

## 姜黄素琥珀酸酯前药的合成及其抗炎活性评价

牛 成<sup>1</sup>, 王东阁<sup>1</sup>, 张天宏<sup>2</sup>, 温鸿亮<sup>1\*</sup>

(1. 北京理工大学化学与化工学院, 北京 102488; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:** 姜黄素是一种从姜科姜黄属植物中提取得到的多酚类化合物, 具有抗炎、抗肿瘤等多种生物活性。但姜黄素水溶性差, 限制了它在临床的使用。根据姜黄素的结构特征, 本文设计合成了姜黄素一取代和二取代琥珀酸酯前体药物并对它们的溶解度、稳定性、大鼠体内的代谢及抗炎活性进行了研究 (实验所用大鼠由军事医学科学院北京实验动物中心提供, 经伦理委员会批准且实验均按照相关指导原则和规定进行), 结果表明: 合成的姜黄素琥珀酸酯前体药物在水中的溶解度比姜黄素提高约 300 倍, 姜黄素一取代琥珀酸酯在水和磷酸缓冲溶液中的半衰期分别为 6.55 和 5.56 h, 姜黄素二取代琥珀酸酯在水和磷酸缓冲溶液中的半衰期分别为 6.81 和 3.48 h; 进入大鼠体内, 姜黄素琥珀酸酯前体药物可迅速完全转变为姜黄素; 抗炎实验显示, 经尾静脉注射给药后, 姜黄素琥珀酸酯前体药物对鸡蛋清诱导的大鼠足跖肿胀模型产生明显的抗炎作用, 与同等剂量下地塞米松的抗炎活性相当。

**关键词:** 姜黄素; 琥珀酸酯; 前药; 抗炎活性

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-2085-08

## Synthesis and anti-inflammatory activity of curcumin succinate prodrugs

NIU Cheng<sup>1</sup>, WANG Dong-ge<sup>1</sup>, ZHANG Tian-hong<sup>2</sup>, WEN Hong-liang<sup>1\*</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 102488, China;

2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China )

**Abstract:** Curcumin, a polyphenolic compound from the plant *Curcuma longa* L., has shown a wide-spectrum of anti-inflammatory and antitumor activities. Despite the promising biological effects of curcumin, its poor solubility has restricted its use in the management of human ailments. To improve its water-solubility, curcumin succinate prodrugs were designed and synthesized and their aqueous solubility, stability, metabolism in rats and anti-inflammatory activity were evaluated (experiments had been approved by the ethics committee and carried out in accordance with the relevant guidelines and regulations; rats were provided by Beijing courtyard experimental animal center of Academy of Military Medical Sciences). The results showed that curcumin succinate prodrugs are very soluble in water and more stable than curcumin in water and in phosphate buffer solution. They released curcumin rapidly and quantitatively after intravenous administration. In phlogogen-induced paw edema in rats, curcumin succinate prodrugs showed anti-inflammatory activity as potent as dexamethasone.

**Key words:** curcumin; succinate; prodrug; anti-inflammatory

炎症是具有血管系统的生物机体对损伤因子所

发生的复杂的防御反应<sup>[1]</sup>。当致炎因子作用于机体时, 机体通过炎症反应消除致炎因子, 这是一个损伤和抗损伤的过程。凡能消除炎症反应的药物统称为抗炎类药物, 抗炎药物是临床上仅次于抗感染药物的第二大类药物, 主要包括甾体类抗炎药物和非甾体抗

收稿日期: 2018-09-28; 修回日期: 2018-10-30.

\*通讯作者 Tel: 18612672686, E-mail: wen.hongliang@bit.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0882

炎药物。甾体类抗炎药物出现于 20 世纪 40 年代, 对关节炎等疾病的治疗虽然具有较好的近期疗效, 但长时间使用会引起依赖性和肾上腺皮质功能衰退, 因此非甾体抗炎药物逐渐成为抗炎药物研究开发的主要方向。目前临床使用的非甾体抗炎药物皆为花生四烯酸环氧酶抑制剂, 通过抑制花生四烯酸环氧酶进而抑制炎症部位前列腺素的合成, 从而达到抗炎作用<sup>[2]</sup>。但抑制炎症部位前列腺素合成的同时也抑制了胃、肾等部位前列腺素的合成, 因此会导致胃出血等一系列不良反应, 因此寻找抗炎活性好、不良反应低的非甾体抗炎药物一直是药物化学领域一个重要的研究课题。

