

苯二醛缩氨基硫脲的合成及其酪氨酸酶抑制活性研究

唐文健, 刘兆明, 殷泽法, 盛筱*, 王守信* (济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘要: 目的 合成苯二醛单缩和二缩氨基硫脲类化合物, 并初步研究其抑制酪氨酸酶的活性和作用机制。方法 以 5 种苯二醛和氨基硫脲为原料, 通过缩合反应合成 9 个目标化合物; 采用蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法和酶抑制动力学实验, 测定目标化合物对酪氨酸酶的抑制活性和作用机制; 选择化合物 **3a** 和 **4a** 进行抑制机制和抑制动力学研究。结果 目标化合物的结构经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及 MS 确证; 所有化合物抑制酪氨酸酶的活性均优于对照药物曲酸; 苯二醛二缩氨基硫脲 **3a-3d** 的活性明显强于相应的单缩氨基硫脲 **4a-4d**; 化合物 **3a** 和 **4a** 对酪氨酸酶的抑制作用均表现为混合型可逆抑制作用。结论 苯二醛二缩氨基硫脲类化合物具有优异的抑制酪氨酸酶的活性, 值得进一步深入研究。

关键词: 酪氨酸酶抑制剂; 缩氨基硫脲; 合成; 机制

中图分类号: R914.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)07-0809-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.07.008

引用本文: 唐文健, 刘兆明, 殷泽法, 等. 苯二醛缩氨基硫脲的合成及其酪氨酸酶抑制活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 809-815.

Synthesis and Tyrosinase Inhibitory Activities of Phthalaldehyde Thiosemicarbazones

TANG Wenjian, LIU Zhaoming, YIN Zefa, SHENG Xiao*, WANG Shouxin* (School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize phthalaldehyde mono- and dithiosemicarbazones and evaluate their tyrosinase inhibitory activities and inhibition mechanisms. **METHODS** Nine target compounds were synthesized through condensation reaction between thiosemicarbazide and 5 phthalaldehydes. The tyrosinase inhibitory activities and mechanisms of the target compounds were determined by measuring the rate of oxidation of L-3-hydroxytyrosine(L-DOPA) and enzyme inhibition kinetics experiment, respectively. The inhibition mechanisms and kinetics of selected compounds **3a** and **4a** were investigated. **RESULTS** The structures of the target compounds were confirmed by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and MS. The activity test showed that all the obtained compounds displayed potent tyrosinase inhibitory activity more than kojic acid, and the phthalaldehyde dithiosemicarbazones **3a-3d** showed significantly stronger activity than the corresponding monothiosemicarbazones **4a-4d**. Compounds **3a** and **4a** were belonged to the reversible and mixed type tyrosinase inhibitors. **CONCLUSION** The phthalaldehyde dithiosemicarbazones have excellent tyrosinase inhibitory activity, which deserve further study.

KEYWORDS: tyrosinase inhibitor; thiosemicarbazone; synthesis; mechanism

酪氨酸酶(tyrosinase, Tyr, EC 1.14.18.1)是一种广泛存在于动植物和微生物中的含铜金属酶, 在多种生理和病理过程中发挥着重要作用^[1-2]。在哺乳动物中, Tyr 是参与黑色素生物合成的关键酶^[3], Tyr 过度活跃会造成人体内黑色素过量表达, 引起一系列色素沉淀性皮肤病, 严重者可导致恶性黑色素瘤^[4]。研究表明, Tyr 还与免疫应答和多巴胺毒性加剧有关, 可引起神经退行性疾病的发生, 如帕金森病^[5]和阿尔茨海默病^[6]。此外, 水果和蔬菜的褐变以及昆虫蜕皮和伤口愈合也与 Tyr 的活性直接相关^[7-8]。因此, 研究开发高效、安全的 Tyr 抑制剂在医药、化妆品、农业和食品工业中备受

关注。

迄今为止, 文献报道了大量天然和人工合成的 Tyr 抑制剂, 如曲酸及其衍生物^[9]、查尔酮类化合物^[10]、黄酮类化合物^[11]、硫脲衍生物^[12]和香豆素衍生物^[13]等。但由于安全性和活性较弱等原因, 仅有曲酸、熊果苷、苯基硫脲等少数化合物被投入到实际应用中。因此, 仍需努力寻找理想的新型 Tyr 抑制剂。芳基缩氨基硫脲(PTSC)是一类具有重要生物学功能和药理作用的化合物, 近些年被广泛用于抗肿瘤^[14]、抗病毒^[15]、抗寄生虫^[16]、抗菌^[17]、抗阿尔茨海默病^[18]等领域药物的研发中。PTSC 类化合物因结构中存在 N-C-S 三齿配位骨

