

# 怀姜的化学成分及其抗炎活性研究

廖怀玉, 韩佳颖, 韩红园, 刘文波, 常霞, 杨静, 张海艳\*, 赵天增\*

河南省科学院 天然产物重点实验室, 郑州 450002

**摘要:**首次对国家地理标志产品怀姜的化学成分进行系统分离,为怀姜的物质基础研究和开发利用提供依据。综合应用硅胶柱色谱, ODS 柱色谱和半制备型高效液相色谱,对怀姜的 70% 乙醇提取物中乙酸乙酯部位的化学成分进行分离纯化,根据核磁共振波谱数据及相关文献数据对化合物进行结构鉴定,从怀姜中分离鉴定出 12 个化合物,分别为(-)-muurola-4,11-diene(**1**)、邻苯二甲酸二丁酯(**2**)、(2Z)-neral acetal-[6]-gingerdiol(**3**)、6-姜酚(**4**)、6-姜烯酚(**5**)、8-姜烯酚(**6**)、10-姜烯酚(**7**)、10-姜酚(**8**)、6-paradol(**9**)、dihydroferulic acid ethyl ester(**10**)、(3R,5S)-3,5-diacetoxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl) decane(**11**)、p-hydroxybenzaldehyde(**12**)。化合物**1**、**2**、**10**、**12**为首次从姜属植物中分离得到,化合物**1**~**4**、**6**~**12**均为首次从怀姜中分离得到。对从怀姜中分离出的化合物**1**、**3**、**6**、**7**、**9**、**11**进行抗炎活性筛选,化合物**3**、**6**、**9**、**11**对 LPS 诱导的 RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞中 NO 的产生有明显的抑制作用。

**关键词:**怀姜;乙酸乙酯部位;化学成分;抗炎活性

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)5-0818-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.5.010

## Study on chemical constituents and anti-inflammatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe

LIAO Huai-yu, HAN Jia-ying, HAN Hong-yuan, LIU Wen-bo,  
CHANG Xia, YANG Jing, ZHANG Hai-yan\*, ZHAO Tian-zeng\*

Key Laboratory of Natural Products, Henan Academy of Science, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** For the first time, the chemical components of national geographical indication product *Zingiber officinale* Roscoe from Boai County, were systematically separated, so as to provide a basis for its material basis research, development and utilization. Its ethyl acetate fraction in 70% ethanol extract was repeatedly chromatographed on Silica gel column, ODS column and semi preparative HPLC to give compounds **1-12**. By using of NMR analysis as well as the literatures, the **12** compounds were identified as (-)-muurola-4,11-diene (**1**), dibutyl phthalate (**2**), (2Z)-neral acetal-[6]-gingerdiol (**3**), 6-gingerol (**4**), 6-shogaol (**5**), 8-shogaol (**6**), 10-shogaol (**7**), 10-gingerol (**8**), 6-paradol (**9**), dihydroferulic acid ethyl ester (**10**), (3R,5S)-3,5-diacetoxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl) decane (**11**), p-hydroxybenzaldehyde (**12**). Among which, compounds **1, 2, 10** and **12** were firstly isolated from the plant of *Zingiber* genus, and compounds **1-4** and **6-12** were firstly isolated from *Zingiber officinale* Roscoe. The anti-inflammatory activities of compounds **1, 3, 6, 7, 9** and **11** were screened. The result showed that compounds **3, 6, 9** and **11** had obvious inhibitory effect on the NO production in LPS induced RAW 264.7 mouse monocyte macrophages.

**Key words:** *Zingiber officinale* Roscoe; ethyl acetate extract; chemical constituents; anti-inflammatory activity

怀姜为姜科姜属植物姜(*Zingiber officinale* Roscoe)的新鲜根茎,产自古怀庆府,为河南省焦作市博

爱县特产,河南省省级非物质文化遗产,中国国家地理标志产品。主产于博爱县北部的清化、月山(上庄)、柏山、徐良等乡镇和沁阳市山王庄镇一带,栽培迄今已有 1 600 多年的历史。博爱县土地疏松肥沃,雨量充沛,光照充足,气候温和,独特的自然环境非常适宜怀姜的生长。怀庆府盛产的生姜,是同类生姜中的佼佼者,块节紧凑、丝细色黄、味道鲜辣、质

