

N,N' -二苯基脲的合成及其生物活性研究

耿会玲¹, 张航行², 麻妙峰¹, 吴文君¹, 周 乐^{1*}

(1. 西北农林科技大学 理学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 咸阳市渭城区第一初中, 陕西 咸阳 712000)

摘 要:采用一种新的方法——氯甲酸甲酯法合成了新型植物生长调节剂 N,N' -二苯基脲。该反应分两步进行, 即在三正丁胺存在下, 苯胺与氯甲酸甲酯加热回流生成苯胺基甲酸甲酯, 后者不经分离再与过量苯胺继续反应, 生成目标产物。第一步反应很快, 回流 30 min 即可; 通过正交试验得出第二步反应的最佳条件为: 反应体系在 120℃ 回流 3.0 h, 产物的产率为 90.5 %。采用 IR、MS、¹H NMR 和 ¹³C NMR 对其结构进行表征。以丰光萝卜种子为材料, 采用萝卜子叶扩张生长法测定其促进细胞分裂的活性, 结果表明: 该化合物在 0.01~1.00 mg·L⁻¹ 浓度范围内能显著促进萝卜子叶生长, 浓度为 1.00 mg·L⁻¹ 时活性最高。

关键词: N,N' -二苯基脲; 有机合成; 生物活性

中图分类号: O625.63⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1001-7461(2009)06-0139-03

Synthesis and Biological Activity of N,N' -Diphenylurea

GENG Hui-ling¹, ZHANG Hang-xing², MA Miao-feng¹, WU Wen-jun², ZHOU Le¹

(1. College of Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. No. 1 Junior School of Weicheng District, Xianyang, Shaanxi 712100, China)

Abstract: N,N' -diphenylurea was synthesized by a novel and simple method. First, aniline reacts with methyl chloroformate in the presence of tri-*n*-butylamine; then the unseparated mixture then reacts with aniline to get final product. The first step was quick, and finished within 30 min of refluxing. The best reaction conditions of the second step was confirmed by the orthogonal experiment. Its yield was 90.5 % when the reagents were refluxed for 3.0 h at 120℃. Its structure was elucidated by IR, MS, ¹H NMR and ¹³C NMR. Its biological activity of promoting Radish Fengguang cell split was tested by the method of radish cotyledon stretching growth. The results showed that the synthesized compound promoted radish cotyledon growing effectively when its concentrations ranged from 0.01 mg·L⁻¹ to 1.00 mg·L⁻¹. Furthermore, it had the highest bioactivity at the concentration of 1.00 mg·L⁻¹.

Key words: N,N' -diphenylurea; organic synthesis; biological activity

细胞分裂素具有促进细胞分裂、诱导植物器官形成、抑制植物衰老等生理活性, 对植物生长发育有多方面的调节作用, 因而在科学研究和农业生产中应用广泛, 在生产上主要用于防止果树生理落果、促进果实发育、防止植物衰老、延长蔬菜贮藏时间等。苯基脲型细胞分裂素是 20 世纪 70 年代合成的一类新型农用生物活性物质, 但植物体内并不存在苯基脲类衍生物及其活性类似物。近年来, 科研人员致

力于合成各种具有较高活性的该类化合物, 并取得了可喜的成绩, N,N' -二苯基脲为国外科研工作者研究开发的该类化合物之一。1955 年, Shantz 等^[1]发现椰乳中的 N,N' -二苯基脲具有促进离体培养的植物细胞分裂的活性。此后大量的应用实例证明, 它比国内使用的嘌呤系列植物生长调节剂更为优越, 具有广泛的生物活性和低毒性等特点, 生产上主要用于农作物的杀虫、杀菌、除草和调节生长, 而

收稿日期: 2009-01-05 修回日期: 2009-02-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571402)