姜黄素 (图 1) 是一种从姜科姜黄属植物中提取得到的多酚类化合物, 姜黄素具有抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性<sup>[3-5]</sup>, 其抗炎活性尤其引人注目<sup>[6-8]</sup>。1982 年 Mukhopadhyay 等<sup>[9]</sup>通过采用角叉菜胶局部注射致大、小鼠急性足趾水肿的实验, 首先发现姜黄素具有抗炎活性。后来临床试验也证明姜黄素具有良好的抗炎活性<sup>[10-12]</sup>。与目前临床使用的非甾体抗炎药物相比, 姜黄素具有非常强的抗炎活性, 同时不良反应也很低。早期的毒性实验中, 给大鼠每日口服姜黄素  $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 连续服用 90 天未见明显毒性<sup>[13]</sup>; 在 I 期临床试验中, 25 个受试者每天给药 8 g 姜黄素未见不良反应的报道<sup>[14]</sup>。进一步研究发现姜黄素对胃肠道没有明显刺激, 对心血管、中枢神经系统和肾上腺皮质也没有影响, 因此具有良好的应用开发前景<sup>[10, 12, 15]</sup>。但姜黄素水溶性差, 由此导致生物利用度很低, 限制了它在临床的使用<sup>[16, 17]</sup>。

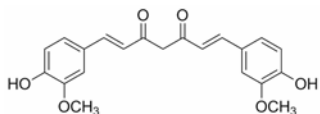


Figure 1 Chemical structure of curcumin

前药是一种本身无活性或活性很低, 但在体内经代谢转化而产生生物活性的化合物。引入琥珀酸酯作为一种重要的药物设计策略, 在前药设计中应用十分广泛。通过引入丁二酰基桥, 可以将化合物原有的活性基团 (如羟基、胺基等) 转变为羧基; 从羧基结构出发, 既可以使其成盐以提高水溶性, 又可以酯化以提高酯溶性, 为前药设计提供了多种可能。为了改善姜黄素的水溶性, 根据其结构, 本文设计合成了姜黄素单琥珀酸酯及姜黄素双琥珀酸酯的钠盐 (图 2), 并对其溶解度、稳定性、大鼠体内的代谢以及抗

炎活性进行了研究。

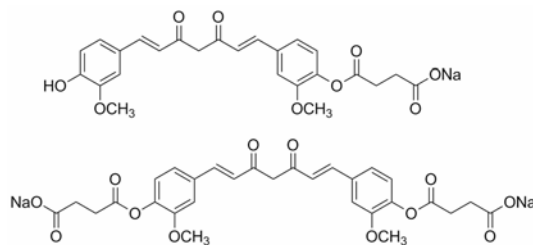


Figure 2 Chemical structures of curcumin succinate prodrugs

## 结果与讨论

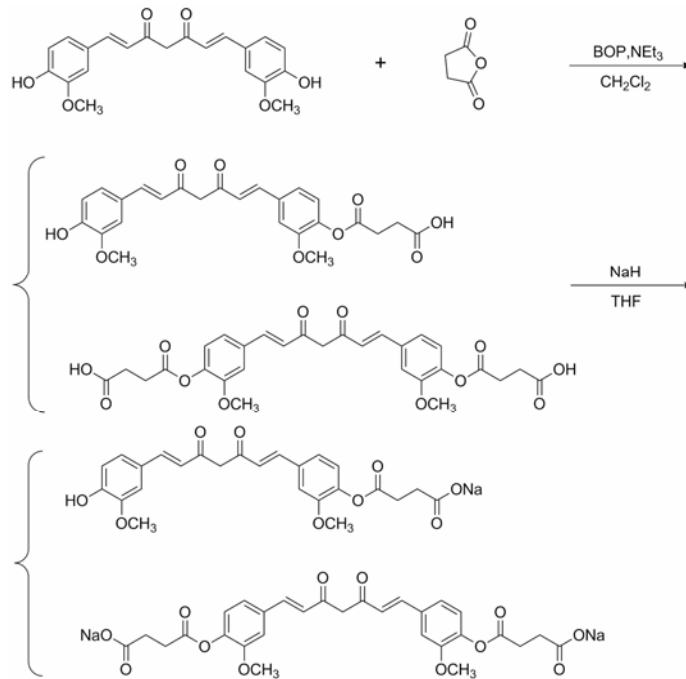
### 1 姜黄素琥珀酸酯前药的合成

首先按照合成路线 1 对目标化合物进行了合成。即: 在三乙胺存在条件下, 姜黄素与琥珀酸酐直接进行酯化反应生成一、二取代的姜黄素琥珀酸酯。分离提纯后, 再将其分别与氢化钠反应制成一、二取代的姜黄素琥珀酸酯钠盐, 这是一条文献报道的琥珀酸酯类前体药物合成的经典方法。但在实际操作过程中发现生成的一、二取代的姜黄素琥珀酸酯极性很大, 分离十分困难。柱层析过程中拖尾现象非常严重, 难以分离, 因此对合成路线进行优化, 采用合成路线 2 完成了目标化合物的合成。

