



УДК 547.572.6; 547.913.7

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КУРКУМИНОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 1996 г. В. Б. Берзин[#], Л. Г. Кацитадзе, Т. В. Пилипенко,
В. В. Овчаренко, А. И. Мирошников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 02.04.96 г.

Установлены основные направления фрагментации куркуминов и их метиловых эфиров при масс-спектрометрическом анализе, что позволяет идентифицировать эти соединения в экстрактах, выделяемых из природных источников. Исследована сравнительная эффективность выделения куркуминов из корней *Curcuma longa* тремя различными вариантами экстракции.

Ключевые слова: *Curcuma longa*, куркумин, масс-спектры.

Интерес к куркумину (диферулоилметану), основному биологически активному компоненту из корневищ куркумы (*Curcuma longa*), связан с его широким использованием в качестве противовоспалительного средства [1, 2]. В последнее время появился ряд работ по ингибированию куркумином ряда ферментов или ферментных систем [3–5]. Исходя из структуры куркумина-I (I) можно предположить, что ингибирование связано с модификацией им остатка аргинина в белковых молекулах, поскольку известно, что дикетоны могут специфически модифицировать гуанидиновые группы [6].

Для детального исследования механизма молекулярного действия куркумина необходим надежный способ его идентификации. Как правило, содержание куркумина в экстрактах определяют по УФ-поглощению в области 420 нм, что дает лишь приблизительную оценку из-за поглощения близких по химической структуре соединений. В работе описано определение куркуминов в виде O-метилпроизводных с применением ВЭЖХ-анализа. Такой подход позволил оценить эффективность их выделения из измельченных корневищ *C. longa* экстракцией хлороформом, а также однократной или двуступенчатой экстракцией этанолом.

Из исследуемых экстрактов колоночной и препаративной ТСХ на силикагеле были выделены три фракции оранжевого цвета, гомогенные при ТСХ, по хроматографической подвижности и УФ-поглощению соответствующие куркуминам-I–III [7]. Идентификацию куркуминов ранее успешно проводили ВЭЖХ на обращенной фазе Showdex C-18 с элюентом MeCN–H₂O–AcOH (10 : 10 : 1) [8]. Однако низкая растворимость соединений этой

группы в водных растворителях затрудняла хроматографическое выделение образцов в указанных условиях в количествах, достаточных для проведения физико-химического анализа даже при использовании колонок полупрепаративного масштаба. Поэтому мы пробы фракций обрабатывали эфирным раствором диазометана (0–5°C, 2 ч), продукты реакции очищали от полярных примесей препаративной ТСХ, а затем метиловые эфиры анализировали ВЭЖХ на универсальном носителе Zorbax CN с элюентом изопропанол–гексан, 5 : 95 (рис. 1а–1в и 2а, 2б).

Метиловые эфиры куркумина-I и куркумина-III, полученные из куркуминов, содержащихся в

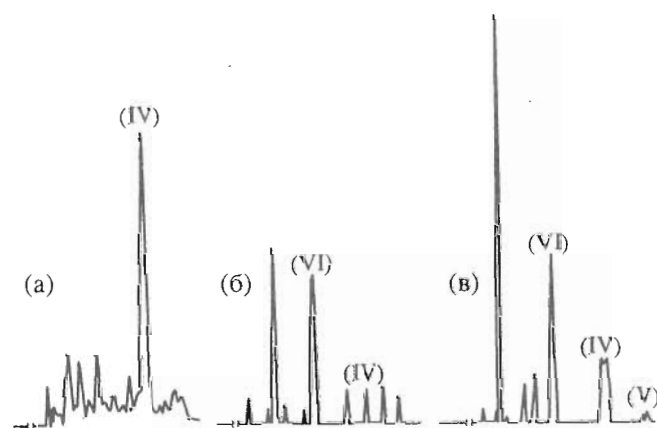


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ обработанной диазометаном фракции R_f 0.3 (см. "Экспер. часть"), обогащенной куркумином-I при экстракции хлороформом (в) и двукратной (а) или однократной (б) экстракции спиртом. Условия ВЭЖХ см. "Экспер. часть". Детекция при λ 230 нм.

[#] Автор для переписки.

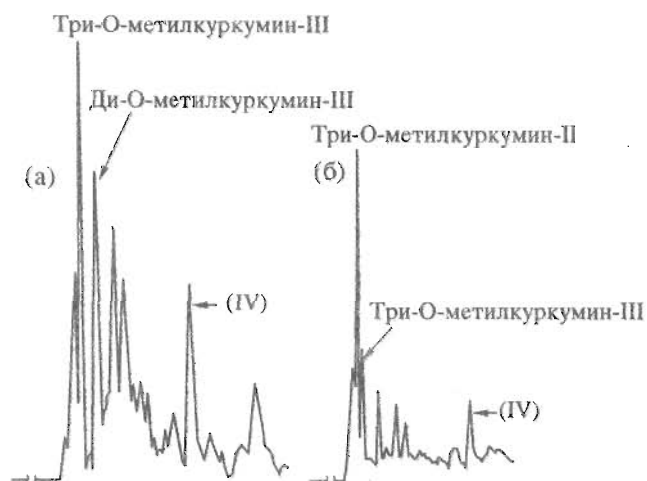


Рис. 2. ВЭЖХ-анализ метиловых эфиров куркумина-III (а) и куркумина-II (б).

экстрактах, далее идентифицировали сравнением с заведомыми образцами, синтезированными из ацетилацетона и 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида или 4-гидроксибензальдегида соответственно

[7, 9] с последующим превращением продуктов в метиловые эфиры. Масс-спектры синтезированного таким образом три-О-метилкуркумина-I (IV) (табл. 1) и образца, выделенного из растительного источника (R_f 0,3), а затем этерифицированного и очищенного полупрепаративной ВЭЖХ, практически совпадают. $^1\text{H-NMR}$ -спектр соединения (IV), подтверждающий его строение, содержит сигналы пяти метоксигрупп (3,95 м. д., с), а также сигналы олефиновых и ароматических протонов. Следует отметить, что сигнал H1 (5,82 м. д., с) по сравнению с аналогичным сигналом в спектре соединения (I) (5,96 м. д., с) оказался смещенным в сильное поле.