收稿日期:2021-03-03 接受日期:2022-04-13

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09711001-008-004);河南省省级财政预算科研项目(18GJ13001, 210613021)

\* 通信作者 Tel: 86-371-89819535; E-mail: haiyanhai6828\_cn@sina.com, tianzeng\_zhao@163.com

地致密,具有抗寒、健胃、发汗、祛病之功效。用于感冒风寒,呕吐,痰饮等疾病的治疗。

目前,对怀姜的研究集中在种植、栽培、营养成分等方面,系统的化学成分组研究未见报道<sup>[14]</sup>。为阐明怀姜的药效物质基础,为怀姜的开发利用提供理论基础,本课题组首次对怀姜化学成分进行系统分离,并采用 1D (<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、DEPT) 和 2D (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、HSQC、HMBC、NOESY) 核磁共振技术对化合物进行结构鉴定<sup>[5-8]</sup>,共鉴定了 12 个化

物(见图 1)。植物姜属于药食两用类植物,经口毒性实验证明生姜属于无毒级物质。姜辣素是植物姜的主要化学成分,具有 3-甲氧基-4-羟基苯基结构单元,有较强的抗炎活性。有研究表明化合物 6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚、6-姜烯酚具有抗炎活性并且有了较为深入的研究<sup>[9]</sup>。故而选择分离鉴定出的部分化合物进行抗炎活性筛选。为怀姜的开发利用及抗炎新药的研发提供参考。

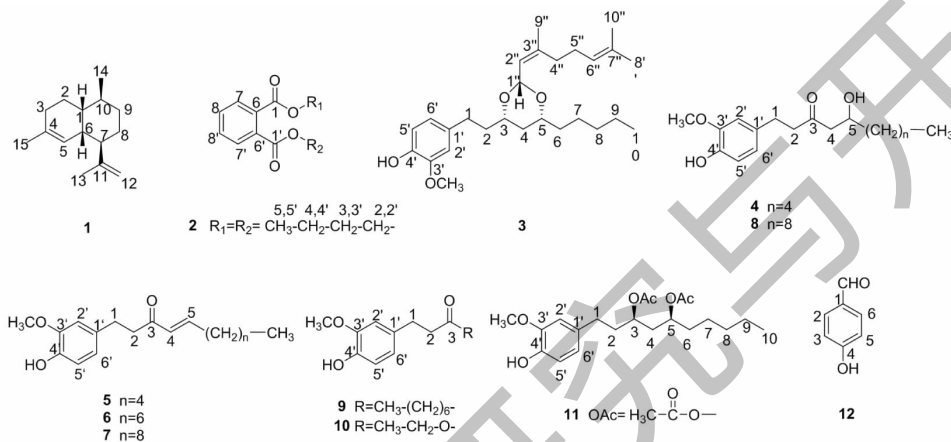


图 1 化合物 1~12 的化学结构

Fig. 1 Structure of compounds 1-12

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Bruker ARX-400 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司, TMS 内标);正向硅胶(200~300 目);GF254 薄层色谱硅胶(青岛海洋化工);Waters 600E 型分析半制备高效液相色谱(美国 Waters 公司);SunFire<sup>®</sup> C<sub>18</sub> OBD 制备色谱柱(10 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司);FS-8200S 型中压快速纯化制备系统(天津艾杰尔科技有限公司);RP-18(Germany, 40~63 μm);其他试剂均为分析纯。

### 1.2 材料

怀姜采自河南省博爱县月山镇,经河南省中医药研究院张留记教授鉴定为姜科姜属多年生草本植物姜(*Zingiber officinale* Roscoe)的新鲜根茎。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 提取与分离

取怀姜 10 kg,切碎,用 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次提取 2 h,合并提取液减压浓缩得浸膏,将浸膏混悬于水中,使用乙酸乙酯萃取 3 次,得到乙酸乙酯萃取物 170 g。乙酸乙酯部位经正向硅

