

· 专栏 ·

取代苯甲醛缩氨基硫脲(脲、硝基胍)类化合物的合成及其对小菜蛾酪氨酸酶的抑制活性

王振^{#a}, 董玮^{#b}, 徐焱^a, 梁沛^b, 杨新玲^{*a}

(中国农业大学 a 理学院 农业部农药化学与应用重点开放实验室, b 农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘要:酪氨酸酶是昆虫生长发育过程中的一个关键性酶,控制酪氨酸酶的活性即可调节昆虫的生长行为。以苯甲醛缩氨基硫脲为母体化合物,通过变换硫脲结构片段,设计了18个结构类似的苯甲醛缩氨基硫脲(脲、硝基胍)类化合物,以取代苯甲醛、氨基硫脲、水合肼等为原料经1~2步反应合成了目标化合物,其结构通过红外、核磁共振氢谱、质谱(ESI)表征。生物活性测试结果表明,硫脲类化合物对小菜蛾酪氨酸酶的抑制活性明显高于脲(硝基胍)类化合物,说明硫脲结构的存在对化合物的活性有利。

关键词:硫脲(脲、硝基胍);合成;酪氨酸酶;生物活性

DOI 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.03.04

中图分类号:O625.4 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2010)03-0264-05

Synthesis of substituted benzylidene hydrazinecarbothioamide (hydrazinecarboxamide, nitrohydrazinecarboxinidamide) and their inhibitory activity on tyrosinase of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.)

WANG Zhen^a, DONG Wei^b, XU Yan^a, LIANG Pei^b, YANG Xinling^{*a}

(a. College of Science Key Laboratory of Pesticide Chemistry and Application, Ministry of Agriculture,

b. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Tyrosinase is a key enzyme in the growth and development of insect. The development of insect can be affected by regulating its tyrosinase activity. Eighteen substituted benzylidene hydrazinecarbothioamide (hydrazinecarboxamide, nitrohydrazinecarboxinidamide) compounds were designed based on changing the thiourea structure fragment of parent compound benzylidene hydrazinecarbothioamide. The title compounds were synthesized from the starting materials of substituted benzaldehyde, thiosemicarbazide, hydrazine hydrate, etc. in 1-2 steps and their structures were characterized by IR, ¹H NMR and MS (ESI). Their effects on tyrosinase of the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) were tested. The bioassay results showed that compounds containing thiourea behaved higher inhibitory activity than compounds containing urea (nitroguanidine), which implied that thiourea fragment was favorable to the activity of compounds.

收稿日期:2010-08-16 修回日期:2010-09-08

作者简介:[#]王振(1983-),男,湖北石首人,博士研究生, E-mail wz1022@163.com; [#]为共同第一作者; * 通讯作者 (Author for correspondence): 杨新玲(1967-),女,河南叶县人,博士,教授,主要从事新农药创制研究,电话:010-62732223 E-mail yangxl@cau.edu.cn

基金项目:国家高技术研究发展计划("863"计划)项目(2006AA10A201)。

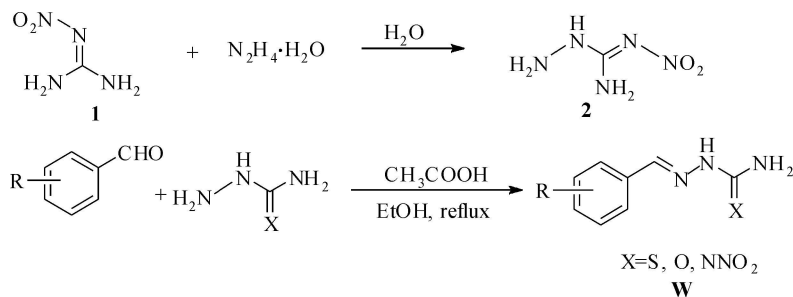
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Key words thiourea (urea nitro guanidine); synthesis tyrosinase; biological activity