Масс-спектр соединения (I), идентичный недавно опубликованному [4], а также масс-спектры синтетического куркумина-III (III) и три-О-метилкуркумина-I (IV) свидетельствуют о совпадении основных направлений фрагментации (схема 1). Эти направления можно представить исходя из ожидаемого распада пяти промежуточных ионов (А–Е), различающихся локализацией заряда и расположением неспаренного электрона. Высокая

Таблица 1. Данные масс-спектров куркуминов (I)–(III) и метиловых эфиров (IV), (VIII)*

| Ионы | m/z (I, %) | | | | |
|------------------|--------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| | (I) | (II) | (III) | (IV) | (VIII) |
| $(M + H)^+$ | 369 (16.10) | 339 (8.3) | 309 (19.11) | 411 (7.5) | 411 (7.47) |
| M^+ | 368 (70.52) | 338 (7.8) | 308 (90.22) | 410 (28.9) | 410 (28.91) |
| $(M-OH)^+$ | 351 (14.19) | 321 (10.0) | 291 (14.13) | — | — |
| $(M-H_2O)^+$ | 350 (44.45) | 320 (8.75) | 290 (38.16) | — | 392 (1.25) |
| $(M-CO)^+$ | 340 (1.62) | — | 280 (7.63) | — | 382 (1.25) |
| $(M-H_2O-Me)^+$ | 335 (3.91) | 305 (1.5) | — | — | — |
| $(M-h-H)^+$ | 325 (0.2) | 296** (4.2) | 265 (1.25) | — | 353 (0.8) |
| $(k)^+$ | 298 (1.65) | 268 (4.0) | 238 (3.41) | 326 (1.8) | 326 (1.84) |
| $(l)^+$ | 272 (18.96) | 242 (6.7) | 212 (24.53) | 300 (18.7) | 300 (18.66) |
| $(M-e-H)^+$ | 244 (5.64) | 214 (8.2) | 214 (7.63) | 272 (7.6) | 272 (7.64) |
| $(M-f)^+$ | 232 (19.82) | 202 (8.3) | 202 (36.02) | — | — |
| $(M-g-H)^+$ | 231 (3.90) | 201 (6.9) | 201 (9.23) | 259 (1.9) | 259 (1.86) |
| $(M-b)^+$ | 219 (3.99) | 219 (6.5) | 189 (14.49) | — | — |
| $(M-d-H)^+$ | 217 (21.00) | — | 187 (29.74) | — | — |
| $(M-a)^+$ | 191 (44.59) | 191 (16.7) | 161 (64.26) | 219 (2.0) | 219 (1.96) |
| | | 161 (12.5) | | 205 (3.6) | |
| $(M-c)^+$ | 190 (53.09) | 190 (14.6) | 160 (76.90) | — | 218 (1.82) |
| $(c)^+$ | 178 (14.88) | — | 148 (23.35) | 192 (17.3) | 192 (17.32) |
| $(a)^+$ | 177 (100) | 177 (27.7) | 147 (100) | 191 (100) | 191 (100) |
| | | 147 (41.6) | | | |
| $(c-CH_2)^+$ | 164 (7.31) | — | 134 (15.45) | — | 178 (4.08) |
| $(c-CH_2-R^2)^+$ | 163 (7.09) | — | 133 (31.40) | 163 (10.2) | 163 (10.16) |
| $(d)^+$ | 150 (26.34) | 150 (100) | 120 (55.13) | — | 164 (4.41) |
| | | 120 (83) | | | |
| $(b)^+$ | 149 (10.15) | 149 (30.5) | 119 (43.49) | — | 163 (10.16) |
| | | 119 (41.9) | | | |
| $(g + H)^+$ | 137 (48.87) | 137 (20.8) | 107 (73.53) | 151 (15.1) | 151 (15.12) |
| | | 107 (39.6) | | | |
| $(e + H)^+$ | 124 (4.15) | — | 94 (6.08) | — | — |

* Для всех соединений, кроме куркумина-II, приведены спектры синтетических образцов.