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2015BL008); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201610443067); 济宁医学院大学生创新训练计划项目(cx2015057)

作者简介: 唐文健, 男 Tel: (0633)2983692 E-mail: 1228284796@qq.com *通信作者: 盛筱, 女, 硕士, 实验师 Tel: (0633)2983692 E-mail: shengxiao1234@126.com 王守信, 男, 博士, 副教授 Tel: (0633)2983692 E-mail: shouxinwang@126.com

架,具有优良的过渡金属螯合能力^[19],使其在金属酶抑制剂尤其是 Tyr 抑制剂的研究中受到越来越多的关注^[20-22]。近几年,研究者们相继合成了大量高效、低毒的 PTSC 类 Tyr 抑制剂^[23-26]。

研究 PTSC 类化合物与 Tyr 的结合模式发现^[27],大多数化合物通过其氨基硫脲基团上的硫原子与酶活性中心的双铜离子配位,从而抑制了酶的活性。Xu 等^[24]研究发现,当 PTSC 芳环上含有乙酰氧甲基时,化合物会与 Tyr 产生不同的结合模式。乙酰氧甲基中的羰基氧原子和缩氨基硫脲上的硫原子会分别与一个铜离子配位,这种结合模式可能增强了抑制剂与酶的相互作用。

同时研究发现,另一种类型的芳香二缩氨基硫脲(DPTSC)可与 2 个铜离子通过不同方式配位^[28],而当缩氨基硫脲基团的邻位含有酚羟基时,酚羟基也会与铜离子配位,产生特殊的配位方式^[29]。因此,如果在芳环中同时引入 2 个缩氨基硫脲基团和羟基时,也可能会改变其与 Tyr 中 2 个铜离子的配位方式,进而可能提高其抑制 Tyr 的活性。本研究以苯二醛和氨基硫脲为原料,合成一系列苯二醛二缩氨基硫脲类化合物,并初步考察苯二醛二缩氨基硫脲较单缩氨基硫脲对 Tyr 抑制活性和抑制机制的影响,为以后更好开发 PTSC 类 Tyr 抑制剂提供参考。目标化合物的合成路线见图 1,结构式见表 1。

1 仪器与试剂

X-4 数字显示显微熔点测定仪(河南巩义英峪予华仪器有限公司),温度计未经校正;中科牛津 WNMRI-400 MHz 核磁共振波谱仪(武汉中科波谱技术有限公司),DMSO-*d*₆ 为溶剂,TMS 为内标;Xevo G2 Q-TOF 液质联用仪(美国 Waters 公司)。DNM-9602G 酶标分析仪(北京普朗新技术

有限公司);BSA124S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

氨基硫脲(批号:W6102060250;纯度:99%)、邻苯二甲醛(批号:A0301000250;纯度:98%)、对苯二甲醛(批号:A0300770250;纯度:98%)、间苯二甲醛(批号:A0300930050;纯度:98%)均购自萨恩化学技术(上海)有限公司;4-羟基间苯二甲醛(上海贤鼎生物科技有限公司,批号:OR465;纯度:98%);2,6-二甲酰-4-甲基苯酚(上海毕得医药科技有限公司,批号:BD7626;纯度:98%);曲酸(批号:M17775;纯度:99%)、3-羟基-L-酪氨酸(*L*-3-hydroxytyrosine, *L*-DOPA, 批号:M20939;纯度:99%)、3-甲基-2-苯并噻唑酮腙盐酸盐(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine hydrochloride, MBTH, 批号:M07058;纯度:98%)均购自上海迈瑞尔化学技术有限公司。其余试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 合成

苯二醛二缩氨基硫脲 **3a~3e** 的合成:将 0.67 mmol 苯二甲醛,1.33 mmol 氨基硫脲,15 mL 乙醇置于 100 mL 圆底烧瓶中,加入催化量的对甲苯磺酸,控制油浴 90 °C,搅拌回流 2 h, TLC 监测显示已无原料;冷却至室温,析出大量固体,抽滤,乙醇洗涤,干燥得到纯的产物。

