

不同提取方式对醋乳香中主要乳香酸类成分含量及其抗炎活性的影响

宁张弛¹, 宋志前¹, 刘元艳², 王淳¹, 甘嘉荷¹, 刘春生², 马新玲¹, 舒一崧², 刘振丽^{1*}
(1. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 确定醋乳香挥发油及水提液中是否含有乳香酸类成分, 并通过比较乳香酸类成分含量和抗炎活性来确定醋乳香最佳提取方法。方法: 采用水提法、乙醇提取法及水蒸气蒸馏-乙醇连续提取法提取, 比较 6 种主要乳香酸类成分 α -乳香酸、 β -乳香酸、3-乙酰- α -乳香酸、3-乙酰- β -乳香酸、11-羧基- β -乳香酸和 11-羧基-3-乙酰- β -乳香酸的含量, 以及对脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型产生白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量, 探讨醋乳香的最佳提取方法。采用 HPLC 测定 6 种乳香酸类成分的含量, 流动相 0.1% 磷酸水溶液-乙腈梯度洗脱, 检测波长 210 nm 和 250 nm。结果: 在醋乳香挥发油中检测到 4 种乳香酸类成分, 但提取率较低(1.73% ~ 13.02%), 水提液中含有上述 6 种乳香酸类成分。相同提取条件下, 乙醇提取法的效率最高, 6 种成分的提取率 81.09% ~ 88.38%。水提法、乙醇提取法及水蒸气蒸馏-乙醇连续提取法细胞液中 TNF- α 质量浓度分别为(2.248 5 \pm 0.332 2), (1.933 2 \pm 0.422 9), (2.148 3 \pm 0.534 3) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, IL-1 β 质量浓度分别为(25.53 \pm 3.23), (23.22 \pm 3.24), (24.32 \pm 4.32) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。最佳乙醇提取工艺为加 8 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次, 每次 30 min, 各成分的提取率均 > 90%。结论: 醋乳香挥发油中含有少量乳香酸类成分, 水提液中也含有乳香酸类成分; 采用乙醇提取法时, 乳香酸类成分的提取率和抗炎活性最强。

[关键词] 醋乳香; 乳香酸; 挥发油; 水提法; 乙醇提取法; 水蒸气蒸馏法; 11-羧基-3-乙酰- β -乳香酸; 炎症因子

[中图分类号] R283.6; R945; R285.5; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0014-06

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2017220014

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1352.036.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 13:52

Effect of Different Extraction Methods on Content of Main Boswellic Acids in Vinegar-processed Olibanum and Its Anti-inflammatory Activity

NING Zhang-chi¹, SONG Zhi-qian¹, LIU Yuan-yan², WANG Chun¹, GAN Jia-he¹,
LIU Chun-sheng², MA Xin-ling¹, SHU Yi-song², LIU Zhen-li^{1*}

(1. Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To confirm the existence of boswellic acids in essential oil and water extract of vinegar-processed Olibanum, and to determine its optimum extraction method by comparing the anti-inflammatory activity and the content of main boswellic acids. **Method:** Water extraction, ethanol extraction and steam distillation-ethanol continuous extraction was adopted, contents of six boswellic acids in water extract, ethanol extract and steam distillation-ethanol continuous extract were determined by HPLC, the anti-inflammatory effect was evaluated by *in vitro* model of RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide (LPS). **Result:** Four

[收稿日期] 20170508(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目面上项目(81470177); 中央级科研院所自主选题(YZ-1656)

[第一作者] 宁张弛, 在读博士, 从事中药质量评价研究, Tel: 010-64089059, E-mail: NZC_2013@163.com

[通讯作者] * 刘振丽, 博士, 研究员, 从事中药药效物质基础与质量评价研究, Tel: 010-64089020, E-mail: zhenli_liu@sina.com

