

黄姜花花的化学成分、抗氧化、酶抑制活性及抗炎作用研究

丁芙蓉^{1,3}, 贾小演^{1,3}, 吴相欢^{1,3},
吴霞^{1,3}, 杨念^{2,3}, 刘雄利^{1,3}, 田民义^{1,3*}

¹贵州大学酿酒与食品工程学院; ²贵州大学生命科学学院;

³西南药食两用资源开发利用技术国家地方联合工程研究中心, 贵阳 550025

摘要: 研究黄姜花花提取物的化学成分、抗氧化、酶抑制活性及抗炎作用。本文采用回流提取法制得黄姜花花水提物和醇提物, 使用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱串联质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap MS) 分析其提取物化学成分, 共鉴定出 58 种化合物, 包括 11 种酚类和 18 种黄酮类化合物。黄姜花花提取物具有较好的抗氧化活性, 对 DPPH、ABTS 自由基的清除作用较强, 同时能够抑制 α -葡萄糖苷酶、酪氨酸酶、乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶的活性。提取物在无毒范围内 (62.5、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 能显著降低 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中促炎症介质 (NO 和 PGE_2) 和细胞因子 (TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β) 的过度分泌。本实验为黄姜花花在食品、药品、化妆品等行业的开发利用提供理论基础。

关键词: 黄姜花; 提取物; 化学成分; 抗氧化活性; 酶抑制活性; 抗炎活性

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)1-0013-13

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.1.002

Chemical composition, antioxidant, enzyme inhibitory and anti-inflammatory activities of *Hedychium flavum* flower

DING Fu-rong^{1,3}, JIA Xiao-yan^{1,3}, WU Xiang-huan^{1,3},
WU Xia^{1,3}, YANG Nian^{2,3}, LIU Xiong-li^{1,3}, TIAN Min-yi^{1,3*}

¹School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University; ²College of Life Sciences, Guizhou University;

³National & Local Joint Engineering Research Center for the Exploitation of Homology Resources of Southwest Medicine and Food, Guiyang 550025, China

Abstract: This study aimed to investigate the chemical composition, antioxidant, enzyme inhibitory, and anti-inflammatory activities of *Hedychium flavum* flower extracts. *H. flavum* flower water extracts and ethanol extracts were obtained by reflux extraction method. The chemical composition of the extracts was identified by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap-MS). A total of 58 compounds were identified, including 11 phenols and 18 flavonoids. The extracts showed strong antioxidant activity in the DPPH and ABTS assay and had certain inhibitory effects on α -glucosidase, tyrosinase, acetylcholinesterase, and butyrylcholinesterase. Within the non-toxic dose range (62.5, 125, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the extracts significantly reduced LPS-induced oversecretion of pro-inflammatory mediators (NO and PGE_2) and cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) in RAW 264.7 cells. Our study provides a theoretical basis for the development and utilization of *H. flavum* flower in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries.

Key words: *Hedychium flavum*; extracts; chemical composition; antioxidant activity; enzyme inhibition activity; anti-inflammatory activity

黄姜花 (*Hedychium flavum* Roxb.) 为姜科姜花

属植物, 具有食用、药用和观赏价值, 主要分布于我国贵州、四川、西藏、云南、广西等地, 也在缅甸、泰国和印度被广泛种植^[1,2]。贵州毕节地区称黄姜花为草果, 是一种当地特色食品。现有研究表明, 黄姜花根状茎具有多种药理作用, 如抗炎、抗菌、抗真菌、抗

收稿日期: 2023-08-18 接受日期: 2023-11-16

基金项目: 国家自然科学基金 (82360834)

* 通信作者 Tel: 86-018286039699; E-mail: mytian@zgu.edu.cn

癌、杀虫和酶抑制活性等^[2,4],被用作食物调味料和中药^[5-6],它的嫩芽被用作调味品和蔬菜。黄姜花的花可作为食品调味料,其香气浓郁且易挥发,人们为了使腌制品中增添浓郁的清香味,常将其添加到剁椒和辣椒酱中,同时新鲜的花瓣可作为炒菜的佐料。黄姜花的花浸膏用于调合香精^[7]。此外,黄姜花的花有健胃止痛,温中散寒的作用,常用于治疗消化不良、腹泻、胃寒腹痛、食积停滞等相关疾病^[6,8]。黄姜花的花挥发油可在化妆品中使用,有芳香健胃的作用^[6]。课题组前期的研究表明黄姜花的花挥发油具有显著的体内外抗炎作用^[9]。目前国内对黄姜花的研究较少,其花非挥发性物质的化学成分和药理活性尚未有报道。所以本实验主要研究黄姜花花提取物的化学成分、抗氧化活性、酶抑制活性和抗炎活性。

1 材料与方法

1.1 材料

样品采购于2019年4月,产自广西贵港,由贵州大学植物学专家胡国雄教授鉴定为姜科姜花属黄姜花(*Hedychium flavum* Roxb.)的花,标本(编号:HF-20190421)保存于贵州省药食同源植物资源开发工程技术研究中心。RAW 264.7 细胞(中国科学院昆明细胞库)。无水硫酸钠和无水乙醇(色谱纯,山东维进化工公司);MTT(98%,批号:530R0511)、二丁基羟基甲苯(BHT)(纯度98%,批号:BCBV3237)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)(纯度98%,批号:SLCH3887)、酪氨酸酶(批号:SLCG8506)、L-酪氨酸(98%,批号:VD223127)、熊果苷(纯度98%,批号:A1026A025)、 α -葡萄糖苷酶(批号:G7352E90B)、4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(纯度99%,批号:H1909087)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,纯度98%,批号:STBH7297)、阿卡波糖(纯度98%,批号:J1824027)、乙酰胆碱酯酶(批号:SLCJ4242)(德国Sigma公司);胎牛血清(批号:22110705,杭州四季青生物公司);丁酰胆碱酯酶(批号:SLCF8252,上海星科生物公司);PGE₂ ELISA 试剂盒(批号:PEQBP5RT2B,中国台湾 Abnova 公司);TNF- α ELISA 试剂盒、IL-6 ELISA 试剂盒(批号:A28221056、A20611035,杭州联科公司);IL-1 β ELISA 试剂盒(批号:20221206,泉州睿信生物公司);二甲基亚砜(DMSO)(分析纯,批号:20220920)、地塞米松(纯度98%,批号:104J054)、

脂多糖(LPS)(纯度99%,批号:622P022)(北京索莱宝公司);高糖 DMEM 和双抗(批号:8122757、192814,北京鼎国昌盛生物公司);碘代乙酰胆碱(批号:C10120826,上海晶抗生物公司);加兰他敏(纯度98%,批号:324E021,上海源叶生物科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 提取物的制备

将新鲜黄姜花的花洗净后粉碎,置于圆底烧瓶(2 L)中,加入蒸馏水(或70%乙醇)采用回流提取法进行提取(2 h)后抽滤,重复操作2次。将两次收集的滤液混合后浓缩,浓缩液冷冻干燥得水提物和醇提物。

1.2.2 总酚酸总黄酮含量测定

1.2.2.1 总酚酸含量测定

总酚酸含量采用福林酚法(Folin-Ciocalteu)^[10]测定。样品溶液(0.5 mL)中加入福林酚试剂(2.5 mL)孵育4 min,然后加入碳酸钠溶液(2 mL,7.5%),孵育60 min后测定其吸光值,测定波长为760 nm。以试剂为空白参比,没食子酸为对照品建立坐标轴,绘制标准曲线。以每克样品相当于多少毫克的没食子酸表示总酚含量(mg GAEs/g sample)。