酪氨酸酶是一种二价铜离子 (Cu^{2+}) 与酶蛋白相结合的金属酶, 广泛存在于动物、植物及微生物中^[1], 兼有加氧酶和氧化酶的双重功能, 能将单酚加氧成二酚, 又可以将二酚等多元酚氧化成醌^[2]。酪氨酸酶的这种双重反应功能, 对生物体黑色素的形成和外来物侵入时获得性免疫反应的产生至关重要^[3-4]。研究表明, 酪氨酸酶是昆虫体壁鞣化、骨化及黑化等过程中的重要酶系。因此, 调节酪氨酸酶的活性可起到控制昆虫生长发育的作用。

取代苯甲醛缩氨基硫脲(脲、硝基胍)类化合物是一类很好的金属离子螯合剂, 在配位化学领域常用作过渡金属离子的配体^[5-7]; 而酪氨酸酶是以铜离子为活性中心的金属酶, 因此苯甲醛缩氨基硫脲(脲、硝基胍)类化合物具有很好的酪氨酸酶抑制剂开发前景。薛超彬等人发现, 苯甲醛缩氨基硫脲对

菜青虫酪氨酸酶有显著的抑制作用^[8], 其 IC_{50} 值为 $0.84 \mu\text{mol/L}$; 另外, 宋华灿等人也发现苯乙酮缩氨基硫脲对蘑菇酪氨酸酶有很强的抑制作用^[9], 其 IC_{50} 值为 $0.34 \mu\text{mol/L}$, 且认为其抑制机理为硫原子与酶活性中心的铜离子进行了结合。为探讨缩氨基硫脲类化合物的活性位点, 笔者以缩氨基硫脲为骨架结构, 根据电子等排原理, 以 O 原子、N 原子取代 S 原子; 同时, 硝基亚氨基结构片段具有多种生物活性, 在新烟碱类农药中广泛存在, 如吡虫啉、噻虫胺、呋虫胺等^[10], 鉴于此, 本文将电子等排后的胍结构进一步衍生为硝基胍结构, 设计合成了如 **Scheme 1** 中 **W** 所示结构通式的化合物, 旨在通过比较硫脲、脲及硝基胍三类化合物的酪氨酸酶抑制活性差异, 研究缩氨基硫脲类化合物的活性片段, 为进一步设计高效抑制剂提供指导。



Scheme 1

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Cole-Palmer 熔点仪 (温度未校正); Bruker Advance DPX (300 MHz) 核磁共振仪 (以 TMS 为内标, DM SO-d_6 为溶剂); Shimadzu R-435 红外光谱仪 (KBr 压片法); 美国安捷伦公司 1100 质谱仪。曲酸 (5-羟基-2-羟甲基-1,4-吡喃酮, Kojic acid 纯度 99%); 托酚酮 (环庚三烯酚酮, Tropone 98%); 其余试剂均为市售 AR 或 CP 级。

1.2 化合物的合成

1.2.1 中间体 1-硝基-3-氨基胍 (2) 的合成 按照文献 [11] 方法合成, 收率 48%, 熔点 $191 \sim 192^\circ\text{C}$ (文献值^[11]: 熔点 $187 \sim 188^\circ\text{C}$, 收率 50%)。

1.2.2 目标物的合成 按照文献 [12] 方法合成。向 50 mL 三口瓶中加入醛、胺 (醛与胺按物质的量比 1:2:1 投料), 以及 30 mL 无水乙醇, 0.1 mL 冰醋酸, 搅拌回流反应至胺消失, 所得固体以甲醇重结晶

得目标物 **W**。

1.3 生物活性测定

按照文献 [13] 方法进行。

1.3.1 酪氨酸酶液制备 向预冷的玻璃匀浆器中加入 30 头 4 龄小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 幼虫, 2 mL 0.1 mol/L, pH = 6.5 的磷酸缓冲液, 充分匀浆, 再用等体积磷酸缓冲液稀释, 混匀, 10 000 g 下离心 15 min 抽滤后取上清液, 冰浴备用。

1.3.2 测试样品的配制 用丙酮和二甲基亚砜 (DM SO) 以体积比 1:9 混溶, 将上述目标物 **W** 配制成 4 mg/mL 的母液, 以曲酸和托酚酮为对照药剂。

