

4-取代基苯胺棉酚席夫碱的合成及脲酶抑制作用研究

廖俊健, 倪铁林, 廖浩然, 黄焯轩, 钱永盛, 陈敏, 卢其明*

(华南农业大学材料与能源学院生物材料研究所, 广州 510642)

摘要: 使用脲酶抑制剂能够降低脲酶的活性, 减缓尿素的水解, 是提高尿素利用率的有效途径。以天然产物棉酚为原料, 通过 N-取代基苯胺对其进行化学改性制备高效脲酶抑制剂苯胺棉酚席夫碱 (Gos-H), 氨基苯甲酸棉酚席夫碱 (Gos-COOH) 和氨基苯磺酸棉酚席夫碱 (Gos-SO₃H), 并探究其抑制土壤氨挥发的效果。结果表明, 棉酚及其衍生物均有较强的脲酶抑制活性。其对刀豆脲酶的抑制 IC₅₀ 值分别如下: Gos, 2.61×10⁻⁵ mol·L⁻¹; Gos-H, 9.93×10⁻⁵ mol·L⁻¹; Gos-COOH, 1.49×10⁻⁴ mol·L⁻¹ 和 Gos-SO₃H, 1.85×10⁻⁴ mol·L⁻¹。抑制土壤氨挥发的 IC₅₀ 值分别为: Gos, 5.74×10⁻⁵ mol·L⁻¹; Gos-H, 3.47×10⁻⁵ mol·L⁻¹; Gos-COOH, 2.27×10⁻⁵ mol·L⁻¹ 和 Gos-SO₃H, 1.75×10⁻⁵ mol·L⁻¹。总体来说, 改性引入的含 O 基团能够增加棉酚席夫碱的抑制能力。

关键词: 席夫碱; 脲酶; 脲酶抑制剂; 静态吸收法

中图分类号: S143.14

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)04-0627-05

Synthesis of 4-substituted-anilinegossypol Schiffbases and its inhibition on urease activity

LIAO Junjian, NI Tielin, LIAO Haoran, HUANG Zhuoxuan, QIAN Yongsheng, CHEN Min, LU Qingming
(Institute of Biomaterial, College of Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: Urease inhibitors are key factors to increase the efficiency of urea usage through reducing urease activity. In order to find novel urease inhibitors, phenylgossypol Schiffbase (Gos-H), benzoyloxy gossypol Schiffbase (Gos-COOH), and sulfonatephenyl gossypol Schiffbase (Gos-SO₃H) were synthesized through chemical modification from natural resource gossypol and their inhibitory effects on urease were studied. These compounds were applied to the red clay soil and the reduction of ammonia volatilization losses from urea with urease was determined. It was showed that gossypol and its derivatives had an excellent performance on inhibiting urease. IC₅₀ values of gossypol and its derivatives to jack bean urease were: Gos, 2.61×10⁻⁵ mol·L⁻¹; Gos-H, 9.93×10⁻⁵ mol·L⁻¹; Gos-COOH, 1.49×10⁻⁴ mol·L⁻¹, and Gos-SO₃H, 1.85×10⁻⁴ mol·L⁻¹. Schiffbases served as inhibitors for minimizing the ammonia volatilization losses from the red clay soil and their IC₅₀ values were: Gos, 5.74×10⁻⁵ mol·L⁻¹; Gos-H, 3.47×10⁻⁵ mol·L⁻¹; Gos-COOH, 2.27×10⁻⁵ mol·L⁻¹, and Gos-SO₃H, 1.75×10⁻⁵ mol·L⁻¹. In conclusion, the inhibition of Schiffbases was enhanced by the O-group modification from chemical treatments.