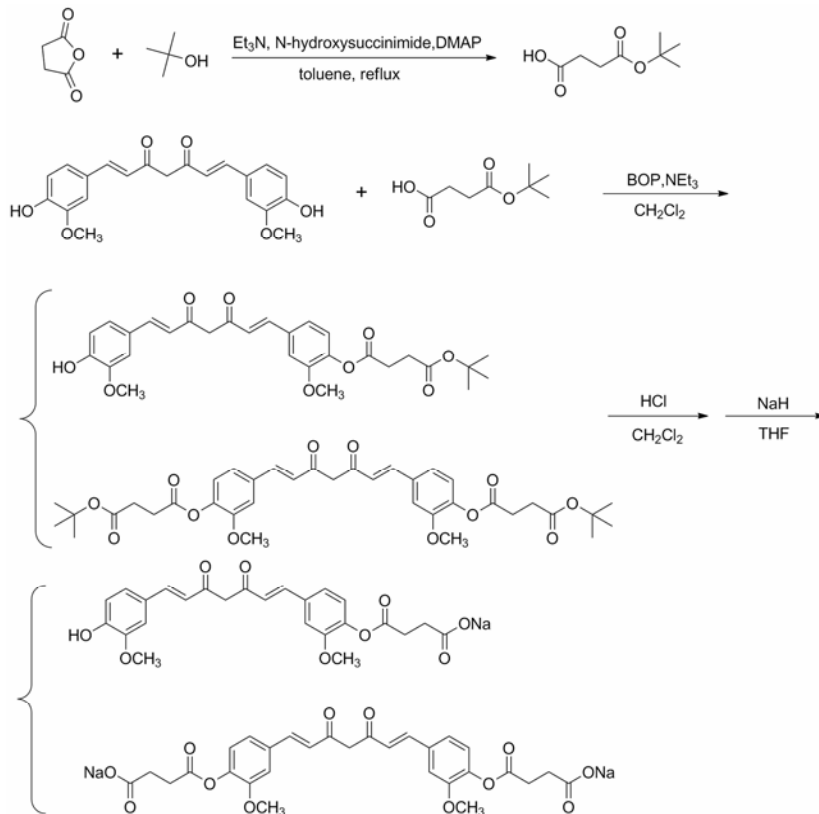
合成路线 2 首先在三乙胺、*N*-羟基琥珀酰亚胺、4-二甲氨基吡啶存在的条件下, 琥珀酸酐与叔丁醇进行酯化反应制备了丁二酸单叔丁酯; 然后将丁二酸单叔丁酯与姜黄素反应合成一、二取代的姜黄素琥珀酸叔丁酯。由于生成的一、二取代姜黄素琥珀酸叔丁酯化合物极性明显降低, 易于进行柱层析分离。分离提纯后得到的一、二取代姜黄素琥珀酸叔丁酯在氯化氢作用下分别进行脱保护, 得到一、二取代姜黄素琥珀酸酯, 再将其与氢化钠反应即得到最终产物一、二取代姜黄素琥珀酸酯钠盐。用这种方法合成的姜黄素琥珀酸酯钠盐纯度好, 稳定性高, 经长时间放置未见游离姜黄素析出。

### 2 前药的理化性质、代谢及抗炎活性

**2.1 前药的溶解度及稳定性** 药物的溶解度是药物的一个重要参数, 也是药物能否被吸收的关键因素之一。姜黄素本身难溶于水, 在水中的溶解度仅为  $13.76 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 一直没有找到与之合适的剂型<sup>[18]</sup>。本文合成了一取代和二取代姜黄素琥珀酸酯钠盐并用紫外分光光度法测定了它们在水中的溶解度, 结果表明一取代姜黄素琥珀酸酯钠盐在水中的溶解度为  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 二取代姜黄素琥珀酸酯钠盐在水中的溶解度为  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 比姜黄素具有明显改善, 达



**Scheme 1** Synthesis of curcumin succinate prodrugs



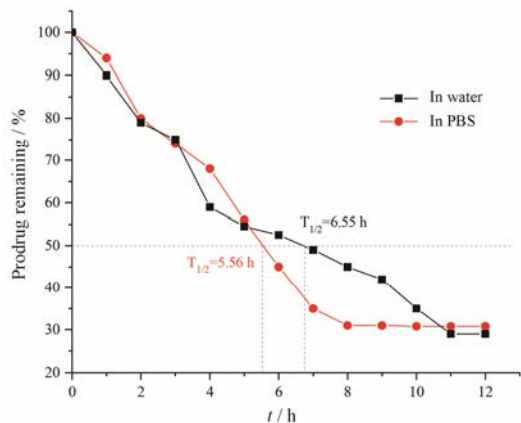
**Scheme 2** Synthesis of curcumin succinate prodrugs