作者简介: 耿会玲, 女, 讲师, 在读博士研究生, 主要从事有机合成研究。

* 通讯作者: 周乐, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事有机合成和天然产物化学研究。

调节植物细胞生长是其最典型的活性特征;同时, N,N' -二苯基脲还可用于合成氨苯磺胺^[2-3]。

国内外合成这一化合物的方法有光气法^[4-5]、草酰氯法^[6]、取代脲法^[7-10]、 CO_2 合成法^[11]、叠氮钠法^[12]等,其中光气法和草酰氯法经常使用。笔者曾尝试过这两种方法,发现它们第一步反应产物苯基异氰酸酯相当活泼,在空气(室温)中很容易聚合,给下一步反应带来困难;此外,光气毒性较大,必须做好安全与环保措施,给生产带来较大困难,因此有必要建立一种简单易行的合成方法。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

丰光萝卜种子由陕西省农业科学院种子公司提供。

所用试剂均为国产分析纯,其中,苯胺、三正丁胺、氯甲酸甲酯、甲基苯胺购自青岛试剂厂。

所用仪器主要有 DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂)、KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、SHB-B95 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)、RE-52 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、254 nm 紫外分析仪(上海科艺光学仪器厂)、EB-280 型电子读数天平(上海物理光学仪器厂)、WRS-1A 型数字熔点仪(上海物理光学仪器厂)、Bio-Rad FTS-135 型红外光谱仪(KBr 压片,德国 Bio 公司生产)、VG Auto Spec-3000 型质谱仪(英国 VG 公司生产)、Bruker DPX400、100 核磁共振仪(以 TMS 为内标)、薄层层析硅胶(G 和 GF254)为青岛海洋化工厂生产。

1.2 化合物的合成方法

向 250 mL 圆底烧瓶中依次加入 9.32 g(0.1 mol)苯胺和 27.75 g(0.15 mol)三正丁胺,在冰水冷却搅拌下逐滴加入 14.18 g(0.15 mol)氯甲酸甲酯,反应放热并伴有大量气体生成。10 min 后有淡黄色粘稠固体产生,待不再有气体放出时加入 1.8 g(0.1 mol)蒸馏水,室温搅拌 30 min,使其充分反应后加热至 75℃,回流 30 min。再向反应瓶中加入 13.97 g(0.15 mol)苯胺,加热至 120℃使其回流,反应液逐渐由淡黄色变为浅棕色。反应 3 h 后,冷却至室温,加入 50 mL 无水乙醇,在搅拌下缓慢倒入 250 mL 蒸馏水中,生成土黄色絮状沉淀。在 4℃条件下静置过夜,次日抽滤,沉淀用水洗涤 3 次。无水乙醇重结晶 2 次,100℃干燥 2 h,得到 19.21 g 晶体,产率为 90.5%。

1.3 生物活性测定

将萝卜种子撒播在垫有湿润滤纸的培养皿里,

于 26.0℃黑暗条件下发芽,大约 48 h 后,从幼苗上取下子叶,彻底去除下胚轴,选取大小一致的子叶作为实验材料^[14];把待测物用 2 mmol·L⁻¹的磷酸缓冲液配置成 10.000、1.000、0.100、0.010、0.001 mg·L⁻¹的溶液,再量取 3 mL 待测液,加到垫有滤纸的培养皿(Φ 9 cm)中,然后在每个培养皿中放入称量过的 8 对子叶;培养皿放在垫有湿润滤纸的盘子内,再把盘子放到合适大小的塑料袋内以维持其内的湿度。整个培养物在 25℃且连续光照的条件下培养 3 d,然后测定子叶的鲜重。以磷酸缓冲液培养的子叶作对照,最后计算每处理子叶的平均鲜重,每试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 最佳反应条件

苯胺和氯甲酸甲酯在三正丁胺中反应后,再与苯胺进行第二步反应生成 N,N' -二苯基脲,也可将两步反应连续进行。第一步反应较快,回流 30 min 即反应完全。第二步反应较慢,是决定整个反应速度和产率的关键步骤。因此,为了确定其最佳反应条件,在第二步反应中设计了 3 因素 2 水平的正交试验,以反应温度和反应时间为主要因素,对目标化合物进行正交试验(表 1)。

