

· 化学成分研究 ·

姜黄素-4-芳杂环叉基衍生物合成及其油水分配系数的测定

黄仰彤, 齐心怡, 邓思亮, 谭祥颖, 王涛, 曾丽云, 曹骋, 朱丽萍 (广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 合成姜黄素 Knoevenagel 衍生物并测定其油水分配系数, 为该类衍生物的进一步研究提供依据。**方法** 以母体亚甲基为修饰位点, 通过 Knoevenagel 缩合反应合成两个姜黄素衍生物 4-(2-噻吩叉基) (**3a**) 和 4-(4-吡啶叉基) (**3b**), 目标产物结构经核磁共振(NMR), 红外吸收光谱(IR)、高分辨液质联用(HR/MS)确定, 并通过高效液相色谱(HPLC)法测定 **3a** 和 **3b** 在正辛醇-水溶液中的油水分配系数。**结果** 成功合成姜黄素 Knoevenagel 衍生物 **3a** 和 **3b**, 两者的油水分配系数($\lg P_{ap}$)分别为 0.96 和 0.82, 与姜黄素($\lg P_{ap}=3.85$)相比, 其水溶性更好。**结论** 相较于姜黄素, 姜黄素 Knoevenagel 衍生物的水溶性增加, 可为芳杂环叉基结构修饰提高姜黄素的生物利用度和药理活性提供实验依据。

关键词: 姜黄素衍生物; Knoevenagel 缩合反应; 高效液相色谱法; 油水分配系数; 生物利用度

中图分类号: R914.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2024)09-1408-05

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2024.09.014

Synthesis of 4-Heteroarylene Derivatives of Curcumin and Determination of Their Oil-Water Partition Coefficient

HUANG Yangtong, QI Xinyi, DENG Siliang, TAN Xiangying, WANG Tao, ZENG Liyun, CAO Cheng, ZHU Liping (Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective In this study, Knoevenagel derivatives of curcumin were synthesized, and their oil-water partition coefficient were determined. Our aim is to provide an experimental basis for further development of curcumin derivatives. **Methods** Two Knoevenagel derivatives of curcumin, including 4-(thiophen-2-ylidene) curcumin (**3a**) and 4-(pyridine-4-ylidene) curcumin (**3b**), were obtained by using the methylene group of curcumin as the modification site and purified by column chromatography. The structures of these derivatives were confirmed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), infrared (IR) and high-resolution liquid mass spectrometry (HR/MS). The oil-water partition coefficient of the derivatives in n-octanol aqueous solution was determined by quantitative analysis using HPLC. **Results** Knoevenagel derivatives of curcumin were successfully synthesis. The oil-water partition coefficients ($\lg P_{ap}$) of curcumin derivatives **3a** and **3b** are 0.96 and 0.82, respectively. Compared with the oil-water partition coefficient of curcumin ($\lg P_{ap}=3.85$), it suggested that curcumin derivatives showed better water solubility than curcumin. **Conclusion** Compared to the curcumin prototype, Knoevenagel derivatives of curcumin increased water solubility and improved bioavailability. Thus, it may provide experimental basis for introducing heteroarylene moiety of the methylene position of curcumin to enhance pharmacological activity.

Keywords: Curcumin derivatives; Knoevenagel reaction; HPLC; oil-water partition coefficient; bioavailability

收稿日期: 2024-03-04

作者简介: 黄仰彤, 男, 本科, 研究方向: 天然产物修饰及活性评价。Email: 475563962@qq.com。通信作者: 朱丽萍, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 小分子药物合成与活性评价。Email: zhuliping@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广州中医药大学“双一流”与高水平大学建设项目(2021xk87, [2022]97号); 国家自然科学基金项目(81774193)。

姜黄素(Curcumin, Cur)是一种从姜黄中提取的天然色素,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗阿尔茨海默病、抗菌等作用^[1-3]。其结构见图1。由于姜黄素毒副作用小、安全和低分子量等特点,其在药物开发利用方面具有广泛的前景^[4]。然而,姜黄素在水中溶解度仅为 $11 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,且结构稳定性差,导致其在体内的吸收较差,生物利用度较低^[5-6],大大限制了其在临床上的使用。因此,提高姜黄素的生物利用度已经成为国内外研究的热点^[7-10]。