到了注射剂的要求。

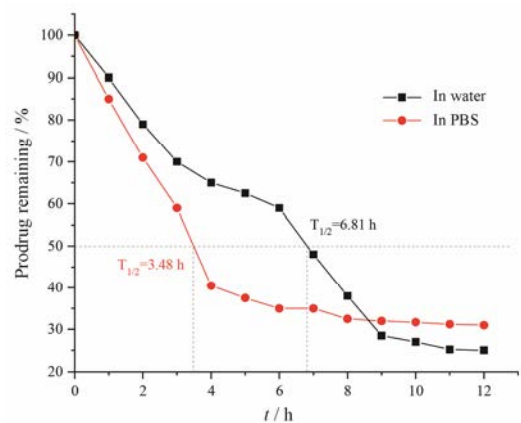
Wang 等<sup>[19]</sup>通过实验证实, 姜黄素在中性 pH 值中稳定性较差, 分解产生阿魏酰甲烷 (4-羟基-3-甲氧基肉桂酸甲烷) 和阿魏酸 (4-羟基-3-甲氧基肉桂

酸)。在 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中, 25 mmol·L<sup>-1</sup> 的姜黄素溶液 5 min 后含量约为 50%, 10 min 后含量约剩 10%。结果显示分解呈 pH 依赖性, 中性-碱性条件下易分解。Wan 等<sup>[20]</sup>也证实, 在溶液中, 当 pH ≤ 5

时姜黄素稳定。随着溶液的 pH 值升高, 姜黄素的降解速率明显加快。为了考察姜黄素琥珀酸酯钠盐的稳定性, 本文采用紫外分光光度法测定一取代和二取代姜黄素琥珀酸酯钠盐在水中含量与时间变化曲线, 结果见图 3 和图 4。



**Figure 3** Plot of percent prodrug remaining as a function of time for curcumin succinate monoester in water and in phosphate buffer solution (pH 7.4)

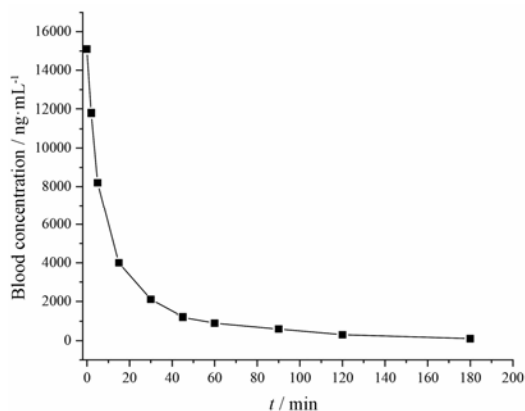


**Figure 4** Plot of percent prodrug remaining as a function of time for curcumin 4,4'-bissuccinate ester in water and in phosphate buffer solution (pH 7.4)

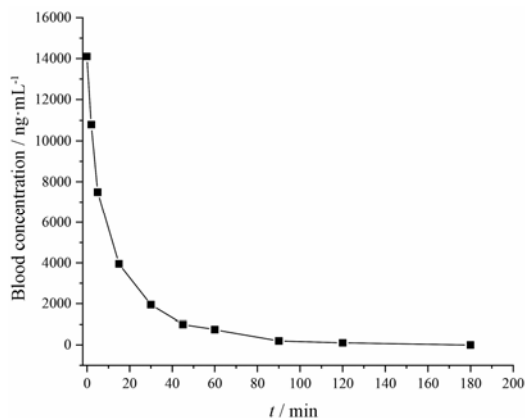
姜黄素单取代琥珀酸酯钠盐在水中和 PBS 缓冲溶液中的稳定性相近, 在水中比 PBS 缓冲溶液中略稳定 ( $T_{1/2\text{水}} = 6.55\text{ h}$ ,  $T_{1/2\text{PBS}} = 5.56\text{ h}$ ); 姜黄素双取代琥珀酸酯钠盐在水中和 PBS 缓冲溶液中的稳定性相差很大, 在水中比 PBS 缓冲溶液中稳定得多 ( $T_{1/2\text{水}} = 6.81\text{ h}$ ,  $T_{1/2\text{PBS}} = 3.48\text{ h}$ )。姜黄素单取代琥珀酸酯钠盐和姜黄素双取代琥珀酸酯钠盐在水中的稳定性较好, 半衰期基本相同 ( $T_{1/2\text{一取代}} \approx 6.55\text{ h}$ ,  $T_{1/2\text{二取代}} \approx 6.81\text{ h}$ ); 在 PBS 缓冲溶液中, 姜黄素单取代琥珀酸酯钠盐的稳定性强于姜黄素双取代琥珀酸酯钠盐 ( $T_{1/2\text{二取代}} \approx 3.48\text{ h}$ ,  $T_{1/2\text{一取代}} \approx 5.56\text{ h}$ )。与姜黄素相比, 姜黄素琥珀酸酯前体药物在水中和 PBS 缓冲溶液中的稳定性已