1.2.2.2 总黄酮含量测定

总黄酮含量采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法(NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH)^[11]测定。样品溶液(5 mL)中加入亚硝酸钠溶液(0.4 mL,5%),孵育6 min,加入硝酸铝溶液(0.4 mL,10%)孵育6 min,加入氢氧化钠溶液(4 mL,4%)后再加入蒸馏水使总体积为10 mL,孵育15 min后测定其吸光值,测定波长为510 nm。以试剂为空白参比,芦丁为对照品建立坐标轴,绘制标准曲线。以每克样品相当于多少毫克的芦丁表示总黄酮含量(mg REs/g sample)。

1.2.3 化学成分分析

采用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱串联质谱(UHPLC-Q-Orbitrap MS)分析提取物化学成分。液相系统:Dionex Ultimate 3000 RSLC (HPG)。流动相:乙腈(含0.1%甲酸)和0.1%甲酸水;进样体积5 μL ;流速0.3 mL/min;柱温:40 $^\circ\text{C}$;色谱柱:ACE Ultracore 2.5 Super C₁₈柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μm)。梯度洗脱程序:0 ~ 2 min,5% A;2 ~ 42 min,5% \rightarrow 95% A;42 ~ 47 min,95% A;47 ~ 47.1 min,95% \rightarrow 5% A;47.1 ~ 50 min,5% A。质谱系统:Thermo Scientific Q Exactive Focus,热喷雾离子源

HESI-II。离子源参数:喷雾电压 3.0 kV(+)/2.5 kV(-);鞘气 35 arb;毛细管温度 320 °C;辅助气 10 arb;挡锥气 0 arb;探头加热器温度 350 °C。质谱扫描参数:扫描方式为 Full MS-ddMS²;分辨率为 70000 (Full MS) 和 17500 (MS/MS);扫描范围为 100 ~ 1500 *m/z*;最大驻存时间为 100 ms (Full MS) 和 50 ms (MS/MS);AGC 目标为 1e⁶ (Full MS) 和 2e⁵ (MS/MS);最小 AGC 目标为 8e³。质谱数据使用 Xcalibur 4.1 (美国赛默飞世尔科技公司) 处理,并通过 mzVault 和 mzCloud 数据库进行比较鉴定,允许相对质量偏差设置为 10 × 10⁻⁶。

1.2.4 抗氧化活性测定

1.2.4.1 清除 DPPH 自由基能力测定

参照 Zhai 等^[12] 的方法进行本实验,实验组 (*A_s*):2 mL 样品溶液与 2 mL DPPH 溶液;样品空白组 (*A_r*):2 mL 样品溶液与 2 mL 溶剂;溶剂空白组 (*A₀*):2 mL 溶剂与 2 mL DPPH 溶液;以上三组于避光室温下孵育 30 min 后测量吸光值 (波长 517 nm)。BHT 为阳性对照,结果以每克样品相当于多少毫克的 BHT (mg BEs/g sample) 表示。按公式(1) 计算 DPPH 自由基清除率 (*R_c*)。

$$R_c = (1 - (A_s - A_r) / A_0) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4.2 清除 ABTS 自由基能力测定

本实验参照 Zhai 等^[12] 的方法进行,实验组 (*A_s*):0.4 mL 样品溶液与 4 mL ABTS 工作液;样品空白组 (*A_r*):0.4 mL 样品溶液与 4 mL 溶剂;溶剂空白组 (*A₀*):0.4 mL 溶剂与 4 mL ABTS 工作液;以上三组避光反应 10 min 后测量吸光值 (波长 734 nm)。BHT 为阳性对照。结果以每克样品相当于多少毫克的 BHT (mg BEs/g sample) 表示。ABTS 自由基清除率按公式(1) 计算。

1.2.5 酶抑制活性测定

1.2.5.1 胆碱酯酶抑制活性测定

参考 Lu 等^[13] 的方法,底物选择碘代乙酰胆碱和硫代丁酰胆碱,阳性对照选择加兰他敏。样品组 (*A₁*):样品溶液 (50 μL) 中加入乙(丁)酰胆碱酯酶 (10 μL, pH 8, 0.5 U/mL), 在 4 °C 反应 15 min。加入二硫代双硝基苯甲酸 (20 μL, 2 mmol/L) 和底物 (20 μL, 2 mmol/L), 在 37 °C 反应 30 min。最后测量吸光值 (波长 405 nm)。样品空白组 (*A₂*):按以上步骤将乙(丁)酰胆碱酯酶换成缓冲液 (pH 8);阴性组 (*A₃*):按以上步骤将样品溶液换成缓冲液 (pH 8);空白组 (*A₄*):按以上步骤将乙(丁)酰胆碱酯酶

和样品溶液都换成缓冲液 (pH 8)。结果以 IC₅₀ 值和每克样品相当于多少毫克的加兰他敏 (mg GALAEs/g sample) 表示。乙(丁)酰胆碱酯酶抑制率 (*R_i*) 计算如公式(2) 所示:

$$R_i = [1 - (A_1 - A_2) / (A_3 - A_4)] \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5.2 酪氨酸酶抑制活性测定

参考 Lu 等^[13] 的方法,底物选择 *L*-酪氨酸,阳性对照为熊果苷。样品组 (*A₁*):样品溶液 (70 μL) 中加入酪氨酸酶 (100 μL, 100 U/mL) 并在 37 °C 反应 5 min。加入底物 (80 μL, 5.5 mmol/L) 后在 37 °C 孵育 30 min。最后测定吸光值 (波长 492 nm)。样品空白组 (*A₂*):按以上步骤将酪氨酸酶换成缓冲液 (pH 6.8);阴性组 (*A₃*):按以上步骤将样品溶液换成缓冲液 (pH 6.8);空白组 (*A₄*):按以上步骤将酪氨酸酶和样品溶液都换成缓冲液 (pH 6.8)。结果以 IC₅₀ 值和每克样品相当于多少毫克的熊果苷 (mg AREs/g sample) 表示。酪氨酸酶抑制率按公式(2) 计算。

1.2.5.3 α-葡萄糖苷酶抑制活性测定

参考 Lu 等^[13] 的方法,底物选择硝基苯-α-*D*-葡萄糖吡喃苷 (*p*-NPG), 阳性对照选择阿卡波糖。样品组 (*A₁*):将样品溶液 (30 μL) 与 α-葡萄糖苷酶 (10 μL, 0.8 U/mL) 加入缓冲液 (60 μL, pH 6.8) 中, 在 37 °C 反应 15 min。然后加入底物 (10 μL, 1 mol/L), 在 37 °C 反应 15 min。最后加入碳酸钠溶液 (80 μL, 0.2 mol/L) 停止反应, 测定吸光值 (波长 405 nm)。样品空白组 (*A₂*):按以上步骤将 α-葡萄糖苷酶换成缓冲液 (pH 6.8);阴性组 (*A₃*):按以上步骤将样品溶液换成缓冲液 (pH 6.8);空白组 (*A₄*):按以上步骤将 α-葡萄糖苷和样品溶液都换成缓冲液 (pH 6.8)。结果以 IC₅₀ 值和每克样品相当于多少毫摩尔的阿卡波糖 (mmol ACEs/g sample) 表示。α-葡萄糖苷酶抑制率按公式(2) 计算。

