



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101616880 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 05

(21) 申请号 200780047571. 9

(22) 申请日 2007. 12. 20

(30) 优先权数据

06127041. 9 2006. 12. 22 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 06. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2007/064370 2007. 12. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02008/077897 EN 2008. 07. 03

(73) 专利权人 贸易公司股份公司

地址 西班牙马德里

(72) 发明人 M·A·斯埃拉 M·勾梅斯-嘉耶侯

R·埃斯古德罗 J·J·卢塞娜

S·加西亚-马可

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 张敏

(51) Int. Cl.

C07C 229/36 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2005095305 A1, 2005. 10. 13, 全文.

Xinhua Li. Stepwise, metal-assisted

decarboxylation promoted by

manganese: reactivity relationship between

manganese and vanadium. 《Inorg. Chem》. 1989,

第 28 卷 (第 18 期), 第 3403-3410 页.

Vincent Pecoraro. Stepwise

metal-assisted oxidative decarboxylation of

vanadium(V) ethylenebis ((o-hydroxyphenyl)

glycine). isolation of a possible

intermediate. 《J. Am. Chem. Soc》. 1984, 第 106

卷 (第 11 期), 3360-3362.

审查员 王大为

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 2 页

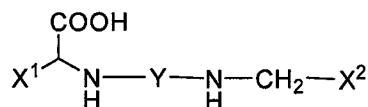
(54) 发明名称

治疗铁缺绿病的新产品

(57) 摘要

本发明包括用于铁缺绿病治疗的新产品的合成。这些产品可能已经改善了现有已知治疗剂的相关特性。所述新产品是非对称的乙烯二氨基羟基苯基乙酸衍生物, 仅具有五个能够螯合金属的配位点。

1. 式 (I) 化合物：



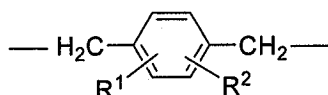
(I)

其中

X^1 为在 α 位具有羟基的 C_6 或 C_{10} 芳族体系, 任选地被最多四个取代基取代, 所述取代基独立地选自: 磷酸基、磺基、卤代基、羧基、乙酰氧基、 C_1 - C_4 烷基、直线型或支化的 C_1 - C_4 烷基,

X^2 为在 α 位具有羟基的 C_6 或 C_{10} 芳族体系, 或者在 α 位具有杂原子的五元或六元杂环, 所述杂原子选自 N、O 和 S, 任选地在它们的结构中包含其它 N、O 或 S 原子, 并且具有 0-3 个双键, 所述芳族、或杂环体系任选地被最多四个取代基取代, 所述取代基独立地选自: 磷酸基、磺基、卤代基、羧基、乙酰氧基、 C_1 - C_4 烷基、直线型或支化的 C_1 - C_4 烷基,

Y 为 $(\text{CH}_2)_n$ 或下式的亚苯二甲基基团：



n 为选自 2、3 和 4 的整数,

R^1 、 R^2 独立地选自 H、直线型或支化的 C_1 - C_4 烷基、 C_6 或 C_{10} 芳基。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 X^2 选自 2-羟基苯基、2-羟基-萘基、2-呋喃基、2-噻吩基、2-吡咯基、2-吡啶基、4-嘧啶基、2-吡嗪基, 上述基团任选地被 2 个或 1 个取代基取代, 所述取代基独立地选自磷酸基、磺基、卤代基、 C_1 - C_4 烷基、羧基、乙酰氧基、直线型或支化的 C_1 - C_4 烷基。

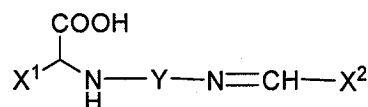
3. 根据权利要求 2 的化合物, 其中 X^1 为 2-羟基苯基或 2-羟基萘基, 任选地被 1 或 2 个独立选自甲基或甲氧基的取代基取代。

4. 根据权利要求 3 的化合物, 其中 X^1 为 2-羟基苯基。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任意一项的化合物, 其中 Y 为 $(\text{CH}_2)_n$ 。

6. 根据权利要求 5 的化合物, 其中 n 为 2。

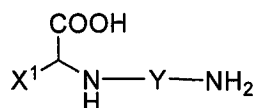
7. 制备如权利要求 1 至 6 中所定义的式 (I) 化合物的方法, 该方法包括在适合的溶剂系统中, 在还原剂存在下还原式 (II) 化合物的步骤：



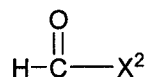
(II)

其中 X^1 、 X^2 和 Y 如权利要求 1 至 6 中所定义。

8. 根据权利要求 7 的方法, 进一步地预先包括通过在适合的溶剂系统中使式 (III) 化合物与式 (IV) 化合物反应制备所述的式 (II) 化合物的步骤：



(III)



(IV)

其中 X^1 、 X^2 和 Y 如权利要求 7 中所定义。

9. 如权利要求 1 至 6 所定义的式 (I) 化合物作为多价金属的络合物形成试剂的用途。

10. 权利要求 1 至 6 中任意一项所定义的式 (I) 化合物与一种或多种多价金属的螯合物。

11. 根据权利要求 10 的螯合物,其中所述的多价金属是至少一种选自铁、镍、锌、锰、镱、钆、铜、钇、铂和金的多元金属。

12. 根据权利要求 11 的螯合物,其中所述的多价金属为铁。

13. 包含如权利要求 1 至 6 中任意一项所定义的式 (I) 化合物或其多元金属螯合物的农业化学组合物。

14. 根据权利要求 13 的农业化学组合物,进一步地包含选自乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、N, N' - 亚乙基 - 二 (2- 羟基苯基) 甘氨酸 (o, o-EDDHA) 和 N, N' - 亚乙基 - (2- 羟基苯基) - 甘氨酸 - (4- 羟基苯基) 甘氨酸 (o, p-EDDHA) 的螯合剂。

15. 如权利要求 1 至 6 所定义的化合物或其多元金属螯合物在制备用于治疗缺铁症相关植物病害的组合物中的用途。

16. 根据权利要求 15 的用途,其中所述病害为铁缺绿病。

治疗铁缺绿病的新产品

发明领域

[0001] 本发明涉及新的非对称的亚乙基二氨基羟基苯基 (hidroxyphenyl) 乙酸衍生物。这些产品具有治疗铁缺绿病 (ironchlorosis) 的用途。

背景技术

[0002] 铁缺绿病是营养性的植物失调病症,其导致叶绿素含量的降低并导致正常绿色植物组织黄化或白化。它是农业中的普遍问题,影响许多作物的发育,引起减产。

[0003] 长久以来已经尝试通过将铁以可吸收形式,最初为铁盐形式供给植物来治疗该缺铁症状。铁盐在某种程度上通过叶部渗透起作用,但是当用于土壤处理时基本上是无效的。在防治缺绿病中,最有效的是铁渗透穿过根部。在这方面,简单的铁盐已经被铁螯合物所替代,所述铁螯合物是包含与称为螯合物或配位剂 (co-ordinates) 的单个有机分子的几个位点连接的铁原子的水溶性络合物。这些产品其中一些被称为六齿络合物,例如铁与乙二胺四乙酸 (EDTA) 或与二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA) 或与 N, N' - 亚乙基 - 二 (羟基苯基) 甘氨酸 (EDDHA) 的络合物,已经成功地用于对抗缺绿病。

[0004] N, N' - 亚乙基 - 二 (2- 羟基苯基) 甘氨酸 (o, o-EDDHA) 经常被描述为最有利于络合金属的化合物之一,并且因为对铁的络合亲和性特别强而最适于用作植物养分或肥料。o, o-EDDHA 的铁螯合物显示 6 的配位数,并且广泛地作为植物养分或植物肥料被用于农业化学目的,以及在作物植物中用于治疗缺绿病。

[0005] N, N' - 亚乙基 - (2- 羟基苯基) - 甘氨酸 - (4- 羟基苯基) 甘氨酸 (o, p-EDDHA) 也是本领域中已知的。与 o, o-EDDHA 相反,在 o, p-EDDHA 异构体中其中一个羟基在苯环的对位。因此, o, p-EDDHA 的铁螯合物显示 5 的配位数,并且其对铁的络合亲和性弱于 o, o-EDDHA。该化合物通常已经被认为是由 o, o-EDDHA 的制造方法产生的不希望的副产品。