经具有明显改善。

**2.2 大鼠体内代谢实验** 由于姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性, 逐渐引起了国内外学者的关注, 人们对其进行了广泛深入地研究。Wahlstrom 等<sup>[21]</sup>最先对姜黄素的生物利用度进行了研究。他们给大鼠口服姜黄素  $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 但在血浆中几乎检测不到姜黄素的浓度, 后来又开展了一系列研究, 取得的实验结果大致相似。出现这种现象的主要原因是姜黄素的水溶性差, 因而导致其生物利用度很低。但姜黄素转化成琥珀酸酯前体药物后, 其水溶性得到了极大地改善。经尾静脉注射姜黄素琥珀酸酯前体药物后, 大鼠血浆中只能检测到姜黄素而检测不到姜黄素琥珀酸酯, 说明前药已经迅速完全转变成姜黄素。图 5 和图 6 是经尾静脉注射姜黄素琥珀酸酯前体药物 ( $12.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 后得到的姜黄素血药浓度曲线。由血药浓度曲线可以看出, 姜黄素在大鼠体内代谢速度较快, 半衰期  $T_{1/2}$  为 10 min, 约 180 min 代谢完全。



**Figure 5** Plot of the plasma curcumin concentrations versus time obtained after intravenous administration of curcumin succinate monoester ( $12.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )



**Figure 6** Plot of the plasma curcumin concentrations versus time obtained after intravenous administration of curcumin 4,4'-bissuccinate ester ( $12.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

**2.3 前体药物的抗炎活性研究** 本文以地塞米松为阳性对照, 生理盐水为阴性对照, 采用鸡蛋清诱导的大鼠足跖肿胀模型对姜黄素琥珀酸酯前体药物的抗炎活性进行了评价, 实验结果见表 1。

结果显示, 生理盐水组的大鼠在致炎后, 右后足跖逐渐发生肿胀, 并且在 1 h 后达到肿胀顶点, 2 h 后略有缓解, 但仍明显处于肿胀状态; 地塞米松组的大鼠在致炎后, 右后足跖同样发生肿胀, 但在 30 min 后逐渐开始消肿, 2 h 后恢复正常; 另外两个姜黄素前药组的大鼠致炎后, 右后足跖发生肿胀, 30 min 后开始消肿, 2 h 同样恢复正常。由此可以得出结论, 二取代姜黄素琥珀酸酯钠盐和一取代姜黄素琥珀酸酯钠盐在进入大鼠体内后, 在 30 min 开始产生明显消肿的作用, 2 h 后完全消肿, 同等剂量下其抗炎效果与地塞米松相当。姜黄素琥珀酸酯前体药物进入大鼠体内代谢产生姜黄素, 姜黄素通过抑制大鼠体内花生四烯酸环氧酶抗炎活性<sup>[22,23]</sup>。与以往的实验不同, 本实验首次采用注射给药, 因此比较准确提供了姜黄素血药浓度与药物作用强度的关系, 为后期研究打下了基础。

### 3 小结

姜黄素是一种从姜科姜黄属植物中提取得到的多酚类化合物, 具有良好的抗炎活性。针对姜黄素水溶性差的特点, 本文设计并合成了单取代和双取代姜黄素琥珀酸酯前体药物。与姜黄素相比, 所得前体药物的水溶性明显改善, 同时在水中和磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4) 中具有良好的稳定性。体内代谢实验表明, 姜黄素琥珀酸单酯和双酯进入大鼠体内后可迅速完全释放出姜黄素。抗炎实验显示, 姜黄素琥珀酸单酯和双酯经尾静脉注射给药后, 对鸡蛋清诱导的大鼠足肿胀模型产生明显的抗炎作用, 与同等剂量下地塞米松的药效相似。以上实验为姜黄素琥珀酸酯前体药物的深入研究打下了基础。

### 实验部分

熔点用 SGWX-4 型显微熔点仪测定, 温度未校正; 核磁共振谱用 Bruker Avance III 500 核磁共振仪

测定, TMS 为内标; 质谱用 Varian MS 500 质谱仪测定; 紫外吸收采用双光束紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司) 测定; 柱色谱硅胶 (200~300 目) 为青岛海洋化工厂生产, 薄层色谱采用 Merck GF254 薄层色谱硅胶板; 其余试剂均为市售分析纯产品, 除特别说明外, 未经处理直接使用。

### 1 前体药物的合成

**1.1 琥珀酸单叔丁酯的合成** 将丁二酸酐 5 g (50 mmol)、*N*-羟基琥珀酰亚胺 1.726 g (15 mmol)、4-二甲氨基吡啶 0.611 g (5 mmol) 混合溶于 30 mL 甲苯中, 再加入叔丁醇 4.818 g (65 mmol) 和三乙胺 1.518 g (15 mmol), 升温至 110 °C, 搅拌回流反应 24 h。停止反应, 将反应液冷却至室温, 加入乙酸乙酯 30 mL 稀释, 并用 10% 柠檬酸水溶液洗涤 3 次, 饱和氯化钠水溶液洗涤 3 次, 收集有机相, 加入无水硫酸钠干燥过夜。过滤, 滤液减压蒸馏, 得到棕色油状液体, 用石油醚-乙醚重结晶, 得到白色针状晶体 3.031 g, 产率 44.1%, 熔点 50~55 °C, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.19 (s, 1H), 2.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.70 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.50 (s, 9H); LC-MS *m/z*: 173.1 [M-H]<sup>-</sup>。