1.2.6 抗炎活性测定

1.2.6.1 细胞毒性测定

样品溶液对 RAW 264.7 细胞系的细胞毒性作用通过 MTT 法进行评估^[14]。在 96 孔板中加入 100 μL RAW 264.7 细胞 (2 × 10⁴ 个细胞/孔) 培养 24 h 后, 将溶解在二甲基亚砷 (DMSO) 中的样品用 DMEM 培养基从 500 μg/mL 连续半倍稀释至 31.25 μg/mL, 吸出旧培养基并加入 100 μL 样品溶液培养 24 h。加入 10 μL MTT 溶液 (5 mg/mL) 后培养 4 h, 去除上清液, 加入 150 μL 二甲基亚砷后震荡 10

min, 测量吸光值(波长 490 nm)。

1.2.6.2 促炎症介质和细胞因子释放量测定

将 RAW 264.7 细胞用 LPS 诱导后取上清液, 采用 Griess 法和 ELISA 试剂盒检测样品对上清液中 NO、PGE₂、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量的影响。在 96 孔板中加入 100 μ L RAW 264.7 细胞(2×10^4 个细胞/孔)培养 24 h 后, 吸出旧培养基加入 100 μ L 样品溶液培养 2 h, 然后加入 100 μ L LPS(1 μ g/mL) 培养 24 h, 收集上清液。设定空白组(control, CON)、模型组(LPS)、阳性对照(地塞米松, DXM)和样品组。根据 NO 试剂盒和 ELISA 试剂盒说明书检测评估 NO、PGE₂、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量。

1.2.7 统计分析

所有数据均重复三次, 以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm$

s) 表示。统计分析采用 SPSS 25.0 软件, 单因素方差分析采用 LSD(最小显著性差异)检验, $P < 0.05$ 时被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄姜花花提取物总酚酸总黄酮含量测定

黄姜花花水提物和醇提物的产率分别为(0.93 ± 0.04)% 和(0.59 ± 0.03)%, 其总酚酸及总黄酮含量如图 1 所示。水提物和醇提物的没食子酸当量值分别为 25.78 ± 0.09 mg GAEs/g sample 和 34.04 ± 0.83 mg GAEs/g sample; 芦丁当量分别为 73.21 ± 0.58 mg REs/g sample 和 41.51 ± 0.72 mg REs/g sample。分析结果表明, 醇提物总酚酸含量显著高于水提物($P < 0.01$), 水提物总黄酮含量显著高于醇提物($P < 0.01$)。

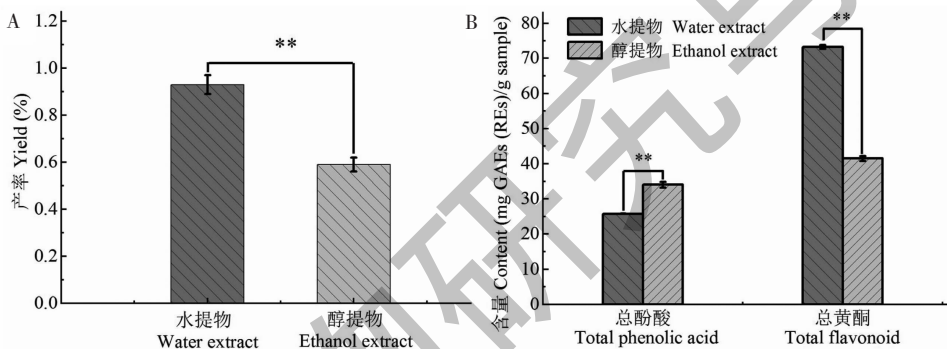


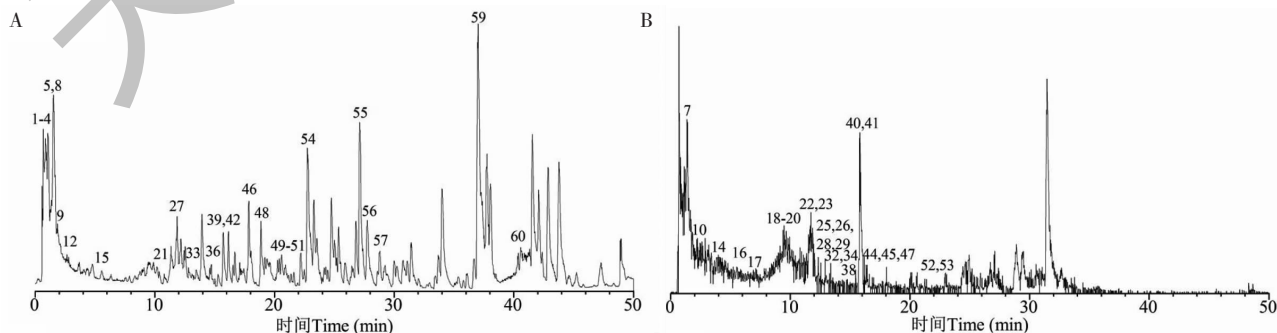
图 1 黄姜花花提取物的产率和总酚酸、总黄酮含量

Fig. 1 The yield and the total phenolic and flavonoid content of *H. flavum* flower extracts

2.2 黄姜花花提取物化学成分分析

从黄姜花花水提取物中鉴定出 42 种化合物, 含有 7 种酚类化合物和 11 种黄酮类化合物; 从黄姜花花醇提取物鉴定出 50 种化合物, 包括 9 种酚类化合物和 17 种黄酮类化合物。两种提取物一共分析鉴定出 58 种化合物(图 2、表 1), 其中, 酚类化合物共有 11 种: 丁香醛、大麦芽碱、香草酸、七叶亭、对羟基肉桂

酸、橙黄决明素-6-*O*-葡萄糖苷、松柏醛、咖啡酸乙酯、阿魏酸乙酯、6-姜酚、去氢二异丁香酚, 结构式见图 3A。黄酮类化合物共有 18 种: 二氢田基黄苷、维采宁 II、罗汉果黄素、杨梅苷、异槲皮苷、野黄芩苷、槲皮素-3-葡萄糖醛酸苷、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、水仙苷、槲皮素、槲皮甙、桑黄素、苏木素、山柰酚、异鼠李素、异黄腐醇、香叶木



续图 2(Continued Fig.2)

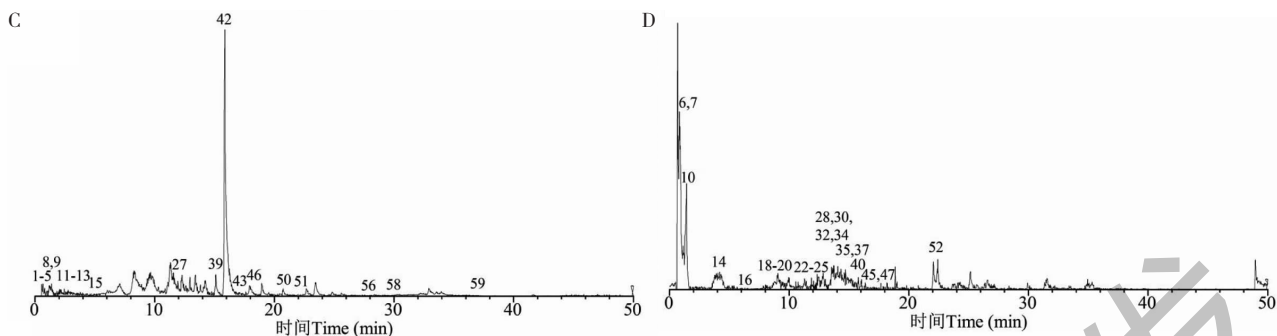


图2 黄姜花的花醇提物和水提物的 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 色谱图

Fig. 2 UHPLC-Q-Orbitrap-MS chromatograms of *H. flavum* flower ethanol extract and water extract

注:A:醇提物正离子模式;B:醇提物负离子模式;C:水提物正离子模式;D:水提物负离子模式。Note:A:Ethanol extract in positive ion mode; B:Ethanol extract in negative ion mode;C:Water extract in positive ion mode;D:Water extract in negative ion mode.