boswellic acids can be detected in essential oil with low extraction rate of 1.73% -13.02% and all of six boswellic acids can be extracted by water. In the same extraction conditions, efficiency of ethanol extraction was optimum with extraction rate of 81.09% -88.38%. Optimum ethanol extraction process was as follows: refluxing extracted twice with 8 times the amount of 95% ethanol for 30 min per time; yield of six boswellic acids were >90%. The content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was $(1.9332 \pm 0.4229) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for ethanol extraction, $(2.2485 \pm 0.3322) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for water extraction and $(2.1483 \pm 0.5343) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for steam distillation-ethanol continuous extraction; their interleukin-1 β (IL-1 β) contents were (23.22 ± 3.24) , (25.53 ± 3.23) , $(24.32 \pm 4.32) \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** The existence of boswellic acids in essential oil and water extract of vinegar-processed Olibanum is confirmed. Ethanol extraction is superior to other extraction methods with the strongest anti-inflammatory activity.

[Key words] vinegar-processed Olibanum; boswellic acids; essential oil; water extraction; ethanol extraction; steam distillation; 11-carbonyl-3-acetyl- β -boswellic acid; inflammatory factors

乳香具有活血定痛、消肿生肌的功效^[1],临床多以醋乳香入药。在 2015 年版《中国药典》收录的含有醋乳香的复方制剂中,醋乳香有的采用水提法,如瘀血痹胶囊(颗粒)、根痛平颗粒、骨伤挫伤胶囊和附桂骨痛胶囊(颗粒);也有的采用乙醇提取法,如腰痛片、舒筋活络颗粒、筋疼消酊、神香苏合丸、活血止痛膏、按摩软膏、安阳精制膏、少林风湿跌打膏、天麻头痛片及天和追风膏;还有采用水蒸气蒸馏法提取其挥发油的,如颈复康颗粒^[1]。

乳香酸组分是乳香及其炮制品中最主要的抗炎活性组分^[2-4],因此,乳香酸组分的溶出是保证该药材临床疗效发挥的关键所在。研究发现乳香挥发油具有抗菌^[5]、抗氧化^[6]及镇痛^[7]等作用,单萜类、二萜类等为挥发油中的主要活性成分^[6],尚未见乳香挥发油中有乳香酸成分的报道。而针对乳香水提液的溶出研究证实,骨架结构为五环三萜类的乳香酸组分是脂溶性成分,在水溶液中溶解性较差。但药理学研究显示乳香水提液也具有抗炎作用^[8]。因此,确定醋乳香挥发油及其水提液中是否含有乳香酸成分,探究不同提取物中乳香酸成分的提取率及抗炎作用,是解释上述疑问的关键。本实验以醋乳香中 6 种乳香酸成分的提取率和提取液的抗炎活性为指标,比较水提法、乙醇提取法及水蒸气蒸馏-乙醇连续提取法的提取效果,为醋乳香的提取方法选择提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,含 G1379A 型脱气机, G1311A 型四元泵, G1313A 型自动进样器, G1316A 型恒温箱, G1315B 型 DAD 检测器), CP225D 型电子天平(德国赛多利斯公司), CJ-840 型洁净工作台(苏州市苏信净化设备厂),