**1.2 一、二取代姜黄素琥珀酸叔丁酯的合成** 将琥珀酸单叔丁酯 2.088 g (12 mmol)、三乙胺 3.642 g (36 mmol)、BOP 5.304 g (12 mmol) 混合溶于 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中。冰浴条件下, 将其缓慢滴加至姜黄素 2.210 g (6 mmol) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液中, 30 min 后缓慢升至室温, 继续反应 4 h。反应结束后, 先后用水和饱和氯化钠洗涤反应液, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥过夜。过滤, 滤液减压蒸馏得到深红色黏稠液体, 硅胶柱层析 (流动相: 石油醚-丙酮=3:1) 得产物。

一取代姜黄素琥珀酸叔丁酯 橙色油状液体 0.56 g, 转化率 18%。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.62~7.59 (m, 2H), 7.28~6.92 (m, 6H), 6.56~6.48 (m, 2H), 5.84 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 2.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.68 (t, *J* = 6.8 Hz 2H), 1.48 (s, 9H); LC-MS *m/z*: 523.1 [M-H]<sup>-</sup>。

二取代姜黄素琥珀酸叔丁酯 黄色油状液体 3.045 g, 转化率 75%。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

**Table 1** Anti-inflammatory activity of curcumin succinate prodrugs

Entry	Dose/mg·kg <sup>-1</sup>	Mean increase in paw circumference/cm					
		0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h
Control		3.00 ± 0.05	3.15 ± 0.12	3.29 ± 0.13	3.32 ± 0.12	3.33 ± 0.09	3.24 ± 0.06
Dexamethasone	12.5	3.00 ± 0.06	3.30 ± 0.20	3.32 ± 0.10	3.20 ± 0.09	3.12 ± 0.09	3.06 ± 0.06
Curcumin diester	12.5	2.95 ± 0.05	3.12 ± 0.13	3.17 ± 0.12	3.04 ± 0.04	3.02 ± 0.03	3.00 ± 0.01
Curcumin monoester	12.5	2.98 ± 0.02	3.14 ± 0.12	3.24 ± 0.04	3.20 ± 0.12	3.09 ± 0.04	3.00 ± 0.01

7.63 (d,  $J = 15.8$  Hz, 2H), 7.28 (s, 2H), 7.18~7.06 (m, 4H), 6.58 (d,  $J = 15.8$  Hz, 2H), 5.87 (s, 1H), 3.89 (s, 6H), 2.89 (t,  $J = 5.9$  Hz, 4H), 2.68 (t,  $J = 5.9$  Hz, 4H), 1.48 (s, 18H); LC-MS  $m/z$ : 702.8 [M+Na]<sup>+</sup>。

**1.3 一、二取代姜黄素琥珀酸酯的合成** 冰浴且避光条件下, 分别将一取代姜黄素琥珀酸叔丁酯 1.082 g (2 mmol) 和二取代姜黄素琥珀酸叔丁酯 3 g (4.4 mmol) 溶于 30 mL 二氯甲烷中, 缓慢通入过量的氯化氢气体。TLC 监测原料消失后, 停止通氯化氢, 将反应液减压浓缩得产物。

一取代姜黄素琥珀酸酯 深绿色固体粉末 0.892 g, 产率 92.3%, 熔点 136~138 °C。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.70 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.70~7.61 (m, 2H), 7.30~6.94 (m, 6H), 6.56~6.49 (m, 2H), 6.14 (s, 1H), 3.81 (s, 6H), 2.97 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.70 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H); LC-MS  $m/z$ : 491.0 [M+Na]<sup>+</sup>。

二取代姜黄素琥珀酸酯 深黄色固体粉末 2.2 g, 产率 79.8%, 熔点 130~132 °C。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.30 (s, 2H), 7.66 (d,  $J = 15.9$  Hz, 2H), 7.52 (s, 2H), 7.34 (d,  $J = 10.8$  Hz, 2H), 7.13 (d,  $J = 10.8$  Hz, 2H), 6.99 (d,  $J = 15.9$  Hz, 2H), 6.21 (s, 1H), 3.83 (s, 6H), 2.81 (t,  $J = 6.3$  Hz, 4H), 2.59 (t,  $J = 6.3$  Hz, 4H); LC-MS  $m/z$ : 569.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.4 一、二取代姜黄素琥珀酸酯钠盐的合成** 冰浴且避光条件下, 分别将一取代姜黄素琥珀酸酯 0.562 g (1.196 mmol) 和二取代姜黄素琥珀酸酯 1.253 g (2.2 mmol) 溶于 30 mL 四氢呋喃中。精确称取处理后的氢氧化钠固体 0.287 g (1.196 mmol) 和 0.106 g (4.4 mmol), 分别加入一取代和二取代姜黄素琥珀酸酯的四氢呋喃溶液中。TLC 监测原料消失后, 停止反应。将反应液减压蒸馏, 经冻干得产物。