素,其结构式见图3B。酚类化合物代表(香草酸,6-姜酚)和黄酮类化合物代表(罗汉果黄素,槲皮素)的质谱裂解途径如图4~7所示。

表1 黄姜花花提取物的植物化学成分

Table 1 Phytochemical compounds in *H. flavum* flower extracts

序号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	误差 Error (1×10^{-6})	二级离子碎片 MS ² fragment ion	水提物 Water extract	醇提物 Ethanol extract
1	0.12	丁香醛 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	C ₉ H ₁₀ O ₄	183.0648	-	-2.32	113.9636, 131.9739, 159.9685, 72.9376	✓	✓
2	0.81	精氨酸 L-Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175.1186	-	-2.07	70.0658, 60.0563, 116.0705, 130.0971	✓	✓
3	0.97	γ-氨基丁酸 γ-Aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂	104.0707	-	1.29	104.1072, 60.0815, 88.0603	✓	✓
4	1.02	L-羟脯氨酸 L-Hydroxyproline	C ₅ H ₉ NO ₃	132.0653	-	-2.07	86.0969, 132.1014, 69.0704	✓	✓
5	1.06	L-亮氨酸 L-Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.1017	-	-1.67	86.0968, 132.0808, 69.0704	✓	✓
6	1.16	葡萄糖内酯 δ-Gluconolactone	C ₆ H ₁₀ O ₆	-	177.0389	-8.93	129.0177, 71.0122, 59.0123, 99.0071	✓	-
7	1.48	D-葡萄糖酸 D-Gluconic acid	C ₆ H ₁₂ O ₇	-	195.0495	-7.77	129.0176, 75.0071, 87.0071	✓	✓
8	1.48	L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	149.0593 [M+NH ₃] ⁺	-	-2.72	120.0808, 103.0543, 131.0488	✓	✓
9	1.74	L-焦谷氨酸 L-Pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ NO ₃	130.0497	-	-1.20	84.0449, 130.0495, 56.0502	✓	✓
10	1.79	柠檬酸 Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	-	191.0182	-7.88	111.0071, 87.0071, 147.0282	✓	✓
11	1.93	大麦芽碱 Hordenine	C ₁₀ H ₁₅ NO	166.1222	-	-2.59	120.0807, 103.0543, 91.0545	✓	-

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	误差 Error (1×10^{-6})	二级离子碎片 MS ² fragment ion	水提物 Water extract	醇提物 Ethanol extract
12	2.39	5-羟甲基糠醛 5-Hydroxymethylfurfural	C ₆ H ₆ O ₃	127.038 8	-	-1.11	127.039 0, 109.028 4, 69.034 0	√	√
13	2.70	胸腺嘧啶 Thymine	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	127.050 0	-	-1.61	127.039 0, 127.049 7, 109.028 4, 99.044 2	√	-
14	4.12	2-异丙基苹果酸 2-Isopropylmalic acid	C ₇ H ₁₂ O ₅	-	175.059 7	-8.78	85.064 3, 157.048 9, 113.059 2	√	√
15	5.52	香草酸 Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	169.049 1	-	-2.75	111.044 1, 65.039 2, 93.033 7, 125.059 5	√	√
16	5.91	七叶亭 Esculetin	C ₉ H ₆ O ₄	-	177.017 8	-8.88	177.017 7, 133.027 9, 105.032 9	√	√
17	9.23	二氢田基黄苷 Taxifolin 7-rhamno- side	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	-	449.107 0	-4.40	125.022 7, 259.051 0, 287.054 8, 151.002 2	√	√
18	9.67	对羟基肉桂酸 <i>p</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	-	163.038 5	-9.92	119.048 6, 91.053 9	√	√
19	10.29	维采宁 II Vicenin II	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-	593.148 7	-4.14	353.065 0, 297.075 5, 473.107 2	√	√
20	11.107	甲氧基香豆素 7-Methoxycoumarin	C ₁₀ H ₈ O ₃	177.054 2	-	-2.55	145.028 1, 117.033 5, 177.053 9, 89.038 9	-	√
21	11.61	党参炔苷 Lobetyolin	C ₂₀ H ₂₈ O ₈	-	441.174 9	-3.89	59.012 3, 71.012 3, 89.022 8, 330.130 6	√	√
22	11.68	罗汉果黄素 Grosvenorine	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	-	739.206 4	-1.81	284.031 4, 255.028 6, 227.033 6, 285.039 1, 151.002 1	√	√
23	11.96	杨梅苷 Myricitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-	463.086 5	-3.76	316.021 1, 271.023 8, 287.018 7, 300.026 3	√	√
24	12.11	异槲皮苷 Isoquercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-	463.086 4	-3.82	300.026 3, 271.023 7, 316.021 0, 255.028 6	-	√
25	12.25	野黄芩苷 Scutellarin	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	463.085 8	-	-2.86	287.054 1, 259.059 4, 85.028 8, 183.028 5	√	√
26	12.41	槲皮素-3-葡萄糖醛 酸苷 Quercetin 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -Glucuronide	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	-	477.065 6	-3.82	301.034 1, 151.002 1, 178.997 1	√	√
27	12.45	异鼠李素-3- <i>O</i> -新橙 皮苷 Isorhamnetin-3- <i>O</i> - nehesperidine	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	-	623.159 2	-6.28	243.028 6, 271.023 6, 285.039 2, 151.002 0	-	√
28	12.49	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖 苷 Kaempferol-3- <i>O</i> - rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-	593.148 7	-4.14	284.031 4, 255.028 6, 227.033 6, 285.039 2	√	-
29	12.98	水仙苷 Narcissoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	-	623.159 4	-	299.018 5, 314.042 1, 315.049 9, 243.028 7	-	√
30	13.16	壬二酸 Azelaic acid	C ₉ H ₁₆ O ₄	-	187.096 1	-8.08	57.033 0, 125.095 5, 97.064 2, 187.096 0	√	√

续表 1 (Continued Tab. 1)