BB150 型 CO₂ 培养箱和 Multiskan Mk3 型酶标仪(美国 Thermo 公司)。

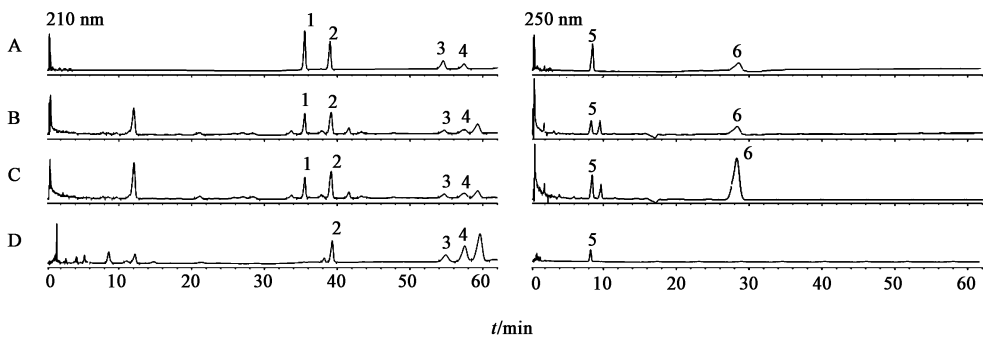
乳香购于北京同仁堂药店,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* 树皮渗出的树脂,按 2008 年版《北京市中药饮片炮制规范》自制醋乳香; α -乳香酸, β -乳香酸,3-乙酰- α -乳香酸及 3-乙酰- β -乳香酸对照品(美国 Chromadex 公司,批号分别为 00002550-T9K, 000025550-T9A, 00002565-101, 00002565-T9E, 纯度均 $\geq 99.8\%$);11-羰基- β -乳香酸和 11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111710-200601, 11710-200601, 纯度均 $\geq 99.8\%$),白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司,批号分别为 DRE20024, DRE20032),脂多糖(LPS)购自 Sigma-Aldrich 公司,双抗、胰蛋白酶、胎牛血清和 DMEM(Gibco 公司,批号 1647116, 1853657, 1624110, 752395),地塞米松(上海申广动物保健品有限公司阜阳分公司,批号 20150312),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 乳香酸成分的 HPLC 定量分析

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 50 mm, 1.8 μm),流动相 0.1% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 30 min, 60% B; 30 ~ 35 min, 60% ~ 80% B; 35 ~ 45 min, 80% B; 45 ~ 60 min, 80% ~ 85% B; 60 ~ 65 min, 85% ~ 100% B),检测波长选择了 210 nm 和 250 nm,柱温设定 30 $^{\circ}\text{C}$,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹。见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取 α -乳香酸, β -乳香酸,3-乙酰- α -乳香酸,3-乙酰- β -乳香酸,11-羰基-



A. 对照品; B. 水提液; C. 乙醇提取液; D. 挥发油; 1. α -乳香酸; 2. β -乳香酸; 3. 3-乙酰- α -乳香酸; 4. 3-乙酰- β -乳香酸; 5. 11-羰基- β -乳香酸; 6. 11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸

图 1 醋乳香不同提取液的 HPLC

Fig. 1 HPLC of different extract of vinegar-processed Olibanum

β -乳香酸和 11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度分别为 0.166, 0.230, 0.160, 0.104, 0.162, 0.160 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备^[9] 取醋乳香饮片粉末(过四号筛)0.1 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。精密吸取各提取液适量, 加甲醇定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得各供试品溶液。

2.1.4 耐用性考察 考察了不同厂家和型号的 C_{18} 色谱柱对供试品溶液中各成分含量测定的影响, 包括 Agilent ZORBAX XDB- C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), Diamonsil C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), Agilent ZORBAX SB- C_{18} (4.6 mm \times 50 mm, 5 μm) 以及 Agilent ZORBAX SB- C_{18} (4.6 mm \times 50 mm, 1.8 μm), 结果表明使用以上 4 种色谱柱所测的各成分含量基本一致, RSD 均 $< 3.0\%$, 分离度良好。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 2, 4, 8, 10, 12, 15, 20 μL , 按 2.1.1 项下色谱条件测定。以峰面积为纵坐标轴, 进样量为横坐标, 得 α -乳香酸, β -乳香酸, 3-乙酰- α -乳香酸, 3-乙酰- β -乳香酸, 11-羰基- β -乳香酸, 11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸的回归方程分别为 $Y = 558.7X - 4.03$ ($r = 0.9996$), $Y = 240.1X + 12.206$ ($r = 0.9997$), $Y = 465.43X - 8.11$ ($r = 0.9999$), $Y = 558.5X + 5.52$ ($r = 0.9997$), $Y = 1965.7X + 4.3$ ($r = 0.9998$), $Y = 1751.7X + 15.3$ ($r = 0.9998$), 线性范围分别为 0.332 ~ 3.320, 0.460 ~ 4.600, 0.320 ~ 3.200, 0.208 ~ 2.080, 0.324 ~ 3.240, 0.320 ~ 3.200 μg 。

2.1.6 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶

液, 按 2.1.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 结果 α -乳香酸, β -乳香酸, 3-乙酰- α -乳香酸, 3-乙酰- β -乳香酸, 11-羰基- β -乳香酸, 11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 1.0%, 1.3%, 1.6%, 1.7%, 1.4%。

