

姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素对照品的制备及姜黄素细胞毒性初步研究

贾淑杰¹, 刘庆焕¹, 王文彤¹, 王 露²

1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

2. 天津海河医院, 天津 300270

摘要: 目的 建立从姜黄中制备姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素对照品的方法, 并对姜黄素进行细胞毒性初步研究。方法 通过硅胶柱色谱对姜黄丙酮提取物进行分离纯化, IR、MS、¹H-NMR 波谱学方法对化合物进行结构鉴定, 通过 TLC 和 HPLC 对其进行纯度检测; 倒置显微镜观察姜黄素对高侵袭性人乳腺癌 MCF-7 细胞、低侵袭性人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和人肝癌 HepG2 细胞的毒性。结果 从姜黄中分离、纯化出姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素对照品, 质量分数均>98%。10、100 ng/mL 的姜黄素能明显抑制 MCF-7、MDA-MB-231 和 HepG2 细胞的生长, 对 HepG2 细胞杀伤力较大。结论 该法制备出的姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素对照品符合中药化学对照品的相关要求, 可作为姜黄药材及其制剂质量控制以及中药药效物质基础研究用的化学对照品; 一定质量浓度的姜黄素能明显抑制人乳腺癌细胞和人肝癌细胞生长。

关键词: 姜黄素类化合物; 对照品; 姜黄素; 去甲氧基姜黄素; 二去甲氧基姜黄素; 细胞毒性

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)06-1118-04

Preparation of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin reference substances and preliminary study on curcumin cytotoxicity

JIA Shu-jie¹, LIU Qing-huan¹, WANG Wen-tong¹, WANG Lu²

1. Tianjin Institute of Medical Pharmaceutical Science, Tianjin 300020, China

2. Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300270, China

Key words: curcuminoids; reference substance; curcumin; demethoxycurcumin; bisdemethoxycurcumin; cytotoxicity

姜黄为姜科姜黄属植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎; 具有破血行气、通经止痛等功效; 主治胸肋刺痛、胸痹心痛、痛经经闭、风湿肩臂疼痛、跌扑肿痛等症^[1]。近代药理研究表明姜黄具有抗炎、调血脂、抗肿瘤、抗氧化作用以及对心血管系统的影响^[2-3]。关于姜黄的化学成分, 国内外早有报道, 主要含有挥发性成分和姜黄素类成分^[4]。《中国药典》2010 年版规定姜黄素为姜黄的定量测定指标^[1]。目前关于姜黄素类化合物对照品的制备研究较少, 限制了对姜黄及其制剂的全面质量控制。本实验对四川乐山地区产的姜黄进行了 3 种姜黄素类化合物(姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素)对

照品的制备研究, 为完善姜黄药材及其制剂质量控制提供对照品, 并对姜黄素进行了细胞毒性初步研究, 为今后开展姜黄药理活性的研究提供实验依据。

1 仪器与材料

X 系列显微熔点测定仪(北京上光仪器有限公司); JEOL—90Q 核磁共振波谱仪(日本株式会社); IR—453 型红外光谱仪(Shimadzu 公司); VG ZAB—HS 型质谱仪; LC—10ATVP、LC—2010AHT 高效液相色谱仪(日本岛津); AE—240 型电子天平(上海梅特勒公司); SW—CJ—1FD 型单人单面净化台(苏州净化设备仪器厂); 细胞培养箱 HEPA class100 (Thermo Forma 公司); 倒置相差显微镜(Olympus

收稿日期: 2011-11-01

基金项目: 天津市科委中药现代化项目“中药对照品的研究”项目资助(K013108911)

作者简介: 贾淑杰(1964—), 女, 天津市人, 医药科学研究所植物化学室, 副主任技师、长期从事药物成分研究及制剂质量标准制定, 承担并参加过国家及省市级课题多项, 曾获市科技技术奖, 在该领域已发表论文 10 余篇。Tel: 15522032883 E-mail: 64641001@163.com

公司); 纯水仪 MillipakOR40 (Millipore); 高温灭菌器 (Hirayama 公司); 微量移液器 (P-2.5、P-10、P-100、P-200、P-1 000, Eppendorf 公司); 细胞培养 6 孔板、24 孔板 (Corning 公司)。

姜黄为四川乐山地区所产, 经天津市医药科学研究所杨企铮研究员鉴定为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的根茎; 特级胎牛血清、Tyrpsin-EDTA、100 U/mL 青-链霉素 (Gibco 公司); 台盼蓝溶液 (Sigma 公司); 人肝癌 HepG2 细胞、高侵袭性人乳腺癌 MCF-7 细胞、低侵袭性人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 (中国科学院上海细胞库, ATCC); 柱色谱及薄层色谱硅胶均为青岛海洋化工厂产品, 所用化学试剂为分析纯和色谱纯。

