекты *Aspergillus niger*)

Структура	Концентрация*, %	Структура	Концентрация*, %
	0,5		0,0005
	> 0,1		0,1
	0,05		0,05
	0,1		

\* предельная концентрация, ниже которой не наблюдается подавление роста тест-объекта

ях и дозах не обладала раздражающим, аллергизирующим, кожно-резорбтивным и кумулятивным действием.

Продолжением данного исследования явилось изучение ряда конденсированных бензофуороксанов, обладающих потенциальной фунгицидной активностью. В качестве нуклеофильного агента использовались ароматические амины, а именно, анилин, *m*- и *p*-нитроанилин, *m*-хлоранилин, *p*-аминобензойная кислота и 2-амино-4-хлорпиридин.

Данные фунгицидной активности полученных полиядерных бензофуороксанов представлены в табл. 2. Из таблицы видно, что фунгицидная активность зависит от структуры замещающего ароматического амина. Активность 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуороксана и 4,6-динитро-5,7-дибромбензофуороксана уменьшается при замене галогена на ариламиновое ядро, свободное от заместителей. Исходная активность сохраняется при замещении аминами, в ядро которых введен атом галогена. Введение нитро- и карбоксигрупп в *para*-положение относительно центра замещения вызывает уменьшение фунгицидной активности.

Всё вышеперечисленное обуславливает перспективность поиска новых биологически активных препаратов среди конденсированных бензофуороксанов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Л. И. Хмельницкий, С. С. Новиков, Т. И. Годовикова, *Химия фуороксанов. Реакции и применение*, 2-е изд., перераб., Наука, Москва (1996), сс. 373 – 379.
- Патент РФ 2032678; *Бюл. изобрет.*, № 10 (1995).
- Патент РФ 2051913; *Бюл. изобрет.*, № 1 (1996).
- Патент РФ 2058141; *Бюл. изобрет.*, № 11 (1996).
- Патент РФ 2067863; *Бюл. изобрет.*, № 29 (1996).
- Патент РФ 2076803; *Бюл. изобрет.*, № 10 (1997).
- Патент РФ 2169564; *Бюл. изобрет.*, № 5 (2001).
- Р. Г. Каримова, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Казань (2003).
- Ф. С. Левинсон, М. И. Евгеньев, Е. А. Ермолаева и др., *Хим.-фарм. журн.*, 37(10), 12 – 15 (2003).
- Патент РФ 2255935; *Бюл. изобрет.*, № 5 (2005).
- Дж. Хорсфолл, *Фунгициды и их действие*, ИЛ, Москва (1948).
- М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Ленинград (1963).
- О. Г. Алексеев, Н. И. Шумская, *Методы определения токсичности и опасности химических веществ*, Медицина, Москва (1970).
- ГОСТ 12.1.007–76; *Вредные вещества. Классификация и требования безопасности*.

Поступила 05.04.05

## FUNGICIDAL AND TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF FUNCTIONALLY SUBSTITUTED NITROBENZOFUROXANES

L. M. Yusupova<sup>1</sup>, S. Yu. Garmonov<sup>1</sup>, I. M. Zakharov<sup>1</sup>, A. R. Bykov<sup>1</sup>, I. F. Falyakhov<sup>1</sup>, and T. V. Garipov<sup>2</sup><sup>1</sup> Kazan State Technological University, Kazan, Tatarstan, Russia;<sup>2</sup> Kazan state academy of veterinary medicine, Kazan, Tatarstan, Russia;

Fungicidal activity of 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxane, 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxane, and related compositions has been studied. The basic toxicological properties of biologically active functionally substituted nitrobenzofuroxanes are established.