[0006] Gómez-Gallego 等 (c. f. Chem. Eur. J. 2005, 11, 5997-6005) 为了说明由于铁螯合物还原酶引起的 Fe(III)-o, o-EDDHA 的还原提出了模型。根据该模型,所述螯合物的还原没有发生在八面体封闭型的络合物上,其中 o, o-EDDHA 的 6 个螯合点与 Fe(III) 配位,而是发生在根际的酸性 pH 形成的六配位开放型络合物上。如所述报告的方案 5 中所示,其中一个邻位羟基不会与 Fe(III) 配位,从而产生了将会被水分子填充的空位配位点。Fe(III)-o, p-EDDHA 络合物,其中一个羟基在对位上,应该已经处于希望的开放形式,并且能够直接地通过酶来还原。

[0007] W02005/095305 公开了包含 (o, o-EDDHA) 和 (o, p-EDDHA) 二者的同分异构混合物,其中 (o, p-EDDHA) 与 (o, o-EDDHA) 的摩尔比高于 0.8 : 1,作为农作物植物的养分并且在上述植物中作为治疗缺绿病的药剂。

[0008] 发明概述

[0009] 目前被用来治疗缺铁症相关的植物病害 (例如铁缺绿病) 的市售螯合剂,例如那些基于 EDDHA 的螯合剂以及它们已知的衍生物,它们的特性仍然并不完全地令人满意。例如,已经注意到目前基于 o, o-EDDHA 的缺绿病治疗剂在植物中表现出延迟的效应。

WO2005/095305 提出通过使用如上所述的 o,o-EDDHA 和 o,p-EDDHA 的同分异构混合物解决该问题。然而, o, p-EDDHA/Fe³⁺ 与 o, o-EDDHA/Fe³⁺ 相比表现出较低的稳定性 (Yunta 等人 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51, 5391-5399), 因此它在土壤中相当具有反应性。

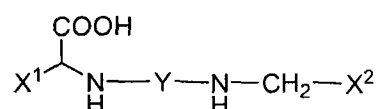
[0010] 在 Lucena, J. J. Iron Fertilizers in Correcting Iron Deficiencies in Plants. Chapter 5, In Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganism 2006, pp 103-127, Springer-Verlag Academic Publishers 中描述了对铁缺绿病的治疗有用的化合物所希望的特性。

[0011] 本发明所要解决的问题是提供对缺铁症相关植物病害的治疗有用的替代产品。相对于目前已知的治疗剂来说, 这些产品可具有改善的特性。

[0012] 解决方法是基于以下事实: 本发明已经确定, 通过除去 EDDHA 的一个羧基并且维持或调整羟基苯基, 保持了对多价金属, 特别是对铁的螯合亲和性, 与此同时可改善一些其它特性, 特别是那些使其对铁缺绿病的治疗有用的特性。进一步的描述参见本文的产品实施例 1-7。

[0013] 因此, 本发明的第一个方面涉及式 (I) 化合物:

[0014]



(I)

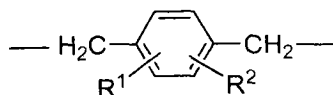
[0015] 其中

[0016] X¹ 为在 α 位具有羟基的 C₆ 或 C₁₀ 芳族体系, 任选地被最多四个取代基取代, 所述取代基独立地选自: 磷酸基、磺基、卤代基、羧基、乙酰氧基、C₁-C₄ 烷氧基或者直线型或支化的 C₁-C₄ 烷基。

[0017] X² 为在 α 位具有羟基的 C₆ 或 C₁₀ 芳族体系, 或者在 α 位具有杂原子的五元或六元杂环, 所述杂原子选自 N、O 和 S, 任选地在它们的结构中包含其它 N、O 或 S 原子, 并且具有 0-3 个双键, 所述芳族、或杂环体系任选地被最多四个取代基取代, 所述取代基独立地选自: 磷酸基、磺基、卤代基、羧基、乙酰氧基、C₁-C₄ 烷氧基、直线型或支化的 C₁-C₄ 烷基。

[0018] Y 为 (CH₂)_n 或下式的亚苯二甲基基团:

[0019]

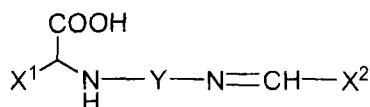


[0020] n 为选自 2、3 和 4 的整数,

[0021] R¹、R² 独立地选自 H、直线型或支化的 C₁-C₄ 烷基、C₆ 或 C₁₀ 芳基。

[0022] 在第二个方面, 本发明涉及制备如本发明第一方面及其相应的实施方案所定义的式 (I) 化合物的方法, 所述方法包括在适合的溶剂系统中, 在还原剂存在下还原式 (II) 化合物的步骤:

[0023]



(II)

[0024] 其中 X^1 、 X^2 和 Y 如前述所定义。

[0025] 在第三个方面中,本发明涉及如本发明第一方面及其相应的实施方案所定义的式 (I) 化合物,作为多价金属络合物形成试剂的用途。

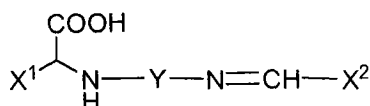
[0026] 在第四个方面中,本发明涉及如本发明第一方面及其相应的实施方案所定义的式 (I) 化合物,与一种或多种多价金属的螯合物。

[0027] 在第五个方面中,本发明涉及包含如本发明第一方面及其相应的实施方案所定义的式 (I) 化合物或其多价金属螯合物的农业化学组合物。

[0028] 在第六个方面中,本发明涉及如本发明第一方面及其相应的实施方案所定义的化合物,或其多价金属螯合物用于制备治疗缺铁症相关植物病害的组合物的用途。

[0029] 在第七个方面中,本发明涉及固体形式的式 (II) 中间体:

[0030]



(II)

[0031] 其中 X^1 、 X^2 和 Y 如前述所定义。

[0032] 在第八个方面中,本发明涉及如本发明第七方面及其相应的实施方案中所定义的式 (II) 中间体,制备如本发明第一方面及其相应的实施方案中所定义的式 (I) 化合物的用途。

[0033] 不希望受理论约束,如 Chem. Eur. J. 2005, 11, 5997 中所报道, Fe(III)-o, o-EDDHA 减轻铁缺绿病的效力要求空位配位点的产生。这个事实解释了其中一个酚基不能配位金属的 o, p-EDDHA 化合物的高效性。有利地,本发明中描述的新化合物仅具有五个能够配位金属的基团。这一点应该对它们的活性是关键的。

[0034] 此外,在本领域中已知的并且用于缺铁症相关植物病害治疗的大多数 EDDHA 的衍生物是对称性化合物,除了 EDDHA 的异构体 o, p-EDDHA。相反地,所有的式 (I) 化合物都是非对称化合物,因为它们缺少 EDDHA 的两个羧基中的一个。因此,制备 EDDHA 衍生物的已知方法不能直接地适用于本发明的化合物。这已经迫使发明人研究出制备所述式 (I) 化合物的新合成方法。

[0035] 在全部的说明书和权利要求书中,词语“包含 (comprise)”以及该词的变型,例如“包含 (comprising)”,并未打算排除其它的技术特征、添加物、组分或步骤。来自要求优先权的申请的内容,以及优先权申请和本申请的摘要的内容,在这里作为参考引入。

[0036] 对那些本领域技术人员来说,在研究了说明书后本发明的其它目的、优点和特征将会变为显而易见的,或者可能从本发明的实践中学习。通过示例方法提供下列实施例,并

且并不意味着成为本发明的限制。

[0037] 附图的简要描述

[0038] 图 1 显示生长在使用各个测试化合物和对照处理过的土壤中的植物的第四级的 SPAD 指数, 根据处理天数变化来表示。

[0039] 图 2 显示在三个抽样时间, 在土壤实验中使用测试化合物和对照处理的枝条干重 (用克表示)。

[0040] 图 3 显示在三个抽样时间, 用测试化合物和对照处理过的植物叶片中铁的浓度。

[0041] 定义

[0042] 通过直线型或支化的 C_1-C_4 烷基, 在这里采用的意思是包含最多 4 个碳原子的直线型或支化的烷基。因此其包括, 例如, 甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。