2.1.7 重复性试验 取醋乳香粉末 6 份, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下条件测定, 结果 α -乳香酸, β -乳香酸, 3-乙酰- α -乳香酸, 3-乙酰- β -乳香酸, 11-羰基- β -乳香酸, 11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸的质量分数分别为 18.44, 47.62, 15.27, 24.51, 6.37, 42.16 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 3.0%, 1.4%, 2.2%, 1.2%, 2.9%, 1.3%。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 按 2.1.1 项下条件测定, 结果 α -乳香酸, β -乳香酸, 3-乙酰- α -乳香酸, 3-乙酰- β -乳香酸, 11-羰基- β -乳香酸, 11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸峰面积的 RSD 分别为 2.9%, 1.2%, 1.4%, 2.4%, 2.1%, 1.9%。

2.1.9 回收率试验 取醋乳香粉末约 0.05 g, 共 6 份, 精密称定, 分别精密加入 α -乳香酸, β -乳香酸, 3-乙酰- α -乳香酸, 3-乙酰- β -乳香酸, 11-羰基- β -乳香酸, 11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸混合对照品溶液适量, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下条件测定, 计算平均加样回收率分别为 100.75%, 100.37%, 103.29%, 99.44%, 100.72%, 98.83%, RSD 分别为 2.8%, 3.0%, 1.9%, 2.5%, 2.5%, 3.0%。

2.2 不同提取液中 6 种乳香酸成分的含量测定^[10]

2.2.1 水提取法 取醋乳香 10 g, 精密称定, 加 6 倍量水回流提取 2 次, 每次提取 30 min, 滤过, 合并滤液, 加水定容, 即得生药质量浓度 0.8 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水提液。

2.2.2 乙醇提取法 取醋乳香 10 g, 精密称定, 加

6 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次,每次提取 30 min,滤过,合并滤液,加 95% 乙醇定容,即得生药质量浓度 $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙醇提取液。

2.2.3 水蒸气蒸馏-乙醇连续提取法 取醋乳香 10 g,精密称定,加入 6 倍量水,采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,挥发油中加入适量无水硫酸钠脱水,计算挥发油得率,待用;水提液滤过,药渣用热水冲洗表面,洗液与滤液合并,加水定容于量瓶中,摇匀,得水提液;药渣继续加 6 倍量 95% 乙醇回流提取

30 min,滤过,滤液加 95% 乙醇定容于量瓶中,摇匀,得乙醇提取液。

2.2.4 样品测定 分别取上述各提取液适量,按 **2.1.1** 项下条件测定,计算 6 种乳香酸成分的含量,提取率 = 提取液中指标成分质量/饮片中该成分质量 $\times 100\%$,提取量 = 提取液中该成分的质量/药材质量,见表 1。结果显示醋乳香挥发油中检测到 4 种乳香酸成分,但含量很低。水提法乳香酸成分的提取率较低,乙醇提取法提取效率最高。

表 1 不同提取方法对醋乳香中乳香酸成分提取量及提取率的影响 ($n = 3$)

方法	溶液	α -乳香酸	β -乳香酸	3-乙酰- α -乳香酸	3-乙酰- β -乳香酸	11-羰基- β -乳香酸	11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸
水提	水提液	5.80(31.46)	12.81(26.90)	5.42(35.50)	7.74(31.58)	1.85(29.03)	12.36(29.32)
乙醇提取	醇提液	16.28(88.38)	41.75(87.64)	12.82(83.90)	19.95(81.43)	5.41(85.06)	34.17(81.09)
水蒸气蒸馏-乙醇	挥发油	- (-)	1.57(3.30)	1.38(9.03)	3.19(13.02)	0.11(1.73)	- (-)
连续提取	水提液	3.37(18.29)	8.00(16.79)	4.39(28.72)	6.68(27.25)	1.86(29.25)	12.30(29.30)
	醇提液	8.97(48.70)	22.76(47.77)	7.03(46.01)	9.87(40.29)	3.43(53.93)	20.18(47.89)