胶色谱柱(200~300 目),使用石油醚-乙酸乙酯(100:1→1:9)进行梯度洗脱,在 100:1 洗脱部位得到化合物 1(15.6 mg)。TLC 检识合并相同馏分,得到组分 Fr. 1~Fr. 5。Fr. 1 通过 RP-18 硅胶柱柱层析,以乙腈-水(30:70→60:40)梯度洗脱,得到 4 个组分 Fr. 1-1~Fr. 1-4,Fr. 1-1 经分析半制备高效液相色谱用乙腈-水(60:40)得到化合物 2(218.6 mg,  $t_R = 50$  min)。Fr. 2 经分析半制备高效液相色谱用乙腈-水(80:20)得到化合物 3(20.5 mg,  $t_R = 42$  min)。Fr. 3 经分析半制备高效液相色谱用乙腈-水(65:35)得到化合物 4(110.0 mg,  $t_R = 14$  min)、5(130.0 mg,  $t_R = 20$  min)、6(8.8 mg,  $t_R = 30$  min)、化合物 7(11.8 mg,  $t_R = 66$  min)、8(12.3 mg,  $t_R = 53$  min)。Fr. 4 通过 RP-18 硅胶柱,以乙腈-水(10:90→60:40)梯度洗脱,得到 Fr. 4-1~Fr. 4-6,Fr. 4-5 为化合物 9(122.2 mg),Fr. 4-3 经分析半制备高效液相色谱用乙腈-水(25:75)得到化合物 10(6.5 mg,  $t_R = 76$  min)。Fr. 5 经分析半制备高效液相色谱用乙腈-水(55:45)得到化合物 11(211.0 mg,  $t_R = 36$  min)、12(7.7 mg,  $t_R = 90$  min)。

### 1.3.2 抗炎活性筛选

RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞,置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育。于 96 孔细胞培养板中每孔加入 100 μL 细胞悬液,6 × 10 个细胞/孔,将培养板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h。弃上清,加入 50 μL 含药培养液,每个单体设 4 个浓度(5、10、15、20 μM),每个浓度设 3 个平行孔,另设正常对照孔。2 h 后,加入 50 μL 脂多糖溶液,脂多糖终浓度为 0.5 μg/mL。加药后,培养板于微孔板振荡器上振荡混匀,置于 37 °C、CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24 h。吸取培养液上清 50 μL,根据说明书进行 NO 含量检测,用酶标仪于 540 nm 处测定吸光度值,绘制标准曲线,计算样品中 NO 含量。所得结果用软件 Graph-Pad Prism 8.0.1 处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 无色油状物;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ:5.30 (1H, m, H-5), 4.74 (1H, m, H-12b), 4.71 (1H, m, H-12a), 2.23 (1H, m, H-6), 1.96 (1H, m, H-7), 1.96 (2H, m, H-3), 1.85 (1H, m, H-2b), 1.71 (3H, s, C-13), 1.71 (1H, m, H-10), 1.62 (3H, s, C-15), 1.60 (1H, m, H-8b), 1.60 (1H, m, H-9b), 1.60 (1H, m, H-1), 1.33 (1H, m, H-2a), 1.30 (1H, m, H-8a), 1.30 (1H, m, H-9a), 1.03 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-14);<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ:39.1 (C-1), 25.7 (C-2), 30.5 (C-3), 133.4 (C-4), 125.6 (C-5), 34.6 (C-6), 48.1 (C-7), 26.2 (C-8), 27.8 (C-9), 32.9 (C-10), 148.7 (C-11), 110.2 (C-12), 20.3 (C-13), 19.5 (C-14), 23.6 (C-15)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>对照一致,故鉴定化合物 **1** 为(-)-muurola-4, 11-diene。

**化合物 2** 无色油状物;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ:7.71 (2H, m, H-7, 7'), 7.52 (2H, m, H-8, 8'), 4.31 (4H, t, *J* = 6.8 Hz, H-2, 2'), 1.72 (4H, m, H-3, 3'), 1.44 (4H, m, H-4, 4'), 0.96 (6H, t, *J* = 6.8 Hz, H-5, 5');<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ:167.7 (C-1, 1'), 65.5 (C-2, 2'), 30.5 (C-3, 3'), 19.2 (C-4, 4'), 13.7 (C-5, 5'), 132.3 (C-6, 6'), 128.8 (C-7, 7'), 130.9 (C-8, 8')。以上数据与文献<sup>[11]</sup>对照一致,故鉴定化合物 **2** 为邻苯二甲酸二丁酯。

