

2-茚酮基姜黄素类似物对酪氨酸酶的抑制作用

韦星船, 缪绸雨, 段彦飞, 陈永洲, 黄晓罗, 张晓琳
(广州大学化学化工学院, 广东 广州 510006)

摘要: 酪氨酸酶抑制剂可作为食品添加剂用作果蔬保鲜和防腐, 芳香醛在适宜的条件下与2-茚酮进行缩合反应, 合成5种含2-茚酮基的对称姜黄素类似物(A₁~A₅)。利用紫外分光光度法测定其对酪氨酸酶的抑制作用。结果表明: 合成的对称性姜黄素类似物均对酪氨酸酶有较强的抑制作用, 其中A₂~A₄的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为25.42、13.51、10.71 μmol/L, 比广泛使用的食品添加剂曲酸(IC₅₀为28.59 μmol/L)的抑制作用强。

关键词: 食品添加剂; 2-茚酮基姜黄素类似物; 酪氨酸酶抑制活性; 姜黄素

Synthesis and Tyrosinase Inhibitory Activity of 2-Indanone-based Curcumin Analogs

WEI Xing-chuan, MIAO Chou-yu, DUAN Yan-fei, CHEN Yong-zhou, HUANG Xiao-luo, ZHANG Xiao-lin
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Tyrosinase inhibitors are widely used as food additives for fruit and vegetable preservation. Five symmetric curcumin analogs were synthesized by condensation reaction between aromatic aldehydes and 2-indanone under appropriate conditions. The inhibitory activity of the curcumin analogues on tyrosinase was evaluated by ultraviolet spectrophotometry. The results showed that these curcumin analogues had powerful inhibitory effects on tyrosinase. The IC₅₀ of A₂, A₃ and A₄ were 25.42, 13.51 μmol/L and 10.71 μmol/L, respectively, which were evidently lower than that of kojic acid (IC₅₀ = 28.59 μmol/L).

Key words: food additive; 2-indanone-based curcumin analogs; tyrosinase inhibition; curcumin

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)15-0066-03

doi:10.7506/spkx1002-6630-201315014

酪氨酸酶也叫多酚氧化酶, 是结构复杂的多亚基的含铜氧化还原酶^[1], 在果蔬中普遍存在。酪氨酸酶具有独特的双重催化功能, 是生物体内合成黑色素的关键酶, 也是引起水果、蔬菜发生酶促褐变的主要酶类^[2]。酪氨酸酶催化氧化果蔬中的内源性多酚物质生成黑色素^[3], 严重影响果蔬等食品的外观品质、营养及商品价值, 令产品难以长期保质保存^[4], 故此酪氨酸酶抑制剂可以用作食品保鲜和防腐。

姜黄素(结构式见图1)是从姜科姜黄属植物的根茎中提取的一种天然有效成分^[5], 具有抗氧化、抗炎、抗病毒、抗癌等生物活性^[6-8]。近年来, 国内外出现许多关于姜黄素类似物及其衍生物作为酪氨酸酶抑制剂的研究, 这些研究主要偏重于含有两个羰基的姜黄素类似物及酚类姜黄素类似物对酪氨酸酶抑制活性的研究^[9-10], 该类姜黄素类似物存在易被氧化的缺陷, 为实际应用增添了难度。目前虽然有报道关于非酚类姜黄素类似物对酪氨酸酶活性的研究^[11], 但是其抑制活性一般。本实验成功合

成性能相对稳定并对酪氨酸酶具有较强抑制活性的2-茚酮基姜黄素类似物。

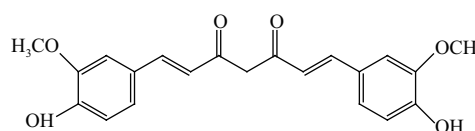
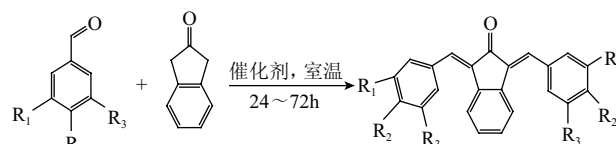