2.3 乙醇提取法的工艺优化 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选醋乳香的乙醇提取工艺,选择提取溶剂用量、提取时间和乙醇体积分数为考察因素,以 6 种乳香酸成分提取量的综合评分为指标。由于 6 个指标成分均为醋乳香中的有效成分,故 α -乳香酸提取量 (U), β -乳香酸提取量 (V), 3-乙酰- α -乳

香酸提取量 (W), 3-乙酰- β -乳香酸提取量 (X), 11-羰基- β -乳香酸提取量 (Y), 11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸提取量 (Z) 的权重系数均设定 $1/6$, 综合评分 = $1/6 \times (U_i/U_{\max} + V_i/V_{\max} + W_i/W_{\max} + X_i/X_{\max} + Y_i/Y_{\max} + Z_i/Z_{\max}) \times 100\%$ 。试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 醋乳香中 6 种乳香酸成分乙醇提取工艺的正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis of ethanol extraction process of six boswellic acids in vinegar-processed Olibanum

No.	A 溶剂用量/倍	B 提取时间/min	C 乙醇体积分数/%	D (空白)	α -乳香酸/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	β -乳香酸/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	3-乙酰- α -乳香酸/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	3-乙酰- β -乳香酸/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	11-羰基- β -乳香酸/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	11-羰基-3-乙酰- β -乳香酸/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	综合评分/%
1	6	30	65	1	16.28	41.75	12.82	19.95	5.41	34.17	61.16
2	6	60	80	2	24.64	63.20	19.41	30.20	8.19	51.73	92.59
3	6	90	95	3	22.87	58.65	18.01	28.03	7.60	48.01	85.93
4	8	30	80	3	23.81	61.07	18.75	29.18	7.91	49.98	89.46
5	8	60	95	1	26.45	67.83	20.83	32.41	8.79	55.52	99.37
6	8	90	60	2	19.86	50.93	15.64	24.34	6.60	41.68	74.61
7	10	30	95	2	26.62	68.26	20.96	32.62	8.85	55.87	100.00
8	10	60	65	3	21.37	54.81	16.83	26.19	7.10	44.86	80.30
9	10	90	80	1	25.31	64.91	19.93	31.02	8.41	53.12	95.09

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 $C > A > B$ 。方差分析表明因素 C 具有显著性影响,其他因素则无显著性影响。综合考虑,选择工

艺组合 $A_2B_1C_3$ 。采用单因素试验考察提取次数,结果显示提取次数对提取液中 6 种乳香酸成分含量无显著影响,故选择提取数 2 次。得醋乳香中乳香酸

表 3 综合评分的方差分析

Table 3 ANOVA of comprehensive score

方差来源	SS	MS	F	P
A	220.283	110.141	7.437	>0.05
B	85.550	42.775	2.888	>0.05
C	954.325	477.162	32.219	<0.05
D(误差)	29.620	14.810		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

成分的最佳提取工艺为加 8 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次,每次 30 min。

2.4 不同提取方法的抗炎活性比较

2.4.1 供试品溶液配制 在预试验基础上,分别取乙醇提取法、水提法及水蒸气蒸馏-乙醇连续提取方法的提取液适量,用二甲基亚砷配成生药质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

2.4.2 细胞培养 RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养,置 5% CO_2 , 37 °C 饱和湿度的细胞培养箱中培养。待细胞生长到对数生长期时进行传代,2~3 d 传代 1 次。取至少 3 代后的细胞用于实验。

2.4.3 提取物对 RAW264.7 细胞生长的影响 取对数生长期的 RAW264.7 细胞,以胰酶消化约 2 min,弃去胰蛋白酶,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中和胰蛋白酶作用,轻轻吹打成单细胞悬液,离心($1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min,下同),弃去上清液,用完全培养基重悬细胞并计数,调整细胞悬液密度至 5×10^4 个/mL,按每孔 200 μL 接种至 96 孔培养板,置于 5% CO_2 , 37 °C 饱和湿度的细胞培养箱中培养 24 h,吸尽每孔上清液,每孔加入无血清 DMEM 培养基 100 μL ,随机分为空白组, $0.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松组(阳性组),磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4,下同)阴性组及不同生药质量浓度(5, 10, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的醋乳香不同提取液组,于 37 °C, 5% CO_2 培养箱中孵育 2 h,以 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 刺激细胞 24 h。采用 CCK-8 试剂盒检测。每个样本均设 3 个复孔。结果醋乳香提取液的生药质量浓度 $\geq 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时会对细胞的活力造成显著影响,故确定醋乳香不同提取液的生药质量浓度选择 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $0.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松组未对细胞活力造成影响。