1.3.3 活性试验测试 反应体系为 1 mL (其中含 0.1 mol/L pH 6.5 的磷酸缓冲液 0.845 mL, 0.05 mL 酶液, 5 μL 样品溶液, 0.1 mL 0.037 5 mol/L 邻苯二酚), 体系中样品最终质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 。在 420 nm 下用时间驱动程序测其在 2 min 内的 OD (光密度) 值的变化。重复 3 次, 计算比活力。以加入 5 μL 有机溶剂的酶液所测活性为对照。按式

(1) 计算抑制率。

$$\text{抑制率 } \% = [(\Delta OD_n - \Delta OD_i) / \Delta OD_n] \times 100 \quad (1)$$

其中, ΔOD_n 为对照光密度变化值, ΔOD_i 为用抑制剂处理后光密度变化值。

2 结果与讨论

2.1 目标物的合成与结构表征

按照文献 [12] 的方法, 以取代苯甲醛为原料,

分别与氨基硫脲、氨基脲和氨基硝基胍反应, 制得相应的取代苯甲醛缩氨基硫脲、取代苯甲醛缩氨基脲和取代苯甲醛缩氨基硝基胍化合物。投料时醛应适当过量, 主要是因为胺与目标物的极性和溶解性比较接近, 若胺反应不完全则影响目标物的纯化; 而取代苯甲醛的极性比目标物的小, 在乙醇等溶剂中易溶解, 易于除去, 从而得到较纯净的目标物。

目标化合物结构及理化性质、质谱数据见表 1, 核磁数据见表 2 红外数据见表 3。

表 1 目标化合物的结构式及理化性质、质谱数据

Table 1 Structures, physicochemical and MS data of target compounds

编号 No	X	R	外观 Appearance	熔点 m. p. / $^{\circ}\text{C}$	产率 Yield (%)	质谱 MS (M+1)
W-01	NNO ₂	H	白色固体 White solid	178~180	74.4	208.2
W-02	NNO ₂	4-F	白色固体 White solid	192~194	65.2	226.5
W-03	NNO ₂	4-OCH ₃	白色固体 White solid	180~181	85.2	238.0
W-04	NNO ₂	4-NO ₂	白色固体 White solid	201~203	77.9	256.3
W-05	NNO ₂	2-OH	灰色固体 Grey solid	155~157	65.5	224.1
W-06	NNO ₂	4-OH	黄绿色固体 Yellow-green solid	166~168	70.2	224.5
W-07	O	H	白色固体 White solid	225~227	82.4	163.5
W-08	O	4-F	白色固体 White solid	216~218	77.5	182.3
W-09	O	4-OCH ₃	白色固体 White solid	226~228	81.5	194.5
W-10	O	4-NO ₂	黄色固体 Yellow solid	180~182	90.0	209.4
W-11	O	2-OH	白色固体 White solid	218~220	71.1	180.1
W-12	O	4-OH	白色固体 White solid	242~244	62.5	180.4
W-13	S	H	白色固体 White solid	155~157	70.1	180.2
W-14	S	4-F	白色固体 White solid	192~194	42.6	198.2
W-15	S	4-OCH ₃	白色固体 White solid	166~168	73.7	210.2
W-16	S	4-NO ₂	黄色固体 Yellow solid	220~222	85.0	225.2
W-17	S	2-OH	浅黄色固体 Pale yellow solid	203~205	89.5	196.2
W-18	S	4-OH	浅黄色固体 Pale yellow solid	225~227	77.6	196.2

