

• 药剂与工艺 •

乳香醋炙前后 13 种乳香酸成分含量变化及活性比较研究

董运茁¹, 张 弋¹, 刘振丽², 王 淳², 彭诗涛², 万晓莹², 宋志前^{2*}, 宁张弛^{2*}

1. 天津市第一中心医院 药学部, 天津 300192

2. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700

摘要: 目的 通过对比乳香醋炙前后 11-羧基- β -乳香酸 (11-keto-boswellic, KBA)、3-乙酰-11-羧基- β -乳香酸 (3-acetyl-11-keto-boswellic acid, AKBA)、榄香醇酸、 β -榄香酮酸、tsugaric acid A、9,11-去氢- α -乳香酸、9,11-去氢- β -乳香酸、 α -乳香酸、 β -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸、3-乙酰- α -乳香酸 (3-acetyl- α -boswellic acid, α -ABA) 和 3-乙酰- β -乳香酸 (3-acetyl- β -boswellic acid, β -ABA) 13 个乳香酸成分含量变化, 探究不同炮制条件对含量变化的影响, 考察差异乳香酸成分抗炎活性, 初步揭示乳香醋炙增效机制。方法 制备不同炮制温度和炮制时间醋乳香, 基于超高效液相色谱仪串联三重四级杆质谱仪 (UPLC-TQ-MS) 建立 13 种乳香酸成分含量测定方法。采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), 以 0.1% 甲酸+5 mmol/L 乙酸铵水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 质谱采用电喷雾负离子源, 多反应监测 (multi-reaction monitoring, MRM) 模式; 建立脂多糖诱导巨噬细胞的炎症细胞模型, 通过 ELISA 法测定乳香、醋乳香、单体 (3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸) 和乳香+单体 (3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸) 对炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 以及 IL-6 的影响。结果 随醋炙温度升高或炮制时间的延长, 乳香中榄香醇酸、 β -榄香酮酸、tsugaric acid A、9,11-去氢- α -乳香酸、9,11-去氢- β -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸、 α -ABA 和 β -ABA 9 个乳香酸含量升高幅度增大, 而 KBA、AKBA、 α -乳香酸、 β -乳香酸 4 个成分含量降低幅度增大, 其中 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸含量变化幅度最大。炮制温度引起的成分变化强于炮制时间的影响。乳香酸类成分含量升高或降低与成分结构有关; 乳香醋炙后抑制炎症因子分泌的作用显著增强, 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸显示出明显的抑制炎症因子分泌活性。结论 温度是影响乳香中乳香酸成分变化的重要因素, 含量升高或降低与结构有关。3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸含量变化最大, 该成分具有显著的抗炎活性, 可能为乳香醋炙增效的物质基础之一。

关键词: 乳香; 醋炙; 乳香酸; 抗炎; UPLC-TQ-MS; ELISA 法; 11-羧基- β -乳香酸; 3-乙酰-11-羧基- β -乳香酸; 榄香醇酸; β -榄香酮酸; tsugaric acid A; 9,11-去氢- α -乳香酸; 9,11-去氢- β -乳香酸; α -乳香酸; β -乳香酸; 3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸; 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸; 3-乙酰- α -乳香酸; 3-乙酰- β -乳香酸

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)23-7128-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.23.007

Comparative study on changes and activity of 13 boswellic acids in *Olibanum* before and after vinegar-processedDONG Yun-zhuo¹, ZHANG Yi¹, LIU Zhen-li², WANG Chun², PENG Shi-tao², WAN Xiao-ying², SONG Zhi-qian², NING Zhang-chi²

1. Department of Pharmacy, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

2. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

收稿日期: 2021-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81873009); 国家自然科学基金项目 (82003950); 中国中医科学院中医基础理论研究所中央级科研院所自主选题 (YZ-202023); 天津市第一中心医院科技基金项目 (院 2020CF13); 中国中医科学院优秀青年科技人才 (创新类) 基金 (ZZ14-YQ-035); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04201)

作者简介: 董运茁 (1992—), 女, 硕士, 药师, 研究方向为中药炮制理论研究。Tel: 13022211026 E-mail: dongyunzhuo@126.com