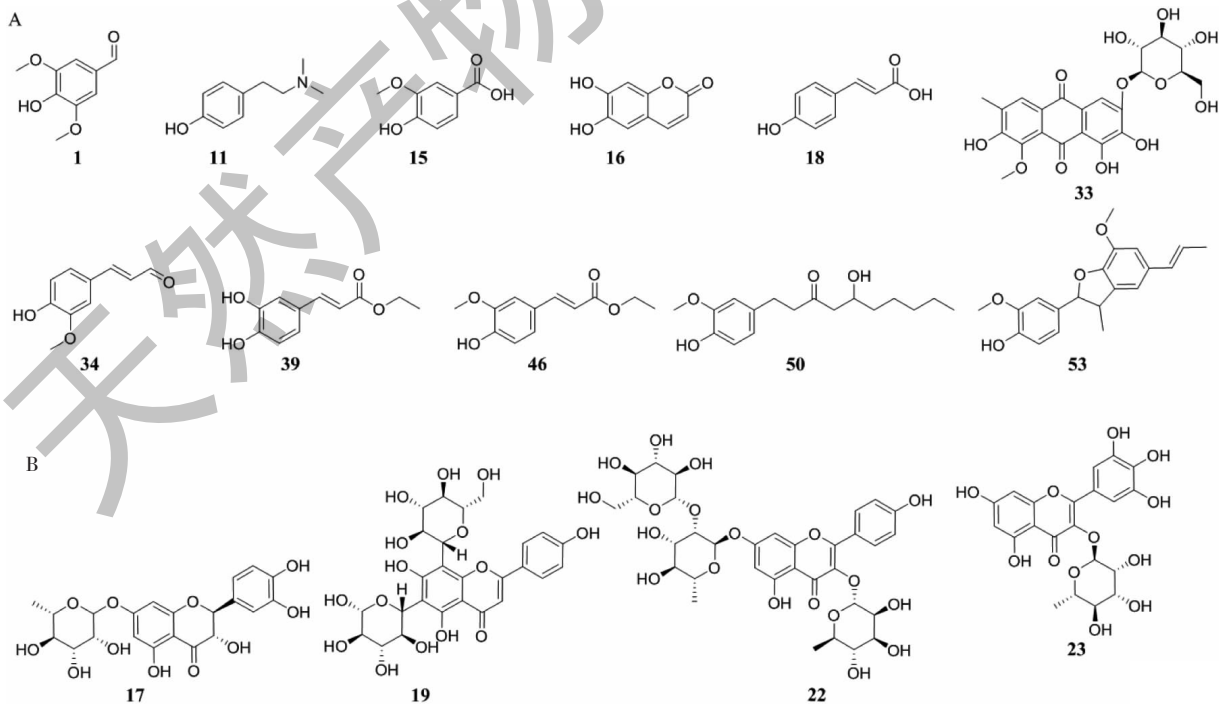
序号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	误差 Error (1×10^{-6})	二级离子碎片 MS ² fragment ion	水提物 Water extract	醇提物 Ethanol extract
31	13.23	槲皮素 Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.049 1	-	-2.84	257.058 8, 229.048 7, 201.053 9, 153.017 7, 137.023 0	-	✓
32	13.25	槲皮苷 Quercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-	447.091 4	-4.22	300.026 3, 271.023 6, 301.034 1, 255.028 7	✓	✓
33	14.60	橙黄决明素-6-O-葡 萄糖苷 Aurantio-obtusin β -D- glucoside	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	-	491.117 4	-4.21	344.052 2, 329.029 1, 242.020 9, 345.060 1	✓	-
34	15.07	松柏醛 Coniferyl aldehyde	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	179.069 8	-	-2.92	147.043 6, 119.049 0, 91.054 5, 133.064 5	-	✓
35	15.17	苍术苷 A Atractyloside A	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₀	-	493.227 1 [M+COOH] ⁻	-4.05	315.180 1, 71.012 2, 101.022 7, 161.043 9	✓	-
36	15.34	癸二酸 Sebacic acid	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	-	183.101 3 [M-H ₂ O] ⁻	-7.52	139.111 2, 183.101 1, 201.111 7, 111.080 0	-	✓
37	15.72	脱水穿心莲内酯 Dehydroandrographol- ide	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	333.204 8	-	-3.79	189.163 1, 297.184 0, 227.105 6, 119.085 4	✓	✓
38	15.81	桑黄 Morin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-	301.034 1	-4.27	151.002 0, 178.997 0, 107.012 2, 83.012 2	✓	✓
39	15.89	咖啡酸乙酯 Ethyl caffeate	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	-	207.064 9	-6.77	135.043 6, 161.022 9, 179.033 5, 133.027 9	-	✓
40	16.15	咖啡豆醇 Kahweol	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	297.183 9	-	-3.29	145.100 7, 119.085 4, 189.163 1, 187.147 5	✓	✓
41	16.99	α -亚麻酸 α -Linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279.231 0	-	-3.10	55.054 9, 79.054 8, 95.085 9	✓	-
42	17.51	苏木素 Hematoxylin	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	-	301.070 6	-3.99	115.002 1, 178.997 1, 123.007 1, 63.012 2	-	✓
43	17.66	山奈酚 Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-	285.039 4	-3.83	93.032 9, 137.022 9, 143.048 6, 229.049 6	✓	✓
44	17.85	莪术烯醇 Curcumenol	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	235.168 5	-	-3.13	121.101 0, 119.085 4, 111.080 4, 123.080 2	✓	✓
45	18.07	异鼠李素 Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	-	315.049 8	-3.99	300.026 2, 151.002 0, 107.012 2, 271.023 5	✓	✓
46	18.82	阿魏酸乙酯 Ethyl ferulate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	223.095 7	-	-3.37	177.054 1, 145.028 0, 117.033 4, 149.059 2	-	✓
47	20.81	异黄腐醇 Isoxanthohumol	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	355.153 1	-	-2.68	137.059 4, 161.059 3, 122.036 1, 210.090 4	-	✓
48	21.58	异土木香内酯 Isoalantolactone	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	233.152 9	-	-2.94	205.158 0, 133.100 7, 145.100 7, 162.103 3	✓	✓
49	22.01	樟脑 Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	153.126 9	-	-2.95	97.065 1, 153.126 9, 135.116 4, 69.070 4	✓	✓

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	误差 Error (1×10^{-6})	二级离子碎片 MS ² fragment ion	水提物 Water extract	醇提物 Ethanol extract
50	22.06	6-姜酚 6-Gingerol	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	-	293.174 6	-4.14	221.153 3, 220.145 4, 236.104 1, 192.114 0, 177.090 5	✓	✓
51	22.11	香叶木素 Diosmetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-	299.054 9	-4.05	284.031 5, 151.002 1, 107.012 2, 63.022 5	-	✓
52	22.27	白术内酯 II Atractylenolide II	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	233.152 9	-	-2.94	191.106 0, 173.095 5, 135.080 1, 111.080 4	-	✓
53	27.34	去氢二异丁香酚 Dehydrodiisoeugenol	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	327.158 0	-	-3.44	203.105 9, 137.059 3, 188.082 5, 103.054 3	-	✓
54	27.74	α -香附酮 α -Cyperone	C ₁₅ H ₂₂ O	219.173 8	-	-2.34	204.150 2, 189.126 8, 111.804 0, 97.065 0	✓	✓
55	29.64	辛可宁 Cinchonine	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	295.181 3	-	2.88	277.215 2, 151.111 1, 81.033 9, 93.070 1	-	✓
56	30.21	吉马酮 Germacrone	C ₁₅ H ₂₂ O	219.173 8	-	-2.43	81.070 1, 95.085 8, 109.101 3	✓	-
57	37.42	松香酸 Abietic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	303.230 9	-	-3.16	95.085 7, 81.070 3, 233.189 0, 257.225 6	✓	✓
58	40.31	亚麻酸乙酯 Linolenic acid ethyl ester	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	307.262 2	-	-3.28	81.070 3, 67.054 8, 95.085 8, 109.101 2	-	✓

注：“✓”表示从提取物中检测出该化合物；“-”表示未从提取物中检测出该化合物。

Note: “✓” means this compound was detected from extract; “-” means this compound was not detected from extract.