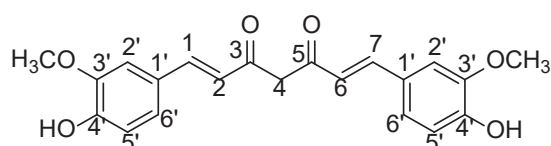


图1 姜黄素的结构

Figure 1 The structure of curcumin

姜黄素结构中的活泼亚甲基在生理条件下易受到水的亲核进攻而降解^[11]。研究^[12]表明,姜黄素C-4位插入苯环,其稳定性增加,且抑制HL-60和HepG2细胞增殖的活性优于姜黄素及化疗药依托泊苷;姜黄素C-4位引入三唑环,其代谢稳定性较姜黄素更高,溶解性增强,且对乳腺癌和前列腺癌细胞的抑制活性更强^[13]。此外,姜黄素C-1和C-7位引入氮杂芳环(如吡啶、吡咯和吡咯),其水溶性较姜黄素亦有所改善,且具有更好的抗癌细胞增殖活性^[14]。综上所述,消除活泼亚甲基和引入杂环骨架可有效提高姜黄素的生物利用度,并增强其药物活性^[15-18]。

药物的油水分配系数($\lg P_{\text{ap}}$)与其在生物膜的渗透

性有很大的相关性,与药物的生物利用度和活性的发挥密切相关。本研究以姜黄素为原料,通过Knoevenagel缩合反应,在亚甲基C-4位引入芳杂环,合成姜黄素4-芳杂环叉基衍生物**3a**和**3b**,并通过测定姜黄素衍生物**3a**和**3b**的油水分配系数,探究亚甲基位点的芳杂环修饰是否可以改善其生物利用度,为姜黄素衍生物的进一步研究和药物开发提供参考。

1 实验材料

1.1 仪器 Nicolet iS5 傅里叶变换红外光谱仪,美国赛默飞世尔科技公司;400 MHz核磁共振波谱仪,美国Bruker公司;UV1100II紫外分光光度计,上海天美科学仪器有限公司;SGWX-4B显微熔点仪,上海仪电物光公司;Triple-TOF 5600高分辨液质联用仪,上海AB SCIEX分析仪器贸易公司;SHA-B型数显水浴恒温振荡器,上海金鹏分析仪器有限公司;SHIMADZU AUY120十万分之一电子分析天平,日本岛津公司;高速离心机,长沙湘仪仪器有限公司。

1.2 试剂 姜黄素,南京泽郎生物科技有限公司,批号:ZL20200820J,纯度>95%;姜黄素衍生物**3a**和**3b**按图2路线合成制备,结构经NMR,IR和HRMS确定;氘代氯仿,青海腾龙微波科技有限公司,批号:P2073143;甲醇为色谱纯,水为双重蒸馏水,其他试剂均为市售分析纯。

2 实验方法

2.1 姜黄素衍生物的合成 见图2。

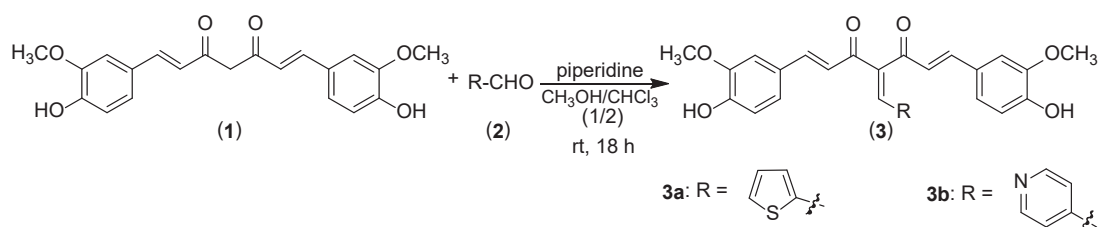


图2 姜黄素衍生物的合成

Figure 2 Synthesis of derivatives of curcumin

2.1.1 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-4-(噻吩-2-叉基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮(3a)的合成 将姜黄素(0.36 g, 1.0 mmol)溶于甲醇/氯仿(12 mL, 1:2, V/V)的混合溶剂中,滴加200 μL 六氢吡啶,随后在搅拌下加入2-噻吩甲醛(0.13 g, 1.2 mmol),室温反应18 h。反应结束后减压浓缩,硅胶柱层析纯化得到黄棕色固体**3a**(102 mg, 产率22%)。熔点148~150 $^{\circ}\text{C}$ 。