2 方法与结果

2.1 姜黄素类化合物对照品的制备

2.1.1 姜黄素类总成分提取 取经过 40 目筛的姜黄根茎 500 g, 置圆底烧瓶中, 以石油醚 (3、2.5、2 倍生药量) 回流提取 3 次, 每次 3 h, 滤过, 将滤过的细粉再用丙酮 (3、2.5、2 倍生药量) 回流提取 3 次, 每次 4 h, 滤过, 浓缩滤液, 得丙酮提取物, 即姜黄素类总成分。

2.1.2 姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素对照品制备 取相当 100 g 姜黄生药的丙酮提取物吸附少量硅胶备用。取 100~200 目硅胶 500 g 于口径 5 cm 色谱柱中, 先以氯仿洗涤, 有液体流出后控制体积流量在 1 mL/min 左右, 上样, 用氯仿洗脱, 分段收集, 并用硅胶 G 薄层色谱法, 正丁醇-浓氨试液-无水乙醇 (30:3:1) 为展开剂, 展开, 合并 Rf 值相同的流分, 第 1 个黄色色带洗脱之后改用氯仿-甲醇 (9.5:0.5) 作为洗脱液, 顺序收集第 2、3 流分, 将分离得到的 3 个流分, 反复用硅胶柱进行柱色谱分离, 浓缩, 得到 3 部分结晶, 分别用无水乙醇重结晶 2 次, 即得化合物姜黄素 (1)、去甲氧基姜黄素 (2) 和二去甲氧基姜黄素 (3)。

2.2 结构鉴定

化合物 1: 橙黄色晶体, mp 178~180 °C。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 403 (OH), 3 015 (=CH), 1 628 (C=O), 1 603, 1 510, 1 460 (苯环骨架震动), 1 284, 1 029 (C-O-C), 962 (反式二烯氢)。EI-MS m/z : 368 [M]⁺, 350 [M-H₂O], 191 与 177 为互补离子。¹H-NMR (CD₃OD, 90 MHz) δ : 3.96 (6H, s, -OCH₃), 5.96 (1H, s, H-4), 6.68 (2H, d, J = 15.8 Hz, H-2, 6), 6.86 (2H, d, J = 7.9 Hz, H-5', 5''), 7.16 (2H, dd, J = 7.9, 1.8 Hz,

H-6', 6''), 7.31 (2H, d, J = 1.8 Hz, H-2', 2''), 7.58 (2H, d, J = 15.8 Hz, H-1, 7), 8.40 (2H, brs, 加 D₂O 后消失, OH)。以上数据与文献报道一致, 鉴定化合物 1 为姜黄素^[5-7]。

化合物 2: 橙黄色晶体, mp 169~171 °C。

IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 423 (OH), 3 015 (=CH), 1 626 (C=O), 1 603, 1 511, 1 446 (苯环骨架震动), 1 283, 1 026 (C-O-C), 962 (反式二烯氢)。EI-MS m/z : 338 [M]⁺, 320 [M-H₂O], 177 与 161, 191 与 147 为两对互补离子。¹H-NMR (CD₃OD, 90 MHz) δ : 3.91 (3H, s, -OCH₃), 5.97 (1H, s, H-4), 6.64 (2H, d, J = 15.8 Hz, H-2, 6), 6.87 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5''), 6.89 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3', 5'), 7.18 (1H, dd, J = 8.0, 1.8 Hz, H-6''), 7.31 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2''), 7.55 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6'), 7.59 (2H, d, J = 15.8 Hz, H-1, 7), 8.49 (2H, brs, 加 D₂O 后消失, OH)。以上数据与文献报道基本一致^[5-7], 鉴定化合物 2 为去甲氧基姜黄素。

化合物 3: 橙黄色晶体, mp 214~217 °C。

IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 356 (OH), 3 016 (=CH), 1 629 (C=O), 1 600, 1 577, 1 512 (苯环骨架震动), 965 (反式二烯氢)。EI-MS m/z : 308 [M]⁺, 290 [M-H₂O], 161 与 147 为互补离子。¹H-NMR (CD₃OD, 90 MHz) δ : 6.00 (1H, s, H-4), 6.67 (2H, d, J = 15.8 Hz, H-2, 6), 6.91 (4H, d, J = 8.4 Hz, H-3', 3'', 5', 5''), 7.58 (4H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 2'', 6', 6''), 7.66 (2H, d, J = 15.8 Hz, H-1, 7), 8.03 (2H, brs, 加 D₂O 后消失, OH)。以上数据与文献报道基本一致^[5-7], 鉴定化合物为 3 为二去甲氧基姜黄素。