2.4.4 炎症因子检测 取对数生长期的 RAW264.7 细胞,经胰酶消化后,弃去胰蛋白酶,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中和胰蛋白酶作

用,离心单细胞悬液,弃上清液,按 2.4.3 项下方法处理,组别分别设定为空白组(PBS),模型组($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS),地塞米松组($0.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)及醋乳香不同提取液组。细胞处理完后,收集上清液,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的含量。每个样本均设 3 个复孔,见表 4。

表 4 不同提取方法对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生 TNF- α 和 IL-1 β 的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of different extraction method on production of TNF- α and IL-1 β in RAW264.7 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF- α / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	0.007 3 \pm 0.001 3	22.23 \pm 3.67
模型	3.372 2 \pm 0.234 9 ²⁾	48.35 \pm 4.93 ¹⁾
地塞米松	0.436 3 \pm 0.088 3 ⁴⁾	20.78 \pm 2.75 ⁴⁾
乙醇提取液	1.933 2 \pm 0.422 9 ³⁾	23.22 \pm 3.24 ³⁾
水提液	2.248 5 \pm 0.332 2 ³⁾	25.53 \pm 3.23 ³⁾
水蒸气蒸馏-乙醇连续提取液	2.148 3 \pm 0.534 3 ³⁾	24.32 \pm 4.32 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

本研究结果显示乳香挥发油中含有乳酸类成分。以往研究显示乳香挥发油具有一定的药理活性^[6],其主要由单萜类、二萜类、烯类和酯类成分组成^[11-13],但尚无乳香挥发油中乳酸类成分的报道。这可能是因为一般挥发油采用气相色谱法或气质联用技术分析成分组成和含量,而乳酸类自身难挥发,需经过衍生化处理后才能气化,进而被上述 2 种仪器检测到。本文采用了 HPLC,该技术可以灵敏地检测到乳香挥发油中的乳酸成分。本实验从醋乳香挥发油中检测到 4 种乳酸类成分,分别为 β -乳酸,3-乙酰- α -乳酸,3-乙酰- β -乳酸和 11-羰基- β -乳酸,但提取率均较低(1.73% ~ 13.02%)。已有 TLC 定性鉴别结果显示,乳香水煎液中含有脂溶性成分^[14],而本实验进一步对醋乳香水提液进行了定量分析。

通过比较不同提取方法对醋乳香中 6 种主要乳酸类成分含量的影响,发现乙醇提取法的效率最高。在 2015 年版《中国药典》记载的含有醋乳香的成方制剂中,采用乙醇提取法提取的制剂比例远高于水提法^[1],这在一定程度上印证了乙醇提取法的优势。本文证实了抗炎有效组分——乳酸类成分存在于醋乳香挥发油和水提液中,确定乙醇提取