Key words: Schiff base; urease; urease inhibitor; static absorbing method

尿素由于其高含氮量而被广泛使用, 但是尿素表施到土壤后, 会在土壤脲酶的作用下迅速水解并生成氨气和二氧化碳而无法被植物吸收利用。脲酶, 也称尿素酰胺水解酶, 是一类广泛存在于植物、细菌、真菌、藻类和无脊椎动物中的酶, 不同来源的脲酶结构及性质会有一定差异^[1]。脲酶对尿素的催化具有高度专一性, 而且尿素在脲酶作用下, 水解

的速度非常快, 15 d 内分解率可达到 98%^[2]。这样尿素分解速度与植物对氮的吸收速度不同步会造成大量的氨挥发损失, 不仅造成空气的污染, 还大大降低了氮肥的利用率^[3-4]。同时会造成土壤中局部铵离子浓度过高和 pH 升高而阻止亚硝酸盐氧化至硝酸盐的进程, 致使亚硝酸盐积累, 造成烧苗现象^[5]。解决以上问题的主要途径之一就是抑制脲酶的活

收稿日期: 2015-03-02

基金项目: 国家自然科学基金 (31272241) 和广东省科技计划项目 (2012B020310003) 共同资助。

作者简介: 廖俊健, 硕士研究生。E-mail: 874164619@qq.com

* 通信作者: 卢其明, 博士, 教授。E-mail: qmlu@scau.edu.cn

性。为此国内外学者做出了许多的探索,开发出多个种类的脲酶抑制剂,主要包含磷胺类,酚醌类和杂环类3种。其中酚醌类主要特征是带有含O基团。

席夫碱是指含有亚胺基 C=N 的一类化合物,亦可称为亚胺。席夫碱及其衍生物作为螯合剂、稳定剂、分析试剂和液晶材料等广泛应用于化工生产和科学研究。已有研究表明一些天然产物有着抑菌或者抗肿瘤的作用^[6-7],也对脲酶有抑制作用^[8],其中就包括棉酚。通过将棉酚改性为席夫碱能够降低其毒性^[9],更有利于其应用。本文以棉酚为原料,用系列4-取代基苯胺对棉酚进行改性得到棉酚席夫碱,对棉酚衍生物具有的脲酶抑制活性进行初步探讨,考察了其抑制土壤氨挥发的效果,为脲酶抑制

剂应用于土壤提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

刀豆脲酶,活性为 $1.7 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,购自上海金穗生物科技有限公司。棉酚(>98%)由陕西慈缘生物工程技术有限公司提供。

供试土壤自广州华南农业大学校区草坪采集,为红壤,基本理化性质:有机质含量为 $19.1 \sim 37.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,全氮含量为 $0.87 \sim 1.58 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,全磷含量为 $0.61 \sim 0.64 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,pH 为 $5.0 \sim 5.5$ 土壤采集后铺平风干,过 100 目筛,装袋备用。采集地与实验的基本概况见表 1。

表 1 采集地的基本概况

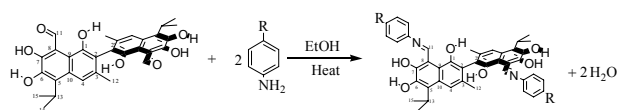
Table 1 Basic status of sampling region

地区 Region	气候条件 Weather situation	地理坐标 Geographic coordinate	海拔/m Altitude	年均气温/ $^{\circ}\text{C}$ Mean annual temperature	年均降水量/mm Mean annual precipitation	无霜期/d Frostfree period	年均日照时数/h Mean annual sunshine
广州 Guangzhou	热带季风海洋气候 Tropical monsoon marine climate	$23^{\circ}16'\text{N}$ $113^{\circ}37'\text{E}$	8.8	21.8	1657	365	1862

主要仪器与试剂包括分析天平,真空旋转蒸发仪,电动搅拌器,分光光度计(V5600,上海元析有限公司)指示剂为甲基红与次甲基蓝 2:1 的混合试剂,其他所用试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 衍生物的合成 参照文献^[10]的方法,选取棉酚为醛基提供试剂,利用 4-取代基苯胺的氨基对棉酚的醛基进行修饰,反应总方程式如下:



其中 $R_1=\text{H}$, 对应的化合物为 4-H-棉酚席夫碱(Gos-H); $R_2=\text{COOH}$, 对应的化合物为 4-COOH-棉酚席夫碱(Gos-COOH); $R_3=\text{SO}_3\text{H}$, 对应的化合物为 4-SO₃H-棉酚席夫碱(Gos-SO₃H)。合成并提纯后得到产品 Gos-H 为淡黄色绒状固体,产率约 78%。产品 Gos-COOH 为橙黄色粉末状固体,产率约 63%。产品 Gos-SO₃H 为橙红色粉末状固体,产率约 57%。