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 2961, 2926(C-H, 脂肪族), 1586, 1560, 1512(C-H, 芳香环), 1261, 1168, 1083, 1031, 803. ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ : 7.98(s, 1H), 7.75(d, $J = 15.4 \text{ Hz}$, 1H), 7.54(d, $J = 16.1 \text{ Hz}$, 1H), 7.46(d, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 1H), 7.39(d, $J = 3.5 \text{ Hz}$, 1H), 7.14(dd, $J = 8.3, 1.7 \text{ Hz}$, 1H), 7.10~7.01(m, 3H), 6.92(d, $J = 2.3 \text{ Hz}$,

2H), 6.89(m, $J = 7.5, 2.5$ Hz, 3H), 3.90(s, 3H), 3.89(s, 3H); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ : 198.2, 186.9, 149.3, 149.1, 148.3, 147.3, 147.2, 146.0, 137.8, 137.3, 135.0, 133.6, 132.3, 128.5, 127.7, 127.1, 125.7, 124.7, 124.2, 120.3, 115.4, 115.3, 110.8, 110.5, 56.5, 56.4。HRMS(ESI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{S}[\text{M}+\text{H}]^+$ 463.121 0; Found: 463.119 8。

2.1.2 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-4-(吡啶-4-叉基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮(**3b**)的合成 按照“2.1.1”项下方法,以4-吡啶甲醛为原料,可合成得到橙黄色固体**3b**(85 mg, 产率19%)。熔点144~146 $^{\circ}\text{C}$ 。IR(KBr), ν , cm^{-1} : 2 962, 2 926(C-H, 脂肪族), 1 577, 1 571, 1 560, 1 509(C-H, 芳香环), 1 262, 1 097, 1 031, 803。 ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ : 8.59(d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.58(d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.80(d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.67(s, 1H), 7.42(d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.34(d, $J = 1.4$

Hz, 1H), 7.33(d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.18(d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.16(d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.02(dd, $J = 10.5, 1.9$ Hz, 2H), 6.96(d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.93-6.87(m, 3H), 3.92(s, 3H), 3.89(s, 3H); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ 196.6, 186.5, 150.2, 149.4, 149.0, 148.7, 147.0, 146.9, 146.9, 144.9, 141.3, 136.5, 136.4, 127.0, 126.2, 124.8, 124.5, 124.2, 123.7, 123.6, 119.3, 115.0, 115.0, 110.4, 109.9, 56.1, 56.0。HRMS(ESI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{N}[\text{M} + \text{Na}]^+$ 480.141 8; Found: 480.140 2。

2.2 油水分配系数的测定

2.2.1 检测波长的选择 分别取衍生物**3a**和**3b**适量,以甲醇为溶剂,做紫外吸收光谱扫描,检测**3a**和**3b**在波长(λ)为254~500 nm范围内的吸光度(A)值,如图3所示。结果表明**3a**和**3b**在378 nm处有最大吸收峰,因此检测波长选择为378 nm。

