

· 快 讯 ·

缩氨基硫脲化合物的合成及对菜青虫酚氧化酶抑制作用研究

李智聪¹, 马素娟¹, 潘志针¹, 杨美花¹, 秦 江¹, 陈清西^{1,2*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 厦门大学化学系生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 菜青虫是危害农作物的主要害虫, 酚氧化酶在昆虫的生长发育过程中起着重要的调节作用, 高效的酚氧化酶抑制剂对于发展新型“环境友好”杀虫剂有着重要的意义. 设计合成了 4 种缩氨基硫脲类化合物, 采用红外光谱、质谱和核磁共振谱对其进行结构鉴定, 进一步研究了它们对菜青虫酚氧化酶的抑制作用, 结果表明, 4 种化合物均有显著的抑制作用, 其半抑制率 IC_{50} 分别为 2.88, 0.93, 3.60 和 0.22 $\mu\text{mol/L}$, 有可能进一步开发成为以酚氧化酶为靶点的新型生物农药. 同时, 为基于缩氨基硫脲母核的酚氧化酶抑制剂的设计提供了数据基础.

关键词: 菜青虫; 酚氧化酶; 缩氨基硫脲; 合成; 抑制作用

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)05-0623-04

菜青虫 (*Pieris rapae* L.) 以十字花科蔬菜的叶片为食, 是一种在我国广泛存在的世界性的害虫, 每年全球用于菜青虫防治的费用高达 1 亿美金. 酚氧化酶 (Phenoloxidase, EC 1.14.18.1) 广泛存在于生物体内, 是昆虫体内的一种重要酶类, 在昆虫的变态发育和免疫系统中起着重要的作用^[1]. 大量研究证明, 酚氧化酶在昆虫蜕皮时的鞣化过程中起重要作用^[2]. 张宗炳指出: 探索新杀虫药剂的一条最有希望的途径是生物合理途径, 其中“原酪氨酸酶抑制剂”和“鞣化过程抑制剂”被列在第一、二位^[3]. 因此, 设计高效的酚氧化酶抑制剂作为杀虫剂具有广阔的应用前景. 缩氨基硫脲具有广泛的生物活性, 近年来, 该类化合物作为抗肿瘤、抗病毒、抗菌、除草剂与杀虫剂的候选化合物^[4], 引起了广泛的关注. 本文设计合成 4 种缩氨基硫脲类化合物, 研究合成化合物对菜青虫酚氧化酶的抑制效应.

1 材料与方法

1.1 材 料

菜青虫采自漳州市九湖镇菜园, 收集四龄幼虫置冰箱冷冻保存备用. 苯甲醛、4-甲氧基苯甲醛、氨基硫

脲均为上海国药集团产品; 4-氰基苯甲醛、4-氯苯甲醛和二甲亚砜 (DMSO) 均为 Sigma 公司产品; L-3,4-二羟基苯氨酸 (L-DOPA) 为 Aldrich 化学公司产品; 其他试剂均为国产分析纯; 使用的蒸馏水为重蒸水.

1.2 方 法

化合物的合成参考文献[5], 其合成线路如图 1 所示.

菜青虫酚氧化酶的提取方法参考文献[6], 并做适当的修改. 取四龄幼虫按 5 倍体质量的比例加入预冷的 0.20 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (pH 6.80), 冰浴匀浆, 冰箱 4 静置 60 min, 4 离心 (8 000 r/min) 30 min, 得上清液即为菜青虫酚氧化酶粗提液, 蛋白浓度测定采用 Bradford 法.

酚氧化酶的活力测定参考文献[7], 并作适当的修改. 在比色杯中先加入不同体积同一浓度的效应物 (溶于 DMSO 溶液) 和 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液以及 1 mmol/L L-DOPA 底物, 共 1.8 mL, 然后加入 200 μL 酶液, 立刻混匀, 测活体系共 2.0 mL. 于 Beckman DU650 分光光度计, 37 恒温下测定 475 nm 的光密度值随时间的增长直线, 从直线的斜率求得酶活力, 消光系数按 $3\ 700\ (\text{mol/L} \cdot \text{cm})^{-1}$ 计算. DMSO 终浓度都为 3.33%, 并在对照中排除其对酶的影响. 酶活力单位 (U) 定义为在该条件下, 每分钟产生 1 $\mu\text{mol/L}$ 产物的酶量.