对苯二甲醛二缩氨基硫脲(**3a**):淡黄色固体,收率 74.3%, m.p. > 250 °C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.49(s, 2H), 8.24(s, 2H), 8.08(s, 2H), 8.04(s, 2H), 7.84(s, 4H); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.96, 141.59, 135.38, 127.51; ESI-MS(*m/z*): 理论值(C₁₀H₁₃N₆S₂) 281.063 8[M+H]⁺; 实测值 281.064 3[M+H]⁺。

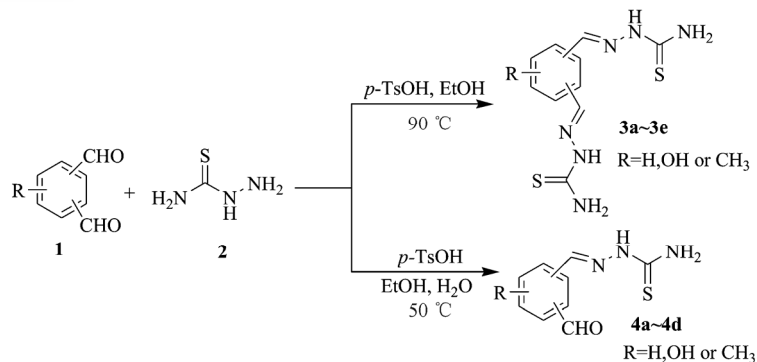


图 1 苯二醛缩氨基硫脲类化合物的合成路线

Fig. 1 Synthetic routes of phthalaldehyde thiosemicarbazones

表1 目标化合物的结构及抑制 Tyr 活性

Tab. 1 Structures and Tyr inhibitory activity of all target compounds

化合物	结构	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	化合物	结构	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
3a		2.80	4a		16.71
3b		2.41	4b		37.93
3c		5.24	4c		23.03
3d		2.64	4d		31.42
3e		27.06	曲酸		77.58

间苯二甲醛二缩氨基硫脲(**3b**): 白色固体, 收率89.2%, m.p.>247~248 °C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.53(s, 2H), 8.26(s, 2H), 8.23(s, 1H), 8.10(s, 2H), 8.06(s, 2H), 7.80(dd, 2H, *J*=1.2 Hz, *J*=7.8 Hz), 7.42(t, 1H, *J*=7.7 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 178.05, 141.63, 134.75, 129.01, 128.70, 125.52; ESI-MS(*m/z*): 理论值(C₁₀H₁₃N₆S₂) 281.063 8[M+H]⁺; 实测值 281.064 5[M+H]⁺。

4-羟基间苯二甲醛二缩氨基硫脲(**3c**): 淡黄色固体, 收率 88.3%, m.p.>250 °C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.43(s, 1H), 11.38(s, 1H), 10.39(s, 1H), 8.37(s, 1H), 8.29(s, 1H), 8.17(s, 1H), 8.13(s, 1H), 8.07(s, 1H), 7.97(s, 1H), 7.93(s, 1H), 7.68(dd, 1H, *J*=1.8 Hz, *J*=8.5 Hz), 6.89(d, 1H, *J*=8.5 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.74, 177.58, 157.94, 142.16, 138.46, 130.10, 125.70, 125.54, 120.74, 116.37; ESI-MS(*m/z*): 理论值(C₁₀H₁₃N₆OS₂) 297.058 7[M+H]⁺; 实测值297.059 1[M+H]⁺。

5-甲基-2-羟基间苯二甲醛二缩氨基硫脲(**3d**): 黄色固体, 收率86.8%, m.p.>250 °C; ¹H-NMR

(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.47(s, 2H), 9.56(s, 1H), 8.33(s, 2H), 8.19(s, 2H), 8.09(s, 2H), 7.64(s, 2H), 2.26(s, 3H); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.63, 152.72, 141.27, 130.45, 128.85, 120.83, 19.86; ESI-MS(*m/z*): 理论值(C₁₁H₁₅N₆OS₂) 311.074 3[M+H]⁺; 实测值311.075 3[M+H]⁺。

邻苯二甲醛二缩氨基硫脲(**3e**): 淡棕色固体, 收率65.9%, m.p. 165~167 °C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.60(s, 2H), 8.57(s, 2H), 8.33(s, 2H), 7.93~7.96(m, 2H), 7.89(s, 2H), 7.40~7.44(m, 2H); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.88, 141.80, 131.96, 129.56, 128.89; ESI-MS(*m/z*): 理论值(C₁₀H₁₂N₆NaS₂) 303.045 7[M+Na]⁺; 实测值 303.046 9[M+Na]⁺。