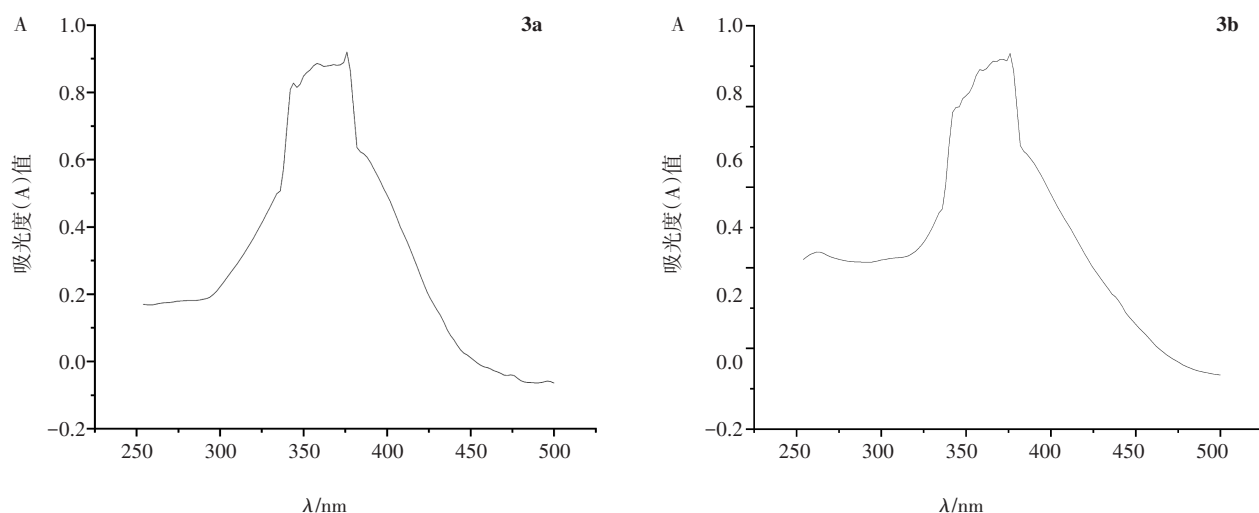


图3 化合物**3a**和**3b**的紫外吸收光谱图

Figure 3 UV-vis of compound **3a** and **3b**

2.2.2 溶液的配制 供试品溶液配制:分别取衍生物**3a**和**3b**适量,精密称定,分别置于25 mL容量瓶中,加适量色谱甲醇溶解,稀释至刻度,摇匀,分别配制成 $0.78 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的**3a**供试品溶液与 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的**3b**供试品溶液,过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜于进样小瓶中,用于方法学考察试验。

正辛醇-水溶液配制:取正辛醇100 mL,双重蒸馏水100 mL,置于带塞锥形瓶中,于恒温振荡器(37°C)中振荡24 h,两相充分混合后,以 $4\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径为6.5 cm),经分离得水饱和的正辛

醇溶液和正辛醇饱和的水溶液,备用。

2.2.3 色谱条件 Agilent 1100高效液相色谱仪(配备DAD 1260检测器),色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$),柱温为室温,姜黄素衍生物**3a**的流动相为甲醇-水(60:40),姜黄素衍生物**3b**的流动相为甲醇-水(55:45),流速: $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量: $10 \mu\text{L}$,检测波长:378 nm。

2.2.4 系统适用性试验 分别精密吸取空白溶剂、供试品溶液**3a**和**3b**各 $10 \mu\text{L}$,注入高效液相色谱仪,按“2.2.3”项下色谱条件测定,记录色谱图。结果

见图 4。姜黄素衍生物 **3a** 的保留时间约为 8.5 min，姜黄素衍生物 **3b** 的保留时间约 10.2 min，在此色谱条件下二者峰形良好，未见空白溶剂对试验有干扰，因此该方法专属性好，可用于衍生物 **3a** 和 **3b** 的测定。

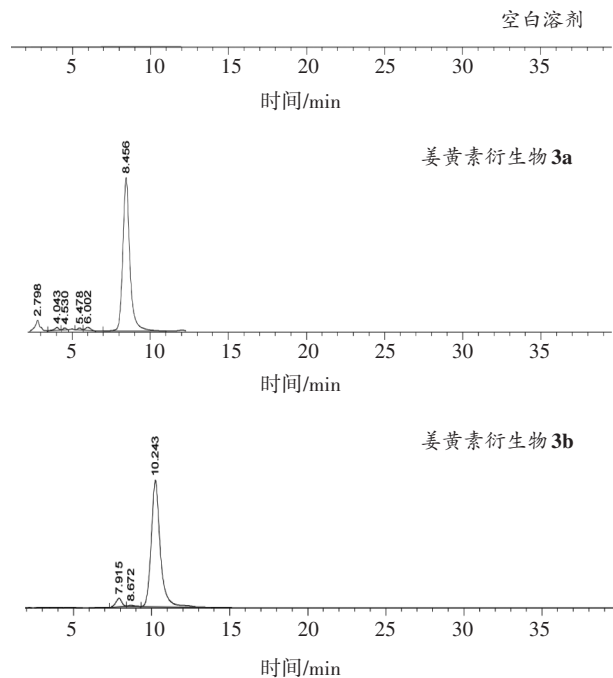


图 4 空白溶剂、姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 的高效液相色谱 (HPLC) 图
Figure 4 HPLC chromatography of blank reagents, derivatives of curcumin **3a** and **3b**

2.2.5 线性关系考察 精密量取姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 供试品溶液适量，分别置于 10 mL 容量瓶中，用色谱甲醇稀释至刻度，摇匀，制成浓度分别为 0.156, 0.312, 0.468、0.624、0.780 mg·mL⁻¹ 的衍生物 **3a** 系列标准工作溶液和 0.08、0.16、0.24、0.32、0.40 mg·mL⁻¹ 的衍生物 **3b** 系列标准工作溶液，按“2.2.3”项下色谱条件分别进样测定。