[0043] 通过 C_1-C_4 烷氧基, 在这里意味着通过氧连接的上述烷基, 实例包括甲氧基、乙氧基、异丙氧基、叔丁氧基等。

[0044] 术语卤代基在本发明中指 F、Cl、Br、I, 优选 Cl。

[0045] C_6 或 C_{10} 芳族体系或者 C_6 或 C_{10} 芳基包括苯基和萘基。

[0046] 特别实施方案的详细说明

[0047] 如上述定义, 式 (I) 化合物中的 X^2 为在 α 位具有羟基的 C_6 或 C_{10} 芳族体系, 或者在 α 位具有杂原子的五元或六元杂环, 所述杂原子选自 N、O 和 S, 任选地在它们的结构中包含其它 N、O 或 S 原子, 并且具有 0-3 个双键, 所述芳族、或杂环体系任选地被最多四个取代基取代, 所述取代基独立地选自: 磷酸基、磺基、卤代基、羧基、乙酰氧基、 C_1-C_4 烷氧基、直线型或支化的 C_1-C_4 烷基。杂环在这里意味着包括非芳族杂环 (例如 2-氮杂环丁烷 (azetidiny1)、2-吡咯烷基、2-哌啶基) 和芳族杂环。优选地所述杂环为杂芳族。

[0048] 优选的式 (I) 化合物是那些其中 X^2 选自 2-羟基苯基、2-羟基萘基、2-呋喃基、2-噻吩基、2-吡咯基、2-吡啶基、4-嘧啶基 (pyridimidiny1)、2-吡嗪基的化合物, 其中上述基团任选地被 2 个或 1 个取代基取代, 所述取代基独立选自: 磷酸基、磺基、卤代基、 C_1-C_4 烷氧基、羧基、乙酰氧基、直线型或支化的 C_1-C_4 烷基。优选地任选取代基包括甲基、苯基、磷酸基、磺基、羧基、乙酰基。

[0049] 更优选的式 (I) 化合物是那些其中 X^1 为任选地被 2 个或 1 个取代基取代的 2-羟基苯基或 2-羟基萘基的化合物, 所述取代基独立选自甲基或甲氧基。仍然更优选的是那些其中 X^1 为 2-羟基苯基的化合物。

[0050] 在式 (I) 化合物中, 优选地 Y 为 $(CH_2)_n$, 并且更优选地 n 为 2。当 Y 为如上述定义的亚苯二甲基基团时, 优选地 R^1 和 R^2 二者都为 H。

[0051] 在优选的实施方案中, 式 (I) 化合物为那些其中 Y 为 $(CH_2)_n$, 并且更优选地 n 为 2, X^1 为 2-羟基苯基, X^2 选自 2-羟基苯基、2-羟基萘基、2-呋喃基、2-噻吩基、2-吡咯基、2-吡啶基、4-嘧啶基 (pyridimidiny1)、2-吡嗪基的化合物, 其中上述 X^2 基团任选地被 2 个或 1 个取代基取代, 所述取代基独立选自: C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、羧基、磺基、乙酰氧基。

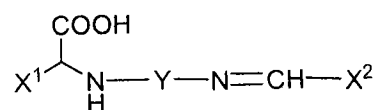
[0052] 最特别优选的化合物选自: 2-(2-((2-羟基苯基)氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸、2-(2-((2-羟基-1-萘基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸、2-(2-((吡啶-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸、2-(2-((1H-吡咯-2-基)甲氨基)

乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸。

[0053] 优选的方法包括但不限于那些如下所述的方法。在适合所使用且适于进行转化的试剂和材料的溶剂中进行反应。有机合成领域的专家将会理解,存在于分子中的官能团必须与计划的转化相一致。这可能有时需要改变合成步骤的顺序或者选择一个特殊方法而不是另一个,以便获得本发明要求的化合物。而且,在如下所述的一些方法中,使用常规的保护基团保护本发明化合物中的试剂官能团或中间体是合乎需要的或者必需的。各种保护基团和引入并除去它们的方法在 Greene 和 Wuts (Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley and Sons, 1999) 中描述。所有本文引用的参考文献通过引用整体地引入。

[0054] 如上所定义的式 (I) 化合物,能够通过包括在适合的溶剂系统中在还原剂存在下还原式 (II) 化合物的步骤的方法制备:

[0055]



(II)

[0056] 其中 X^1 、 X^2 和 Y 如前述所定义。

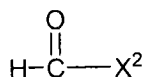
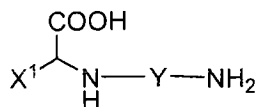
[0057] 可在不同的溶剂体系中进行反应。适合的溶剂系统包括 C_1 - C_4 醇类例如甲醇和乙醇、乙酸、水及其混合物。优选地反应在甲醇中进行。

[0058] 适合的还原剂为氢化物和氢与金属催化剂。优选地,还原剂选自硼氢化物,例如氰基硼氢化钠,三乙酰氧基硼氰化钠,硼氰化钠。当使用的还原剂为硼氰化钠或 Pd 氢化时会获得较好的结果。

[0059] 反应优选地在 15°C 至 40°C 的温度范围进行。当在 18°C 至 25°C 进行时会获得较好的结果。

[0060] 在优选的实施方案中,根据本发明的第二个方面制备式 (I) 化合物的方法,进一步地预先包括通过在适合的溶剂系统中使式 (III) 化合物与式 (IV) 化合物反应制备所述的式 (II) 化合物的步骤:

[0061]



(III)

(IV)

[0062] 其中 X^1 、 X^2 和 Y 如前述所定义。

[0063] 式 (III) 化合物与式 (IV) 化合物之间的反应可在不同的溶剂系统中进行。适合的溶剂系统包括 C_1 - C_4 醇类例如甲醇和乙醇;水;腈例如乙腈;酮例如 2-丁酮;以及它们的混合物。优选地,反应在甲醇、乙醇、水或其混合物中进行。

[0064] 在优选地实施方案中,式 (III) 化合物与式 (IV) 化合物之间的反应,以及随后的

获得式 (II) 化合物以制备式 (I) 化合物的还原作为一锅反应进行。

[0065] 实施方法的最佳条件根据本领域技术人员所考虑的参数而变化,例如起始物、温度和类似条件。本领域技术人员通过常规试验,并且根据本文中包括的实施例的教导可容易地确定所述反应条件。

[0066] 式 (III) 化合物在文献中描述过,和 / 或能够通过类似于目前工艺水平中已知的那些方法 (例如 US 5,679,704、DE3329028A1 和 WO-2006045852A1) 从市售产品制备。

[0067] 如前定义的式 (I) 化合物可用作多价金属的络合物形成试剂。优选地,所述多价金属为至少一种选自铁、镍、锌、锰、镱 (ytterbium)、钆、钴和铜的金属。更优选地,所述金属为铁。

[0068] 如前定义的式 (I) 化合物可与一种或多种多价金属形成螯合物。优选地,所述多价金属为至少一种选自铁、镍、锌、锰、镱 (ytterbium)、钆、钴、铜、钇、铂和金。更优选地,所述金属为铁。上述铁螯合物可进一步包含例如碱金属或碱土金属,如钠、钾、钙或镁,特别是钠。

[0069] 根据本发明的螯合物可用作农业上可接受组合物的活性成分,作为单独活性成分或与其它农业上的活性成分结合,例如植物养分或植物肥料。因此,根据本发明的农业化学组合物包含如上定义的式 (I) 化合物,或其金属螯合物。所述组合物可进一步包含农业上可接受的载体。组合物优选地以溶液或悬浮液的形式通过加入土壤而应用。

[0070] 其它农业上可接受的活性成分可以是额外的肥料、微量营养元素供体或其它影响植物生长和发育的制剂,或者植物保护产品如选择性除草剂或杀虫剂、杀真菌剂、杀细菌剂、杀线虫剂、杀螺剂,或者如果需要,上述制剂中几种的混合物。

[0071] 农业上可接受的活性成分还包括其它螯合剂。所述螯合剂包括乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、o, o-EDDHA 和 o, p-EDDHA。在一个实施方案中,本发明的农业化学组合物还包括 o, o-EDDHA。