**化合物 3** 无色油状物;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ:6.82 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.70 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.68 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz,

H-6'), 5.33 (1H, dq, *J* = 6.4, 1.2 Hz, H-2''), 5.18 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H-1''), 5.11 (1H, tq, *J* = 6.8, 1.2 Hz, H-6''), 3.86 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.62 (1H, m, H-5), 3.62 (1H, m, H-3), 2.72 (1H, m, H-1b), 2.62 (1H, m, H-1a), 2.12 (2H, m, H-5''), 2.05 (2H, m, H-4''), 1.90 (1H, m, H-2b), 1.74 (3H, d, *J* = 1.2 Hz, 1.70 (1H, m, H-2a), 1.68 (3H, br s, H-8''), 1.60 (1H, m, H-6b), 1.58 (3H, br s, H-10''), 1.50 (1H, m, H-4b), 1.42 (1H, m, H-6a), 1.42 (1H, m, H-7b), 1.28 (1H, m, H-7a), 1.28 (1H, m, H-4a), 1.28 (2H, m, H-8), 1.28 (2H, m, H-9), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-10), H-9'');<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ:30.9 (C-1), 37.8 (C-2), 75.4 (C-3), 36.9 (C-4), 76.5 (C-5), 35.9 (C-6), 24.7 (C-7), 31.8 (C-8), 22.6 (C-9), 14.0 (C-10), 133.9 (C-1'), 111.0 (C-2'), 146.4 (C-3'), 143.7 (C-4'), 114.2 (C-5'), 121.0 (C-6'), 98.6 (C-1''), 122.5 (C-2''), 142.3 (C-3''), 39.3 (C-4''), 26.2 (C-5''), 123.9 (C-6''), 131.7 (C-7''), 25.7 (C-8''), 17.4 (C-9''), 17.7 (C-10''), 55.8 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>对照一致,故鉴定化合物 **3** 为(2*Z*)-neral acetal-[6]-gingerdiol。

**化合物 4** 黄色油状物;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ:6.81 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.67 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.64 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 4.03 (1H, m, H-5), 3.84 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.82 (2H, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 系统-A<sub>2</sub>, *J* = 6.4 Hz, H-1), 2.72 (2H, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 系统-B<sub>2</sub>, *J* = 6.4 Hz, H-2), 2.55 (1H, ABX 系统-B, *J* = 17.2, 3.2 Hz, H-4b), 2.50 (1H, ABX 系统-A, *J* = 17.2, 8.4 Hz, H-4a), 1.47 (1H, m, H-6b), 1.42 (1H, m, H-7b), 1.38 (1H, m, H-6a), 1.38 (1H, m, H-7a), 1.30 (2H, m, H-9), 1.28 (2H, m, H-8), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-10);<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ:29.3 (C-1), 45.4 (C-2), 211.5 (C-3), 49.3 (C-4), 67.7 (C-5), 36.4 (C-6), 25.1 (C-7), 31.7 (C-8), 22.6 (C-9), 14.0 (C-10), 132.6 (C-1'), 111.1 (C-2'), 146.5 (C-3'), 144.0 (C-4'), 114.5 (C-5'), 120.7 (C-6'), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>对照一致,故鉴定化合物 **4** 为 6-姜酚。

**化合物 5** 黄色油状物;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ:6.82 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.81 (1H, dt, *J* = 15.9, 7.1 Hz, H-5), 6.71 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.68 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, H-6'), 6.09

(1H, dt,  $J = 15.9, 1.3$  Hz, H-4), 5.58 (1H, br s, 4'-OH), 3.86 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.86 (2H,  $J = 7.0$  Hz, H-1), 2.83 (2H,  $J = 7.0$  Hz, H-2), 2.19 (2H, dq,  $J = 7.1, 1.3$  Hz, H-6), 1.44 (2H, m, H-7), 1.30 (2H, m, H-9), 1.28 (2H, m, H-8), 0.89 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-10); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 29.9 (C-1), 41.9 (C-2), 199.9 (C-3), 130.3 (C-4), 147.9 (C-5), 32.4 (C-6), 27.8 (C-7), 31.3 (C-8), 22.4 (C-9), 13.9 (C-10), 133.2 (C-1'), 111.1 (C-2'), 146.4 (C-3'), 143.9 (C-4'), 114.3 (C-5'), 120.8 (C-6'), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>对照一致,故鉴定化合物**5**为6-姜烯酚。