表 2 目标化合物的核磁共振氢谱

Table 2 ¹H NMR data of target compounds

编号 No	¹ H NMR (DM SO-d ₆), δ
W-01	7.42~7.47(m, 3H, AH), 7.85~7.89(m, 2H, AH), 8.17(s 1H, CH=N), 8.56(br 1H, NH ₂), 8.83(br 1H, NH ₂), 11.83(s 1H, NNH)
W-02	7.26~7.32(m, 2H, AH), 7.93~7.99(m, 2H, AH), 8.16(s 1H, CH=N), 8.61(s 1H, NH ₂), 8.85(s 1H, NH ₂), 11.84(s 1H, NNH)
W-03	3.81(s 3H, OCH ₃), 6.97~7.02(m, 2H, AH), 7.80~7.84(m, 2H, AH), 8.11(s 1H, CH=N), 8.47(br 1H, NH ₂), 8.77(br 1H, NH ₂), 11.72(s 1H, NNH)
W-04	8.17~8.20(m, 2H, AH), 8.24~8.29(m, 3H, AH + CH=N), 8.84(br 1H, NH ₂), 8.97(br 1H, NH ₂), 12.07(s 1H, NNH)
W-05	6.82~6.90(m, 2H, AH), 7.23~7.28(m, 1H, AH), 8.02~8.05(dd J ₁ =1.44 Hz, J ₂ =7.80 Hz 1H, AH), 8.47(s 1H, CH=N), 8.51(br 1H, NH ₂), 8.81(br 1H, NH ₂), 10.01(s 1H, OH), 11.73(s 1H, NNH)

续表 (Continued)

编号 No	$^1\text{H NMR}(\text{DM SO-d}_6), \delta$
W-06	6.79~6.83(m, 2H, A H), 7.67~7.72(m, 2H, A H), 8.06(s 1H, CH=N), 8.39(br 1H, NH ₂), 8.75(br 1H, NH ₂), 9.99(s 1H, OH), 11.68(s 1H, NNH)
W-07	6.49(br 2H, NH ₂), 7.34~7.42(m, 3H, A H), 7.70~7.73(m, 2H, A H), 7.84(s 1H, CH=N), 10.26(s 1H, NNH)
W-08	6.51(br 2H, NH ₂), 7.19~7.24(m, 2H, A H), 7.76~7.82(m, 3H, A H + CH=N), 10.25(s 1H, NNH)
W-09	3.78(s 3H, OCH ₃), 6.42(br 2H, NH ₂), 6.92~6.96(m, 2H, A H), 7.62~7.67(m, 2H, A H), 7.78(s 1H, CH=N), 10.10(s 1H, NNH)
W-10	6.69(br 2H, NH ₂), 7.93(s 1H, CH=N), 7.99~8.04(m, 2H, A H), 8.18~8.23(m, 2H, A H), 10.62(s 1H, NNH)
W-11	6.40(br 2H, NH ₂), 6.78~6.87(m, 2H, A H), 7.14~7.20(m, 1H, A H), 7.74~7.77(m, 1H, A H), 8.14(s 1H, CH=N), 10.02(br 1H, OH), 10.19(s 1H, NNH)
W-12	6.37(br 2H, NH ₂), 6.75~6.77(m, 2H, A H), 7.51~7.54(m, 2H, A H), 7.73(s 1H, CH=N), 9.73(s 1H, OH), 10.02(s 1H, NH)
W-13	7.38~7.44(m, 3H, A H), 7.78~7.81(m, 2H, A H), 8.00(s 1H, NH ₂), 8.05(s 1H, CH=N), 8.21(s 1H, NH ₂), 11.44(s 1H, NNH)
W-14	7.20~7.28(m, 2H, A H), 7.84~7.91(m, 2H, A H), 8.04(s 2H, CH=N + NH ₂), 8.20(s 1H, NH ₂), 11.40(s 1H, NH)
W-15	3.79(s 3H, OCH ₃), 6.94~6.98(m, 2H, A H), 7.71~7.76(m, 2H, A H), 7.92(s 1H, NH ₂), 8.12(s 1H, CH=N), 8.11(s 1H, NH ₂), 11.29(s 1H, NNH)
W-16	8.08~8.13(m, 3H, A H + CH=N), 8.21~8.26(m, 3H, A H + NH ₂), 8.41(s 1H, NH ₂), 11.72(s 1H, NNH)
W-17	6.79~6.88(m, 2H, A H), 7.18~7.24(m, 1H, A H), 7.90(d J = 7.05 Hz, 2H, A H + NH ₂), 8.11(s 1H, NH ₂), 8.37(s 1H, CH=N), 9.87(s 1H, OH), 11.37(s 1H, NNH)
W-18	6.76~6.80(m, 2H, A H), 7.59~7.64(m, 2H, A H), 7.83(s 1H, NH ₂), 7.95(s 1H, CH=N), 8.06(s 1H, NH ₂), 9.87(s 1H, OH), 11.25(s 1H, NNH)