[0072] 农业上可接受的载体可以是天然的或改良的矿物质、溶剂、分散剂、润湿剂、胶粘剂、增稠剂或粘结剂。所述载体和添加剂在例如 W095/30651 中描述。

[0073] 根据本发明的式 (I) 化合物具有治疗缺铁症相关的植物病害的用途。优选地,所述病害为铁缺绿病。

[0074] 优选的式 (II) 中间体是其中 X^1 为 2-羟基苯基的那些。

实施例

[0075] 实施例 1 :2-(2-((2-羟基苯甲基)氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0076] 步骤 1. 式 (II) 中间体 ($X^1 = 2\text{-羟基苯基}$, $Y = (\text{CH}_2)_2$, $X^2 = 2\text{-羟基苯甲基}$)

[0077] 向 pH7.3 的 2-(2-氨基乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸盐水溶液中加入等摩尔量的水杨醛乙醇溶液。在室温下搅拌 1h 之后,标题的席夫碱被过滤并且以 80% 的收率作为固体获得。

[0078] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6 , 2.5, ppm) : $\delta = 8.54$ (s, 1H, CH = N), 7.48 (d, 1H, J = 7.5Hz, Ar), 7.34 (t, 1H, J = 7.62Hz, Ar), 7.30 (d, 1H, J = 7.32Hz, Ar), 7.18 (m, 1H, Ar), 6.92-6.70 (m, 4H, Ar), 4.62 (s, 1H, CH), 3.83 (m, 4H, CH_2), 3.15 (m, 1H, CH_2), 3.02 (m, 1H, CH_2)。

[0079] 步骤 2. 2-(2-((2-羟基苯甲基)氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0080] 室温下,在甲醇(10% Pd/C)中氢化在步骤1中获得的席夫碱产生为褐色固体的标题产物(80%)。

[0081] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O , 4.8(H₂O), ppm): δ = 7.20-7(m, 4H, Ar), 6.79-6.66(m, 4H, Ar), 4.36(s, CH), 3.87(s, 2H, CH_2), 2.84-2.69(m, 4H, CH_2)。

[0082] 实施例2: 2-(2-((2-羟基-1-萘基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0083] 步骤1. 式(II)中间体(X^1 = 2-羟基苯基, Y = $(\text{CH}_2)_2$, X^2 = 2-羟基-1-萘基)

[0084] 根据实施例1,但是从等摩尔量的2-(2-氨基乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸盐和1-甲酰基- β -萘酚开始,以70%的收率获得黄色固体的标题席夫碱。

[0085] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO, 2.5, ppm): δ = 9.11(s, 1H, CH-N), 8.055(d, 1H, J = 8.35Hz, Ar), 7.72(d, 1H, J = 9.44Hz, Ar), 7.63(d, 1H, J = 7.10Hz, Ar), 7.42(d, 2H, J = 7.07Hz, Ar), 7.25(d, 1H, J = 9.44Hz, Ar), 7.17(d, 2H, J = 7.11Hz, Ar), 6.75-6.67(m, 2H, Ar), 4.43(s, 1H), 3.86-3.78(m, 2H, CH_2), 3.2-3.02(m, 1H CH_2), 2.92-2.8(m, 1H, CH_2)。

[0086] 步骤2. 2-(2-((2-羟基-1-萘基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0087] 等摩尔量的步骤1中获得的席夫碱、 NaBH_3CN 和催化量的 Zn_2Cl 的甲醇混合物在室温下搅拌3h。通过蒸发除去溶剂并且获得褐色固体的标题产物(85%产率)。

[0088] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O , 4.8(H₂O), ppm): δ = 7.7-7.55(m, 3H, Ar), 7.45-7.37(m, 1H, Ar), 7.3-7.15(m, 2H, Ar), 7.06(d, 1H, J = 5.67Hz, Ar), 6.95(d, 1H, J = 9.17Hz, Ar), 6.8-7.2(m, 2H, Ar), 5.02(s, 1H), 4.23(s, 2H), 3.22-3.073(m, 4H)。

[0089] 实施例3: 2-(2-((吡啶-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0090] 步骤1. 式(II)中间体(X^1 = 2-羟基苯基, Y = $(\text{CH}_2)_2$, X^2 = 吡啶-2-基)

[0091] 根据实施例1的方法,但是从pH7的等摩尔量的2-(2-氨基乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸盐和2-吡啶甲醛开始。在室温下20h之后除去溶剂,并且以90%的收率获得黄色固体的标题席夫碱。

[0092] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO, 2.5, ppm): δ = 8.63(bs, 1H, J = 4.77Hz, CH = N), 8.5-8.1(m, 1H, Ar), 8.0-7.84(m, 2H, Ar), 7.46(t, 1H, Ar J = 6.58Hz,), 7.21-7.1(m, 1H, Ar), 7.05-6.95(m, 1H, Ar), 6.88-6.73(m, 2H, Ar), 4.59(s, 1H, CH), 3.9(m, 2H, CH_2), 3.1-3.0(m, 2H, CH_2)。

[0093] 步骤2. 2-(2-((吡啶-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0094] 等摩尔量的步骤1中获得的席夫碱和 NaBH_4 甲醇混合物在室温下搅拌20h。通过蒸发除去溶剂并且获得白色固体的标题产物(95%的收率)。

[0095] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, D_2O , 4.8(H₂O) ppm): δ = 8.4-8.36(m, 1H, Ar), 7.82(td, 1H, J_1 = 7.65Hz, J_2 = 1.38Hz, Ar), 7.77-7.72(m, 2H, Ar), 7.36-7.25(m, 2H, Ar), 7.2-7.0(m, 1H, Ar), 6.74-6.65(m, 1H, Ar), 4.38(s, CH), 3.76(s, 2H, CH_2), 2.78-2.6(m, 4H, CH_2)。

[0096] 实施例4: 2-(2-((1H-吡咯-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0097] 步骤1. 式(II)中间体(X^1 = 2-羟基苯基, Y = $(\text{CH}_2)_2$, X^2 = 1H-吡咯-2-基)

[0098] 根据实施例1的方法,但是从等摩尔量的2-(2-氨基乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸盐和吡咯-2-甲醛开始,在室温下搅拌20h之后,以90%的收率获得橙色固体的标题席夫碱。

[0099] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO, 2.5, ppm): δ = 8.09(s, 1H, CH = N), 7.35-7.20(m,

1H, Ar), 7.0–6.95 (m, 1H, Ar), 6.87 (s, 1H, Ar), 6.75–6.65 (m, 1H, Ar), 6.5–6.4 (m, 1H, Ar), 6.3–6.2 (m, 1H, Ar), 6.115–6.05 (m, 1H, Ar), 4.11 (s, 1H, CH), 3.65–3.5 (m, 2H, CH₂), 2.9–2.6 (m, 2H, CH₂)。

[0100] 步骤 2: 2-(2-((1H-吡咯-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0101] 等摩尔量的步骤 1 中获得的席夫碱和 NaBH₄ 的甲醇混合物在室温下搅拌 20h。通过蒸发除去溶剂并且获得橙色固体的标题产物 (94% 的收率)。

[0102] ¹H-NMR (500MHz, D₂O, 4.8 (H₂O), ppm) : δ = 7.2–7.1. (m, 2H, Ar), 6.80–6.69 (m, 3H, Ar), 6.15–6.25 (m, 2H, Ar), 4.44 (s, 1H), 3.70 (s, 2H, CH₂), 2.85–2.6 (m, 4H, CH₂)。

[0103] 实施例 5 : 2-(2-((咪唑-4(5)-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0104] 步骤 1. 式 (II) 中间体 (X¹ = 2-羟基苯基, Y = (CH₂)₂, X² = 咪唑-4(5)-基)

[0105] 向 pH7.2 的 2-(2-氨基乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸盐盐酸盐溶液中加入等摩尔量的 4(5)-甲酰基咪唑 / 甲醇溶液。在室温下搅拌 24h 之后, 标题席夫碱被过滤并且以定量的收率作为固体获得。

[0106] ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD, 3.31ppm) : δ = 8.21 (宽 s, 1H, CH = N), 7.76 (s, 1H, CH = N), 7.49 (s, 1H, CH = N), 7.23 (dt, 1H, J₁ = 7.56Hz, J₂ = 1.35Hz, Ar), 7.10 (td, 1H, J₁ = 1.38Hz, J₂ = 7.56Hz, Ar), 6.77 (m, 2H, Ar), 5.74 (1H, NH), 4.44 (s, 1H, CH), 3.72–3.70 (m, 2H, CH₂), 3.08–3.0 (m, 1H, CH₂), 2.95–2.34 (m, 1H, CH₂)。