**化合物 6** 黄色油状物; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.82 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.79 (1H, dt,  $J = 16.0, 6.8$  Hz, H-5), 6.71 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'), 6.68 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, H-6'), 6.09 (1H, dt,  $J = 16.0, 1.2$  Hz, H-4), 5.49 (1H, s, 5'-OH), 3.87 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.86 (2H,  $J = 7.0$  Hz, H-1), 2.83 (2H,  $J = 7.0$  Hz, H-2), 2.19 (2H, dq,  $J = 6.8, 1.2$  Hz, H-6), 1.44 (2H, m, H-7), 1.28 (8H, m, H-8, 9, 10, 11), 0.88 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-12); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 29.9 (C-1), 42.0 (C-2), 199.8 (C-3), 130.3 (C-4), 147.9 (C-5), 32.5 (C-6), 28.1 (C-7), 29.1\* (C-8), 29.0\* (C-9), 31.7 (C-10), 22.6 (C-11), 14.1 (C-12), 133.3 (C-1'), 111.1 (C-2'), 146.4 (C-3'), 143.9 (C-4'), 114.3 (C-5'), 120.8 (C-6'), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>对照一致,故鉴定化合物**6**为8-姜烯酚。

**化合物 7** 黄色油状物; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.82 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.79 (1H, dt,  $J = 16.0, 6.8$  Hz, H-5), 6.71 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'), 6.68 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, H-6'), 6.09 (1H, dt,  $J = 16.0, 1.2$  Hz, H-4), 5.48 (1H, s, 5'-OH), 3.87 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.86 (2H,  $J = 7.0$  Hz, H-1), 2.83 (2H,  $J = 7.0$  Hz, H-2), 2.19 (2H, dq,  $J = 6.8, 1.2$  Hz, H-6), 1.44 (2H, m, H-7), 1.26 (12H, m, H-8, 9, 10, 11, 12, 13), 0.88 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-14); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 29.9 (C-1), 42.0 (C-2), 199.8 (C-3), 130.3 (C-4), 147.9 (C-5), 32.5 (C-6), 28.1 (C-7), 29.2\* (C-8), 29.3\* (C-9), 29.5\* (C-10), 29.4\* (C-11), 32.5 (C-12), 22.7 (C-13), 14.1 (C-14), 133.3 (C-1'), 111.1 (C-2'), 146.4 (C-3'), 143.9 (C-4'), 114.3 (C-5'), 120.8 (C-6'),

55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>对照一致,故鉴定化合物**7**为10-姜烯酚。

**化合物 8** 黄色油状物; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.82 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.68 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 6.64 (1H, dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-6'), 5.51 (1H, s,  $J = 2.0$  Hz, 4'-OH), 4.02 (1H, m, H-5), 3.87 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.93 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, 5-OH), 2.83 (2H,  $J = 7.1$  Hz, H-1), 2.73 (2H,  $J = 7.1$  Hz, H-2), 2.55 (1H,  $J = 17.4, 3.0$  Hz, H-4b), 2.49 (1H,  $J = 17.4, 8.8$  Hz, H-4a), 1.38 (1H, m, H-6a), 1.48 (1H, m, H-6b), 1.27 (1H, br s, H-7a), 1.38 (1H, m, H-7b), 1.27 (12H, br s, H-8, 9, 10, 11, 12, 13), 0.88 (3H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-14); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 29.3 (C-1), 45.4 (C-2), 211.4 (C-3), 49.4 (C-4), 67.7 (C-5), 36.5 (C-6), 25.5 (C-7), 29.5\* (C-8), 29.5\* (C-9), 29.5\* (C-10), 29.6\* (C-11), 31.9 (C-12), 22.7 (C-9), 14.1 (C-14), 132.6 (C-1'), 111.0 (C-2'), 146.4 (C-3'), 144.0 (C-4'), 114.4 (C-5'), 120.8 (C-6'), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>)。其中\*归属可互换。以上数据与文献<sup>[14]</sup>对照一致,故鉴定化合物**8**为10-姜酚。