** Соответствует иону $(M-COCH_2)^+$.

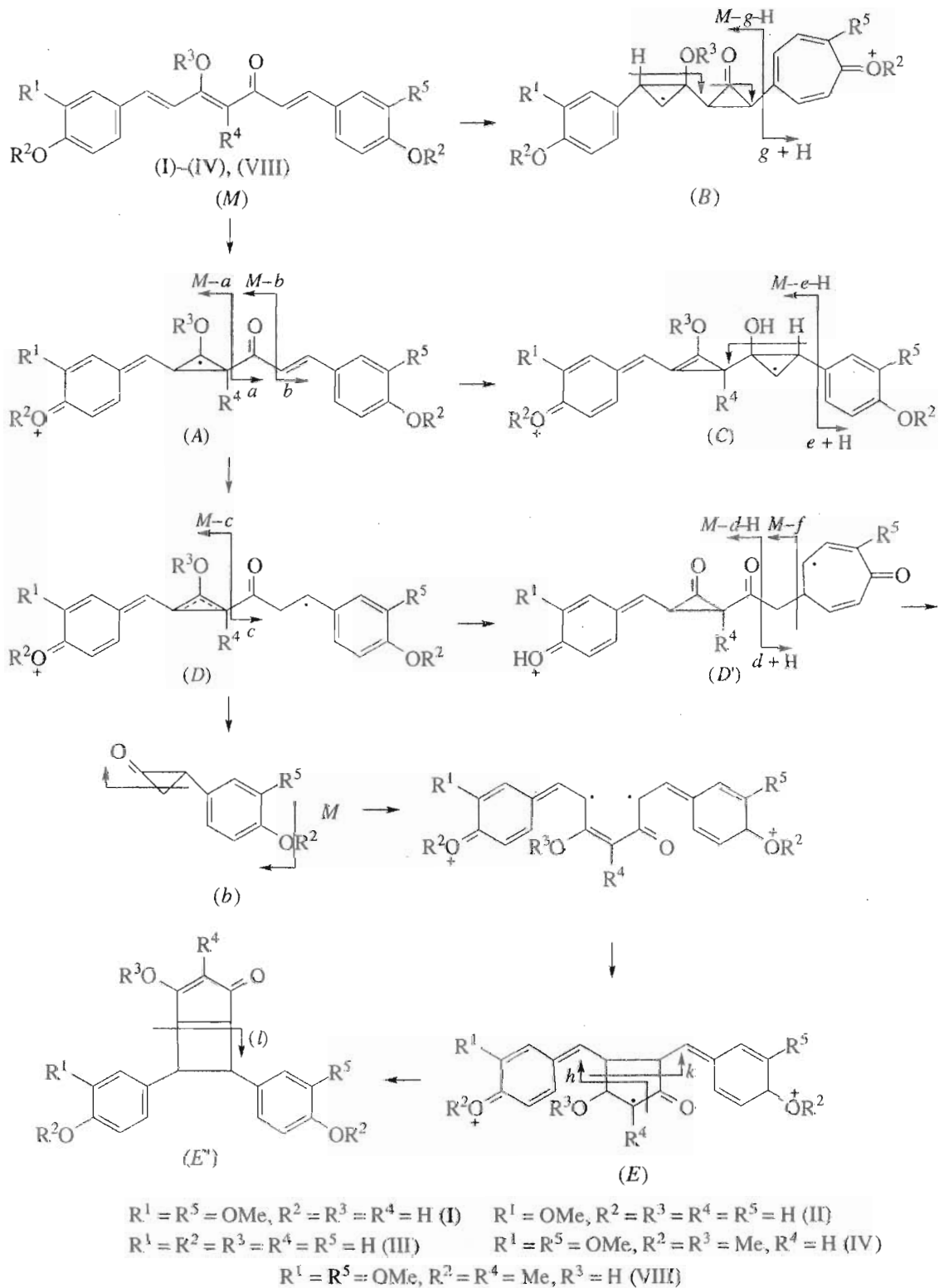
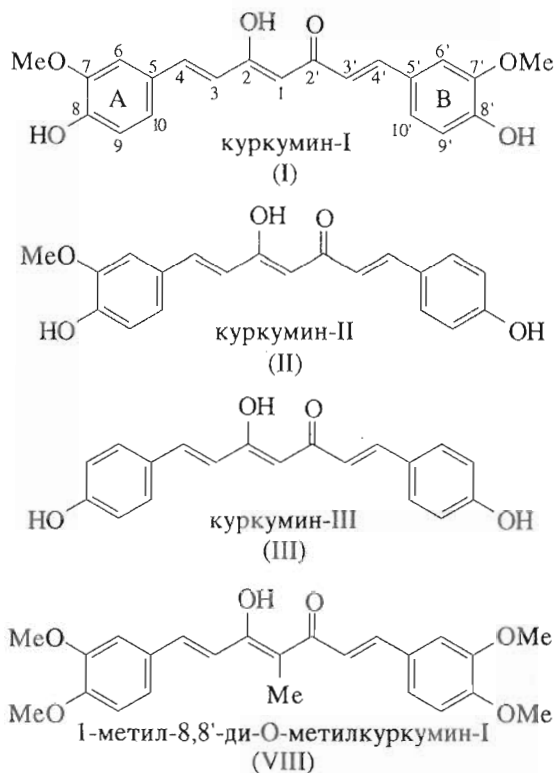


Схема 1. Основные направления фрагментации куркуминов (I)–(III) и метиловых эфиров (IV), (VIII).

вероятность образования иона (A) согласуется с наиболее интенсивными пиками ионов (a)⁺ для соединений (I), (III) и для энолэфира (IV), не обладающего β-дикетонной группировкой (табл. 1). В то

же время интенсивность пиков ионов (b)⁺, возникающих в результате разрыва между карбонильной группой и двойной связью, значительно ниже. Отщепление замещенных ароматических циклов

$(e + H)^+$ из иона (C) или иона тропиля ($g + H)^+$ из иона (B) характерно для всех соединений, но последний распад преобладает. Интенсивности пиков ионов $(g + H)^+$ и ионов $(M-c)^+$ практически совпадают, причем последние соответствуют α -распаду (по связям C1–C2') иона (D), в который, по-видимому, превращается ион (A) в результате миграции протона от C1 к двойной связи при C3'. Для соединений (I), (III) характерен также распад по C2'–C3' и C3'–C4'-связям (ионы $(M-d-H)^+$ и $(M-f)^+$), что можно представить как следствие трансформации ароматического фрагмента иона (D) в соответствующий ион тропиля (D').



Для характеристики куркуминов (I), (III) и производного (IV) существен распад ионов (E' и E),

приводящий в конечном итоге к выбросу фрагмента C3–C3' углеводородной цепи и образованию замещенных стильбенов (I) или их предшественников – производных 1,4-дифенилбутадиена (k). С фрагментацией иона (E) связано образование ионов $(M-CH_2CO-R^3)^+$, причем для соединения (III, $R^3 = H$) трудно представить иной путь отщепления протонированного кетена ($CH_2=C=O^+H$). Для подтверждения такого направления фрагментации исследован масс-спектр 1-метилзамещенного аналога ди-О-метилкуркумина-I (VIII) (табл. 1), полученного алкилированием соединения (I) метилиодидом. Этот вариант метилирования соединения (I) приводил как к 1,1-диметил-, так и к 1-метилпроизводным [9]. В нашем случае образовывалась (по данным ВЭЖХ) смесь четырех соединений в соотношении 19 : 49 : 16.5 : 15.5, из которой доминирующий продукт (VIII) выделен кристаллизацией. Масс-спектр 1-метил-8,8'-ди-О-метилкуркумина-I (VIII) оказался почти идентичным масс-спектру соединения (IV). Таким образом, О- или С-метилирование группировки $COCH_2$ β -дикетонной формы ди-О-метилкуркумина-I (V) (см. схему 3) не влияет на состав ионов (h)⁺. Кроме того, дегидратацию соединения (VIII), не имеющего свободной фенольной группы, можно представить лишь как результат распада иона (C). Декарбонилированию этого же енолэфира (VIII) отвечает распад иона (B). Таким же образом, по-видимому, образуются ионы $(M-H_2O)^+$ и $(M-CO)^+$ и для соединений (I), (III). Возникновение перечисленных первичных ионов (табл. 2), за исключением ионов $(M-b)^+$, подтверждено соответствующими метастабильными переходами в масс-спектрах соединений (I), (III), (VIII).