2 实验结果

收稿日期: 2009-04-25

基金项目: 国家自然科学基金 (30570408, 20832005), 福建省重点科技项目 (2007N0051) 资助

* 通讯作者: chenqx @xmu.edu.cn

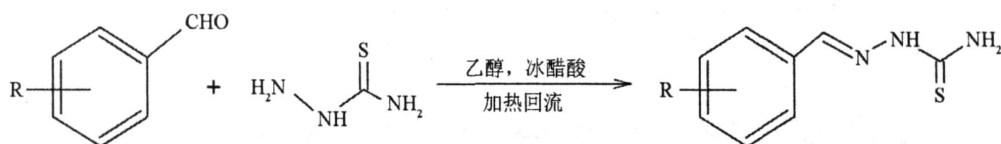


图1 缩氨基硫脲的合成路线图

化合物 a, b, c 和 d 分别为苯甲醛缩氨基硫脲, 4-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲, 4-氰基苯甲醛缩氨基硫脲和 4-氯苯甲醛缩氨基硫脲, 其中 R 分别为 H, 4-OCH₃, 4-CN 和 4-Cl

Fig. 1 Synthesis schedule of thiosemicarbazones

2.1 缩氨基硫脲类化合物的合成

有机合成得到 4 种缩氨基硫脲化合物 a, b, c 和 d 均为白色粉末状固体, 合成的产率分别为 70.7%, 89.5%, 82.7% 与 44.1%.

2.2 缩氨基硫脲类化合物的质谱分析

采用 Bruker ESQUIRE-LC ESI-MS 对合成化合物的分子量进行表征, 得到 4 种合成产物: 苯甲醛缩氨基硫脲(a)、4-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲(b)、4-氰基苯甲醛缩氨基硫脲(c) 和 4-氯苯甲醛缩氨基硫脲(d) 的分子量分别为 179.1, 210.1, 205.1 和 214.2. 图 2 为化合物 4-氯苯甲醛缩氨基硫脲(d) 的质谱图.

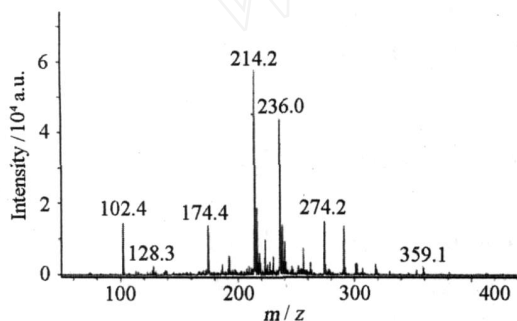


图2 4-氯苯甲醛缩氨基硫脲(d) 的 ESI-MS 谱图

Fig. 2 ESI-MS spectra of 4-chlorobenzaldehyde thiosemicarbazone (d)

2.3 缩氨基硫脲类化合物的红外光谱

采用 Thermo Nicolet Nexus 470 型傅立叶变换红外光谱仪对合成产物的结构进行表征, 得到如下结果:

化合物 (a): IR (KBr), cm^{-1} : 3 472 (NH₂); 3 358 (NH); 1 617 (C=N); 1 251 (C=S).

化合物 (b): IR (KBr), cm^{-1} : 3 418 (NH₂); 3 261 (NH); 1 624 (C=N); 1 293 (C=S).

化合物 (c): IR (KBr), cm^{-1} : 3 412 (NH₂); 3 219 (NH); 1 623, 1 609 (C=N); 1 282 (C=S).

化合物 (d): IR (KBr), cm^{-1} : 3 437 (NH₂); 3 281 (NH); 1 601 (C=N); 1 282 (C=S).

分析以上结果可知, 反应产物均在 1 600 cm^{-1} 左右出现 C=N 的吸收峰, 同时未发现芳香醛在 1 680

cm^{-1} 的吸收峰, 说明缩合反应进行完全.