**化合物 9** 黄色油状物; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.81 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.69 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 6.66 (1H, dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-6'), 3.86 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.82 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-1), 2.69 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2), 2.37 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-4), 1.54 (2H, m, H-5), 1.25 (8H, m, H-6, 7, 8, 9), 0.87 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-10); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 29.6 (C-1), 44.6 (C-2), 210.8 (C-3), 43.2 (C-4), 23.8 (C-5), 29.2 (C-6), 29.1 (C-7), 31.7 (C-8), 22.6 (C-9), 14.1 (C-10), 133.1 (C-1'), 111.1 (C-2'), 143.9 (C-3'), 146.5 (C-4'), 114.4 (C-5'), 120.8 (C-6'), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>对照一致,故鉴定化合物**9**为6-paradol。

**化合物 10** 褐色油状物; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.83 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.71 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-2'), 6.64 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, H-6'), 4.13 (2H, q,  $J = 6.8$  Hz, H-4), 3.87 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.88 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-1), 2.56 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2), 1.24 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-5); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 30.7 (C-1), 36.4 (C-2), 173.0 (C-3), 60.4 (C-4), 14.2 (C-5), 132.5 (C-

1'), 111.0 (C-2'), 146.4 (C-3'), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>), 144.0 (C-4'), 114.3 (C-5'), 120.9 (C-6')。以上数据与文献<sup>[15]</sup>对照一致,故鉴定化合物 **10** 为 dihydroferulic acid ethyl ester。

**化合物 11** 黄色油状物; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.81 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.66 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.63 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 4.94 (1H, m, H-5), 4.94 (1H, m, H-3), 3.86 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.55 (2H, m, H-1), 2.05 (3H, s, 5-OAc), 1.99 (3H, s, 3-OAc), 1.89 (2H, m, H-2), 1.89 (1H, m, H-4b), 1.75 (1H, dt, *J* = 8.4, 5.6 Hz, H-4a), 1.51 (2H, m, H-6), 1.25 (6H, m, H-7, 8, 9), 0.87 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-10); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 31.2 (C-1), 35.9 (C-2), 70.9 (C-3), 38.4 (C-4), 71.2 (C-5), 34.2 (C-6), 24.7 (C-7), 31.5 (C-8), 22.5 (C-9), 13.9 (C-10), 133.1 (C-1'), 111.1 (C-2'), 146.5 (C-3'), 143.9 (C-4'), 114.4 (C-5'), 120.8 (C-6'), 170.7\* [3-OAc (C=O)], 21.1\*\* [3-OAc (CH<sub>3</sub>)], 170.8\* [5-OAc (C=O)], 21.2\*\* [5-OAc (CH<sub>3</sub>)], 55.8 (3'-OCH<sub>3</sub>), 其中\* 归属可互换,\*\* 归属可互换。以上数据与文献<sup>[16]</sup>对照一致,故鉴定化合物 **11** 为 (3*R*,5*S*)-3,5-diacetoxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl) decane。

**化合物 12** 黄色油状物; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.66 (1H, s, CHO), 7.68 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, *J* = 8.4 Hz, H-3, 5); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 192.9 (CHO), 165.3 (C-4), 133.5 (C-2, 6), 130.3 (C-1), 116.9 (C-3, 5)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>对照一致,故鉴定化合物 **12** 为 *p*-hydroxybenzaldehyde。

## 2.2 活性测试结果

Dugasani<sup>[18]</sup>研究发现 6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚、6-姜烯酚可以抑制脂多糖诱导的炎症细胞产生 NO, 发挥其抗炎功效,6-姜酚、8-姜酚可以抑制其 NO 的产生 (*P* < 0.05), 10-姜酚可以显著抑制 NO 的产生 (*P* < 0.01), 6-姜烯酚有极其显著抑制 NO 的产生 (*P* < 0.001)。本实验采用脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型<sup>[19-21]</sup>, 以吲哚美辛为阳性对照, 对怀姜中分离得到的化合物 **1**、**3**、**6**、**7**、**9**、**11** 进行了抗炎活性筛选, 结果化合物 **3** (IC<sub>50</sub> = 13.16 μg/mL)、**6** (IC<sub>50</sub> = 1.63 μg/mL)、**9** (IC<sub>50</sub> = 2.38 μg/mL)、**11** (IC<sub>50</sub> = 6.56 μg/mL) 对 LPS 诱导的炎症细胞中 NO 的产生有明显的抑制作用, 表现出比阳性