В соответствии с направлением фрагментации 3,9,9'-три-О-метилдиферулоилацетона (IX), полученного обработкой диазометаном диферулоилацетона [9], выделенного в виде примеси при синтезе куркумина-I (I) и охарактеризованного ¹H-ЯМР-спектром, строение промежуточного

Таблица 2. Первичные ионы в масс-спектрах соединений (I), (III), (VIII), подтвержденные метастабильными переходами

| Ионы | m/z (I, %) | | | Ионы | m/z (I, %) | | |
|--------------|--------------|------------|------------|-------------|--------------|------------|------------|
| | (I) | (III) | (VIII) | | (I) | (III) | (VIII) |
| $(M + H)^+$ | 369 (43) | 309 (32) | 411 (31) | $(I)^+$ | 272 (9.7) | 212 (16.1) | 300 (26.9) |
| M^+ | 368 (100) | 308 (100) | 410 (100) | $(M-e-H)^+$ | 244 (23.6) | 214 (19.3) | 272 (47.3) |
| $(M-Me)^+$ | – | – | 395 (20.4) | $(M-f)^+$ | 232 (12.9) | 202 (21.5) | – |
| $(M-H_2O)^+$ | 350 (11.8) | 290 (11.8) | 392 (30.1) | $(M-g-H)^+$ | 231 (4.4) | 201 (15) | 259 (3.3) |
| $(M-CO)^+$ | 340 (11.8) | 280 (22.6) | 382 (15.1) | $(M-d-H)^+$ | 217 (3.2) | 187 (15.1) | – |
| $(M-MeOH)^+$ | 336 (14.0) | – | 378 (53.8) | $(M-c)^+$ | 190 (33.3) | 160 (75.3) | 218 (2) |
| $(M-h-H)^+$ | 325 (5.4) | 265 (7.5) | 353 (20.4) | $(a)^+$ | 177 (3.3) | 147 (8.8) | – |
| $(k)^+$ | 298 (1.6) | 238 (3.2) | 326 (4.3) | | | | |

молекулярного иона M^+ этого соединения можно представить в виде изомерной тетрациклической структуры (F) (схема 2). В этом случае ионы с m/z 273, 231, 151 согласуются с распадом молекулы по типу $(M-CO-g-H)^+$, $[M-(CO)_2CH_2-g-H]^+$, $[M-(g+H)]^+$ (см. схему 1), что подтверждает наличие β -дикетонной группировки и, следовательно, строение соединения (IX); бициклической структуре соединения (IX) отвечают ионы типа $(M-a)^+$, $(a)^+$, $(a')^+$, $(a'-Me)^+$, $(a'-CH\equiv CH)^+$ (m/z 247, 205, 191, 176, 165 соответственно). Распад эфира (IX) по типу $(M-MeOC=CHCO)^+$, с выбросом второй карбонильной группы и протона, приводит к иону G ($n=2$), m/z 339. Последний при отщеплении одной или двух молекул ацетилена (распад типа I) превращается в ионы с m/z 313, 287.

Весьма вероятно, что некоторые пики, выявленные ВЭЖХ-анализом суммарных экстрактов корневищ куркумы, соответствуют частично метилированным производным соединения (I). Для их идентификации три-О-метилкуркумин (IV) был подвергнут кислотному гидролизу. При кратковременной обработке (20°C , 30 мин) производного (IV) в ацетоновом растворе каталитическим количеством HCl образовывалась смесь (40 : 60) 8,8'-ди-О-метилкуркумина (V) и 8'-О-метилкурку-

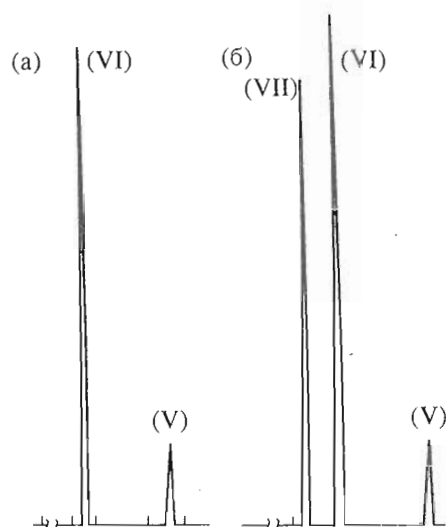


Рис. 3. ВЭЖХ-анализ продуктов частичного гидролиза три-О-метилкуркумина (IV) в течение 30 мин (а), 20 ч (б).

мина (VI) (рис. 3а, схема 3). Лабильность эфира (V) в отличие от производного (VI) не позволила выделить это соединение в чистом виде. Его присутствие в смеси эфиров (V), (VI) установлено

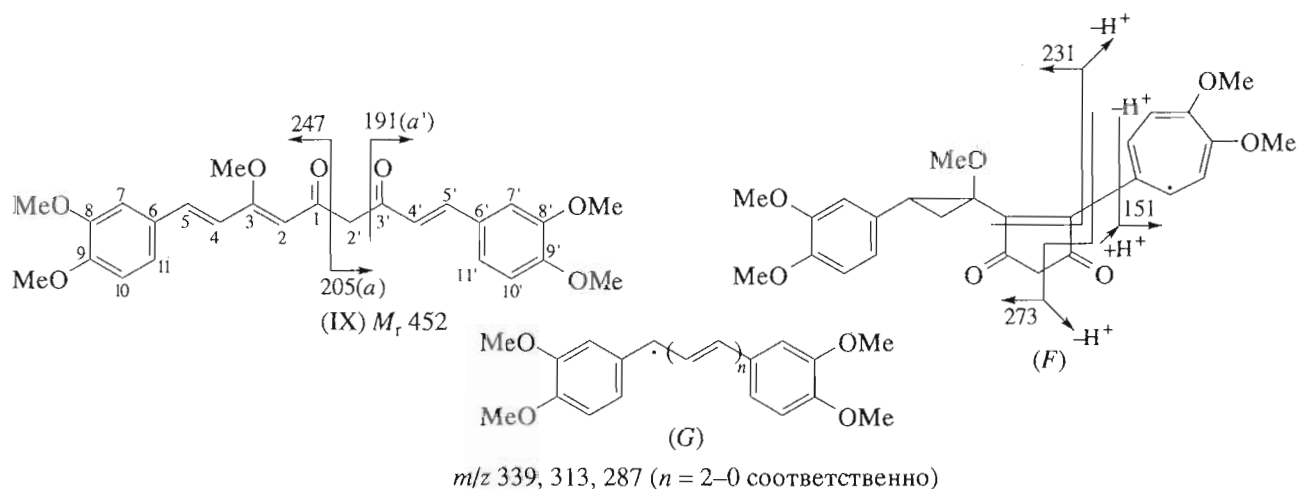


Схема 2. Основные направления фрагментации 3,9,9'-три-О-метилдиферулоилацетона (IX).