表 3 目标化合物特征官能团的红外光谱数据

Table 3 IR data of target compounds

编号 No	R(KBr), ν / cm^{-1}					
	$\nu_{\text{N-H}_2}$	$\nu_{\text{N-H}}$	$\nu_{\text{C=C(Ar)}}$	$\nu_{\text{C=N}}$	$\nu_{\text{C=N(-NO}_2)}$	$\nu_{\text{C=O}}$ 或 $\nu_{\text{C=S}}$
W-01	3 455	3 340	1 580 1 400	1 518	1 607	
W-02	3 459	3 343	1 648 1 573	1 511	1 607	
W-03	3 477	3 399	1 669 1 409	1 517	1 618	
W-04	3 431	3 334	1 654 1 612	1 511	1 580	
W-05	3 449	3 332	1 585 1 492	1 522	1 624	
W-06	3 458	3 336	1 583 1 394	1 520	1 610	
W-07	3 458	3 286	1 689, 1 511, 1 429	1 649		1 598
W-08	3 461	3 281	1 690 1 507 1 432	1 644		1 601
W-09	3 453	3 281	1 689 1 509 1 436	1 647		1 605
W-10	3 446	3 162	1 524 1 438	1 680		1 603
W-11	3 492	3 278	1 522 1 489 1 448	1 696		1 589
W-12	3 473	3 261	1 607 1 509 1 451	1 684		1 583
W-13	3 402	3 145	1 585 1 533 1 489 1 447	1 601		1 285
W-14	3 391	3 158	1 533 1 504 1 461	1 600		1 294
W-15	3 402	3 152	1 535 1 510 1 473	1 602		1 244
W-16	3 489	3 141	1 525 1 450	1 579		1 286
W-17	3 442	3 170	1 537 1 489 1 463	1 605		1 265
W-18	3 359	3 194	1 586 1 553 1 509	1 609		1 268

目标物 IR 谱图中, 活泼氢 N—H 伸缩振动吸收峰位于 $3\ 500\sim\ 3\ 200\ \text{cm}^{-1}$, C=O 伸缩振动峰在 $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 附近, C=S 伸缩振动峰在 $1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 附近, C=N 伸缩振动峰在 $1\ 680\ \text{cm}^{-1}$ 附近。

目标物 $^1\text{H NMR}$ 谱图中, 由于硫脲和硝基胍的末端 C—N 键具有部分双键性质, 硝基胍和硫脲片段存在共振结构, 导致末端 NH_2 上的两个质子成为不等价质子, 明显呈现为两组峰。NH 由于受附近 C=N 键及 C=S 键的吸电子影响, 明显向低场偏移, 化学位移值在 10~12 之间。

2.2 生物活性

从化合物对小菜蛾酪氨酸酶的抑制活性结果(见表 4)可以看出, 取代苯甲醛缩氨基胍(硝基胍)类化合物(W-01~W-12)在 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 下对酶的抑制活性较差, 大部分低于对照药剂曲酸和托酚酮, 只有当苯环 4 位为羟基取代时(W-06 和 W-12), 活性与曲酸相当, 说明 4 位羟基取代可以提高活性, 这可能是由于 4 位羟基取代后与底物结构比较相似, 可作为酪氨酸酶的竞争性抑制剂^[14]; 而大部分取代苯甲醛缩氨基硫脲类化合物(W-13~W-18)对酶具有明显的抑制作用, 除苯环 4 位为硝基的 W-16 外, 其余 5 个化合物的抑制率均高于 99%, 优于曲酸和托酚酮, 值得进一步深入研究。

表 4 目标物在 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 下对小菜蛾酪氨酸酶的抑制活性

Table 4 Inhibiting activity of target compounds under $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ on tyrosinase of *Plutella xylostella* (L.)