对照吲哚美辛 (IC<sub>50</sub> = 15.84 μg/mL) 更强的抗炎活性 (见表 1)。

表 1 化合物 **1**、**3**、**6**、**7**、**9** 和 **11** 的体外抗炎活性

Table 1 Anti-inflammatory activities of compounds **1**, **3**, **6**, **7**, **9** and **11**

化合物 Compound	半数抑制浓度 IC <sub>50</sub> (μg/mL)
<b>1</b>	36.44
<b>3</b>	13.16
<b>6</b>	1.63
<b>7</b>	30.01
<b>9</b>	2.38
<b>11</b>	6.56
吲哚美辛 Indometacin	15.84

## 3 讨论与结论

植物姜中主要含有挥发油、姜辣素、二苯基庚烷类化合物<sup>[22]</sup>。本研究首次对怀姜的化学成分进行了系统分离, 从怀姜的乙酸乙酯部位分离得到 12 个化合物, 包含 1 个倍半萜类化合物, 2 个羧酸酯类化合物, 8 个姜辣素类化合物及 1 个其他类化合物, 其中 8 个姜辣素成分为 2 个姜酚、3 个姜烯酚、1 个副姜油酮、2 个姜辣二醇。除化合物 **5** 之外, 其余 11 个化合物均为首次从怀姜中分离得到, 4 个化合物为首次从姜属植物中分离得到。

在 LPS 诱导的炎症细胞中, 一氧化氮合酶 (iNOS) 表达增加, 催化 NO 生成, 进而促使细胞分泌炎症标志因子肿瘤坏死因子 (TNF-α), TNF-α 诱导白细胞介素-1 (IL-1) 和白细胞介素-6 (IL-6) 表达释放, 使炎症损伤的级联效应放大, 从而进一步加剧炎症反应<sup>[19]</sup>。生姜提取物可以通过降低 iNOS 和环氧化酶-2 (COX-2) 的 mRNA 表达抑制 LPS 诱导的炎症细胞 NO 和前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 释放增加, 进一步下调炎症因子的表达, 减少炎症因子的释放, 发挥抗炎功效<sup>[9]</sup>。姜辣素类化合物对炎症介质 (NO 和 PGE<sub>2</sub>) 的产生有明显的抑制作用, 且呈明显的剂量依赖性; 浓度为 6 μM 时, 6-姜烯酚对产生 NO 和 PGE<sub>2</sub> 的抗炎抑制作用优于 10-姜酚, 10-姜酚对产生 NO 和 PGE<sub>2</sub> 的抗炎抑制作用优于 6-姜酚、8-姜酚; 姜酚的碳链长度影响其抗炎活性, 不饱和酮结构使得姜烯酚抗炎活性优于姜酚<sup>[18]</sup>。Van Breemen 等<sup>[23]</sup>使用纯化的人类重组蛋白环氧化酶-1 (COX-

1)、环氧化酶-2(COX-2)代替细胞实验方法,发现 8-姜烯酚、10-姜烯酚和 10-姜酚通过抑制 COX-2 而非抑制 COX-1 的产生发挥抗炎作用;浓度为 1.3  $\mu\text{M}$  时,10-姜烯酚比 8-姜烯酚对 COX-2 的抑制作用更强。本研究选取化合物 (-)-muurola-4, 11-diene、(2Z)-neral acetal-[6]-gingerdiol、8-姜烯酚、10-姜烯酚、6-paradol、(3R, 5S)-3, 5-diacetoxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl) decane, 以脂多糖(LPS)诱导的 RAW 264.7 细胞炎症为模型,以 NO 含量为评价指标,吡嗪美辛为阳性对照,评价化合物的抗炎活性;结果显示,化合物(2Z)-neral acetal-[6]-gingerdiol、8-姜烯酚、6-paradol、(3R, 5S)-3, 5-diacetoxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl) decane 与吡嗪美辛相比均具有更强的抗炎活性,其中 8-姜烯酚的抗炎活性优于化合物(2Z)-neral acetal-[6]-gingerdiol、6-paradol、(3R, 5S)-3, 5-diacetoxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl) decane。本文抗炎活性研究以抑制 iNOS 的表达,降低 LPS 诱导的炎症细胞 NO 的释放,进而起到抗炎的功效,证实 8-姜烯酚具有良好的抗炎活性,可能是开发治疗炎症疾病的良好候选药物。本研究不仅丰富了怀姜的化学结构信息,为其抗炎活性的研究提供依据,也为怀姜的开发利用提供基础。