一取代姜黄素琥珀酸酯钠盐 深红色固体粉末 0.423 g, 产率 72.1%, 熔点 105~108 °C。

二取代姜黄素琥珀酸酯钠盐 深黄色固体粉末 1.039 g, 产率 77.1%, 熔点 107~111 °C。

## 2 溶解度测试实验

精密称取姜黄素琥珀酸酯钠盐 2 mg 加入到离心管中, 加入超纯水 1 mL 使其溶解。待全部溶解后, 再次精密称取钠盐 2 mg, 加入其中, 重复上述步骤, 直到观察到固体不再溶解, 记录加入固体的总质量, 即得到姜黄素琥珀酸酯钠盐在水中的溶解度。

## 3 稳定性实验

**3.1 水中稳定性实验** 本实验采用紫外分光光度法测试姜黄素衍生物在水及缓冲溶液中的稳定性, 具

体方法为: 精密称取姜黄素琥珀酸酯钠盐 25.00 mg 于 250 mL 的量瓶中, 加入超纯水并定容至 250 mL, 得到 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的姜黄素衍生物溶液, 室温下避光保存。从起点开始, 每隔 1 h 取样, 过滤, 加入到石英比色皿中, 设置检测波长为 500~350 nm, 进行扫描, 测定其最大吸收波长下对应的吸光度, 并与起始吸光度比较, 计算其含量百分率, 做含量百分率-时间曲线, 即得到姜黄素琥珀酸酯钠盐在水中的稳定性数据。

**3.2 磷酸盐缓冲溶液中稳定性实验** 精密称取姜黄素琥珀酸酯钠盐 25.00 mg 于 250 mL 的量瓶中, 加入磷酸盐缓冲溶液 (pH = 7.4 ± 0.2) 并定容至 250 mL, 得到 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的姜黄素琥珀酸钠溶液, 室温下避光保存。从起点开始, 每隔 1 h 取样, 过滤, 加入到石英比色皿中, 设置检测波长为 500~350 nm, 进行扫描, 测定其最大吸收波长下对应的吸光度, 并与起始吸光度比较, 计算其含量百分率, 作含量百分率-时间曲线, 即得到姜黄素琥珀酸酯钠盐在磷酸盐缓冲溶液中的稳定性数据。

## 4 体内代谢实验

姜黄素琥珀酸酯前体药物体内代谢实验采用 Xevo TQ MS-acquity UPLC System (美国 Waters 公司) 测定, 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (2.1 mm × 50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , 美国 Waters 公司), 流动相乙腈-0.2% 甲酸水溶液, 流速 0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 华法令为内标, 单个样品分析时间 3.5 min, 梯度洗脱 (0 min: 40% 乙腈, 3 min: 100% 乙腈), 柱温 35 °C; 进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

实验动物为成年 SD 大鼠, 体重 190~200 g, 由军事医学科学院北京实验动物中心提供, 经伦理委员会批准且实验均按照相关指导原则和规定进行, 实验前禁食 12 h, 自由饮用无菌水。

大鼠适应 3 天后, 尾静脉注射给药, 剂量为 12.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 每个时间点 5 只动物。分别于给药后 2 min、5 min、15 min、30 min、45 min、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h 从眼底静脉丛取血 0.5 mL, 置于肝素化的 1.5 mL Eppendorf 中, 于 4 °C、3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下离心 10 min, 转移血浆于 1.5 mL Eppendorf 中, -80 °C 冰箱中保存备用。

将血浆供试品在室温下融化后混匀以备用。用移液器吸取血浆 100  $\mu\text{L}$  于 2 mL Eppendorf 管中, 依次加入内标 20  $\mu\text{L}$ , 乙腈 (含 0.2% 的甲酸) 300  $\mu\text{L}$ , 涡旋振荡 5 min, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 °C 条件下离心 15 min, 取上清液 400  $\mu\text{L}$ , 置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 30 °C

水浴中氮气流下吹干, 残留物用含 50% 水的乙腈溶液 100  $\mu\text{L}$  复溶, 涡旋振荡 1 min, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 15 min, 取上清液 5  $\mu\text{L}$  进样。采用 WatersXevo 系列三重四级杆质谱仪测定, 氮气为载气, 电喷雾离子源 (ESI) 正负离子模式同时检测记录实验结果。