1.2.2 对刀豆脲酶的抑制实验 于 25 mL 比色管中加入不同浓度的抑制剂,定容至 10 mL 刻度线后加入 600 μL 浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的脲酶溶液,将比色管置于温度 37°C 的水浴锅中预先培养 1 h 后取出,加入 5 mL 蒸馏水,1 mL 10% 尿素溶液,置于 37°C 水浴锅继续培养 0.5 h,培养完后,向各容量瓶分别加入 3 mL 水杨酸钠溶液,充分摇匀,0.2 mL 亚硝

基铁氰化钠溶液,0.5 mL 次氯酸钠溶液,最后蒸馏水定容至刻度线。置于 37°C 水浴锅中显色 1 h,取出充分冷却,以无脲酶添加作为参比,无脲酶抑制剂添加作为空白组,采用水杨酸-次氯酸钠盐分光光度法^[11]用 10 mm 比色皿于 697.5 nm 处测定吸光度值。

1.2.3 抑制土壤氨挥发试验 将 40 g 土与一定量的抑制剂混匀,放入 500 mL 广口瓶中,加入适量蒸馏水,摇匀,再加入 1.72 g 的尿素,摇匀,将 20 mL 含 2% 硼酸以及加入了指示剂的 50 mL 吸收皿一并放入广口瓶中,置于事先调好温度的培养箱中培养。培养 1 d 取出,用浓度为 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸溶液进行滴定,直到吸收皿内溶液呈暗红色且 30 s 内颜色不改变为止,记录硫酸的用量,计算出氨气的释放量。测到的氨气量可反映出土壤脲酶的活性,将无抑制剂处理的样本作为空白(CK)。

2 结果与分析

2.1 棉酚及其衍生物对刀豆脲酶活性的抑制效果

以棉酚及其衍生物的不同浓度对应其对尿素酶抑制率作图,并且进行 S 曲线拟合(Sigmoidal fit)。

IC_{50} 值,即将酶促反应抑制至 50% 时所需要的抑制剂的浓度,可体现抑制剂的作用效果。棉酚及其衍生物对刀豆脲酶抑制的 IC_{50} 值汇总于表 2 中,另外加入硫脲作为标准参照物。

表 2 棉酚及其衍生物抑制刀豆脲酶的 IC_{50} 值Table 2 IC_{50} values of gossypol and its derivatives on jack bean urease

化合物 Compound	$IC_{50}/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
硫脲 Thiourea	5.70×10^{-4}
Gos	2.61×10^{-5}
Gos-H	9.93×10^{-5}
Gos-COOH	1.49×10^{-4}
Gos-SO ₃ H	1.85×10^{-4}

从表 2 可以看到, 棉酚及其衍生物都有着优秀的脲酶抑制性, 均比硫脲的 IC_{50} 值低。

2.2 不同用量抑制剂抑制土壤氨挥发效果

采用静态吸收法^[12]研究棉酚席夫碱抑制土壤氨挥发的效果。其效果如何对于脲酶抑制剂在农业中的应用有着重大的意义。以抑制率为纵坐标, 抑制剂浓度为横坐标, 棉酚及其衍生物抑制土壤氨挥发的效果如图 1 所示, 其中 I 为抑制率, C 为浓度。

通过对曲线进行拟合后计算得到各物质抑制土壤氨挥发效果的 IC_{50} 值为: Gos, $5.74\times 10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Gos-H, $3.47\times 10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Gos-COOH, $2.27\times 10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 Gos-SO₃H, $1.75\times 10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

从图 1 可知, 棉酚衍生物对土壤氨气挥发的减缓作用不同, 效果最好的是 4-磺酸基-棉酚席夫碱 (Gos-SO₃H), 比棉酚的 IC_{50} 值小, 即比棉酚的抑

制能力强。另外 Gos-H 和 Gos-COOH 的抑制能力相当, 且都比原料棉酚的抑制能力强。总体来说, 4-取代苯胺对棉酚的改性可以得到令人满意的结果。

4-磺酸基-棉酚席夫碱的抑制能力突出, 与其磺酸基有着重大的关系。很多的细菌抑制剂结构中都有磺酸基, 进入细菌后通过抑制其生长达到杀菌效果。邱业先等^[13]的研究也指出, 很多的脲酶抑制剂可以抑制产脲酶细菌的生长。初步预测 4-磺酸基-棉酚席夫碱对土壤脲酶的抑制是相似机理。