续图 3 (Continued Fig.3)

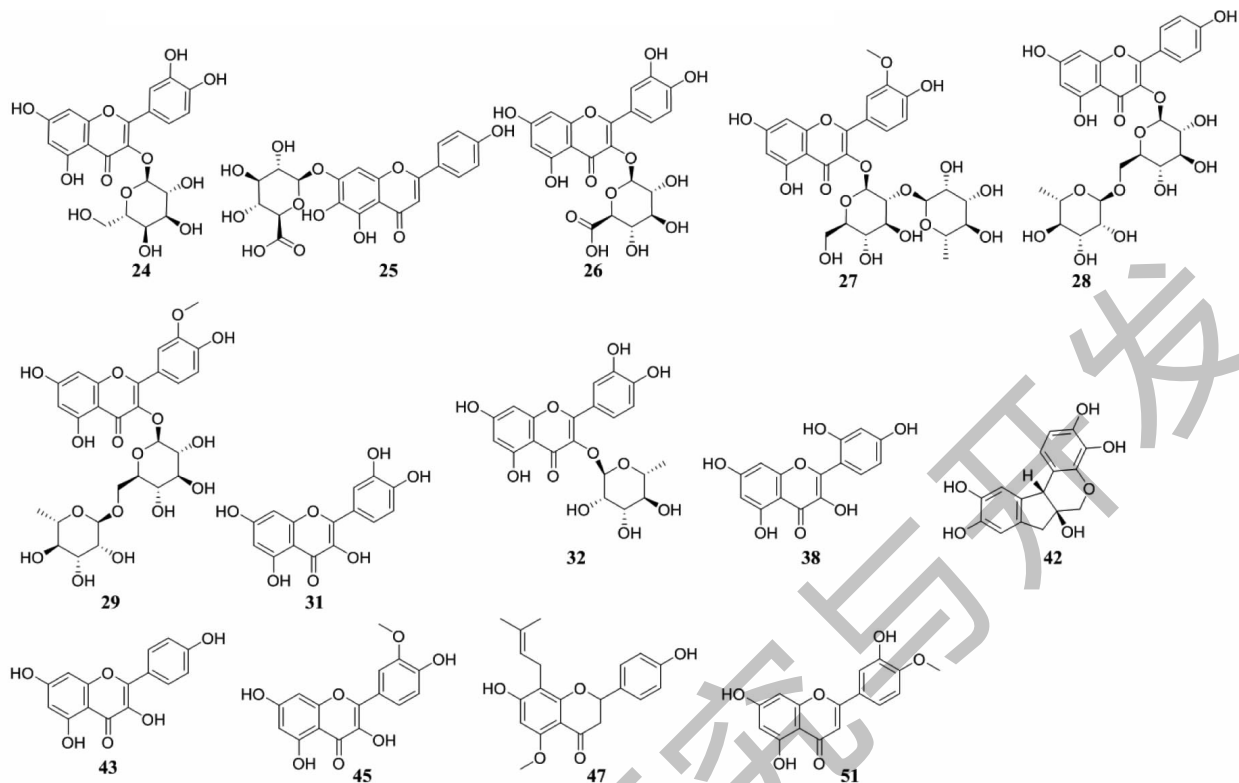


图3 黄姜花花提取物酚类和黄酮类化合物结构

Fig. 3 Structures of phenolic and flavonoid compounds from *H. flavum* flower extracts

注:图中编号对应的化合物见表1。Note: The numbers in this figure corresponds to the compounds in Table 1.

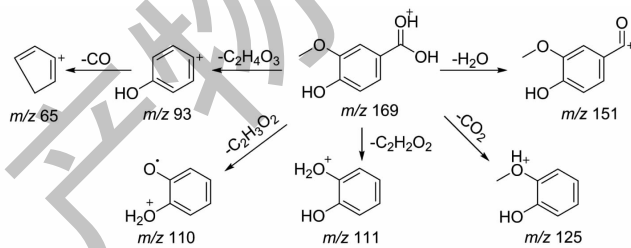


图4 香草酸的裂解途径

Fig. 4 Fragmentation pathway of vanillic acid

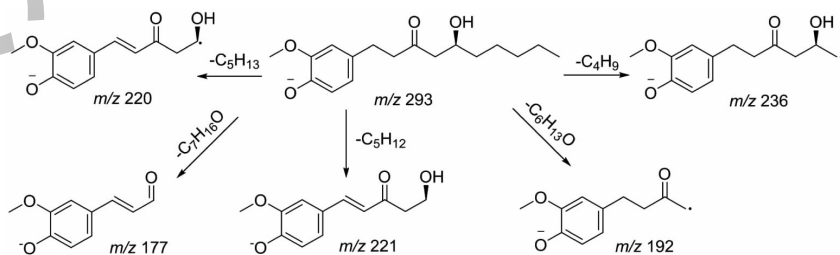


图5 6-姜酚的裂解途径

Fig. 5 Fragmentation pathway of 6-gingerol

2.3 黄姜花花提取物的抗氧化活性

由表2可知,黄姜花花水提物和醇提物对DP-

PH和ABTS自由基都有较好的抗氧化活性。二者对DPPH自由基的 IC_{50} 值分别为 $165.78 \pm 2.45 \mu\text{g}/$

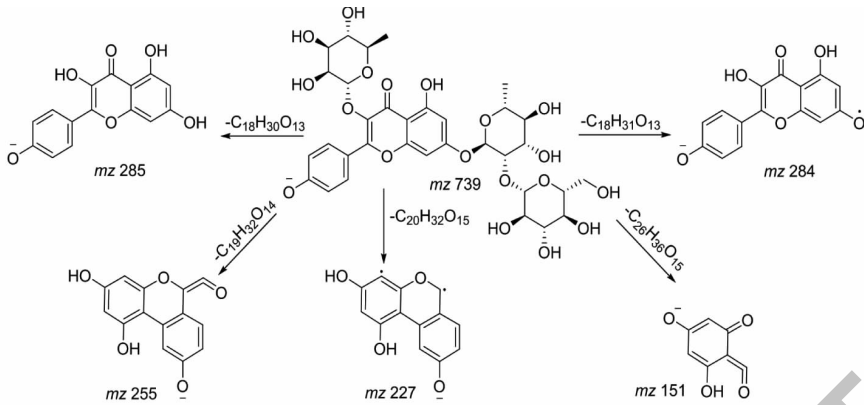


图6 罗汉果黄素的裂解途径

Fig. 6 Fragmentation pathway of grosvenorin

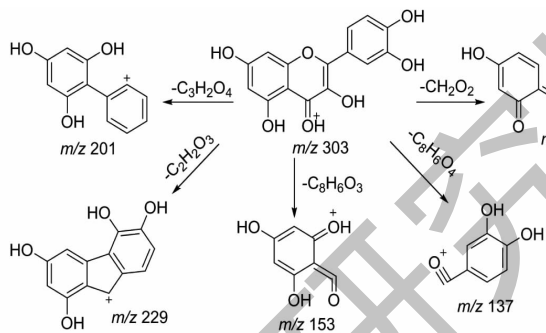


图7 槲皮素的裂解途径

Fig. 7 Fragmentation pathway of quercetin

表2 黄姜花花提取物的抗氧化活性

Table 21 Antioxidant activity of *H. flavum* flower extracts

样品 Sample	DPPH		ABTS	
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	当量 Equivalent (mg BEs/g sample)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	当量 Equivalent (mg BEs/g sample)
水提取物 Water extract	165.78 \pm 2.45	667.14 \pm 9.95	104.97 \pm 8.27	129.53 \pm 10.24
醇提取物 Ethanol extract	163.70 \pm 2.84	679.32 \pm 12.00	99.69 \pm 2.97	135.91 \pm 4.05
BHT	110.21 \pm 0.78	-	13.71 \pm 0.25	-

mL 和 163.70 \pm 2.84 $\mu\text{g/mL}$, BHT 当量分别为 667.14 \pm 9.95 mg BEs/g sample 和 679.32 \pm 12.00 mg BEs/g sample; 对 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值分别为 104.97 \pm 8.27 $\mu\text{g/mL}$ 和 99.69 \pm 2.97 $\mu\text{g/mL}$, BHT 当量为 129.53 \pm 10.24 mg BEs/g sample 和 135.91 \pm 4.05 mg BEs/g sample。