## 5 抗炎活性实验

本实验以采用鸡蛋清作为致炎剂, 以雄性大鼠 (成年 SD 大鼠, 体重 190~200 g, 购于军事医学科学院北京实验动物中心, 实验前禁食 12 h, 自由饮用无菌水) 为模型, 设置两组对照组和两组实验组。阳性对照组静脉注射地塞米松, 阴性对照组静脉注射生理盐水, 两组实验组分别静脉注射二取代和一取代姜黄素琥珀酸酯钠盐的生理盐水溶液。踝关节方向皮下注射鸡蛋清作为致炎方式, 并测定大鼠踝关节肿胀程度, 以观察姜黄素衍生物的抗炎消肿作用, 具体实验步骤为: 将 20 只雄性大鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 称重, 并分别编号为 1、2、3、4、5。其中第一组是生理盐水组, 第二组是二取代姜黄素琥珀酸酯钠盐组, 第三组是地塞米松组, 第四组是一取代姜黄素琥珀酸酯钠盐组; 取第一组大鼠由尾静脉注射生理盐水 1  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 第二组大鼠由尾静脉注射 0.5% 的二取代姜黄素琥珀酸酯钠盐生理盐水溶液 1  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 第三组大鼠由尾静脉注射 0.5% 地塞米松注射液 1  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 第四组大鼠由尾静脉注射 0.5% 的一取代姜黄素琥珀酸酯钠盐生理盐水溶液 1  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; 剪去每只鼠右后肢踝关节的毛并在足跖某处用记号笔画点作为测量点, 并用软尺测量右后足的原始周长; 在 4 组大鼠注射药物 30 min 后, 从右后足掌心向踝关节方向用 4 号针头皮下注射 10% 鸡蛋清 0.1  $\text{mL}$ ; 在注射致炎物后的 5、15、30、60 和 120 min 分别测量右后足跖的周长, 将致炎后的足跖厚度减去致炎前的足跖厚度即为足跖肿胀度。

## References

[1] Ferrero-Miliani L, Nielsen OP, Andersen PS, et al. Chronic inflammation-importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2007, 147: 227–235.

[2] Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs [J]. *Nat New Biol*, 1971, 231: 232–235.

[3] Roth G, Chandra A, Nair M. Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents [J]. *Nat Prod*, 1998, 61: 542–545.

[4] Aggarwal BB, Kumar AP, Bharti AC. Anticancer potential of

curcumin preclinical and clinical studies [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23: 363–398.

[5] Jordan WC, Drew CR. Curcumin — a natural herb with anti-HIV activity [J]. *J Natl Med Assoc*, 1996, 88: 333.

[6] Chan MM, Ho CT, Huang HI. Effects of three dietary phytochemicals from tea rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production [J]. *Cancer Lett*, 1995, 96: 23–29.

[7] Chan MM, Huang HI, Fenton MR, et al. *In vivo* inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55: 1955–1962.

[8] Lukita Atmadja W, Ito Y, Baker GL, et al. Effect of curcuminoids as anti-inflammatory agents on the hepatic microvascular response to endotoxin [J]. *Shock*, 2002, 17: 399–403.

[9] Mukhopadhyay A, Basu N, Ghatak N, et al. Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats [J]. *Agents Actions*, 1982, 12: 508–515.

[10] Satoskar RR, Shah SJ, Shenoy SG. Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1986, 24: 651–654.

[11] Lal B, Kapoor AK, Asthana OP, et al. Efficacy of curcumin in the management of chronic anterior uveitis [J]. *Phyther Res*, 1999, 13: 318–322.

[12] Lal B, Kapoor AK, Agrawal PK, et al. Role of curcumin in idiopathic inflammatory orbital pseudotumours [J]. *Phyther Res*, 2000, 14: 443–447.

[13] Majeed M, Badmaev V, Shivakumar U, et al. Curcuminoids Antioxidant Phytonutrients [M]. Piscataway, NJ: Nutriscience Publishers Inc, 1995.

[14] Cheng AL, Hsu C, Lin J, et al. Phase I clinical trial of curcumin a chemopreventive agent in patients with high-risk or pre-malignant lesions [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21: 2895–2900.

[15] Deodhar SD, Sethi R, Srimal RC. Preliminary studies on antirheumatic activity of curcumin [J]. *Indian J Med Res*, 1980, 71: 632–634.

[16] Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat [J]. *Basic Clin Pharmacol*, 1978, 43: 86–92.

[17] Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice [J]. *Drug Metab Dispos*, 1999, 27: 486–494.

[18] Modasiya M, Patel V. Studies on solubility of curcumin [J]. *Int J Pharm Life Sci*, 2012, 3: 1490–1497.

[19] Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, et al. Stability of curcumin

- in buffer solutions and characterization of its degradation products [J]. *J Pharm Biomed*, 1997, 15: 1867–1876.
- [20] Wan H, Zhao Y, Han G, et al. Study on stability of curcumin in different condition [J]. *Med Innov China (中国医学创新)*, 2009, 6: 17–18.
- [21] Wahlstrom B, Blenow G. A study on the fate of curcumin in the rat [J]. *Basic Clin Pharmacol*, 1978, 43: 86–92.
- [22] Ammon HP, Safayhi H, Mack T, et al. Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and boswellic acids [J]. *J Ethnopharmacol*, 1993, 38: 113–119.
- [23] Jian YT, Wang JD, Mai GF, et al. Curcumin regulates cyclooxygenase-2 activity in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis [J]. *J Fourth Mil Med Univ (第四军医大学学报)*, 2005, 26: 521–524.