另外对比化合物 Gos-H, Gos-COOH 和 Gos-SO₃H 的结构可以发现, Gos-COOH 和 Gos-SO₃H 带有含 O 基团, 抑制能力均比没有含 O 基团的 Gos-H 强。带有含 O 基团的衍生物抑制能力较强, 这与很多的酚醌类脲酶抑制剂的特征性基团结构一致, 预示着本系列的抑制土壤脲酶潜力。

2.3 温度对棉酚席夫碱抑制土壤氨挥发的影响

选取了 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃和 45℃等 6 个不同温度的处理, 另外设置不加抑制剂的为对照 (CK), 其余培养条件一样, 培养 1 d 后取出, 测定硼酸吸收的氨气量。以氨气的检出量为纵坐标, 温度为横坐标, 席夫碱 Gos-H, Gos-COOH 和 Gos-SO₃H 及 CK 不同温度下土壤脲酶活性如图 2 所示。

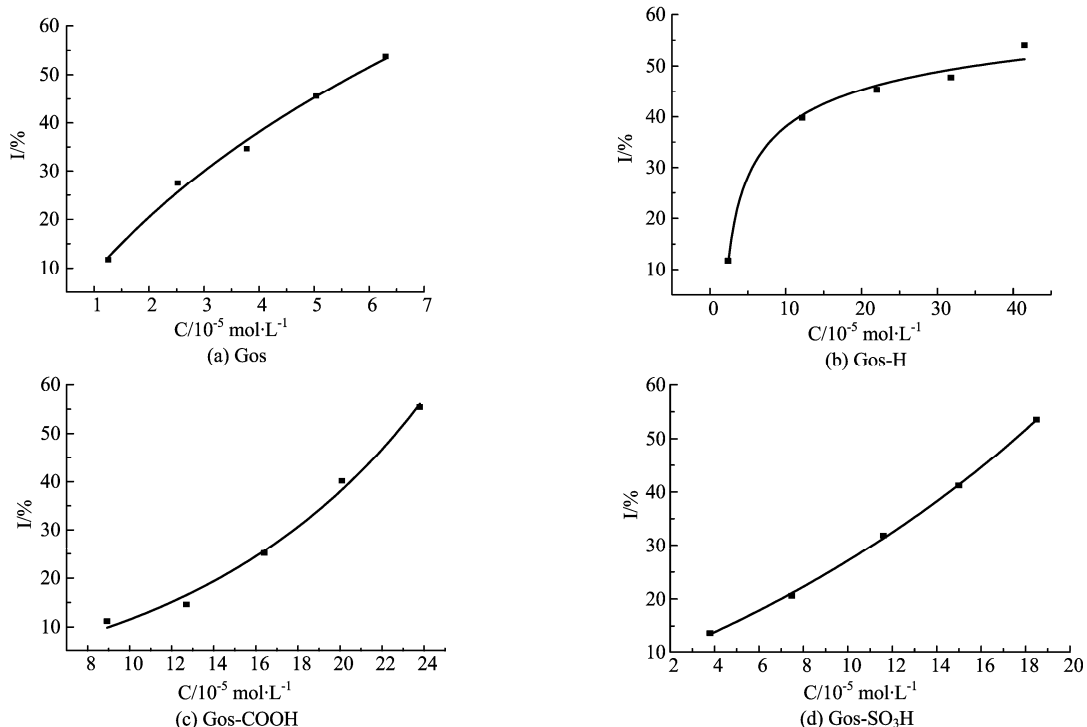


图 1 棉酚及其衍生物不同用量抑制土壤氨挥发效果

Figure 1 Inhibition of different usage of gossypol and its derivatives on soil ammonia volatilization