以各衍生物浓度为横坐标(*X*, mg·mL⁻¹)，各峰面积为纵坐标(*Y*)绘制标准曲线。结果显示，姜黄素衍生物 **3a** 在 0.156~0.780 mg·mL⁻¹ 内，浓度与峰面积成良好的线性关系，回归方程为 $Y=14\,858X-564.1$ ， $r=0.999\,4$ ；姜黄素衍生物 **3b** 在 0.08~0.40 mg·mL⁻¹ 内，浓度与峰面积呈良好的线性关系，回归方程为 $Y=11\,851X-31.622$ ， $r=0.999\,6$ 。

2.2.6 精密度试验 分别吸取姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件连续进样 6 次，测定并记录其峰面积，计算其相对标准偏差 (RSD)。结果姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 峰面积的 RSD 分

别为 1.39% 和 1.21%，表明该仪器的精密度良好，能满足测定要求。

2.2.7 稳定性试验 分别吸取姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件，在供试品溶液制备后 0、2、6、12、24 h 分别进样测定，记录姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 的峰面积，计算其峰面积的 RSD。结果姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 峰面积的 RSD 分别为 1.54% 和 1.53%，表明姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 油水分配系数的测定^[20-21] 精密量取姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 供试品溶液适量，分别置于 10 mL 容量瓶中，用色谱甲醇稀释至刻度，摇匀，制成浓度分别为 0.4 mg·mL⁻¹ 的 **3a** 溶液和 0.1 mg·mL⁻¹ 的 **3b** 溶液。分别精密量取 2 mL 溶液，分别置于具塞试管中，各自精密加入被正辛醇饱和的水溶液 2 mL，密闭，置于恒温水浴振荡器 (37 °C) 中振摇 24 h，以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min (离心半径为 6.5 cm)。取上层有机相经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，按“2.2.3”项下的色谱条件进样分析，记录其峰面积，代入标准曲线计算可得平衡后在有机相中姜黄素衍生物的浓度 (*C*₀)。根据 $C_w=C-C_0$ 计算可得平衡后在水相中姜黄素衍生物的浓度 (*C*_w) (*C* 为水饱和正辛醇中姜黄素衍生物的浓度)，再根据公式 $\lg P_{ap}=\lg(C_0/C_w)$ 计算可得衍生物的油水分分配系数。结果见表 1。

表 1 姜黄素衍生物 3a 和 3b 的油水分分配系数				
Table 1 Oil water partition coefficients of derivatives of curcumin 3a and 3b				
衍生物	<i>C</i> ₀ /(mg·mL ⁻¹)	<i>C</i> _w /(mg·mL ⁻¹)	<i>P</i> _{ap}	lg <i>P</i> _{ap}
3a	0.361	0.039	9.12	0.96
3b	0.087	0.013	6.60	0.82

研究^[16]表明，油水分分配系数 (lg*P*_{ap}) 在 -1~2 时表明药物在胃中吸收较好，lg*P*_{ap} 在 2~3 时则较易被肠道吸收。由表 1 结果可知，姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 的 lg*P*_{ap} 均落在 -1~2 的范围内，相较于姜黄素原型化合物 (lg*P*_{ap}=3.85)，其油水分分配系数有所下降，表明亚甲基位点修饰合成得到的姜黄素 Knoevenagel 衍生物，能改变姜黄素母体的透生物膜作用，其水溶性有所提高，在胃中可能有较好的吸收。

3 讨论

大量研究表明，姜黄素中引入芳杂环结构可有效改善其稳定性，提高其生物利用度，增强药效。本研究利用 Knoevenagel 缩合反应得到姜黄素 4-芳杂环

叉基衍生物 **3a** 和 **3b**, 其合成及理化性质未见报道。

油水分配系数是药物后续研发所必须的且重要的理化参数, 目前多采用正辛醇-水系统用于模拟生物体系, 通过分析药物进入该体系的浓度推测药物的透膜能力, 为后续药物的组织分布代谢等提供依据, 也可以为药物的药效发挥提供参考。本研究考察了姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 在正辛醇-水溶液中的油水分配系数, 结果显示, 相较于姜黄素原型化合物, 姜黄素衍生物 **3a** 和 **3b** 的 $\lg P_{ap}$ 有所下降, 水溶性增加。在后续研究中, 为提高姜黄素的生物利用度, 可通过在亚甲基位点引入芳杂环结构(如噻唑环和吡啶环)。