[0107] 步骤 2: 2-(2-((咪唑-4(5)-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0108] 在室温下甲醇 (10% Pd/C) 中氢化步骤 1 获得的席夫碱产生作为固体的标题产物 (35%)。

[0109] ¹H-NMR (500MHz, D₂O, 4.8 (H₂O) ppm) : δ = 7.55 (s, 1H, C = N), 7.06–7.0.3 (m, 2H, Ar), 6.88 (s, 1H, C = N), 6.68–6.64 (m, 2H, Ar), 4.33 (s, 1H, CH), 3.59 (s, 2H, CH₂), 2.76–2.56 (m, 4H, CH₂)。

[0110] 实施例 6 : 2-(2-((1H-咪唑-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0111] 步骤 1. 式 (II) 中间体 (X¹ = 2-羟基苯基, Y = (CH₂)₂, X² = 1H-咪唑-2-基)

[0112] 向 pH7.2 的 2-(2-氨基乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸盐盐酸盐溶液中加入等摩尔量的 2-甲酰基咪唑 / 甲醇溶液。在室温下搅拌 24h 之后, 标题的席夫碱被过滤并且以定量的收率作为固体获得。

[0113] ¹H-RMN (500MHz, CD₃OD, 3.31ppm) δ = 8.24 (宽 s, 1H, CH = N), 7.18 (s, 2H, CH = N), 7.10–6.97 (m, 2H, Ar), 6.79–6.73 (m, 2H, Ar), 5.72 (宽 s, 1H, NH), 4.36 (s, 1H, CH), 3.79–3.75 (m, 2H, CH₂), 3.03–2.94 (m, 1H, CH₂), 2.89–2.84 (m, 1H, CH₂)。

[0114] 步骤 2: 2-(2-((1H-咪唑-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0115] 在室温下甲醇 (10% Pd/C) 中氢化步骤 1 获得的席夫碱产生作为固体的标题产品 (34%)。

[0116] ¹H-RMN (500MHz, D₂O, 4.8 (H₂O) ppm) δ = 7.55 (s, 1H, C = N), 7.06–7.03 (m, 2H, Ar), 6.88 (s, 1H, C = N), 6.68–6.64 (m, 2H, Ar), 4.33 (s, 1H, CH), 3.59 (s, 2H, CH₂), 2.76–2.56 (m, 4H, CH₂)。

[0117] 实施例 7 : 2-(2-((哌啶-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0118] 步骤 1. 式 (II) 中间体 (X¹ = 2-羟基苯基, Y = (CH₂)₂, X² = 哌啶-2-基)

[0119] 向 pH7.2 的 2-(2-氨基乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸盐水溶液中加入等摩尔量的 2-甲酰基-N-叔丁氧基羰基-哌啶 / 甲醇。在室温下搅拌 24h 之后,标题席夫碱被过滤并且以定量的收率作为固体获得。

[0120] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d₆, 2.5, ppm) : δ = 7.57 (s, 1H, C = N), 7.28-7.26 (m, 2H, Ar), 7.0-6.96 (m, 2H, Ar), 4.5 (s, 1H, CH), 4.14-4.05 (m, 1H, CH), 3.3-2.80 (m, 6H, CH₂), 1.49-1.36 (m, 6H, CH₂), 1.36 (s, 9H, CH₃)。

[0121] 步骤 2. 2-(2-((哌啶-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0122] 在室温下甲醇 (10% Pd/C) 中氢化步骤 1 获得的席夫碱,随后使用溶解在 10ml 二噁烷中的 1ml 的 10% H₂SO₄ 除去叔丁氧基羰基 (BOC), 室温下 24h, 产生了作为固体的标题产物 (60%)。

[0123] $^1\text{H-RMN}$ (500MHz, D₂O, 4.8 (HDO) ppm) : δ = 7.21-7.16 (m, 2H, Ar), 6.72-6.67 (m, 2H, Ar), 4.35 (s, 1H, CH), 3.56-3.51 (m, 1H, CH), 3.1-2.52 (m, 8H, CH₂), 1.49-1.45 (m, 2H, CH₂), 1.13-1.03 (m, 4H, CH₂)。

[0124] 实施例 8 : 2-(2-((吡咯烷-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0125] 步骤 1. 式 (II) 中间体 (X^1 = 2-羟基苯基, Y = (CH₂)₂, X^2 = 吡咯烷-2-基)

[0126] 向 pH7.2 的 2-(2-氨基乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸盐水溶液中加入等摩尔量的 2-甲酰基-N-叔丁氧基羰基-吡咯烷 / 甲醇。在室温下搅拌 24h 之后,标题席夫碱被过滤并且以定量的收率作为固体获得。

[0127] $^1\text{H-RMN}$ (500MHz, DMSO-d₆, 2.5, ppm) : δ = 7.57 (宽 s, 1H, C = N), 7.27 (d, 1H, J = 7.35Hz, Ar), 7.01-6.91 (m, 1H, Ar), 6.66-6.59 (m, 2H, Ar), 4.6 (m, 1H, CH), 3.92 (s, 1H, CH), 2.71-2.6 (m, 1H, CH₂), 2.59-2.45 (m, 1H, CH₂), 1.99-1.75 (m, 4H, CH₂), 1.38-1.37 (m, 2H, CH₂), 1.37 (s, 9H, CH₃)。

[0128] 步骤 2. 2-(2-((吡咯烷-2-基)甲氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸

[0129] 在室温下甲醇 (10% Pd/C) 中氢化步骤 1 获得的席夫碱,随后使用溶解在 10ml 二噁烷中的 1ml 的 10% H₂SO₄ 除去 BOC 基团, 室温下 24h, 产生了作为固体的标题产物 (50%)。

[0130] $^1\text{H-RMN}$ (500MHz, D₂O, 4.8 (HDO) ppm) : δ = 7.31-7.26 (m, 2H, Ar), 6.91-6.87 (m, 2H, Ar), 5.1 (s, 1H, CH), 3.9-3.83 (m, 1H, CH), 3.44-3.20 (m, 8H, CH₂), 1.96-1.65 (m, 4H, CH₂)。

[0131] 实施例 9 : 2-(2-((2-羟基苯甲基)氨基)乙氨基)-2-(2-羟基-4-甲基苯基)乙酸

[0132] 步骤 1. 式 (II) 中间体 (X^1 = 2-羟基-4-甲基苯基, Y = (CH₂)₂, X^2 = 2-羟基苯甲基)

[0133] 向 pH7.2 的 2-(2-氨基乙氨基)-2-(2-羟基-4-甲基苯基)乙酸盐水溶液中加入等摩尔量的水杨醛 / 乙醇。在室温下搅拌 1h 之后,标题席夫碱被过滤并且以 65% 的收率作为黄色固体获得。

[0134] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d₆, 2.5, ppm) : δ = 8.54 (s, 1H, CH = N), 7.45 (d, 1H, J = 7.78Hz, Ar), 7.33 (td, 1H, J₁ = 1.63Hz, J₂ = 8.2Hz, Ar), 7.08 (d, 1H, J = 7.7Hz, Ar), 6.9 (t, 2H, J = 7.27Hz, Ar), 6.61-6.58 (m, 2H, Ar), 4.56 (s, 1H, CH), 3.85-3.81 (m, 2H, CH₂), 3.17-3.09 (m, 1H, CH₂), 3.09-2.95 (m, 1H, CH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃)。

[0135] 步骤 2. 2-(2-((2-羟基苯甲基)氨基)乙氨基)-2-(2-羟基-4-甲基苯基)乙酸

[0136] 在室温下甲醇 (10% Pd/C) 中氢化步骤 1 获得的席夫碱产生作为褐色固体的标题产物 (75%)。

[0137] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O , 4.8 (H₂O), ppm) : δ = 7.22-7.1 (m, 3H, Ar), 6.72-6.64 (m, 4H, Ar), 4.37 (s, 1H, CH), 3.92 (s, 2H, CH_2), 2.59-2.81 (m, 4H, CH_2), 2.23 (s, 3H, CH_3)。