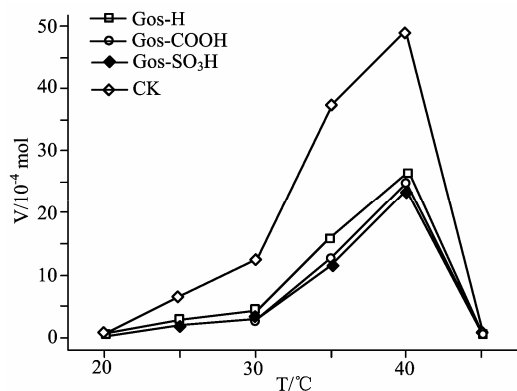


图 2 不同温度时在抑制剂作用下的土壤脲酶活性

Figure 2 Inhibition of inhibitors on soil urease under different temperatures

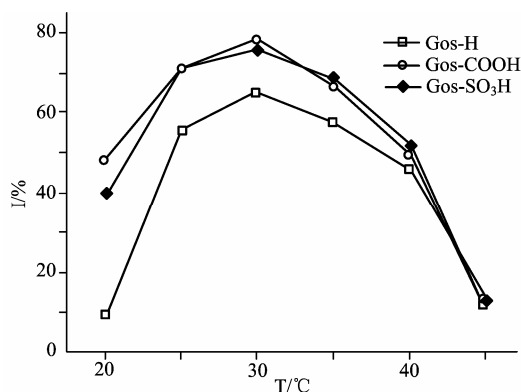


图 3 温度对席夫碱抑制土壤氨挥发能力的影响

Figure 3 Effects of temperature on Schiffbase inhibiting soil ammonia volatilization

从图 2 中的曲线可以看出,随着温度的增加,氨气的释放量逐渐增加,在约 40℃处有着最大的氨气释放量,说明该温度下土壤脲酶的活性最高或者是产脲酶的微生物活性最高。当温度继续升高到 45℃之后脲酶的活性大幅度降低,基本与 20℃时的活性持平。这表明温度过低时(温度小于 25℃)脲酶的生物活性会受阻,但是过高的温度(温度大于 45℃)会反过来抑制脲酶的活性,说明脲酶或者产脲酶的微生物耐热性不强,对温度非常敏感。

另外以抑制率为纵坐标,温度为横坐标,化合物对土壤氨挥发的抑制效果如图 3 所示。

从图 3 中可以看到,3 种席夫碱对土壤氨挥发的抑制都呈现先升后降的趋势。席夫碱 Gos-H 和 Gos-COOH 的抑制能力相当,都较 Gos-SO₃H 的抑制作用强,与前述结论一致。对比图 2 和图 3 可知,从 25℃开始棉酚席夫碱显著地减缓土壤氨挥发的增长。

不同温度时脲酶抑制率的变化规律为: 25~40

℃,几种抑制剂的抑制率达 50%以上,最高抑制率出现在 30℃。反映出席夫碱的抑制性也有不同的变化规律:低温时投入抑制剂与 CK 的活性相差不大,均接近 0;当温度从 30℃达到 45℃这一个范围时,抑制率均有下降,是因为在 30℃左右可能是脲酶适宜的催化温度,脲酶活性较高,抑制剂的抑制作用相对降低;较高温度时初期差距较小,后期差距扩大;高温时初期差距较大,后期不再扩大。这种差距反映土壤脲酶的活性与脲酶抑制剂作用的特征:低温时土壤脲酶活性低,主要是温度显示抑制作用;适宜温度时土壤脲酶活性高,相对地突出抑制剂对土壤脲酶活性的抑制作用;高温时土壤脲酶本身的活性降低,使不同抑制剂抑制性的差异减少。

3 小结与讨论

选取棉酚为原料,分别以苯胺、对氨基苯甲酸和对氨基苯磺酸对棉酚的醛基基团进行修饰,得到系列棉酚席夫碱,并以得到的化合物作为新型的脲酶抑制剂进行抑制活性研究。对棉酚的改性不仅可以降低棉酚的毒性,还能保护棉酚的酚羟基^[14]。

实验结果表明各化合物对刀豆脲酶活性以及土壤氨挥发都具有抑制作用,且随着浓度增加,抑制效果越好。棉酚,各个席夫碱抑制刀豆脲酶活性 IC_{50} 值分别为: Gos, $2.61 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Gos-H, $9.93 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Gos-COOH, $1.49 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 Gos-SO₃H, $1.85 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 棉酚与 3 个席夫碱对土壤氨挥发的抑制率达到 50%所需要的浓度分别为: Gos, $5.74 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Gos-H, $3.47 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Gos-COOH, $2.27 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 Gos-SO₃H, $1.75 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这说明对棉酚的改性能得到令人满意的效果。