苯二醛单缩氨基硫脲 **4a~4d** 的合成: 将 2.41 mmol 苯二醛加入到250 mL两颈烧瓶中, 溶于50 mL乙醇中, 加入催化量的对甲苯磺酸, 加热至50 °C。然后将2.19 mmol氨基硫脲溶于30 mL水, 缓慢滴至对苯二甲醛中。将混合溶液50 °C加热搅拌反应4.5 h, TLC监测已无原料; 冷却至室温, 析出大量固体, 抽滤, 水洗, 干燥, 得固体粗产物。用乙醇和水重结晶得纯的固体。

对苯二甲醛单缩氨基硫脲(**4a**): 黄色固体, 收率 70.4%, m.p. >250 °C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.64(s, 1H), 10.01(s, 1H), 8.35(s, 1H), 8.18(s, 1H), 8.10(s, 1H), 8.03(d, 2H, *J*=8.1 Hz), 7.91(d, 2H, *J*=8.1 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 192.66, 178.31, 140.61, 139.87, 136.48, 129.71, 127.76; ESI-MS(*m/z*): 理论值(C₉H₁₀N₃OS) 208.053 9[M+H]⁺; 实测值 208.054 8[M+H]⁺。

间苯二甲醛单缩氨基硫脲(**4b**): 淡黄色固体, 收率 72.7%, m.p. 210~212 °C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.55(s, 1H), 10.03(s, 1H), 8.33(s, 1H), 8.30(s, 1H), 8.15(d, 1H, *J*=8.0 Hz), 8.13(s, 2H), 7.90(d, 1H, *J*=7.6 Hz), 7.62(t, 1H, *J*=7.6 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 192.85, 178.18, 140.82, 136.62, 135.27, 132.76, 129.72, 129.49, 128.79; ESI-MS(*m/z*): 理论值(C₉H₁₀N₃OS) 208.053 9[M+H]⁺; 实测值 208.054 9[M+H]⁺。

3-甲酰基-4-羟基苯甲醛缩氨基硫脲(**4c**): 白色固体, 收率 90.6%, m.p. >250 °C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.49(s, 1H), 11.09(s, 1H), 9.86(s, 1H), 8.58(s, 1H), 8.38(s, 1H), 8.23(s, 1H), 8.06(s, 1H), 7.75(d, 1H, *J*=8.7 Hz), 7.03(d, 1H, *J*=8.4 Hz); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 191.02, 177.92, 161.49, 137.58, 130.79, 128.75, 121.08, 116.86, 116.61; ESI-MS(*m/z*): 理论值(C₉H₁₀N₃O₂S) 224.048 8[M+H]⁺; 实测值 224.050 2[M+H]⁺。

5-甲基-2-羟基间苯二甲醛单缩氨基硫脲(**4d**): 黄色固体, 收率 86.1%, m.p. >250 °C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.52(s, 1H), 10.92(s, 1H), 10.05(s, 1H), 8.37(s, 1H), 8.24(s, 1H), 8.21(s, 1H), 8.10(s, 1H), 7.60(s, 1H), 2.31(s, 3H); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 195.72, 177.94, 156.65, 137.07, 134.20, 134.13, 129.06, 122.11, 121.79, 19.72; ESI-MS(*m/z*): 理论值(C₁₀H₁₂N₃O₂S) 238.064 5[M+H]⁺; 实测值 238.065 7[M+H]⁺。

2.2 Tyr 活性抑制试验

参照文献报道的蘑菇 Tyr 多巴速率氧化法^[23], 并稍做修改。使用 *L*-DOPA 作为底物, 曲酸作为阳性对照。将待测化合物用 DMSO 溶解, 配制成

10 mol·L⁻¹ 的储备液, 然后用 pH=7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)稀释成至少 8 个不同浓度的溶液。反应在 96 孔培养板中进行, 总反应体系 300 μL。在测活体系中依次加入 111 μL PBS 溶液, 6 μL Tyr, 3 μL Tyr 抑制剂, 混匀后加入 60 μL MBTH (5 mmol·L⁻¹) 溶液, 120 μL *L*-DOPA(2.5 mmol·L⁻¹) 溶液, 充分混匀后室温反应 10 min, 然后往体系中加入 300 μL 乙腈终止反应; 取 200 μL 混合溶液用酶标仪于 490 nm 波长下测量其吸光度, 最后计算 Tyr 的抑制率。

$$\text{Tyr 抑制率} = [1 - (A_1 - A_2) / (A_3 - A_4)] \times 100\%$$

其中 *A*₁: 加抑制剂和酶的混合液所测的吸光度; *A*₂: 加抑制剂而未加酶的混合液所测的吸光度; *A*₃: 未加抑制剂加酶的混合液所测的吸光度; *A*₄: 未加抑制剂亦未加酶的混合液所测的吸光度。每次实验重复测试 3 次, 最终用 graphpad prism 6 软件计算得到化合物的 IC₅₀ 值。