**致谢:**郑州大学分析测试中心的朱卫国老师帮助进行核磁共振仪样品测试,中国医学科学院药物研究所的秦海林研究员团队帮助进行抗炎活性筛选,在此特致谢意!

#### 参考文献

- Zhang LM. High yield cultivation technology of Qinghua ginger[J]. Bull Agr Sci Technol(农业科技通讯), 2019, 48: 295-297.
- Xue JP, Huang YQ, Zhang AM. Study on technique of inducing microrhizome in *Zingiber officinale*[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32:1621-1624.
- Zhang YX, He CP. Study on the relationship between selenium soil and selenium content of Huaijiang[J]. Agr Henan(河南农业), 2019, 30(22):14.
- Chen X, Chang X, Liang YH, et al. Analysis of nutritional components between Huaijiang and other varieties of ginger[J]. J Anhui Agr Sci(安徽农业科学), 2020, 48:194-196, 209.
- Hang HY, Wang ZY, Liang YH, et al. An NMR study on 6-shogaol[J]. Henan Sci(河南科学), 2020, 38:697-702.
- Zhao TZ. Nuclear Magnetic Resonance Hydrogen Spectroscopy(核磁共振氢谱)[M]. Beijing: Peking University Press, 1983:33-34, 49, 80-83, 95-106.
- Zhao TZ, Qin HL, Zhang HY, et al. Two-Dimensional NMR Spectroscopy(核磁共振二维谱)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2018:94-97, 184-189.
- Wang H, Si HR, Jiao YF, et al. Chemical constituents from berries of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32:1343-1347.
- Guo XX, Su DX. Study on the intervention effect of ginger extract on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells[J]. Qual Safe Agro-Prod(农产品质量与安全), 2021, 19(5):83-90.
- Saritas Y, Sonwa MM, Iznaguen H, et al. Volatile constituents in mosses(Musci)[J]. Phytochemistry, 2001, 57:443-557.
- Li JT, Yin BL, Liu Y, et al. Mono-aromatic constituents of *Dendrobium longicornu*[J]. Chem Nat Compd, 2009, 45: 234-236.
- Feng T, Su J, Ding ZH, et al. Chemical constituents and their bioactivities of "Tongling White Ginger" (*Zingiber officinale*)[J]. J Agr Food Chem, 2011, 59:11690-11695.
- Okamoto M, Irii H, Tahara Y, et al. Synthesis of a new [6]-gingerol analogue and its protective effect with respect to the development of metabolic syndrome in mice fed a high-fat diet[J]. J Med Chem, 2011, 54:6295-6304.
- Lee SW, Lim JH, Kin MS, et al. Phenolic compounds isolated from *Zingiber officinale* roots inhibit cell adhesion[J]. Food Chem, 2011, 128:778-782.
- Beck JJ, Kim JH, Campbell BC, et al. Fungicidal activities of dihydroferulic acid alkyl ester analogues[J]. J Nat Prod, 2007, 70:779-782.
- Kikuzaki H, Tsai SM, Nakatani N. Gingerdiol related compounds from the rhizomes of *Zingiber officinale*[J]. Phytochemistry, 1991, 31:1783-1786.
- Liu GY, Ma SC, Zhang XM, et al. Study on chemical constituents in seeds of *Helicia nilagirica* (II)[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30:830-832.
- Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, et al. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 127:515-520.
- Park SB, Park GH, Kim HN, et al. Anti-inflammatory effect of the extracts from the branch of *Taxillus yadoriki* being parasitic in *Neolitsea sericea* in LPS-stimulated RAW 264.7 cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104(1):1-7.