温度对酶促水解反应和抑制反应综合作用的结果是低温时土壤脲酶活性低,低温的抑制起主导作用;适宜温度时土壤脲酶活性高,相对地突出席夫碱对土壤脲酶活性的抑制作用;高温时土壤脲酶本身的活性降低,使不同席夫碱抑制性的差异减少。带有含 O 基团的席夫碱在不同温度下和不同用量时均表现出更强的抑制能力,说明改性引入的含 O 基团能够增强席夫碱的抑制作用。

对比棉酚衍生物抑制刀豆脲酶和土壤氨挥发的结果可以发现,两者的抑制情况有所不同,可能是因为土壤中的脲酶与刀豆脲酶差异较大。研究者通常把抑制剂对刀豆脲酶的抑制实验结果作为初步筛选的手段,但是在将初步筛选得到的脲酶抑制剂应用到土壤时,要根据土壤的种类,性质等实际条件

做出调整以达到最优效果。

参考文献:

- [1] Krajewska B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review [J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2009, 59(1/3): 9-21.
- [2] 陈轶雄, 陈敏, 张宗毅, 等. 醋酸棉酚对土壤脲酶活性的抑制作用[J]. *水土保持学报*, 2012, 26(1): 219-222.
- [3] You Z L, Zhou P. Synthesis, characterization and crystal structures of a pair of azido-bridged polynuclear Schiff base copper (II) complexes with urease inhibitory activity [J]. *Transit Metal Chem*, 2008, 33(4): 453-457.
- [4] Shi D H, You Z L, Xu C, et al. Synthesis, crystal structure and urease inhibitory activities of Schiff base metal complexes[J]. *Inorg Chem Commun*, 2007, 10(4): 404-406.
- [5] 许欢, 周波, 张池, 等. 赤红壤地区不同熟化程度旱地理化特性及酶活性差异研究[J]. *广东农业科学*, 2014(9): 79-82.
- [6] Ngan L T M, Moon J, Shibamoto T, et al. Growth-inhibiting, bactericidal, and urease inhibitory effects of *Paeonia lactiflora* root constituents and related compounds on antibiotic-susceptible and -resistant strains of *Helicobacter pylori*[J]. *J Agr Food Chem*, 2012, 60(36): 9062-9073.
- [7] 张慷华. 牛磺酸棉酚的合成与抗肿瘤作用的研究[D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [8] Olech Z, Zaborska W, Kot M. Jack bean urease inhibition by crude juices of *Allium* and *Brassica* plants. Determination of thiosulfates[J]. *Food Chem*, 2014, 145(1): 154-160.
- [9] Przybylski P, Bejcar G, Huczynski A, et al. ¹H- and ¹³C-NMR, FTIR, UV-VIS, ESI-MS, and PM5 studies as well as emission properties of a new Schiff base of gossypol with 5-methoxytryptamine and a new hydrazone of gossypol with dansylhydrazine[J]. *Biopolymers*, 2006, 82(5): 521-535.
- [10] Yang J, Zhang F, Li J, et al. Synthesis and antiviral activities of novel gossypol derivatives[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(3): 1415-1420.
- [11] 胡小玲, 吴鹏. 水杨酸—次氯酸盐测定水中氨氮方法的改进[J]. *干旱环境监测*, 2005(3): 184-185.
- [12] 孙克君, 毛小云, 卢其明, 等. 几种控释氮肥减少氨挥发的效果及影响因素研究[J]. *应用生态学报*, 2004, 15(12): 2347-2350.
- [13] 邱业先, 汪金莲, 陈尚研, 等. 茶多酚对产脲酶菌生长和脲酶分泌的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2002, 8(1): 119-121.
- [14] Yang J, Li J, Yang J, et al. Synthesis and anti-HIV-1 activity of the conjugates of gossypol with oligopeptides and *d*-glucosamine [J]. *Chinese Chem Lett*, 2014, 25(7): 1052-1056.