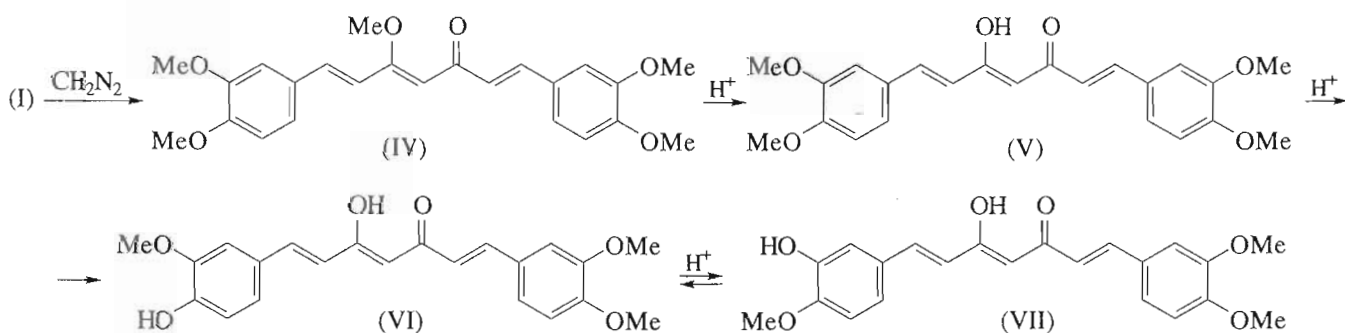


Схема 3. Ступенчатый гидролиз три-О-метилкуркумина (IV).

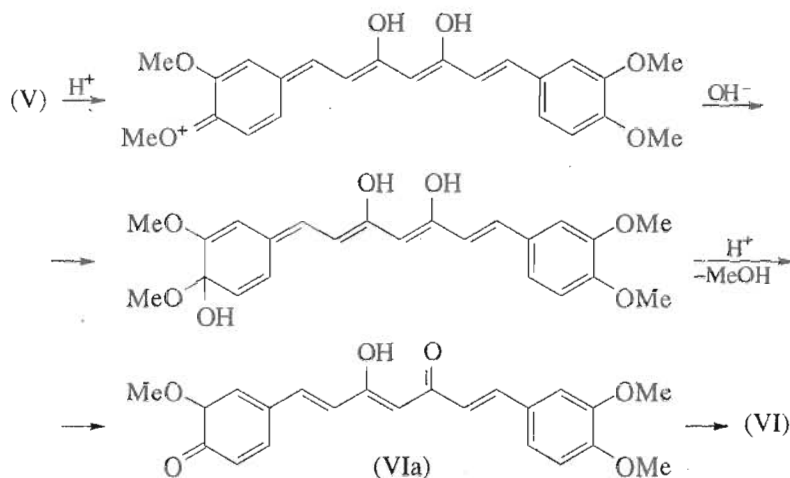


Схема 4. Направление гидролиза 8,8'-ди-О-метилкуркумина (V).

масс-спектрометрически по пикам молекулярного (m/z 396) и перегруппировочных ионов, возникающих при выбросе β -дикетонной группировки или фрагмента C3–C3' углеводородной цепи (m/z 326 или 300, ионы k , l , схема 1). В масс-спектре соединения (VI) аналогичные ионы имели значения m/z 382 и 312, 286 соответственно.

Лабильность енольного эфира при действии кислот хорошо известна [10]. Оказалось, что и 8-метоксигруппа ароматического цикла также подвергается гидролизу, что скорее всего обусловлено таутомерными превращениями соединения (V) (схема 4). Косвенным подтверждением строения моно-О-метилпроизводного (VI) послужило его обнаружение при анализе метиловых эфиров фракции с R_f 0,3, выделенной из суммарных экстрактов (табл. 3), поскольку среди известных природных диарилгептеноидов соединений с фенольной группой при C7 не обнаружено [11, 12].

Увеличение продолжительности гидролиза три-О-метилкуркумина (IV) в тех же условиях до 20 ч привело к смеси соединений (V)–(VII) с соотношением 18,3 : 46,4 : 35,3 (рис. 3б). По сравнению с составом смеси, полученной при кратковременном гидролизе, содержание соединений (V), (VI) снизилось на 21,7 и 14,6% соответственно. Такое суммарное изменение состава смеси, которое соответствует количеству вновь образовавшегося соединения (VII) (36,3 и 35,3%), дает основание предполагать, что предшественником эфира (VII) является его изомер (VI), причем это превращение аналогично известной перегруппировке α -кетолов [13]. Строение соединений (VI), (VII), выделенных полупрепаративной ВЭЖХ, подтверждено данными масс-спектров. В масс-спектре моно-О-метилкуркумина (VI) преобладают пики, соответствующие фрагментации изомерного трициклического молекулярного иона, в результате которой образуются соответствующие перегруппировочный

ион (l)⁺ и фрагменты, возникающие при его распаде (m/z 286, 255, 240, 239, 211, 183) (схема 5а). Расположение двух метоксильных групп при C7 и C7' ароматических циклов согласуется с распадом как кольца А (ионы с m/z 356, 328, 314), так и кольца В (ионы с m/z 161, 147, 133). Высокая интенсивность иона ($M + H - Me$)⁺ (m/z 369), по-видимому, обусловлена вицинальным расположением метоксильной и гидроксильной групп. Масс-спектр 7-дезметил-8,8'-ди-О-метилкуркумина (VII) аналогичен масс-спектру его изомера (VI), за исключением пиков ионов с m/z 354, 214, 200, 177 и 162. Первый из них соответствует иону ($M - CO$)⁺, а два последующих, как можно предположить, распаду относительно более интенсивного иона с m/z 240, обладающего структурой замещенного тропилия (схема 5б). Ионы с m/z 177 и 162 соответствуют ионам (a)⁺ и ($a - Me$)⁺, причем ароматический цикл в этих ионах содержит лишь одну метоксильную группировку.