编号 No	抑制率 Inhibition rate/ %	编号 No	抑制率 Inhibition rate/ %
W-01	3.2	W-11	—
W-02	12.5	W-12	54.1
W-03	15.9	W-13	99.8
W-04	11.4	W-14	99.8
W-05	3.1	W-15	99.8
W-06	56.1	W-16	—
W-07	5.9	W-17	99.5
W-08	—	W-18	100
W-09	8.7	曲酸 Kojic acid	52.5
W-10	—	托酚酮 Troponone	94.4

注: “—”表示无活性。Note: “—” means no activity.

通过比较取代苯甲醛缩氨基胍(硝基胍)类化合物(即 W-01~W-12)与取代苯甲醛缩氨基硫脲类化合物(即 W-13~W-18)的生物活性, 发现后者的抑制活性明显高于前者, 说明硫脲片段对生物活性具有决定性的作用, 因此, 在设计席夫碱类酪氨酸

酶抑制剂时, 应保留硫脲结构片段。

谨以此文敬贺钱传范教授八十华诞!

参考文献:

- [1] FENOLL L G, PENALVER M J RODRIGUEZ J N, et al Tyrosinase kinetics discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates [J]. *Int J Biochem Chem Cell Biol*, 2004, 36: 235–246.
- [2] D KON M. *Enzymes* [M]. New York: Academic Press, 1979: 1116–1118.
- [3] KUBO I, CHEN Q X, NHEI K J, et al Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors [J]. *Food Chem*, 2003, 81: 241–247.
- [4] RH H. *Chemistry of Insect Cuticle in the Physiology of Insect* [M]. New York: Academic Press, 1974: 216–270.
- [5] KASHAW S K, GUPTA V, KASHAW V, et al Anticonvulsant and sedative-hypnotic activity of some novel 3-[5-(4-substituted) phenyl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl]-2-styrylquinazolin-4(3H)-ones [J]. *J Med Chem Res*, 2010, 19(3): 250–261.
- [6] ALAGHAZ A M, AMMAR, A A. Preparation and characterization of some novel diphenyl phosphine hydrazones and semicarbazones and their metal complex derivatives [J]. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat Elem*, 2008, 183(11): 2827–2844.
- [7] COLLARD C C, RENSON M. Infrared spectra of substances having a C—Se bond adjacent to one or more nitrogen atoms II. Selenosemicarbazides [J]. *Bull Soc Chim Belg*, 1963, 72: 291–303.
- [8] JIE Xian-ye (解先业), JIANG Lin (姜林), XU E Cao-bin (薛超彬), et al 取代苯甲醛缩氨基硫脲的合成及其对昆虫酚氧化酶的抑制活性 [J]. *Chemical Reagents (化学试剂)*, 2007, 29(1): 34–36.
- [9] LIU J B, YI W, WAN Y Q, et al 1-(1-arylethylidene) thiosemicarbazide derivatives: a new class of tyrosinase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 1096–1102.
- [10] ZHANG Zheng (张政). Study on the synthesis and insecticidal activities of nitroarylideneamino guanidine derivatives (含硝基缩氨基胍类化合物的合成及其杀虫活性的研究) [D]. Beijing: China Agricultural University (中国农业大学), 2006.
- [11] McKAY A F. Nitroguanidines [J]. *Chem Rev*, 1952, 51: 301–346.
- [12] KONG Xiang-wen (孔祥文), ZHANG Jing (张静). 一锅法合成苯甲醛缩氨基胍 [J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2002, 19(2): 112–113.
- [13] LIANG Pei (梁沛), MENG Feng-xia (孟凤霞), GAO Xi-wu (高希武), et al 小菜蛾酪氨酸酶生物化学性质研究 [J]. *Acta Entomologica Sinica (昆虫学报)*, 2003, 46(5): 553–557.
- [14] KM Y J Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 1707–1723.

(责任编辑: 金淑惠)