2.3 抑制 Tyr 活性机制的判断

固定 *L*-DOPA 的浓度不变, 将 Tyr 稀释成 2.7, 5.4, 8.1, 10.7 μg·mL⁻¹, 将抑制剂稀释成终浓度分别为 0.5, 2, 5, 10 μmol·L⁻¹ 的溶液。通过测定酶促反应的速度与酶浓度之间的关系, 以及不同浓度的抑制剂对酶促反应(催化氧化 *L*-DOPA)的影响, 然后以酶活力(*Y* 轴)对酶浓度(*X* 轴)作图, 从而判断抑制剂对酶的抑制机制。

2.4 抑制 Tyr 活性类型的判断

固定 Tyr 的浓度 10.7 μg·mL⁻¹, 将抑制剂稀释成终浓度分别为 4, 8, 12, 16 μmol·L⁻¹ 的溶液, 将 *L*-DOPA 配制成浓度分别为 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mmol·L⁻¹ 的溶液。测定不同浓度的抑制剂对 Tyr 酶活力的影响。通过 Lineweaver-Burk 双倒数图法, 来判断抑制剂的抑制类型。将得到的直线斜率和截距对样品浓度进行二次作图, 使用二次作图的斜率与截距数据来计算相应的抑制常数。

3 结果与讨论

3.1 目标化合物的合成

苯二醛二缩氨基硫脲的合成相对简单, 只需将苯二醛与氨基硫脲按 1:2 当量投料, 于乙醇中 90 °C 加热, 2 h 即可反应完全, 且产物直接从溶剂中析出。而在苯二醛单缩氨基硫脲的合成中, 为保证只有一个醛基参与反应, 反应过程中要严格控制苯二醛始终过量, 因此需将氨基硫脲缓慢滴

至苯二醛的乙醇溶液中。反应温度控制在50~60℃之间为宜,温度过高醛基会被氧化而导致副产物生成。为了增加原料氨基硫脲的溶解性并使产物从反应液中析出,可将氨基硫脲溶于水,滴至反应体系中。此外,因邻苯二甲醛对空气和光敏感,反应时应避光并用惰性气体保护,在此条件下,可顺利得到邻苯二甲醛二缩氨基硫脲**3e**;但邻苯二甲醛单缩氨基硫脲在空气和溶液中均非常容易变质,最终无法得到纯的产物。

3.2 目标化合物抑制 Tyr 活性结果

所有目标化合物均具有一定的抑制 Tyr 的活性,且优于对照药曲酸。苯二醛二缩氨基硫脲**3a~3d**具有优异的抑制 Tyr 的活性,明显强于其相应的苯二醛单缩氨基硫脲**4a~4d**,这表明在苯二醛结构中多引入1个氨基硫脲基团,能提高目标化合物抑制 Tyr 的活性。邻苯二甲醛二缩氨基硫脲**3e**的活性明显比间位和对位苯二醛二缩氨基硫脲**3a~3d**要差,原因可能是由于2个缩氨基硫脲基团处在邻位,造成了空间位阻较大,影响了**3e**与酶活性中心的结合;化合物**3a~3d**的活性相差不大,说明当2个缩氨基硫脲基团处在间位和对位以及有羟基取代基存在时,对化合物的活性影响不大。结果见表1。

3.3 化合物 3a 和 4a 抑制 Tyr 机制的判定

选择化合物**3a**和**4a**作为研究对象,测定不同浓度化合物**3a**和**4a**对酶催化氧化L-DOPA活力的影响。以酶活力对Tyr浓度作图,2组直线均通过原点,结果见图2。随着体系中抑制剂浓度的增加,直线的斜率均逐渐降低,说明化合物**3a**和**4a**与Tyr的结合均是可逆过程,即酶活力降低不是因为Tyr量的减少所致,而是化合物**3a**和**4a**对Tyr抑制作用的结果^[23]。以上结果表明,化合物**3a**和**4a**具有相同的抑制Tyr的机制,即多引入一个氨基硫脲基团并没有改变该类抑制剂与酶的作用机制。