图1 姜黄素结构图

Fig.1 Structure of curcumin

本实验设计合成了5种对称性姜黄素类似物, 并研究其对酪氨酸酶的抑制作用, 合成路线如图2所示。



A₁. R₁=R₃=H, R₂=F; A₂. R₁=R₃=H, R₂=Cl; A₃. R₁=R₃=H, R₂=Br; A₄. R₁=R₃=H, R₂=OH; A₅. R₁=R₃=OCH₃, R₂=OH。

图2 姜黄素类似物合成反应

Fig.2 Synthesis reaction of curcumin analogs

收稿日期: 2012-09-14

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B050400028); 广州市科技计划项目(12C32011623);

广州大学“挑战杯”大学生课外学术科技作品项目(1107812005)

作者简介: 韦星船(1964—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为药物合成化学。E-mail: gzwxc001@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

取代苯甲醛(分析纯) 美国Acros Organics公司;
2-茛酮(分析纯) 上海Aladdin有限公司; 酪氨酸酶(比活力为3933U/mg)、L-多巴(分析纯) 美国Worthington Biochem公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

双目镜X-5型显微熔点测定仪 北京泰克仪器有限公司; UV-1102型紫外分光光度计 上海天美科学仪器有限公司; XT200A型电子分析天平 瑞士Pracisa公司; PHS-25数显pH计 上海精密科学仪器有限公司; DZF-6020型真空干燥箱 上海一恒科技有限公司; ESQUIRE 3000型质谱分析仪 德国Bruker光谱仪器有限公司; 1~100 μ L移液枪 芬兰杰尼斯实验室设备有限公司; 100~1000 μ L移液枪 德国艾本德股份公司; 硅胶薄层色谱板(TLC) 青岛海洋化工厂。

1.3 方法

1.3.1 2-茛酮基姜黄素类似物的合成

催化剂的配制^[12-13]: 用1g的醋酸铵溶于50mL乙醇得到的乙醇醋酸铵溶液; 将浓硫酸与氯化钠反应产生的HCl气体通入冰乙酸中直至饱和制得催化剂混酸。

在圆底烧瓶中加入适当的芳香醛12mmol, 用16mL合适的催化剂溶解, 然后避光加入2-茛酮4mmol, 快速振荡溶解, 在避光、40℃的条件下反应3h后室温静置3d, 用TLC法跟踪反应进度, 反应完全后用无水乙醇洗涤, 抽滤, 重复洗涤3次后在无水乙醇中重结晶, 40℃真空干燥。其中A₁、A₄、A₅用乙醇醋酸铵作为催化剂, A₂、A₃用混酸作为催化剂。

1.3.2 酪氨酸酶抑制活性测试

分别称取A₁~A₅为0.0069、0.0075、0.0093、0.0068、0.0092g, 用二甲亚砜(DMSO)溶解配制为0.5mol/L的样品溶液待用; 配制质量浓度为4.58mg/mL的L-DOPA溶液、质量浓度为66.7 μ g/mL的酶溶液及0.016mol/L的磷酸缓冲液(pH6.8)。分别取适当量的样品, 960 μ L预先配制好的L-DOPA溶液作为底物, 24 μ L酶溶液, 用缓冲液将体系补充到4000 μ L, 以不加酶只加抑制剂和L-DOPA溶液为空白, 室温下测定70s内在波长为475nm的紫外光下的吸光度随时间的增长直线, 从直线斜率求得酶活力^[14-15]。以样品在混合溶液中终浓度为横坐标, 酶活力为纵坐标作图, 得到导致酶活力下降50%时抑制剂的浓度(IC₅₀)。将IC₅₀作为评价样品抑制效果的评判标准。

2 结果与分析

2.1 对称姜黄素类似物的结构表征

对称姜黄素类似物A₁, 浅黄针状晶体, 产率73%,

mp为177.5~179.3℃, 化学式为C₂₃H₁₄O₂, 元素分析(实测值/计算值): C(80.20/80.23)、H(4.10/4.07)。ESI-MS(*m/z*): 344([M]⁺)。¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 7.32~8.23(14H, -CH=, ArH)。