2.3 纯度检测

2.3.1 薄层色谱法 将制备所得的化合物 1~3 分别点于硅胶 G 板上, 正丁醇-浓氨试液-无水乙醇 (30:3:1) 为展开剂, 展开, 结果显黄棕色斑点, 未见其他杂质斑点, 姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素 Rf 值分别 0.78、0.62、0.50。见图 1。

2.3.2 高效液相色谱法 色谱条件: 十八烷基硅胶键合硅胶 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为四氢呋喃-水-冰醋酸 (39:56:5); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 260 nm; 姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素样品质量分数分别达到 98.96%、98.54%、98.13%。

2.4 姜黄素的细胞毒性试验

2.4.1 细胞培养 将人肝癌 HepG2 细胞、高侵袭性

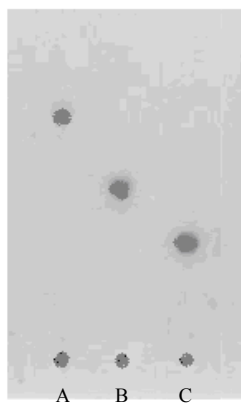


图 1 姜黄素 (A)、去甲氧基姜黄素 (B) 和二去甲氧基姜黄素 (C) 的 TLC 图谱

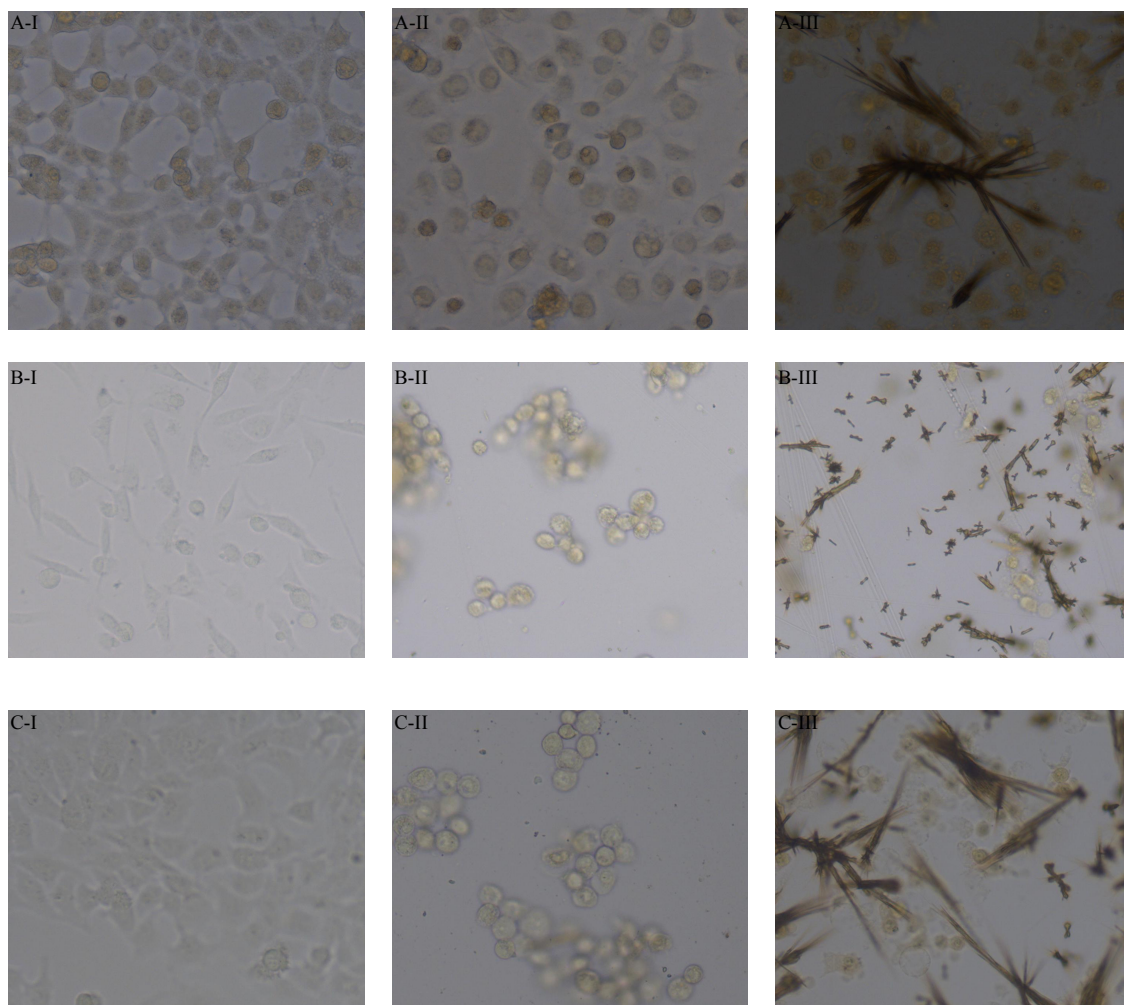
Fig. 1 TLC chromatogram of curcumin (A), demethoxycurcumin (B), and bisdemethoxycurcumin (C)