表 1 化合物的正交试验结果

Table 1 Orthogonal experiment

试验号	反应温度/℃	反应时间/h	产率/%
1	110	2.0	81.9
2	110	3.0	82.8
3	110	4.0	82.0
4	120	2.0	85.5
5	120	3.0	90.5
6	120	4.0	86.0
7	130	2.0	82.1
8	130	3.0	84.1
9	130	4.0	83.3

正交试验表明,该化合物的最佳反应条件为:当第二步反应加入苯胺的量为 0.15 mol,反应温度为 120℃,回流时间为 3 h,产物的收率为 90.5%。因为苯胺比较昂贵,第一步反应中苯胺的量为 0.10 mol,使其他试剂过量来摸索反应的物料比,发现其他试剂均过量 50%时的产率较高,所以,合成产物的适宜工艺条件为:苯胺、氯甲酸甲酯和三正丁胺的量比为 1.0 : 1.5 : 1.5。

由于第二步发生加成-消除反应,消除反应很容易进行,而加成反应则较慢,对整个反应速率起决定作用。苯胺的氨基氮原子上有孤电子而对带部分负电荷,苯胺基甲酸甲酯的羰基碳原子因吸电子共轭效应和诱导效应而带部分正电荷,反应时带负电荷的氨基氮原子进攻带部分正电荷的羰基碳原子,形

成一个反应中间体,这一过程需要的能量较高,所需回流时间较长。这一过程完成后消去一分子甲醇即可得到 *N,N'*-二苯基脲。

尽管在设定的温度和时间范围内,温度和时间都对产率有一定的影响,但总体差异不大。因此,从经济的角度考虑,表1中1号化合物所对应的反应条件可作为制备该化合物的适宜条件。

2.2 产物的谱学特征

N,N'-二苯基脲: $C_{13}H_{12}N_2O$, 白色针状晶体 (EtOH), m. p. 239.3—239.7°C (Lit. 241–242°C)^[15]; IR (KBr, cm^{-1}): 3 325 (酰胺氮氢键, 中), 3 136 (酰胺氮氢键, 中强), 2 362, 2 335, 1 945, 1 872 (苯环的复合频和倍频谱带, 弱), 1 721 (苯环, 弱), 1 649 (酰胺羰基, 强), 1 596 (苯环碳碳双键, 强), 1 555 (氮氢键, 强), 1 497 (苯环, 强), 1 447 (苯环, 中), 1 315 (碳氮键, 中), 1 297, 1 234 (酰胺 II 带), 1 082 (碳氮键, 弱), 1 052 (酰胺 III 带, 弱), 913, 894 (碳碳双键, 中), 854, 755 (苯环五个相邻的氢, 强), 697 (苯环对位取代), 668 (苯环一取代); EI-MS m/z : 213 [M+1], 212 [M], 194 [M-H₂O], 119 [M-18-苯环], 94 [苯胺+1], 93 [苯胺] (基峰), 92 [苯胺-1], 91 [苯胺-2], 78 [C₆H₅+1], 77 [C₆H₅], 76 [C₆H₅-1], 65 [C₅H₅], 64 [C₅H₄], 63 [C₅H₄-1]; ¹H NMR (400 MHz, (DMSO-d₆, TMS): δ 8.34 (s (br), 2H, NH), 7.45 (d, *J* = 8 Hz, 4H, ArH), 7.27 (t, *J* = 8 Hz, 4H, ArCH), 6.96 (t, *J* = 7 Hz, 2H, ArCH). ¹³C NMR (100 MHz, (DMSO-d₆, TMS): δ 153.4 (CO), 140.3 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 122.5 (Ar-C), 119.3 (Ar-C)。

2.3 产物的生物活性

由表2可知,与对照相比,*N,N'*-二苯基脲的质量浓度为0.010~1.000 mg·L⁻¹时均能显著促进萝卜子叶的扩张,子叶的增重率与细胞分裂素质量浓度呈正相关。其中,质量浓度为1.00 mg·L⁻¹时活性最高,为对照的8倍多。