对称姜黄素类似物A₂, 黄色固体粉末, 产率75%, mp为202.3~202.4℃, 化学式为C₂₃H₁₄OCl₂, 元素分析(实测值/计算值): C(73.18/73.21)、H(3.67/3.71)。ESI-MS(*m/z*): 378([M+H]⁺)。¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 7.27~7.74(14H, -CH=, ArH)。

对称姜黄素类似物A₃, 深黄固体粉末, 产率70%, mp为211.8~213.5℃, 化学式为C₂₃H₁₄OBr₂, 元素分析(实测值/计算值): C(59.26/59.23)、H(3.05/3.00)。ESI-MS(*m/z*): 466([M]⁺)。¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 7.17~8.17(14H, -CH=, ArH)。

对称姜黄素类似物A₄, 深绿色固体粉末, 产率69%, mp为272.4~273.1℃, 化学式为C₂₃H₁₆O₃, 元素分析(实测值/计算值): C(81.19/81.18)、H(4.73/4.71)。ESI-MS(*m/z*): 340([M]⁺)。¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz): δ 8.32(d, 2H, -OH)、7.82(d, 2H, -CH=)、7.67(d, 2H, arom)、7.51(d, 4H, arom)、7.25(d, 2H, arom)、6.82(d, 4H, arom)。

对称姜黄素类似物A₅, 褐绿色块状固体, 产率77%, mp为220.1~221.7℃, 化学式为C₂₇H₂₄O₇, 元素分析(实测值/计算值): C(70.36/70.43)、H(5.20/5.22)。ESI-MS(*m/z*): 460([M]⁺)。¹H-NMR(DMSO-d₆, 300 MHz): δ 9.32(d, 2H, -OH)、9.01(d, 2H, -CH=)、7.91(d, 2H, arom)、7.63(d, 2H, arom)、7.02(d, 4H, arom)、4.93(d, 12H, -OCH₃)。

2.2 化合物对酪氨酸酶的抑制作用

通过紫外分光光度计测量吸光度随时间变化曲线, 计算出酶活力, 以抑制剂浓度为横坐标, 酶活力为纵坐标, 得到化合物对酪氨酸酶的抑制曲线。由此得到导致酶活力下降50%时抑制剂的浓度(IC₅₀), 如表1所示。

表1 2-茛酮基姜黄素类似物对酪氨酸酶的抑制作用
Table 1 Inhibitory effects of 2-indanone-based curcumin analogs on tyrosinase

抑制剂	取代基	IC ₅₀ /(μ mol/L)
A ₁	R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =F	72.09
A ₂	R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =Cl	25.42
A ₃	R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =Br	13.51
A ₄	R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =OH	10.71
A ₅	R ₁ =R ₃ =OCH ₃ , R ₂ =OH	>100
姜黄素		94.73
曲酸		28.59

由表1可知, 实验合成样品对酪氨酸酶的抑制作用有明显变化。随抑制剂结构的变化, 抑制作用有规律性改变。其中由于氢键的吸电子作用, 抑制活性最强的是对羟基苯甲醛与2-茛酮的合成产物: 2,5-双(4-羟基苯基)甲

基)-2-茛酮(A₄), 其对酪氨酸酶的抑制活性是常用食品添加剂曲酸的2.67倍。而含有卤素原子的化合物的酪氨酸酶抑制活性比姜黄素大幅度提高, 按F、Cl、Br的顺序递增, 可能卤原子的引入能增强化合物的酪氨酸酶抑制活性。A₅较A₄多两个-OCH₃, 其抑制作用也明显减弱, 可能是由于氧原子的拉电子效应影响了羟基的氢键作用。实验所得产物除A₅外, 对酪氨酸酶的抑制作用均比姜黄素(IC₅₀ = 94.73 μmol/L)有较大提高。

3 讨论

3.1 文献报道含羟基的芳香醛和酮的反应一般都是对羟基进行保护, 在碱性条件下反应^[16-18], 但醋酸铵的弱碱性既可以避免氧化原料又可以起到很好的催化作用, 因此本实验采用醋酸铵作为催化剂成功合成未见报道的化合物A₄、A₅, 且实验操作简单, 副产物少。