2.4 黄姜花花提取物的酶抑制活性

由表 3 可知,黄姜花花提取物对 α -葡萄糖苷

酶、酪氨酸酶、乙(丁)酰胆碱酯酶有一定的抑制作用,水提物的阳性当量值分别为 0.09 \pm 0.01 mmol ACEs/g sample、2.62 \pm 0.16 mg AREs/g sample、0.05 \pm 0.006 mg GALAEs/g sample 和 0.93 \pm 0.13 mg GALAEs/g sample;醇提物的阳性当量值分别为 0.22 \pm 0.04 mmol ACEs/g sample、5.23 \pm 0.45 mg AREs/g sample、0.05 \pm 0.001 mg GALAEs/g sample 和 1.87 \pm 0.08 mg GALAEs/g sample。

表 3 黄姜花花提取物的酶抑制活性

Table 3 Enzyme inhibitory activity of *H. flavum* flower extracts

酶 Enzyme	IC ₅₀ (mg/mL)					阳性当量 Equivalent of positive control	
	水提取物 Water extract	醇提取物 Ethanol extract	阿卡波糖 Acarbose	熊果苷 Arbutin	加兰他敏 Galanthamine ($\mu\text{g/mL}$)	水提取物 Water extract	醇提取物 Ethanol extract
α -葡萄糖苷酶 α -Glucosidase	7.30 \pm 0.58	2.98 \pm 0.55	0.42 \pm 0.04	-	-	0.09 \pm 0.01 mmol ACEs/g sample	0.22 \pm 0.04 mmol ACEs/g sample
酪氨酸酶 Tyrosinase	38.27 \pm 2.40	19.21 \pm 1.69	-	0.10 \pm 0.04	-	2.62 \pm 0.16 mg AREs/g sample	5.23 \pm 0.45 mg AREs/g sample
乙酰胆碱酯酶 Acetylcholinesterase	6.10 \pm 0.11	6.39 \pm 0.28	-	-	0.30 \pm 0.09	0.05 \pm 0.006 mg GALAEs/g sample	0.05 \pm 0.001 mg GALAEs/g sample
丁酰胆碱酯酶 Butyrylcholinesterase	7.48 \pm 1.10	3.68 \pm 0.15	-	-	6.88 \pm 0.12	0.93 \pm 0.13 mg GALAEs/g sample	1.87 \pm 0.08 mg GALAEs/g sample

2.5 黄姜花花提取物的抗炎活性

2.5.1 黄姜花花提取物细胞毒性

如图 8 所示,黄姜花花醇提取物在 500 $\mu\text{g/mL}$ 对 RAW 264.7 细胞表现出促增殖作用,黄姜花花水提取物浓度在 250 $\mu\text{g/mL}$ 及以下时对 RAW 264.7 细胞

无毒性。与空白组相比,在黄姜花花醇提取物和水提取物的浓度范围为 31.25 ~ 250 $\mu\text{g/mL}$ 时对 RAW 264.7 细胞存活率的影响不显著 ($P > 0.05$),所以后续试验选择浓度为 62.5、125、250 $\mu\text{g/mL}$ 。

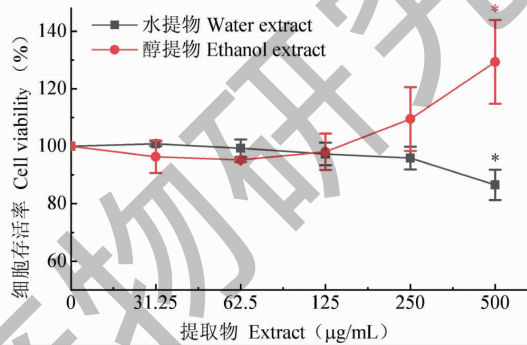


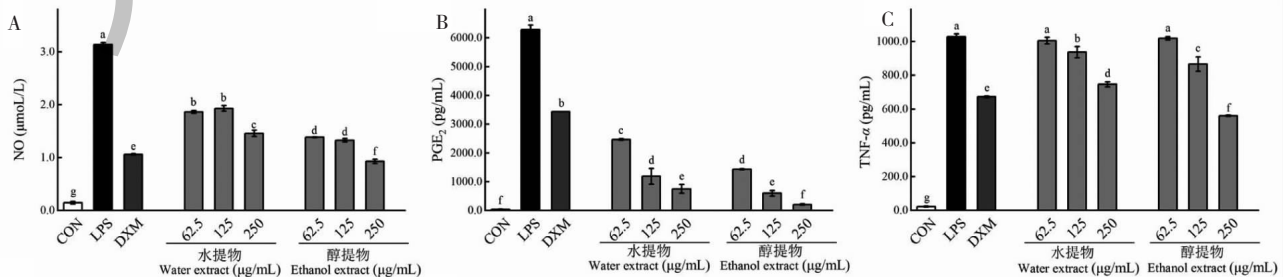
图 8 黄姜花花提取物对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

Fig. 8 Effects of *H. flavum* flower extracts on cell viability of RAW 264.7 cells

2.5.2 黄姜花花提取物促炎症介质和细胞因子释放量测定

如图 9 所示,将 RAW 264.7 细胞用 LPS 诱导后,模型组 NO、PGE₂、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放量与空白对照相比显著提高 ($P < 0.05$),使用提取物 (62.5、125、250 $\mu\text{g/mL}$) 预处理 RAW 264.7 细胞

后,NO、PGE₂、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放量均低于模型组。尤其是浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 的醇提取物对 NO、PGE₂、TNF- α 和 IL-6 的影响均优于地塞米松 (20 $\mu\text{g/mL}$),而对 IL-1 β 的影响相当于地塞米松 (20 $\mu\text{g/mL}$)。此外浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 的水提取物对 PGE₂ 和 IL-6 的作用优于地塞米松 (20 $\mu\text{g/mL}$)。以



续图 9 (Continued Fig.9)

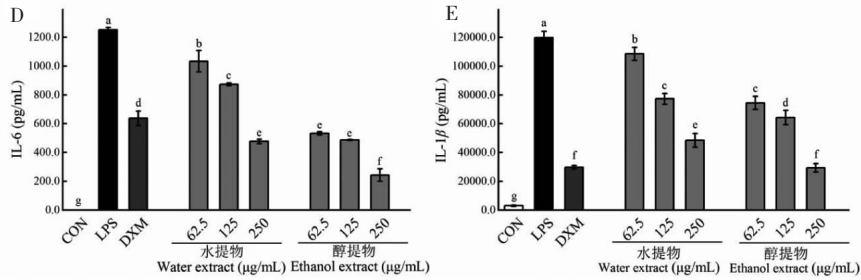


图9 黄姜花花提取物对 RAW 264.7 细胞促炎介质和细胞因子释放量的影响

Fig. 9 Effects of *H. flavum* flower extracts on the pro-inflammatory mediators and cytokines release in RAW 264.7 cells

注:图中不同小写字母表示显著差异($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters in the figures indicated significant differences ($P < 0.05$).