3.4 化合物 3a 和 4a 抑制 Tyr 类型的判定

在测活体系中,固定Tyr的浓度,改变L-DOPA浓度,测定不同浓度的化合物**3a**和**4a**对酶活力的影响,采用Lineweaver-burk双倒数作图。结果见图3。图中的2组直线均交于第二象限中的一点,说明化合物**3a**和**4a**抑制Tyr活性的类型均为混合

型,即化合物**3a**和**4a**不仅能与游离的酶结合,还可以与酶-底物的复合物结合^[24]。再分别以双倒数直线的斜率和截距对化合物**3a**和**4a**浓度进行二次作图(如图3中的内插图所示),通过所得直线的斜率与截距可以计算出化合物**3a**和**4a**的抑制常数 K_I (抑制剂与酶的亲合能力)和 K_{IS} (抑制剂对酶-底物复合物的亲合能力)。计算公式如下:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_{IS}}\right)$$

其中 v 、 K_m 、 V_m 分别为反应速率,米氏常数,以及最大反应速率; $[I]$ 和 $[S]$ 分别是抑制剂的浓度和底物浓度。

通过计算得出,化合物**3a**的抑制常数 K_I 为 $8.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_{IS} 为 $17.98 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;化合物**4a**的抑制常数 K_I 为 $12.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_{IS} 为 $26.67 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由此可见,化合物**3a**和**4a**与酶的亲合能力均强于它们与酶-底物复合物的亲合能力;且**3a**与酶或酶-底物复合物的亲合能力均比**4a**强,即**3a**比**4a**具有更强的抑制Tyr的作用,这与表1的活性测试结果一致。

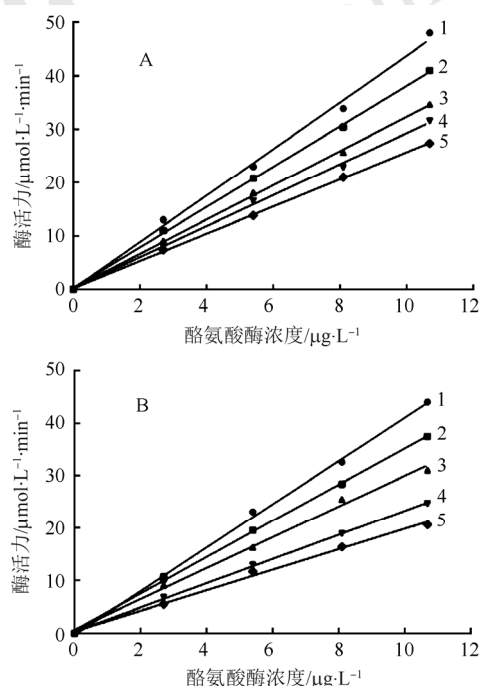


图2 化合物**3a**和**4a**对酪氨酸酶的抑制机制
A—化合物**3a**中曲线1~5的浓度分别为0, 0.5, 2, 5和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
B—化合物**4a**中曲线1~5的浓度分别为0, 0.5, 2, 5和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。
Fig. 2 Inhibitory mechanism of compounds **3a** and **4a** on Tyr

A—concentrations of compound **3a** for curves 1–5 were 0, 0.5, 2, 5 and $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; B—concentrations of compound **4a** for curves 1–5 were 0, 0.5, 2, 5 and $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