Наличие образцов частично и полностью метилированных производных куркумина (IV)–(VII) позволило осуществить сравнительный анализ содержания куркумина-I в трех видах экстрактов, полученных из корневищ *C. longa* (табл. 3). Аликваты фракций с R_f 0,3 (ТСХ) каждого из трех экстрактов обрабатывали одинаковым количеством реагента (см. "Экспериментальную часть"), подобраным при преобразовании синтетического образца (I) в полностью О-метилированный куркумин (IV). Подобной обработки пробы, выделенной при двуступенчатой экстракции этанолом, оказалось достаточно для исчерпывающего метилирования куркумина-I (рис. 1а). Напротив, пробы, выделенные при однократной экстракции этанолом или хлороформом, содержали после такой обработки также и моно-О-метилкуркумин (VI) (рис. 1б, 1в), что обусловлено конкурирующим поглощением диазометана другими (по-видимому,

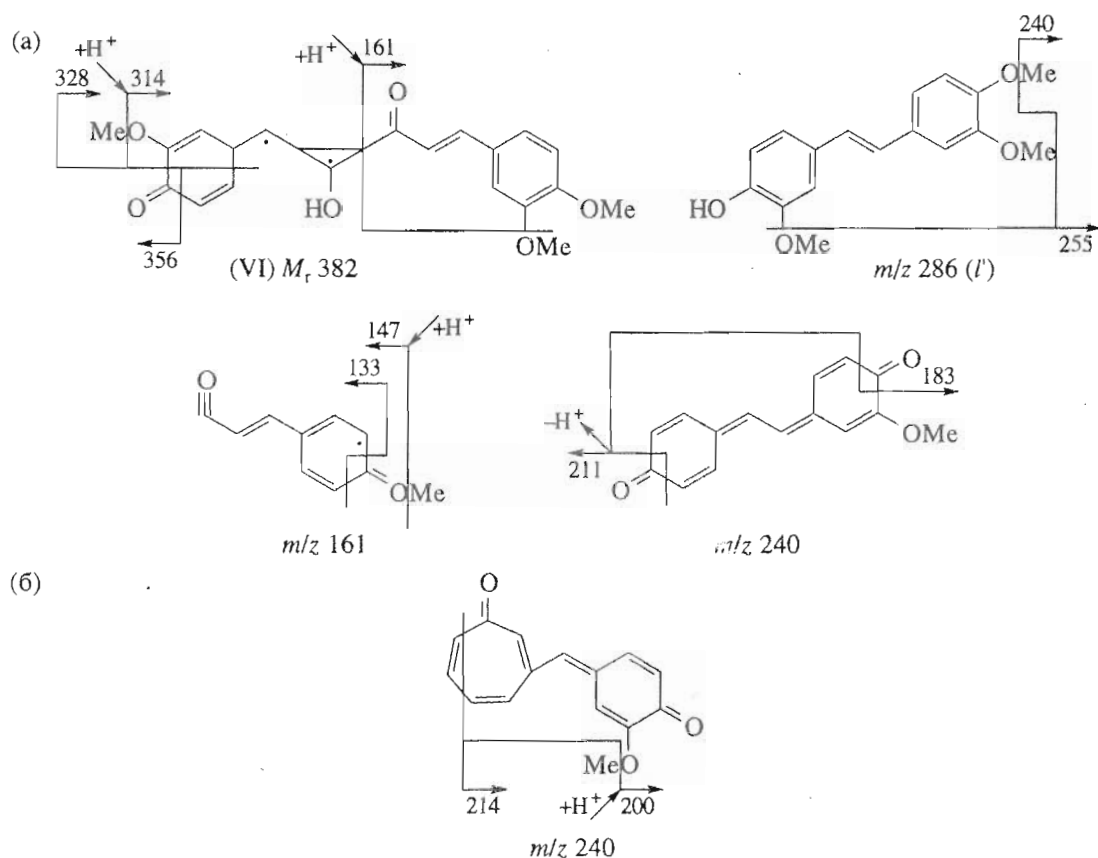


Схема 5. Основные направления фрагментации 8'-О-метилкуркумина (VI) (а) и 7-дезметил-8,8'-О-диметилкуркумина (VII) (б).

фенольными) соединениями, обнаруженными ранее в подобных экстрактах [12]. При применении 2-кратного избытка метилирующего реагента такое различие в анализируемых образцах исчезало.

Фракция, выделенная из спиртового экстракта и по хроматографической подвижности (R_f 0.14) совпадающая с куркумином-III, оказалась, по данным ВЭЖХ-анализа (после обработки диазометаном), многокомпонентной, с низким содержанием соединений, обнаруживаемых при детекции по УФ-поглощению при 254 нм (рис. 2а). Поэтому ожидаемые при обработке диазометаном О-метилпроизводные куркумина-III не выделяли, а идентифицировали в смеси метиловых эфиров сравнением с продуктами метилирования синтетического соединения (III). Последнее охарактеризовано ^1H -ЯМР-спектром и масс-спектром (табл. 1). При обработке синтетического куркумина-III диазометаном образовалась смесь (83 : 17) двух производных с временами удерживания при ВЭЖХ-анализе 5.58 и 6.76 мин соответственно.

Соединения с аналогичными временами удерживания обнаружены (рис. 2а) и в анализируемой фракции (R_f 0.14), выделенной из природного источника, что доказывает их происхождение из куркумина-III. Доминирующий компонент с низкой

полярностью, по-видимому, представляет собой продукт исчерпывающего метилирования – три-О-метилпроизводное куркумина-III, а сопутствующее ему соединение – ди-О-метилкуркумин-III.

Присутствие куркумина-II во фракции с R_f 0.2 удалось подтвердить лишь данными масс-спектра этой фракции, полученного с применением селективной регистрации ионного тока. Идентификации этого соединения, преобладающего в смеси

Таблица 3. Сравнительное содержание метилированных производных куркумина-I в экстрактах*

| Соединение | Время удерживания, ВЭЖХ, мин | Экстракты** | | |
|---------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | EtOH ¹ | EtOH ² | CHCl ₃ |
| (IV) | 13.80 | 7.92 | 42.67 | 25.60 |
| (V) | 17.03 | – | – | 3.83 |
| (VI) | 10.67 | 30.98 | – | 14.35 |
| (VII) | 8.43 | – | – | – |
| Σ (IV)–(VII) | | 38.9 | 42.67 | 43.78 |

* Содержание (в процентах) рассчитано к общему поглощению компонентов фракций при 230 нм.