上结果表明,黄姜花花提取物可显著抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中促炎症介质和细胞因子的释放,并且呈剂量依赖性。

3 讨论与结论

植物多酚和黄酮类化合物具有抗氧化、清除自由基、增强免疫力、抗菌消炎、改善心血管、保护肝脏、抗衰老、降血脂、抗癌等作用^[15],而黄姜花花提取物总酚酸总黄酮含量较高,可以用作酚类和黄酮类的丰富来源。从黄姜花花提取物中共鉴定出 58 种化合物,包括 11 种酚类化合物和 18 种黄酮类化合物。黄姜花花提取物对 DPPH 和 ABTS 自由基都有较好的抗氧化活性,特别是对 DPPH 自由基的清除作用较强。在过去的研究中发现,植物提取物的总酚和类黄酮含量与其对 DPPH 和 ABTS 的清除能力呈正相关性^[16,17],所以黄姜花花提取物较强的抗氧化能力与其较高的总酚酸和总黄酮含量密不可分。

黄姜花花醇提物和水提物都能显著降低 RAW 264.7 细胞中促炎症介质 (NO 和 PGE₂) 和细胞因子 (TNF-α、IL-6 和 IL-1β) 的过度分泌,其中醇提物表现出更好的抗炎活性。据研究报道,松柏醛具有较好的抗炎作用,可减轻炎症损伤^[18];异槲皮苷可抑制 TNF-α、NO、iNOS 和 COX-2 的过度产生^[19];槲皮素可降低炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β 的释放量^[20];香叶木素具有抗炎作用^[21]。以上化合物只存在于醇提物中,这些化合物可能是黄姜花花醇提物抗炎活性较好的原因。除此之外,两种提取物都含有的丁香醛有抗炎作用^[22];香草酸可抑制细胞因子的产生,用于治疗炎症^[23];七叶亭可抑制炎症相关介质合成,减轻炎症反应^[24,25];维采宁 II 可抑制细胞因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 产生^[26]。因此,黄姜花花提取物的抗炎作用可能与其中酚类和黄酮类化合物的

生物活性相关。

综上所述,黄姜花花水提物和醇提物含有较高含量的酚类和黄酮类化合物,有较好的抗氧化活性抑制能力和一定的酶抑制能力,同时表现出较好的抗炎作用。研究结果可为黄姜花的花在食品、药品、化妆品等领域的开发利用提供理论基础。

参考文献

- Huang HW. Ex situ Flora of China: Zingiberaceae (中国迁地栽培植物志:姜科) [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2021: 416.
- Tian MY, Wu XH, Lu TY, et al. Phytochemical analysis, antioxidant, antibacterial, cytotoxic, and enzyme inhibitory activities of *Hedychium flavum* rhizome [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 572659.
- Rajasekaran K, Sakhanokho HF, Tabanca N. Antifungal activities of *Hedychium* essential oils and plant extracts against mycotoxigenic fungi [J]. Crop Improv, 2012, 26: 389-396.
- Sakhanokho HF, Sampson BJ, Tabanca N, et al. Chemical composition, antifungal and insecticidal activities of *Hedychium* essential oils [J]. Molecules, 2013, 18: 4308-4327.
- Wang Y. The Coloured Atlas of Chinese Natural Medicine (中国天然药物彩色图集) [M]. Guiyang: Guizhou Publishing Group, Guiyang & Guizhou Science and Technology Publishing House, 2010: 200.
- CHMC-Chinese Herbal Medicine Company. The Chinese Traditional Medicine Resource Records (中国药材公司. 中国中药资源志要) [M]. Beijing: Science Press, 1994: 1511.
- Editorial Committee of the Chinese Academy of Sciences. Flora of China (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1981: 26-27.
- Ai TM, Dai LK. Chinese Medicinal Plants (中国药用植物志) [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2013: 381-382.
- Tian MY, Xie D, Yang Y, et al. *Hedychium flavum* flower es-

- essential oil; chemical composition, anti-inflammatory activities and related mechanisms in vitro and in vivo [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301:115846.
- 10 Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods [J]. *Am J Enol Viticult*, 1977, 28:49-55.
- 11 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- 12 Zhai DC, Wang WJ, Yin X, et al. Chemical constituents of the volatile oil from *Ormosia hosiei* leaves and its antioxidant and antimicrobial activity [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31:815-820.
- 13 Lu TY, Chen Q, Zhao XG, et al. Chemical constituents and *in vitro* pharmacological activities of essential oil from rhizome of *Alpinia galanga* (L.) Willd. [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32:1866-1875.
- 14 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65:55-63.
- 15 You X. Property of nature antioxidants-plants polyphenol and flavonoids extracts and their bioactivities on human health [J]. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2011, 30:481-488.
- 16 Jaganath IB, Crozier A. Dietary flavonoids and phenolic compounds [M]//Fraga CG. *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*, John Wiley & Sons, Inc., 2010:1-50.
- 17 Mustafa RA, Hamid AA, Mohamed S, et al. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants [J]. *J Food Sci*, 2010, 75:C28-C35.
- 18 He Y, Li Q, Zhou W, Gu Y, Jiang Y. Coniferyl aldehyde alleviates LPS-induced WI-38 cell apoptosis and inflammation injury via JAK2-STAT1 pathway in acute pneumonia [J]. *Allergol Immunopathol*, 2021, 49:72-77.
- 19 Liu TX, Li J, Jiang GJ, et al. Regulation effects of isoquercitrin on inflammatory in LPS-induced RAW264.7 cell [J]. *Her Med* (医药导报), 2017, 36:601-605.
- 20 Sul OJ, Ra SW. Quercetin prevents LPS-induced oxidative stress and inflammation by modulating NOX2/ROS/NF- κ B in lung epithelial cells [J]. *Molecules*, 2021, 26:6949.
- 21 Lee D, Park J, Choi J, et al. Anti-inflammatory effects of natural flavonoid diosmetin in IL-4 and LPS-induced macrophage activation and atopic dermatitis model [J]. *Immunopharmacol*, 2020, 89:107046.
- 22 Wu J, Fu YS, Lin K, et al. A narrative review: the pharmaceutical evolution of phenolic syringaldehyde [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153:113339.
- 23 Sharma N, Tiwari N, Vyas M, et al. An overview of therapeutic effects of vanillic acid [J]. *Plant Arch*, 2020, 20:3053-3059.
- 24 Garg SS, Gupta J, Sahu D, et al. Pharmacological and therapeutic applications of esculetin [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23:12643.
- 25 Cheng YJ, Tian XL, Zeng YZ, et al. Esculetin protects against early sepsis via attenuating inflammation by inhibiting NF- κ B and STAT1/STAT3 signaling [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19:432-441.
- 26 Li Y, Zheng Y, Wang H. Anticancer activity of vicenin-2 against 7, 12 dimethylbenz [a] anthracene-induced buccal pouch carcinoma in hamsters [J]. *J Biochem Mol Toxic*, 2021, 35:e22673.