为乳香酸类成分的最佳提取方式,这可为醋乳香的相关制剂研究提供参考。

有研究发现醋乳香乙醇提取液与醋乳香挥发油具有抗炎镇痛活性差异^[7]。水蒸气蒸馏-乙醇连续提取法兼顾了挥发油中活性物质,也发挥了乙醇提取的优势。为了进一步确定最佳提取方法,本文采用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF- α 及 IL-1 β , 对不同提取方法的抗炎活性进行比较。结果发现与模型组比较,3 种提取方法所得提取物对 TNF- α 和 IL-1 β 的活性均有显著性差异,且乙醇提取法的抗炎作用最强,但与其他 2 种提取方法比较无显著性差异。该结果与文献报道的乳香酸类成分体外抗炎评价结论一致^[15-16],不同乳香酸单体及提取物在人外周血单核细胞及小鼠巨噬细胞炎症模型中,抗炎活性随着用量的增加呈增强趋势,但是各给药组间无显著差异。原因可能是由于乳香酸的溶解性所限制,虽然乳香醇提物中乳香酸含量最高,但由于溶解性问题,用于抗炎活性研究的浓度较低,使其无法完全突显乳香酸类成分含量大的绝对优势。相关报道显示,乳香酸类成分的脂溶性较强,其水溶解性差,采用二甲基亚砷溶解用于细胞模型实验时,只有主要乳香酸类成分 11-羧基- β -乳香酸及 3-乙酰- β -乳香酸的浓度 $< 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,才能保证二者的充分溶解,上述特点也正是开展乳香酸类成分及乳香提取物抗炎活性研究的难点所在^[17-18]。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:223-1663.

[2] Kokkiripati P K, Bhakshu L M, Marri S, et al. Gum resin of *Boswellia serrata* inhibited human monocytic (THP-1) cell activation and platelet aggregation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1):893-901.

[3] Saraswati S, Pandey M, Mathur R, et al. Boswellic acid inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model [J]. *Microvasc Res*, 2011, 82(3):263-268.

[4] Cuaz-Pérolin C, Billiet L, Baugé E, et al. Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF- κ B inhibitor acetyl-11-keto- β -boswellic acid in LPS-challenged ApoE $^{-/-}$ mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 28(2):272-277.

[5] Sadhasivam S, Palanivel S, Ghosh S. Synergistic antimicrobial activity of *Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr. (Burseraceae) essential oil with various azoles against pathogens associated with skin, scalp and nail infections [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2016, 63(6):

495-501.

[6] Mothana R A A, Hasson S S, Schultze W, et al. Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic Soqatraen *Boswellia* species [J]. *Food Chem*, 2011, 126(3):1149-1154.

[7] 郑杭生,冯年平,陈佳,等. 乳香没药的提取工艺及其提取物的镇痛作用 [J]. *中成药*, 2004, 26(11):956-958.

[8] 冯兰香,顾奋翔. 几种单、复方乳香水煎提取物抗炎镇痛作用的比较性研究 [J]. *医学研究与教育*, 2011, 28(4):53-55.

[9] 王淳,夏磊,宋志前,等. 乳香中 5 种乳香酸成分含量分析 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(10):1330-1333.

[10] 夏磊. 乳香质量标准研究 [D]. 天津:天津中医药大学,2012.

[11] 王勇,潘国梁,陈彦,等. 4 种方法提取乳香化学成分及其 GC-MS 研究 [J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(14):1054-1056.

[12] 赵金凤,周春兰,周凤琴,等. 乳香挥发性成分 GC-MS 分析 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(8):1050-1053.

[13] 张振凌,郑玉丽. HPLC 比较乳香炮制前后 11-羧基- β -乙酰乳香酸含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(14):51-53.

[14] 秦华珍,洗寒梅,甄汉深,等. 乳香没药水煎剂的薄层层析研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2003, 21(2):236-237.

[15] Gayathri B, Manjula N, Vinaykumar K S, et al. Pure compound from *Boswellia serrata* extract exhibits anti-inflammatory property in human PBMCs and mouse macrophages through inhibition of TNF α , IL-1 β , NO and MAP kinases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(4):473-482.

[16] Dey D, Chaskar S, Athavale N, et al. Inhibition of LPS-Induced TNF- α and NO production in mouse macrophage and inflammatory response in rat animal models by a novel ayurvedic formulation, BV-9238 [J]. *Phyther Res*, 2014, 28(10):1479-1485.

[17] PAN Y N, LIANG X X, NIU L Y, et al. Comparative studies of pharmacokinetics and anticoagulatory effect in rats after oral administration of Frankincense and its processed products [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 172:118-123.

[18] DU Z, LIU Z, NING Z, et al. Prospects of boswellic acids as potential pharmaceuticals [J]. *Planta Med*, 2015, 81(4):259-271.

[责任编辑 刘德文]