3.2 如今社会以绿色环保为发展宗旨, 合成活性良好、安全无毒的活性物质是国内外学者的研究热点, 本研究采用具有操作简单、条件温和、原料廉价、产率较高的实验方法, 成功合成了5种对称性姜黄素类似物作为新型酪氨酸酶抑制剂, 很有必要对此类化合物进行深入研究, 从而开发出一些可用于食品行业的防腐剂、保鲜剂。

参考文献:

- [1] BRUNET P C J. The metabolism of the aromatic amino acids concerned in the cross: linking of insect cuticle[J]. *Insect Biochem*, 1980, 10(5): 467-500.
- [2] 陈清西, 林建峰, 宋康康. 酪氨酸酶抑制剂的进展[J]. *厦门大学学报*, 自然科学版, 2007, 46(2): 274-283.
- [3] TSUKAMOTO T, ICHIMARU Y, KANCGAC N, et al. Identification and isolation of endogenous insect phenoloxidase inhibitors[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1992, 184(1): 86-92.
- [4] 李韶勇, 孙命. 黑色素的合成及其常见抑制剂的作用机理[J]. *天津师范大学学报*, 自然科学版, 2002, 22(1): 17-22.
- [5] 崔晶, 翟光喜, 姜红祥. 姜黄素的研究进展[J]. *中南药学*, 2005, 3(2): 108-119.
- [6] GOEL A, KUNNUMAKKARA A B, AGGARWAL B B. Curcumin as "Curcumin": from kitchen to clinic[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(4): 787-809.
- [7] AGGARWAL B B, HARIKUMAR K B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases[J]. *Int J Biochem Cell Bio*, 2008, 41: 40-59.
- [8] SHANG Y J, JIN X L, SHANG X L, et al. Antioxidant capacity of curcumin-directed analogues: structure- activity relationship and influence of microenvironment[J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(4): 1435-1442.
- [9] 杜志云, 徐学涛, 潘文龙, 等. 姜黄素类化合物及姜黄素衍生物对酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. *日用化学工业*, 2008, 38(3): 172-175.
- [10] 杜志云, 涂增清, 张焜, 等. 姜黄素多酚类似物对酪氨酸酶抑制活性的研究[J]. *日用化学工业*, 2011, 41(1): 27-31.
- [11] LEE K H, ABAZIZ F H, SYAHIDA A, et al. Synthesis and biological evaluation of curcumin like diarylpentanoid analogues for anti-inflammatory, antioxidant and antityrosinase activities[J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44(8): 3195-3200.
- [12] WEI Y, CAO R H, CHEN Z Y, et al. Design, synthesis and biological evaluation of hydroxy-methoxy- substituted phenyl methylene thiosemicarbazones as tyrosinase inhibitors[J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(11): 1273-1277.
- [13] 杜志云, 涂增清, 张焜, 等. 多酚姜黄素类似物的-步合成[J]. *合成化学*, 2011, 19(3): 385-388.
- [14] 莫容清, 杜志云, 涂增清, 等. 姜黄素类似物2, 5-双(2, 4-二羟基苯亚甲基)环戊酮的合成及酪氨酸酶抑制活性[J]. *化学试剂*, 2012, 34(2): 101-103; 107.
- [15] SEO S Y, SHARMA V K, SHARMAN N. Mushroom tyrosinase: recent prospects [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(10): 2837-2853.
- [16] MAEDA K, FUKUDA M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture[J]. *J Pharm Exp Ther*, 1996, 276(2): 765-769.
- [17] ARTICO M, DISANTO R, COSTI R, et al. Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV- 1 integrase: synthesis, biological evaluation, and molecular modelin[J]. *J Med Chem*, 1998, 41(21): 3948-3960.
- [18] KHATIB S, NERYA O, MUSA R, et al. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors; the importance of a 2, 4- sub-stituted resorcinol moiety[J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(2): 433-441.