[0138] 实施例 102-(2-((2-羟基苯甲基)氨基)乙氨基)-2-(2-羟基-5-甲基苯基)乙酸

[0139] 步骤 1. 式 (II) 中间体 (X^1 = 2-羟基-5-甲基苯基, Y = $(\text{CH}_2)_2$, X^2 = 2-羟基苯甲基)

[0140] 向 pH7.2 的 2-(2-氨基乙氨基)-2-(2-羟基-5-甲基苯基)乙酸盐水溶液中加入等摩尔量的水杨醛/乙醇。在室温下搅拌 1h 之后, 标题席夫碱被过滤并且以 52% 的收率作为黄色固体获得。

[0141] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6 , 2.5, ppm) : δ = 8.55 (s, 1H, C = N), 7.45 (d, 1H, J = 7.6Hz, Ar), 7.32 (t, 1H, J = 8.81Hz, Ar), 7.02 (s, 1H, Ar), 6.90 (t, 3H, J = 7.56Hz, Ar), 6.68 (d, 1H, J = 8.13, Ar), 4.52 (s, 1H, CH), 3.85-3.80 (m, 2H, CH_2), 3.2.-3.12 (m, 1H, CH_2), 3.01-2.94 (s, 1H, CH_2), 2.17 (s, 3H, CH_3)。

[0142] 步骤 2. 2-(2-((2-羟基苯甲基)氨基)乙氨基)-2-(2-羟基-5-甲基苯基)乙酸

[0143] 在室温下甲醇 (10% Pd/C) 中氢化步骤 1 获得的席夫碱的产生作为褐色固体的标题产物 (70%)。

[0144] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O , 4.8 (H₂O), ppm) : δ = 7.18 (t, 1H, J = 6.14Hz, Ar), 7.2-7.15 (m, 2H, Ar), 6.92-6.89 (s, 1H, Ar), 6.89-6.68 (m, 3H, Ar), 5.15 (s, 1H, CH), 4.16 (s, 2H, CH_2), 3.36-3.19 (m, 4H, CH_2), 2.19 (s, 3H, CH_3)

[0145] 实施例 11: 铁螯合物的制备

[0146] 用于制备本发明的铁螯合物的一般方法如下:

[0147] 向式 (I) 配体的 NaOH 溶液 (1 : 3 配体 : NaOH 摩尔比) 中加入等摩尔量的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液。在加入过程中, 溶液的 pH 应该通过加入 NaOH 或 HCl 维持在 6.0-8.0 之间, 并且最终调节到 7。最终溶液在使用前滤过 0.45 μm 的纤维素膜。

[0148] 实施例 12: 螯合剂的滴定法纯度的确定

[0149] 光度滴定

[0150] 通过将适量螯合剂溶解在所需量的 NaOH 溶液中制备螯合剂溶液。然后通过加入 MES 生物学缓冲液 [2-(N-吗啉基)乙磺酸] 将 pH 调节至 6, 并且在滴定过程中使用 NaOH 溶液维持该 pH。用 NaCl 将离子强度固定在为 0.1M, 并且上层气体是不含 CO_2 的 N_2 。将测试溶液置于恒温夹套反应容器中 (即 100ml 或 150ml 容量), 该容器具有装备进气口和出口管、复合 pH 玻璃电极、光度检测器和两个末端延伸到液体表面以下的活塞式滴定管, 和磁力搅拌器的密闭盖子。光度滴定包括将通过原子吸收光谱预先校准的 Fe(III) 标准溶液加入螯合剂中, 直到吸光度在 480nm 不呈现变化。滴定终点可使用两个线性部分的交点并且还使用平滑的二阶导数方法来计算。

[0151] 电位滴定

[0152] 螯合剂纯度也可以通过在如前所述的相同条件下使用 Cu^{2+} 离子选择电极的电位滴定而确定。使用选择性 Cu(II) 电极和参比电极, 用 Cu(II) 溶液滴定螯合剂溶液, 使用选

择电极测量 Cu^{2+} 游离阳离子。电位滴定的终点可以通过 Gran 方程法或使用一阶导数法确定。预先将用作滴定溶液的 Cu(II) 溶液使用 EDTA-Na_2 溶液校准,并且通过用 Cu(II) 作为滴定溶液滴定保持 $\text{pH} = 6$ 的 NaCl 溶液来确定选择电极的斜率。

[0153] 实施例 13:农业化学活性的确定

[0154] Fe 螯合物在无土栽培法中为大豆植物提供 Fe 的效力

[0155] 在黑暗中使大豆种子 (*Glycine max* L. cv. Stine 0480) 在 30°C 且 60% RH 的纸上萌发 2 天,所述纸用 1M CaSO_4 湿润。然后,将幼苗在装满 1/5 稀释的 EDTA 缓冲营养液 (大量营养元素 (mM) -1.0 $\text{Ca(NO}_3)_2$ 、0.9 KNO_3 、0.3 MgSO_4 、0.1 KH_2PO_4 ;阳离子微量营养元素 (μM) -5.0 EDTA/Fe^{3+} 、2.5 MnSO_4 、1.0 CuSO_4 、10 ZnSO_4 、1.0 CoSO_4 、1.0 NiCl_2 、115.5 Na_2EDTA ;阴离子微量营养元素 (μM) -35 NaCl 、10 H_3BO_3 、0.05 Na_2MoO_4 ;0.1mM HEPES) 的 10L 容器内 (每个容器 50 株幼苗) 放置 6 天。在第 7 天,为了诱导 Fe 缺绿病,将幼苗转移到包含充分通氧但不含 Fe^{3+} 螯合物的 EDTA 缓冲营养液的 12L 聚丙烯桶中。植物生长在这样的条件下,直到观察到清楚的缺 Fe 症状 (7 天),并且随后将植物置于 2L 罐中 (每罐 6 株植物),用黑色塑料覆盖以避免光线照射。比较作为 Fe 源的不同的 Fe 螯合物和剂量的效果。治疗中使用的螯合物为 o,o-EDDHA/ Fe^{3+} 、o,p-EDDHA/ Fe^{3+} 、EDTA/ Fe^{3+} 和实施例 1/ Fe^{3+} 。最后一个为实施例 1 化合物:2-(2-((2-羟基苯甲基)氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸 (DCHA) 的 Fe 螯合物。营养液包含用于幼苗期的大量营养元素和阴离子微量营养元素,以及下列阳离子微量营养元素成分: (μM) 1.0 MnSO_4 、0.5 CuSO_4 、0.5 ZnSO_4 、0.1 NiCl_2 和 0.1 CoSO_4 。并且,将 $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CaCO_3 加入营养液在 pH7.5 缓冲 pH 并且模拟钙质土的条件。在生长室中植物在该营养液中生长 21 天,所述生长室配有荧光灯和钠蒸汽灯,白天处于 16h/ 30°C 和 50% 的湿度,并且晚上处于 8h/ 25°C 和 70% 的湿度。每两天加水,并且每 7 天更新营养溶液。以完全随机设计方式重复处理四次。在 7、14 和 21 天之后收获植物。

[0156] 在实验期间,每隔一天使用叶绿素含量测定仪 (MinoltaSPAD-502) 采集所有叶片发育阶段的 SPAD 读数 (平均每个阶段两或三个读数)。在这里仅仅给出所测量的最小的完全展开的叶片 (在第 2 天的第二阶段,在第 10 天的第三阶段和在第 20 天的第四阶段) 的数值 (表 1)。

[0157] 表 1. Fe 螯合物处理在测量的 SPAD 指数上的效果。

[0158]

处理	SPAD		
	处理后的时间 (天)		
	2 (第 2 阶段)	10 (第 3 阶段)	20 (第 4 阶段)
T0 对照 (不含 Fe)	5.0 d	3.4 d	—
T1 5 μ M 实施例 1 /Fe ³⁺	8.4 abc	32.8 a	34.8 a
T2 10 μ M 实施例 1/Fe ³⁺	8.8 ab	35.7 a	35.0 a
T3 5 μ M o, o-EDDHA/Fe ³⁺	6.2 cd	26.7 b	30.2 a
T4 10 μ M o, o-EDDHA/Fe ³⁺	9.1 ab	31.6 ab	32.4 a
T5 5 μ M o, p-EDDHA/Fe ³⁺	8.1 abc	30.9 ab	32.2 a
T6 10 μ M o, p-EDDHA/Fe ³⁺	10.4 a	33.1 a	32.9 a
T7 5 μ M EDTA/Fe ³⁺	6.8 bcd	6.9 d	11.4 c