2.4 缩氨基硫脲类化合物的核磁共振氢谱

采用 Bruker AV400 400 MHz 核磁共振仪对 4 种合成产物进行结构鉴定, 其氢谱的结果如下:

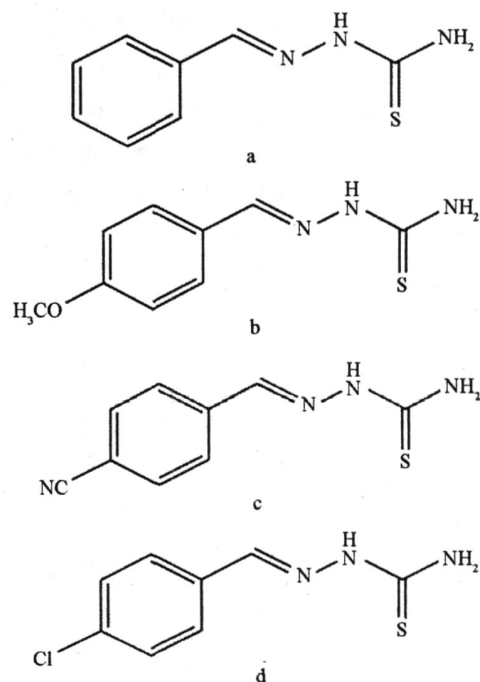
化合物 (a): ¹H-NMR (DMSO-d₆, TMS, 400 MHz): 11.43 (HN, s), 8.06 (CH, s), 7.79, 7.38 (C₆H₅, 5H, m), 8.21, 7.98 (NH₂, s).

化合物 (b): ¹H-NMR (DMSO-d₆, TMS, 400 MHz): 11.31 (HN, s), 8.00 (CH, s), 8.13, 7.92 (NH₂, d), 7.72 (C₆H₂, 2H, d), 6.95 (C₆H₂, 2H, d), 3.76 (OCH₃, 3H, s).

化合物 (c): ¹H-NMR (DMSO-d₆, TMS, 400 MHz): 11.42 (HN, s), 8.19 (CH, s), 7.95, 7.80 (C₄H₄, 4H, d), 8.21, 8.06 (NH₂, s).

化合物 (d): ¹H-NMR (DMSO-d₆, TMS, 400 MHz): 11.42 (HN, s), 8.02 (CH, s), 7.95, 7.40 (C₄H₄, d), 8.21, 8.04 (NH₂, s).

结合核磁共振氢谱与碳谱、红外光谱和质谱数据, 解析出化合物结构分别为:



其中 ,a、b、c 和 d 分别为 :苯甲醛缩氨基硫脲、4- 甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲、4- 氰基苯甲醛缩氨基硫脲和 4- 氯苯甲醛缩氨基硫脲. 结构表征的结果表明 ,本实验成功合成了上述 4 种缩氨基硫脲类化合物.

2.5 缩氨基硫脲类化合物对菜青虫酚氧化酶的抑制作用

以 *L*-DOPA 为底物 ,测定酚氧化酶的活性 ,酶反应的进程曲线为通过原点的一直线 ,产物的形成量与反应时间成正比关系 ,直线的斜率即为酶活力 ,表明酶催化 *L*-DOPA 氧化没有迟滞过程. 以合成的 4 种缩氨基硫脲类化合物为效应物 ,随着效应物浓度的增加 ,直线的斜率下降 ,说明 4 种效应物均对酚氧化酶活性有一定的抑制作用 ,其浓度效应见图 3. 使得酚氧化酶活力下降 50 % 所需要的抑制剂浓度 (IC_{50}) 分别为 2.88 , 0.93 , 3.60 和 0.22 $\mu\text{mol/L}$. 该结果表明 ,4 种合成的

缩氨基硫脲类化合物均对酶活力有显著的影响 ,苯环上对位的取代基的类型对抑制效应有影响 :当苯环的对位有甲氧基和氯原子取代时 ,缩氨基硫脲类化合物对菜青虫酚氧化酶的抑制活性分别提高了 3 倍和 14 倍 ;而苯环的对位被氰基取代时 ,缩氨基硫脲类化合物对菜青虫酚氧化酶的抑制活性略有降低.