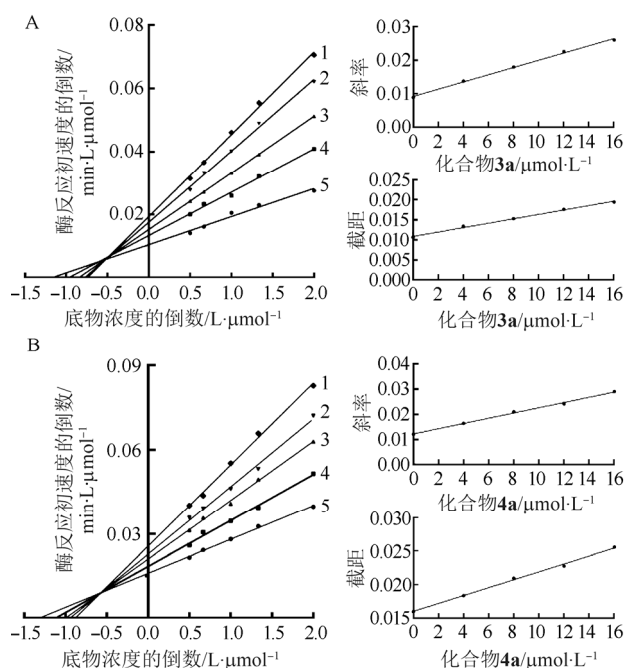


图3 化合物 **3a** 和 **4a** 对酪氨酸酶的抑制类型和抑制常数测定
A—化合物 **3a** 中曲线 1~5 的浓度分别为 16, 12, 8, 4 和 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
B—化合物 **4a** 中曲线 1~5 的浓度分别为 16, 12, 8, 4 和 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。
Fig. 3 Inhibition type and inhibition constant of compounds **3a** and **4a** on Tyr
A—concentrations of compound **3a** for curves 1–5 were 16, 12, 8, 4 and 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; B—concentrations of compound **4a** for curves 1–5 were 16, 12, 8, 4 and 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

4 结论

本研究以 5 种苯二醛和氨基硫脲为原料, 合成了 9 个苯二醛单缩和二缩氨基硫脲类化合物。初步活性测试结果表明, 苯二醛二缩氨基硫脲具有优异的抑制 Tyr 活性, 明显强于其相应的单缩氨基硫脲, 这表明在苯二醛结构中多引入 1 个氨基硫脲基团, 能显著提高目标化合物抑制 Tyr 的活性。初步作用机制和动力学研究结果表明, 对苯二醛二缩氨基硫脲 **3a** 和单缩氨基硫脲 **4a** 对 Tyr 均表现为混合型可逆抑制机制, 即多引入 1 个氨基硫脲基团并没有改变目标化合物的抑制机制和类型, 但化合物 **3a** 相比 **4a** 具有更强的与酶以及酶-底物复合物的亲和能力, 这可能是苯二醛二缩氨基硫脲类化合物活性增强的重要原因。综上, 苯二醛二缩氨基硫脲类化合物具有优异的抑制 Tyr 的活性, 可作为新的 Tyr 抑制剂先导化合物进一步研究和开发。

REFERENCES

[1] CASANOLA-MARTIN G M, LE-THI-THU H, MARRERO-

PONCE Y, et al. Tyrosinase enzyme: 1. An overview on a pharmacological target [J]. Curr Top Med Chem, 2014, 14(12): 1494-1501.

- [2] LAI X, WICHES H J, SOLER-LOPEZ M, et al. Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins [J]. Chem-Eur J, 2018, 24(1): 47-55.
- [3] MIRICA L M, VANCE M, RUDD D J, et al. Tyrosinase reactivity in a model complex: an alternative hydroxylation mechanism [J]. Science, 2005, 308(5370): 1890-1892.
- [4] BUITRAGO E, HARDRE R, HAUDECOEUR R, et al. Are human tyrosinase and related proteins suitable trgets for melanoma therapy? [J]. Curr Top Med Chem, 2016, 16(27): 3033-3047.
- [5] BIZZARRI B M, MARTINI A, SERAFINI F, et al. Tyrosinase mediated oxidative functionalization in the synthesis of DOPA-derived peptidomimetics with anti-Parkinson activity [J]. RSC Adv, 2017, 7(33): 20502-20509.
- [6] WU Y, LIU J, WU Z R. Effect of *N-trans*-feruloyloctopamine from garlic skin on alzheimer's disease model rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学杂志), 2015, 32(12): 1437-1439.
- [7] SHAO L, WANG X, CHEN K, et al. Novel hydroxypyridinone derivatives containing an oxime ether moiety: Synthesis, inhibition on mushroom tyrosinase and application in anti-browning of fresh-cut apples [J]. Food Chem, 2018, 242: 174-181.
- [8] SUGUMARAN M. Comparative biochemistry of Eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects [J]. Pigment Cell Res, 2002, 15(1): 2-9.
- [9] XIE W, ZHANG H, HE J, et al. Synthesis and biological evaluation of novel hydroxybenzaldehyde-based kojic acid analogues as inhibitors of mushroom tyrosinase [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27(3): 530-532.
- [10] ZHANG X, HU X, HOU A, et al. Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(1): 86-90.
- [11] ORHAN I E, KHAN M T. Flavonoid derivatives as potent tyrosinase inhibitors -a survey of recent findings between 2008-2013 [J]. Curr Top Med Chem, 2014, 14(12): 1486-1493.
- [12] LARIK F A, SAEED A, CHANNAR P A, et al. Design, synthesis, kinetic mechanism and molecular docking studies of novel 1-pentanoyl-3-arylthioureas as inhibitors of mushroom tyrosinase and free radical scavengers [J]. Eur J Med Chem, 2017(141): 273-281.
- [13] ASHRAF Z, RAFIQ M, SEO S Y, et al. Design, synthesis and bioevaluation of novel umbelliferone analogues as potential mushroom tyrosinase inhibitors [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2015, 30(6): 874-883.
- [14] ELSAYED H E, EBRAHIM H Y, HAGGAG E G, et al. Rationally designed hecogenin thiosemicarbazone analogs as novel MEK inhibitors for the control of breast malignancies [J]. Bioorg Med Chem, 2017, 25(24): 6297-6312.
- [15] KESEL A J. Broad-spectrum antiviral activity including human immunodeficiency and hepatitis C virusesmediated by a novel retinoid thiosemicarbazone derivative [J]. Eur J Med Chem, 2011, 46(5): 1656-1664.
- [16] CARVALHO C S, MELO E J, TENORIO R P, et al. Anti-parasitic action and elimination of intracellular Toxoplasma gondii in the presence of novelthiosemicarbazone and its 4-thiazolidinone derivatives [J]. Braz J Med Biol Res,