参考文献:

- [1] SCHRAUFSTÄTTER E, BERNT H. Antibacterial action of curcumin and related compounds[J]. *Nature*, 1946, 164(4167): 456-456.
- [2] NGUYEN T A, FRIEDMAN A J. Curcumin: a novel treatment for skin-related disorders[J]. *Journal of Drugs in Dermatology*, 2013, 12(10): 1131-1137.
- [3] LAI P K, ROY J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 11(11): 1451-1460.
- [4] ANAND P, KUNNUMAKKARA A B, NEWMAN R A, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2007, 4(6): 807-818.
- [5] PENG J R, QIAN Z Y. Drug delivery systems for overcoming the bioavailability of curcumin: not only the nanoparticle matters[J]. *Nanomedicine*, 2014, 9(6): 747-750.
- [6] ABD EL-HACK M E, EL-SAADONY M T, SWELUM A A, et al. Curcumin, the active substance of turmeric: its effects on health and ways to improve its bioavailability[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(14): 5747-5762.
- [7] 任金妹, 李曼, 谢宁, 等. 提高姜黄素口服生物利用度方法的研究进展[J]. *中国药房*, 2018, 29(23): 3303-3307.
- [8] GRILL A E, KONIAR B, PANYAM J. Co-delivery of natural metabolic inhibitors in a self-microemulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of curcumin[J]. *Drug Delivery and Translational Research*, 2014, 4(4): 344-352.
- [9] JI H, TANG J, LI M, et al. Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles with Brij78 and TPGS improved *in vivo* oral bioavailability and *in situ* intestinal absorption of curcumin[J]. *Drug Delivery*, 2016, 23(2): 459-470.
- [10] MUANGNOI C, JITHAVECH P, BHUKET P R B, et al. A curcumin-diglyceric acid conjugated prodrug with improved water solubility and antinociceptive properties compared to curcumin[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2018, 82(8): 1301-1308.
- [11] WANG Y J, PAN M H, CHENG A L, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, 15(12): 1867-1876.
- [12] TANG J J. Activity and mechanism of multi-conjugated resveratrol analogs and curcuminoids as antioxidants and anticancer agents[D]. Lan Zhou: School of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, 2011.
- [13] MANDALAPU D, KARAN S S, GUPTA S, et al. Synthesis and biological evaluation of some novel triazole hybrids of curcumin mimics and their selective anticancer activity against breast and prostate cancer cell lines[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(17): 4223-4232.
- [14] ATIRU J T, TIM V W, CHARLOTTE G, et al. Synthesis of novel aza-aromatic curcuminoids with improved biological activities towards various cancer cell lines[J]. *Chemistry Open*, 2018, 7(5): 381-392.
- [15] HATAMPOUR M, HADIZADEH F, JAAFARI M R, et al. Anti-proliferative potential of fluorinated curcumin analogues: experimental and computational analysis and review of the literature[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2022, 29(8): 1459-1471.
- [16] AGRAWAL D K, MISHRA P K. Curcumin and its analogues: potential anticancer agents[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2010, 30(5): 818-860.
- [17] CHAUDHARY M, KUMAR N, BALDI A, et al. Chloro and bromo-pyrazole curcumin Knoevenagel condensates augmented anticancer activity against human cervical cancer cells: design, synthesis, *in silico* docking and *in vitro* cytotoxicity analysis[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2020, 38(1): 200-218.
- [18] YADAV I S, NANDEKAR P P, SRIVASTAVA S, et al. Ensemble docking and molecular dynamics identify Knoevenagel curcumin derivatives with potent anti-EGFR activity[J]. *Gene*, 2014, 539(1): 82-90.
- [19] 李俊海, 孙纲春, 谢晶曦. 姜黄素类似物的合成及其生物活性的测定[J]. *化学研究与应用*, 2009, 21(7): 984-988.
- [20] 冯改丽, 罗璟, 袁欢, 等. CBUA-NO平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(11): 1166-1168, 1172.
- [21] 郭静一, 何群, 郭瑜, 等. 双烟酸姜黄素酯平衡溶解度及表观油水分配系数的测定[J]. *中国药师*, 2018, 21(2): 197-200, 214.

(编辑: 梁进权)