** EtOH¹ – однократная экстракция спиртом, EtOH² – двухступенчатая экстракция спиртом.

других, способствовала одинаковая с соединениями (I) и (III) направленность фрагментации. Поскольку молекула куркумина-II лишена симметрии, любое направление распада типа $(a)^+$, $(M-a)^+$, $(b)^+$, $(d)^+$ приводит к паре ионов, указанных в табл. 1 (m/z 191 и 177, 147 и 161, 149 и 119, 150 и 120, схема 1). В сочетании с ионами $(M-e-H)^+$, $(d-Me)^+$, а также $(M+H)^+$, M^+ , $(M-H_2O)^+$, $(M-Me-H_2O)^+$ (m/z 214, 135, а также 339, 338, 320, 306 соответственно) такой распад согласуется со строением соединения (II). ВЭЖХ-анализ фракции с R_f 0.2, обработанной диазометаном, приведен на рис. 26. На основании почти одинаковой полярности основного компонента фракции и три-О-метилкуркумина-III первому из них приписана структура три-О-метилкуркумина-II.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры 1H -ЯМР регистрировали на приборе Bruker WT-500 (ФРГ), химические сдвиги (δ) приведены в миллионных долях по отношению к Me_4Si , константы спин-спинового взаимодействия даны в герцах. Масс-спектры электронного удара соединений (II), (IV), (VI), (VII), (IX) получены на спектрометре Mat-44-S, а соединений (I), (III), (VIII) — на спектрометре VG Analytical 7070E; спектры метастабильных ионов соединений (I), (III), (VIII) регистрировали при связанном сканировании ($B/E = const$). УФ-спектры получали на приборе Specord UV/VIS.

Для колоночной хроматографии использовали силикагель марки L, 100/160 (ЧСФР). Препаративную ТСХ осуществляли на силуфоле UV₂₅₄ в системе бензол-хлороформ-этанол (48 : 48 : 4, система 1). Десорбцию образцов осуществляли метанолом. ВЭЖХ-анализ куркуминов проводили в виде их метиловых эфиров, полученных обработкой в течение 2 ч при 0–5°C соответствующих образцов (10 мг) эфирным раствором диазометана (3 × 1.5 мл) на колонке (0.46 × 25 см) Zorbax CN в системе гексан-изопропанол, 95 : 5 (скорость потока 0.6 мл/мин, детекция — УФ при 230 нм). Соединения (IV), (VI), (VII) выделяли ВЭЖХ в полу-препаративном масштабе в тех же условиях.

Выделение куркуминов (I)–(III)

А. Суспензию 100 г измельченных в порошок высушенных корневищ *C. longa* перемешивали 5 ч при 20°C в 0.5 л петролейного эфира. Фильтрат, содержащий 3.68 г малополярных примесей, отбрасывали, а осадок перемешивали 4 ч при 20°C в 0.5 л 96% этанола. После упаривания этанольного фильтрата остаток (4.26 г, масло коричневого цвета) обрабатывали вначале 30 мл бензола, а затем 30 мл смеси бензол-этанол (10 : 1). Получали 2.81 г кристаллического осадка, который разделяли препаративной ТСХ (силикагель КСК,

200–250 меш) на три фракции с R_f 0.3, 0.2 и 0.14 (куркумины-I, -II, -III) в соотношении 12 : 5 : 3 (по весу), после чего каждую очищали повторной ТСХ на силуфоле. УФ (этанол) каждой из фракций: λ_{max} 400–420 нм [8]. ВЭЖХ-анализ — см. рис. 16 и 2а, 2б.

Б. Суспензию 100 г измельченных корневищ *C. longa* кипятили 4 ч при перемешивании в 1 л хлороформа. Раствор отделяли, упаривали и получали 8.34 г остатка. Колоночной хроматографией при элюировании системой 1 из 2 г остатка выделяли 1.34 г фракции с R_f 0.3 (ТСХ), которую затем подвергали очистке препаративной ТСХ, и получали 0.5 г фракции, обогащенной куркумином-I. ВЭЖХ-анализ — см. рис. 1в.

В. *Двуступенчатая экстракция этанолом.* В три делительные воронки помещали по 5 г измельченных корневищ *C. longa*. Первую порцию заливали 40 мл 96% этанола. Спустя 24 ч раствор декантировали и прибавляли его к второй порции корневищ. Затем вновь через 24 ч раствор отделяли от осадка и прибавляли его к третьей порции корневищ. Такую последовательную экстракцию трех порций корневищ повторяли еще раз с новой порцией этанола. Оба суммарных экстракта объединяли, упаривали и получали 2.0 г остатка (темно-коричневое масло), препаративной ТСХ которого выделяли 0.8 г фракции, обогащенной куркумином-I. ВЭЖХ-анализ — см. рис. 1а.

Синтетический куркумин-I (I) (т. пл. 182–184°C) получали с выходом 71% по методике [7]. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 3.97 (6H, с, 2 × OCH_3), 5.85 (1H, с, 1-H), 6.48 (2H, д, J 16, 3-H, 3'-H), 6.95 (2H, д, J 8, 9-H, 9'-H), 7.06 (2H, д, J 2.5, 6-H, 6'-H), 7.14 (2H, д, J 8, 2.5, 10-H, 10'-H), 7.60 (2H, д, J 16, 4-H, 4'-H). Масс-спектр — см. табл. 1. ТСХ маточного раствора, полученного при выделении куркумина-I из продукта реакции, выделяли диферулоилацетон с выходом 17% [8]. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 3.42 (1H, м, 2'-H_A), 3.75 (1H, м, 2'-H_B), 3.93 (6H, с, 2 × OCH_3), 5.79 (1H, с, 2-H), 6.48 (2H, д, J 15, 4-H, 4'-H), 6.93 (2H, д, J 7.5, 10-H, 10'-H), 7.05 (2H, с, 7-H, 7'-H), 7.13 (2H, д, J 7.5, 11-H, 11'-H), 7.60 (2H, д, J 15, 5-H, 5'-H). Масс-спектр 3,9,9'-три-О-метилдиферулоилацетона (IX), m/z (I , %): $(M+H)^+$ 453 (25), M^+ 452 (22), $(M-CO)^+$ 424 (5.5), $(M-MeOH)^+$ 420 (11.5), $(M-CO-OMe)^+$ 393 (1.9), 339 (1.8), 313 (1.9), 287 (3.9), 273 (4.8), 247 (25), 231 (23), 205 (13.5), 191 (38.5), 176 (39), 165 (19.3), 151 (100), 133 (24).