- 2010, 43(2): 139-149.
- [17] HASSAN, S S. Antibacterial, DFT and molecular docking studies of Rh(III) complexes of coumarinyl-thiosemicarbazone nuclei based ligands [J]. Appl Organomet Chem, 2018, 32(3): e4170.
- [18] EL-SAIED F A, SALEM T A, SHAKDOFA M M E. Anti-neurotoxic evaluation of synthetic and characterized metal complexes of thiosemicarbazone derivatives [J]. Appl Organomet Chem, 2018, 32(4): e4215. Doi: 10.1002/aoc.4170. 4215.
- [19] MOORTHY N S, CERQUEIRA N M, RAMOS M J, et al. Aryl- and heteroaryl-thiosemicarbazone derivatives and their metal complexes: a pharmacological template [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2013, 8(2): 168-182.
- [20] LI M, YU Y, LIU J, et al. Investigation of the interaction between benzaldehyde thiosemicarbazone compounds and xanthine oxidase [J]. J Mol Struct, 2018(1159): 23-32.
- [21] CAVUSOĞLU B K, SAĞLIK B N, OSMANIYE D, et al. Synthesis and biological evaluation of new thiosemicarbazone derivative schiff bases as monoamine oxidase inhibitory agents [J]. Molecules, 2017, 23(1): e60. Doi: 10.3390/molecules.23010060.
- [22] ROGOLINO D, BACCHI A, DE LUCA L, et al. Investigation of the salicylaldehyde thiosemicarbazone scaffold for inhibition of influenza virus PA endonuclease [J]. J Biol Inorg Chem, 2015, 20(7): 1109-1121.
- [23] SONG S, YOU A, CHEN Z, et al. Study on the design, synthesis and structure-activity relationships of new thiosemicarbazone compounds as tyrosinase inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2017(139): 815-825.
- [24] XU J, LIU J, ZHU X, et al. Novel inhibitors of tyrosinase produced by the 4-substitution of TCT [J]. Food Chem, 2017(221): 1530-1538.
- [25] YOU A, ZHOU J, SONG S, et al. Structure-based modification of 3-/4-aminoacetophenones giving a profound change of activity on tyrosinase: from potent activators to highly efficient inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2015(93): 255-262.
- [26] YI W, DUBOIS C, YAHIAOUI S, et al. Refinement of arylthiosemicarbazone pharmacophore in inhibition of mushroom tyrosinase [J]. Eur J Med Chem, 2011, 46(9): 4330-4335.
- [27] DONG H, LIU J, LIU X, et al. Molecular docking and QSAR analyses of aromatic heterocycle thiosemicarbazone analogues for finding novel tyrosinase inhibitors [J]. Bioorg Chem, 2017(75): 106-117.
- [28] LOBANA T S, SHARMA R, BAWA G, et al. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals—an overview [J]. Coord Chem Rev, 2009, 253(7): 977-1055.
- [29] SELEEM H S, EL-SHETARY B A, KHALIL S M E, et al. Structural diversity in copper(II) complexes of bis(thiosemicarbazone) and bis(semicarbazone) ligands [J]. J Coord Chem, 2005, 58(6): 479-493.

收稿日期: 2018-06-10
(本文责编: 沈倩)