人乳腺癌 MCF-7 细胞、低侵袭性人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞贴壁生长于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 取对数生长期的细胞用于试验。

2.4.2 药物处理 将姜黄素用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解为 40 mg/L 的储备液, 然后用培养基稀释至最终质量浓度。

2.4.3 细胞计数 在 6 孔板中铺同样的细胞, 待 12 h 细胞贴壁后每孔分别加入 2 mL 终质量浓度为 10、100 ng/mL 的姜黄素, 共孵育 24 h, 比较不同质量浓度的姜黄素对 3 种细胞系生长的影响。倒置显微镜下观察细胞形态, 细胞飘起呈圆形的为死细胞。

2.4.4 试验结果 见图 2 和表 1。分析数据发现, 细胞存活率与姜黄素的作用浓度呈剂量依赖关系,



I-空白对照 II-姜黄素 10 ng·mL⁻¹ III-姜黄素 100 ng·mL⁻¹
I-blank control II-curcumin 10 ng·mL⁻¹ III-curcumin 100 ng·mL⁻¹

图 2 姜黄素处理 MCF-7 (A)、MDA-MB-231 (B) 和 HepG2 (C) 细胞 24 h 后的显微镜图

Fig. 2 Microscope diagram of MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B), and HepG2 (C) cells treated with curcumin for 24 h

表 1 姜黄素处理细胞系 24 h 后的细胞计数

Table 1 Cell counting after treated with curcumin for 24 h

组 别	剂量 / (ng·mL ⁻¹)	细胞计数 / 个		
		MCF-7	MDA-MB-231	HepG2
对照	—	2 890 000	1 290 000	2 430 000
姜黄素	10	2 430 000	0	0
	100	780 000	0	0

这与倒置显微镜的观察结果一致。乳腺癌和肝癌比较, 药物对肝癌作用较明显。乳腺癌两种细胞系的比较, 药物对恶性程度较低的细胞杀伤性作用大。

3 讨论

本实验先将姜黄素粉末以石油醚脱脂, 挥发油的量减少, 脱脂越完全越有利于下一步的柱分离及纯化。

提取姜黄素类化合物采用 100~200 目硅胶分离效果较好, 笔者在实验过程中用<100 目硅胶, 在洗脱过程中化合物 1、2 易产生重叠; >200 目硅胶, 使洗脱流速减小, 也容易使化合物 1、2 拖尾, 影响分离效果。

多次试验摸索采用柱子口径在 5 cm 左右, 配合试验中的取样量, 硅胶用量及体积流量, 分离效果较好。

总之, 柱子的粗细, 体积流量的快慢, 硅胶粗细及用量对柱分离效果都有一定的影响, 应加以控制。

实验得到的化合物 1、2、3 质量分数>98%, 符合《中药新药研究的技术要求》有关规定, 可作为化学对照品使用。

姜黄素的细胞毒性观察结果提示其对肿瘤细胞具有明显的杀伤力, 为进一步探讨其药理活性及其作用机制提供了实验依据。

参考文献

- [1] 中国药典. [S] 一部. 2010.
- [2] 李学庆, 索丽霞, 邹文俊. 姜黄的临床应用及药理研究概况 [J]. 中医药通报, 2002, 1(2): 46-48.
- [3] 肖东琼, 秦 岭. 姜黄与高脂血症 [J]. 中西医结合心血管病杂志, 2007, 5(9): 854-856.
- [4] 吴宏伟, 李洪梅, 唐仕欢, 等. 姜黄药效物质基础研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(2): 104-106.
- [5] 杨模坤, 董晓萍, 唐耀书. 姜黄化学成分的研究 [J]. 植物学报, 1984, 2(23): 51-52.
- [6] Kuroyanagi M, Natori S. Some observations on curcuminoids from Zingiberaceae plants [J]. *J Pharm Soc Jpn*, 1970, 90(11): 1467-1470.
- [7] 聂小安, 马自超, 吴伟志, 等. 姜黄色素的分离及其结构鉴定 [J]. 中国野生植物资源, 1993(3): 1-7.