表2 化合物促进萝卜子叶生长的活性

Table 2 Biological activity of promoting radish cotyledon growth

试验 化合物	浓度 (mg·L ⁻¹)	萝卜子叶鲜重的增加量/g			平均增重率/%
		重复1	重复2	重复3	
I	0.001	-0.02	-0.03	-0.04	-47.37
	0.010	0.12	0.12	0.14	90.48
	0.100	0.16	0.18	0.20	128.57
	1.000	0.25	0.28	0.30	197.62
	10.000	0.03	0.06	0.05	24.30
CK	—	0.04	0.06	0.04	24.30

3 结论

本实验采用一种新的方法——氯甲酸甲酯合成了 *N,N'*-二苯基脲,该法具有设备简单、反应步骤少、后处理简便和产率高等优点,适于实验室和工业生产使用。作者采用该法合成了其他9种二苯基脲类化合物,证明该法具有普遍性。整个实验分两步进行,第二步反应较慢,决定着整个反应的速度。用3因素2水平正交试验对第二步反应的最佳反应条件进行筛选,借助红外光谱、质谱和核磁共振证明所得产物为目标化合物。该化合物促进细胞分裂的活性可以通过多种方法测量,作者采用萝卜子叶扩张生长法测定它们的活性,发现该化合物在0.010~1.000 mg·L⁻¹质量浓度范围内能显著促进萝卜子叶生长,质量浓度为1.000 mg·L⁻¹时活性最高。

参考文献:

- [1] SHANTZ E, STEWARD F. The identification of compound a from coconut milk as 1,3-Diphenylurea[J]. J. Am. Chem. Soc., 1955, 77: 6351-6353.
- [2] BIGI F, MAGGI R, SARTORI G, *et al.* Reaction of aromatic amines and ethyl acetoacetate promoted by zeolite HSZ-360 phosgene-free synthesis of symmetric diphenylurea [J]. Chem. Commun., 1998(4): 513-514.
- [3] JBEAVER D J, ROMAN D P, STOFFEL P J. The preparation and bacteriostatic activity of substituted ureas[J]. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79 (5): 1236-1245.
- [4] 王立坤,李正明.具有生物活性的脲类化合物的合成研究[J].化学通报,1992(1):32-37.
- [5] WLADYSŁAW W, RYSZARD S, ANDRZEJ J, *et al.* 4,4'-Dinitrophenylurea[P]. Poland, 123 410, 1984-11-15.
- [6] OKAMOTO T, ISOGAI Y, SHUDO K, *et al.* N-(2-chloro-4-pyridyl) ureas useful in plant growth regulating composition [P]. Germany, 2 843 722. 1979-04-19.
- [7] 周美华,张小林,刘敏,等. *N,N'*-二硝基苯基脲的合成研究[J].化学试剂,2005,46(6):349-351.
- [8] 王振荣,李步清.农药商品大全[M].北京:中国商业出版社,1996:299-301.
- [9] 丘坤元,程世友,雷维素,等. *N*-丙烯酰基-*N'*-苯基脲及其衍生物的合成与聚合反应[J].高分子学报,1994,22(6):709-716.
- [10] 李榆,张黔忠,江银瑞,等.氰酸盐法合成脲类除草剂杀草隆[J].农药,1998,37(4):22-23.
- [11] BUCKLAR S A. Reaction of phosphine with isocyanates[J]. J. Org. Chem., 1959, 24(7): 1460-1462.
- [12] HENRIE R N. Preparation of pyridyl urea compounds and agriculture uses as plant growth regulator[P]. World Intellectual Property Organization, 8 702 665, 1987-05-07.
- [13] 孔繁雷.除草剂杀草隆及其中间体的合成方法[J].农药译丛,1990,24(4):40-44.
- [14] 马庆虎.植物激素的生物试法(一)——细胞分裂素[J].植物杂志,1987(2):40-41.
- [15] BOIVIN P A, BRIDGED W, BOIVIN J L. Synthesis and infrared spectra of guanylureas[J]. Can. J. Chem., 1954, 32: 242-248.