[0159]

T8 10 μ M EDTA/Fe ³⁺	8.1 abc	16.6 c	19.9 b
-------------------------------------	---------	--------	--------

[0160] 栏中不同的字母表示根据 Duncan 检验的处理之间的显著性差异 ($\alpha = 0.05$)

[0161] 通过 SPDA 指数估计处理应用之后的叶绿素和植物恢复。表 1 显示了该参数的时间过程。处理应用两天之后,使用 10 μ M o, p-EDDHA/Fe³⁺ 处理的植物显示最高的 SPAD 指数值,但是它仅与 5 μ M o, o-EDDHA/Fe³⁺、5 μ M EDTA/Fe³⁺ 和 -Fe 处理相比显示显著差别。十天后,使用 5 μ M 和 10 μ M 实施例 1/Fe³⁺ 和 10 μ M o, p-EDDHA/Fe³⁺ 处理的植物相对于 5 μ M o, o-EDDHA/Fe³⁺、5 μ M 和 10 μ M EDTA/Fe³⁺ 和 -Fe 处理来说已经显著地返绿。在试验结尾 (处理应用后 20 天),与剂量无关,使用实施例 1, o, o-EDDHA 和 o, p-EDDHA Fe 螯合物 (T1、T2、T3、T4、T5 和 T6) 处理的植物与 5 μ M 和 10 μ M 剂量的 EDTA/Fe³⁺ 和 -Fe 处理相比,已经完全地返绿,显示了显著的 SPAD 指数值。

[0162] 考虑到所应用的低剂量和观测到的趋势,我们能够得出结论:实施例 1 获得的产品呈现治疗铁缺绿病的迅速作用,类似于 o, p-EDDHA,但是高于 o, o-EDDHA。

[0163] 将根和枝条分开,并且使用 Tween 80 (Merck) 和 HCl 溶液洗涤,并且确定鲜重和干重 (在烘干步骤之后)。研磨样品并且在马弗炉中干燥消解 (480 $^{\circ}$ C),将灰烬溶于 HCl 中。通过原子吸收光谱法分析 Fe、Mn、Cu 和 Zn。

[0164] 在表 2 中显示了各个抽样时间内,较低 Fe 应用处理的植物中的 Fe 含量。可以观察到新化合物实施例 1/Fe³⁺ 与其它处理相比能够提供明显更高含量的铁,并且在该实验条件下更快,甚至在第三抽样时间比 o, p-EDDHA 更多。然而,当使用大剂量的 Fe 时 (10 μ M, 表 3),仅与 EDTA/Fe³⁺ 处理的差异是显著的。能够得出结论:与其它螯合物相比,实施例 1/Fe³⁺ 能够以较低浓度使用来治疗铁缺绿病。

[0165] 表 2 用低剂量的螯合物处理过的植物中的 Fe 含量 (μ g Fe 每株植物)

[0166]

Fe 含量 ($\mu\text{g Fe}$ 每株植物)			
	第 1 次抽样 处理后 7 天	第 2 次抽样 处理后 14 天	第 3 次抽样 处理后 21 天
对照 (不含 Fe)	20.3 c	10.0 c	11.2 c
5 μM 实施例 1/ Fe^{3+}	57.4 a	152 a	268 a
5 μM <i>o,o</i> -EDDHA/ Fe^{3+}	26.0 bc	83.6 b	202 b
5 μM <i>o,p</i> -EDDHA/ Fe^{3+}	43.0 ab	128 a	223 b
5 μM EDTA/ Fe^{3+}	14.2 c	19.6 c	22.6 c

[0167] 栏中不同的字母表示根据 Duncan 检验的处理之间的显著性差异 ($\alpha = 0.05$)[0168] 表 3 用高剂量的螯合物处理过的植物中的 Fe 含量 ($\mu\text{g Fe}$ 每株植物)

[0169]

Fe 含量 ($\mu\text{g Fe}$ 每株植物)			
	第 1 次抽样 处理后 7 天	第 2 次抽样 处理后 14 天	第 3 次抽样 处理后 21 天
对照 (不含 Fe)	20.3 b	10.0 b	11.2 b
10 μM 实施例 1/ Fe^{3+}	69.3 a	136 a	235 a
10 μM <i>o,o</i> -EDDHA/ Fe^{3+}	61.4 a	129 a	254 a
10 μM <i>o,p</i> -EDDHA/ Fe^{3+}	77.8 a	129 a	259 a
10 μM EDTA/ Fe^{3+}	27.7 b	32.6 b	47.6 b

[0170] 栏中不同的字母表示根据 Duncan 检验的处理之间的显著性差异 ($\alpha = 0.05$)

[0171] 在土壤条件下 Fe 螯合物为大豆植物提供 Fe 的效力

[0172] 在黑暗中使大豆种子 (*Glycine max* L. cv. Stine 0480) 在 30°C 且 60% RH 的纸上萌发 2 天, 所述纸用 1M CaSO_4 湿润。然后, 将幼苗在装满 1/5 稀释的 EDTA 缓冲营养液 (大量营养元素 (mM) -1.0 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、0.9 KNO_3 、0.3 MgSO_4 、0.1 KH_2PO_4 ; 阳离子微量营养元素 (μM) -5.0EDTA/ Fe^{3+} 、2.5 MnSO_4 、1.0 CuSO_4 、10 ZnSO_4 、1.0 CoSO_4 、1.0 NiCl_2 、115.5 Na_2EDTA ; 阴离子微量营养元素 (μM) -35 NaCl 、10 H_3BO_3 、0.05 Na_2MoO_4 ; 0.1mM HEPES) 的 10L 容器内 (每个容器 50 株幼苗) 放置 4 天。然后, 为了诱导 Fe 缺绿病, 再使用不含 Fe 的营养溶液两天, 并且随后将植物移栽在包含 700g 的钙质土 (380mg $\cdot\text{Kg}^{-1}$ 碳酸钙, 89g $\cdot\text{Kg}^{-1}$ 活性 CaCO_3 , pH7.70) 和 300g 的灰砂的 1L 罐中 (3 株植物每罐), 用黑色塑料覆盖以避免光线照射。比较作为 Fe

源的不同的 Fe 螯合物的效果 :o,o-EDDHA/ Fe^{3+} 、o,p-EDDHA/ Fe^{3+} 、EDTA/ Fe^{3+} 和实施例 1/ Fe^{3+} 。最后一个为实施例 1 化合物 :2-(2-((2-羟基苯甲基)氨基)乙氨基)-2-(2-羟基苯基)乙酸的 Fe 螯合物。在生长室中植物在该土壤中生长 21 天,所述生长室配有荧光灯和钠蒸汽灯,白天处于 16h/30℃ 和 50% 的湿度,并且晚上处于 8h/25℃ 和 70% 的湿度。以完全随机设计方式重复处理五次。在 2、7 和 21 天之后收获单株植物。

[0173] 在实验期间,每隔一天使用叶绿素含量测定仪 (MinoltaSPAD-502) 采集所有叶片发育阶段的 SPAD 读数 (平均每个阶段两或三个读数)。在这里给出所测量的在第 2 天的第 2 阶段,在第 12 天的第 3 阶段和在第 22 天的第四和第五阶段) 的数值 (表 4)。

[0174] 表 4. 在土壤实验中所测量的 Fe 螯合物处理在 SPAD 指数上的效果

[0175]

处理	SPAD			
	处理后的时间(天)			
	2 (第 2 阶段)	12 (第 3 阶段)	22 (第 4 阶段)	22 (第 5 阶段)
对照 (-Fe)	19.1	12.6	9.0	-
o, o-EDDHA/ Fe^{3+}	22.4	42.1	34.1	28.8
o, p-EDDHA/ Fe^{3+}	25.8	41.2	33.0	21.0
实施例 1/ Fe^{3+}	23.9	41.0	34.1	26.6

[0176] 栏中不同的字母表示根据 Duncan 检验的处理之间的显著性差异 ($\alpha = 0.05$)