2,8,8'-Три-О-метилкуркумин-I (IV) получали обработкой соединения (I) эфирным раствором диазометана с выходом 64%. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 5.96 (1H, с, 1-H), 6.49, 6.51 (по 1H, д, J 15.3, 3-H, 3'-H), 6.85, 6.94 (по 1H, д, J 8.3, 9-H, 9'-H), 7.06, 7.09 (по 1-H, д, J 1.5, 6-H, 6'-H), 7.13 (2H, м, 10-H, 10'-H), 7.60, 7.62 (по 1H, д, J 15.4, 4-H, 4'-H). Масс-спектр — см. табл. 1, 2.

Аналогично соединению (I) из 4-гидроксибензальдегида по методике [7] с выходом 68.2% получали куркумин-III (III), т. пл. 221–223°C. Спектр $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): 4.70 (1H, с, 1-H), 6.79 (2H, д, J 16, 3-H, 3'-H), 7.07 (4H, д, J 8.3, 7-H, 7'-H, 9-H, 9'-H), 7.69 (4H, д, J 8.3, 6-H, 6'-H, 10-H, 10'-H), 7.79 (2H, д, J 16, 4-H, 4'-H). Масс-спектр – см. табл. 1, 2.

1-Метил-8,8'-ди-О-метилкуркумин-I (VIII), т. пл. 147–149°C, получали из синтетического соединения (I) с выходом 43% по методике [9]. Масс-спектр – см. табл. 1, 2.

8'-О-Метилкуркумин (VI) и 7-дезметил-8,8'-ди-О-метилкуркумин (VII). Раствор 50 мг три-О-триметилкуркумина-I (IV) в 3 мл ацетона подкисляли 0.1 мл 5% HCl, перемешивали 30 мин при 20°C, концентрировали в вакууме, остаток экстрагировали эфиром, эфирный раствор промывали водой, высушивали MgSO_4 и упаривали. Получали 40 мг смеси (40 : 60) соединений (V), (VI). ВЭЖХ – рис. 3а.

При выдерживании указанной выше реакционной смеси в течение 20 ч при 20°C аналогичным образом получали смесь (18.3 : 46.4 : 35.5) соединений (V)–(VII). Производные (VI), (VII) выделяли полупрепаративной ВЭЖХ (рис. 3б).

Масс-спектр соединения (VI): ($M + H$)⁺ 383 (7), M^+ 382 (5), ($M + H - \text{CH}_2$)⁺ 369 (27.8), ($M - \text{CH}_2$)⁺ 368 (9), ($M - \text{CH} \equiv \text{CH}$)⁺ 356 (13.9), ($M - \text{CO}$)⁺ 354 (7), 342 (8.4), 340 (6.9), 328 (5.2), 314 (19.5), 312 (11), 300 (12), 286 (29.2), 264 (7), 255 (19.5), 240 (44.5), 236 (19), 221 (32.0), 211 (19.5), 183 (20.8), 161 (30.5), 147 (50.5), 133 (48.6), 121 (40.2), 107 (36.1), 98 (100).

Масс-спектр соединения (VII): ($M + H$)⁺ 383 (2.8), M^+ 382 (1.5), 369 (38.9), 368 (8.3), 356 (7), 354

(11.8), 342 (5.5), 340 (6.9), 328 (2.8), 314 (16.7), 312 (5.6), 300 (6.9), 286 (16.7), 264 (11.1), 255 (16.7), 240 (37.5), 236 (22.2), 221 (25.0), 214 (22.6), 200 (13.9), 185 (25.0), 177 (29.1), 162 (37.5), 161 (36.1), 147 (95.7), 134 (56.9), 133 (50), 122 (51.3), 121 (45.9), 107 (63.8), 98 (100).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Srimal R.C. // *Drugs of the Future*. 1987. V. 12. P. 331–333.
2. Ammon H.P.T., Wahi A.W. // *Planta Med.* 1991. V. 57. P. 1–7.
3. Ammon H.P.T., Anazodo M.I., Safayhi H., Dhawan B.N., Srimal R.C. // *Planta Med.* 1992. V. 58. P. 226.
4. Shimizu S., Jareonkitmongol S., Kawashima H., Akimoto K., Yamada H. // *Lipids*. 1992. V. 27. P. 509–512.
5. Reddy S., Aggarwal B.B. // *FEBS Lett.* 1994. V. 341. P. 1–22.
6. Yankeelov J.A. // *Methods Enzymol.* 1972. V. 25 (part B). P. 566–579.
7. Pabon H.Y.Y. // *Rec. Trav. Chim.* 1964. V. 83. P. 370–386.
8. Kazuya A., Koichi K., Torachiro S., Tomoko T., Motoyoshi S., Masanori K. // *Eisei Shikensho Hokoku*. 1986. V. 104. P. 124–128. // *C. A.* 1987. V. 106. № 172947.
9. Roughly P.J., Whitting D.A. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1973. P. 2379–2388.
10. *Organikum*. М.: Мир, 1979. С. 64.
11. Shinicki B., Ichiro J., Kazuyuki A., Hiroshi M., Koichi T., Hideji I. // *Chem. Pharm. Bull.* 1987. V. 35. P. 3298–3304.
12. Ytokawa H., Morita H., Midorikawa J., Aigama R., Morita M. // *Chem. Pharm. Bull.* 1985. V. 33. P. 4889–4893.
13. Матве Ж., Алле А. Принципы органического синтеза. М.: ИЛ, 1962. С. 309.

Identification of Natural Curcumins

V. B. Berzin, L. G. Katsitadze, T. V. Pilipenko,
V. V. Ovcharenko, and A. I. Miroshnikov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow GSP-7, 117871 Russia*

Abstract—The fragmentation patterns of curcumins and their methyl ethers, which help to identify these compounds in extracts from natural sources, were established under mass spectrometry. The efficiencies of three different methods for curcumin extraction from *Curcuma longa* rhizomes were compared.

Key words: *Curcuma longa*, curcumin, mass spectra.