3 讨 论

缩氨基硫脲类化合物是目前广受关注的一类具有抗菌、抗病毒的希夫碱类化合物 ,本文以乙醇和水作为溶剂 ,采用冰醋酸作为催化剂 ,合成了 4 种取代苯甲醛缩氨基硫脲类化合物 ,并采用红外光谱、质谱和核磁共

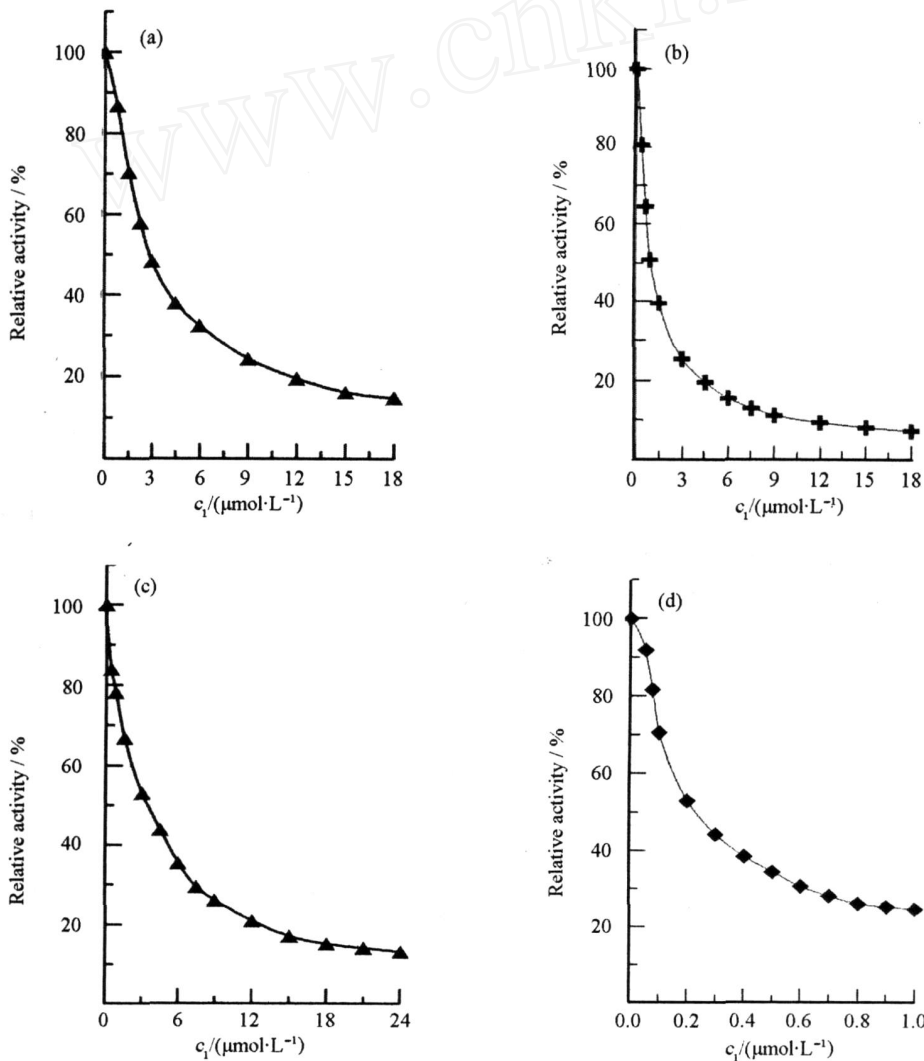


图 3 4 种缩氨基硫脲对菜青虫酚氧化酶的抑制作用效应
(a) ,(b) ,(c) ,(d) 分别为化合物 a ,b ,c ,d 对菜青虫酚氧化酶的抑制效应曲线

Fig. 3 Inhibitory effects of four thiosemicarbazones on the activity of phenoloxidase from fourth instars of *Pieris rapae* L.