[0177] 所有螯合物处理都比对照显示出较高的 SPAD 指数,如图 1 中所示。该数据和可见症状表示使用这些螯合物而从缺绿病中完全恢复。在处理应用两天之后,使用 o,p-EDDHA/ Fe^{3+} 和实施例 1/ Fe^{3+} 处理的植物,由于这些化合物的快速作用而表现出较好的恢复,并且在此之后,使用 o,o-EDDHA/ Fe^{3+} 的处理给出最高值,但是与实施例 1/ Fe^{3+} 类似。

[0178] 在各个抽样时间,将枝条分开并且使用 Tween 80 (Merck) 和 HCl 溶液洗涤,并且确定鲜重和干重 (在烘干步骤之后)。研磨样品并且在马弗炉中干燥消解 (480℃),将灰烬溶于 HCl 中。通过原子吸收光谱法分析 Fe、Mn、Cu 和 Zn。

[0179] 在图 2 中显示了枝条提供的干重。实施例 1/ Fe^{3+} 再次显示其为有效的 Fe 缺绿病的治疗剂。在图 3 中还显示了三个取样时间的叶片中的铁浓度。三种铁螯合物相对于对照显著地提高了 Fe 浓度。

[0180] 从该实验中,仅用一次处理,我们能够得出结论:实施例 1 中获得的产品在高钙条件下有效地解决了铁缺绿病。它的效率与它的快速作用机制有关。

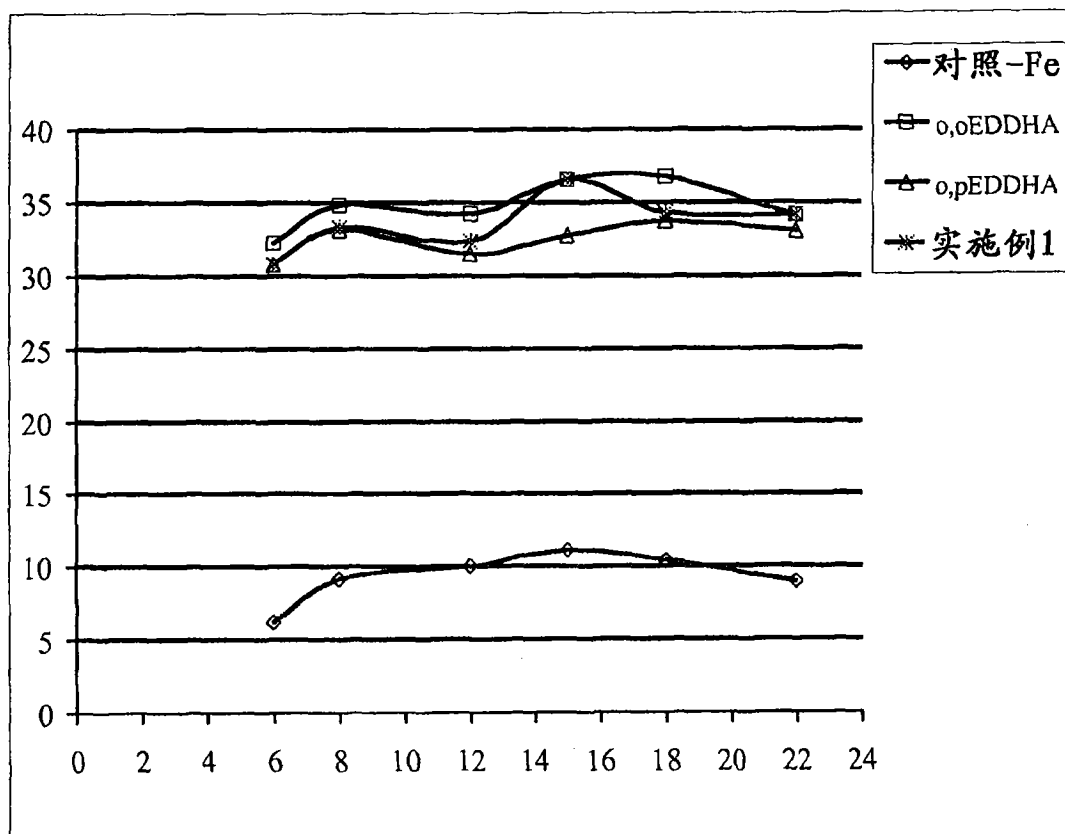


图 1

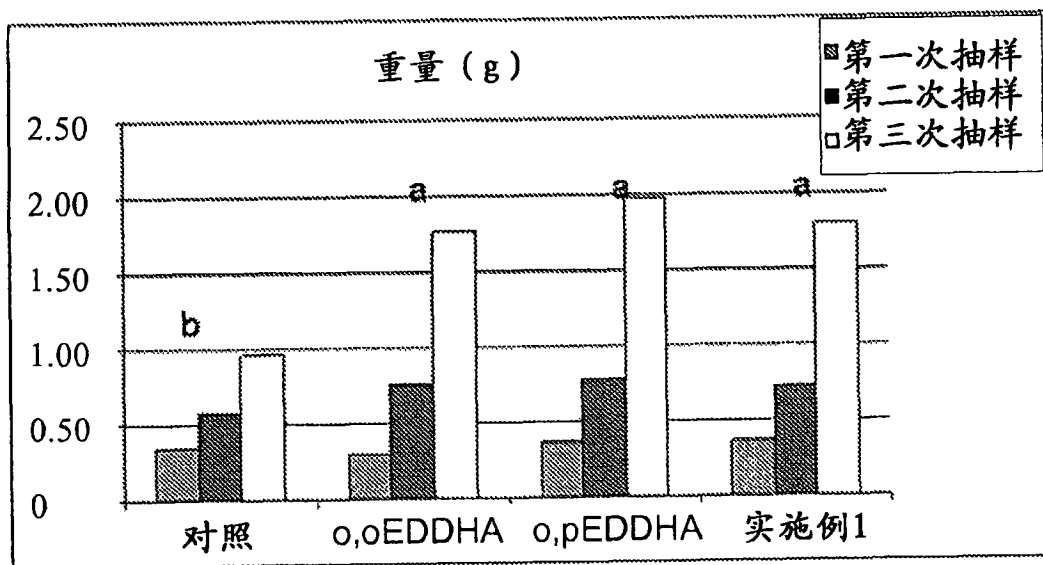


图 2

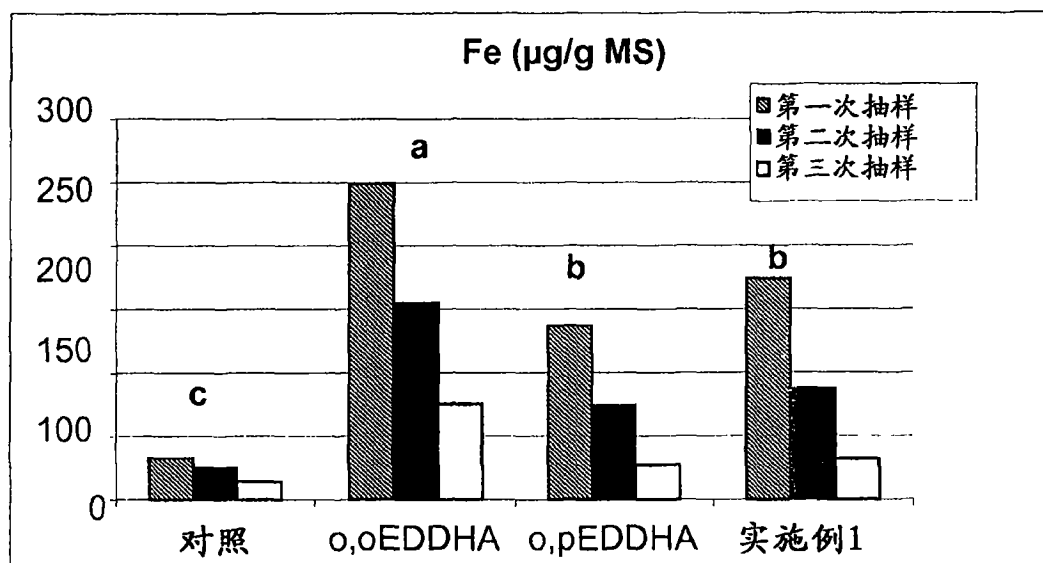


图 3