振方法对其结构进行了表征,证实了合成方法的有效性。

菜青虫是菜粉蝶的幼虫,也是其危害农作物的主要形态,是在我国广泛存在的一种世界性的农作物害虫。在防治该害虫上,目前一般采用化学防治方法,但农药残留对人体和环境造成很大危害,因此,发展对人体安全对昆虫具专一作用的杀虫剂用于菜青虫的防治尤为重要。而酚氧化酶与菜青虫的生长发育和免疫息息相关,因此,酚氧化酶的高效抑制剂有可能成为新型的杀虫剂^[8]。本文的实验结果表明,苯甲醛缩氨基硫脲、4-甲氧基苯甲醛缩氨基硫脲、4-氰基苯甲醛缩氨基硫脲和4-氯苯甲醛缩氨基硫脲对菜青虫酚氧化酶粗酶液均有显著的抑制作用,与取代苯甲酸^[9]相比,活性提高了1 000倍以上,提示该类化合物有开发成为新型杀虫剂的潜力。但是其抑制机理以及对动植物的毒性仍需要进一步的研究。此外,本研究表明,对于取代苯甲醛缩氨基硫脲类化合物来说,当苯环的对位被氯原子和甲氧基取代时,可使得抑制作用增强。这为基于缩氨基硫脲母核的酚氧化酶抑制剂的设计提供了参考数据。

参考文献:

[1] Ashida M, Yamazaki H. Biochemistry of the phenoloxidase system in Insect: with special reference to its activation. [M]// Molting and metamorphosis. Ohnishi E, Ishizaki H (eds). Tokyo: Japan Science Society Press, 1990: 239 - 261.

- [2] Benjamin N D, Montgomery M W. Polyphenoloxidase of royal ann cherries: purification and characterization[J]. Food Sci, 1973, 38: 799 - 806.
- [3] 张宗炳,冷欣夫. 杀虫药剂毒力及应用[M]. 北京: 化学出版社, 1993: 331 - 337.
- [4] Xue C B, Li Z, Luo W C, et al. 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid, and their derivatives as phenoloxidase inhibitors[J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15: 2006 - 2015.
- [5] Zhu Y J, Song K K, Li Z C, et al. Antityrosinase and antimicrobial activities of trans-cinnamaldehyde thiosemicarbazone[J]. J Agri Food Chem, 2009, 57: 5518 - 5523.
- [6] Wang Q, Chen Q X, Huang X H, et al. Studies on the enzymatic characterization and functional groups of polyphenoloxidase from pupae of Blowfly (*Sarcophaga bullata*) [J]. Biochemistry Biokhimiia, 2004, 69 (8): 918 - 920.
- [7] 薛超彬,王勤,罗万春,等. 铜试剂对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用[J]. 昆虫学报, 2005, 48(1): 290 - 294.
- [8] Xie J J, Chen Q X, Wang Q, et al. Activation kinetics of cetylpyridinium chloride on the prophenol oxidase from pupae of blowfly (*Sarcophaga bullata*) [J]. Pesti Biochem Phy, 2007, 87: 9 - 13.
- [9] Wang Q, Ke L N, Xue C B, et al. Inhibitory kinetics of *p*-substituted benzaldehydes on polyphenol oxidase from the fifth instar of *Pieris rapae* L. [J]. Tsinghua Science and Technology, 2007, 12: 400 - 404.

Study on the Synthesis and Inhibitory Effects of Thiosemicarbazones on Phenoloxidase from *Pieris rapae* L.

LI Zhi-cong¹, MA Su-juan¹, PAN Zhi-zhen¹, YANG Mei-hua¹, QIN Jiang¹, CHEN Qing-xi^{1,2*}

(1. Key Lab. of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Key Lab. for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Pieris rapae* L. was a kind of insects harmful to vegetables. Phenoloxidase (PO) is responsible for enzymatic browning during the growth of the insects. It also is involved in the defense reaction and has some certain relation with the immune condition of the insects, and effective PO inhibitors are of great values in developing new, environment friendly pesticide. In this study, four thiosemicarbazone compounds were synthesized and indentified by IR, ES-MS and NMR. Furthermore, their inhibitory effects on PO from *Pieris rapae* L. were tested. Results showed that all four compounds showed great inhibitory effects. The IC_{50} , the inhibitor concentrations leading to 50% activity lost, were estimated to be 2.88, 0.93, 3.60 and 0.22 $\mu\text{mol/L}$. This meant that these four compounds had the potential to use as pesticide designing based on PO. Meanwhile, this study provided data to further inhibitor design.

Key words: *Pieris rapae* L.; phenoloxidase; thiosemicarbazone; synthesis; inhibitory effects