***通信作者:** 宁张弛, 女, 博士, 助理研究员, 主要从事中药药效物质基础与质量评价研究。

Tel: (010)64089020 E-mail: yizhangyichi1573@sina.com

宋志前, 男, 副主任技师, 主要从事中药药效物质基础和炮制原理研究。

Abstract: Objective To establish a UPLC-TQ-MS method for the simultaneous determination of 13 boswellic acids included 11-keto-boswellic (KBA), 3-acetyl-11-keto-boswellic acid (AKBA), elemolic acid, β -elemonic acid, tsugaric acid A, 9,11-dehydro- α -boswellic acid, 9,11-dehydro- β -boswellic acid, α -boswellic acid, β -boswellic acid, 3-acetyl-9,11-dehydro- α -boswellic acid, 3-acetyl-9,11-dehydro- β -boswellic acid, 3-acetyl- α -boswellic acid (α -ABA) and 3-acetyl- β -boswellic acid (β -ABA) in raw *Olibanum* and vinegar-processed *Olibanum*, compare the effect of different temperatures and times on the content of 13 index components and reveal the anti-inflammation activity of differential boswellic acids. **Methods** The *Olibanum* were processed at different temperatures and times. The ultra-performance liquid chromatograph-tandem triple-quadrupole mass spectrometer (UPLC-TQ-MS) method was established for the simultaneous determination of 13 boswellic acids. Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m) was eluted with the mobile phase of water (containing 0.1% formic acid and 5 mmol/L ammonium acetate) and acetonitrile (containing 0.1% formic acid) with gradient elution. The flow rate was 0.3 mL/min. The column temperature was maintained at 40 $^{\circ}$ C. The negative ion mode was chosen. Multiple reaction monitoring (MRM) was employed for quantification; The cells model was induced by lipopolysaccharide, the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) after the treatment of *Olibanum*, vinegar-processed *Olibanum*, 3-acetyl-9,11-dehydro- β -boswellic acid and *Olibanum* + compound (3-acetyl-9,11-dehydro- β -boswellic acid) were determined by ELISA method. **Results** With the increase of temperature and time, the content of nine compounds in vinegar-processed frankincense, including elemolic acid, β -elemonic acid, tsugaric acid A, 9,11-dehydro- α -boswellic acid, 9,11-dehydro- β -boswellic acid, 3-acetyl-9,11-dehydro- α -boswellic acid, 3-acetyl-9, 11-dehydro- β -boswellic acid, α -ABA and β -ABA were increased. While the content of four compounds, including KBA, AKBA, α -boswellic acid and β -boswellic acid was decreased. And the change of 3-acetyl-9,11-dehydro- β -boswellic acid was most notable. Comparing with the duration of the processing, the temperature contributes more to the changes of contents which are related to the structure of the ingredients. The anti-inflammatory activity of *Olibanum* was significantly enhanced after vinegar-processing, and 3-acetyl-9,11-dehydro- β -boswellic acid plays an important role in the inhibition of the cytokine. **Conclusion** The changes of boswellic acids in *Olibanum* were mostly influenced by temperature, which is related to the chemical structure. 3-acetyl-9,11-dehydro- β -boswellic acid shows notable anti-inflammatory activity with the most change of content during processing. These results may become the material bases for the synergistic effect of *Olibanum* processing.

Key words: *Olibanum*; roasted with vinegar; olibanic acid; anti-inflammatory; UPLC-TQ-MS; ELISA method; 11-keto-boswellic; 3-acetyl-11-keto-boswellic acid, elemolic acid; β -elemonic acid; tsugaric acid A; 9,11-dehydro- α -boswellic acid; 9,11-dehydro- β -boswellic acid; α -boswellic acid; β -boswellic acid; 3-acetyl-9,11-dehydro- α -boswellic acid; 3-acetyl-9,11-dehydro- β -boswellic acid; 3-acetyl- α -boswellic acid; 3-acetyl- β -boswellic acid

乳香是橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw.及同属植物 *B. bhaw-dajiana* Birdw.树皮渗出的树脂,为常用中药,具有活血行气化瘀、消肿止痛的功效^[1]。据记载,其炮制方法在唐代有研法(《经效产宝》),宋代有炒制(《证类本草》),醋炙(《太平惠民和剂局方》)等。现在药典收载的乳香炮制方法为醋炙。传统中药炮制理论认为,乳香经过醋炙后可以增强其活血行气止痛的功效,降低刺激性^[2]。虽然几千年前古人就注意到了炮制的宏观效应,且在漫长的实践过程中形成了系统的传统炮制理论。但是,当前乳香醋炙的炮制规范尚无量化标准,多地区炮制规范中仅有“炒至表面光亮”的形态描述,对炮制火候的要求并不统一,比如山西、重庆等地区炮制规范中对炮制火候并未要求,北京、天津、内蒙等地区炮制规范中为采用“文火”炮制,广西炮制规范中规定采用“中火”炮制^[3-6],炮制工艺“各地各法”情况普遍存在,造成性状上北方醋乳香呈

现黄色或棕黄色,南方则为棕褐色或黑褐色的显著差异^[7]。如何采用现代科学技术方法,表征乳香醋炙引起的化学成分变化,对于从更深层次阐明乳香醋炙机制、规范乳香醋炙工艺、完善乳香质量标准具有重要的意义。

乳香酸类成分是乳香中最具代表性的成分,具有较强的药理活性^[8-9],如 3-乙酰-11-羰基- β -乳香酸(AKBA)可通过对核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的抑制作用,减缓慢性炎症的发展,进而减弱其介导的白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白介素-8 (interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等细胞因子的生成,减弱疼痛传入神经系统的刺激,起到镇痛作用^[10]。以往炮制对乳香化学成分的影响研究,主要集中于 5 个乳香酸类成分,即 11-羰基- β -乳香酸(KBA)、 α -乳香酸、 β -乳香酸、3-乙酰 α -乳香酸(α -

ABA) 和 3-乙酰 β -乳香酸 (β -ABA) 的变化^[11-12], 但是其中不乏存在矛盾的研究结果。研究显示, 乳香醋炙后 KBA 含量有升高^[11], 也有降低的报道^[12]。如何厘清这些研究差异, 揭示炮制前后差异成分对其活性的影响, 仍需要进一步的深入研究。

本课题组前期经过化学分离、液质和液核联用分析等方法, 确定乳香中存在多种乳香酸类成分, 并分离纯化了醋乳香中具有 π - π 共轭特征结构的 9,11-去氢类乳香酸成分^[13], 确定其为乳香和醋乳香的主要差异成分之一, 但其活性如何没有研究报道。中药为多成分整体作用^[14]。因此, 本研究在前期工作基础上, 通过 UPLC-TQ-MS 技术对乳香和不同炮制条件制得的醋乳香中的 13 种化学成分进行含量测定, 并通过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导建立的炎症细胞模型对比乳香醋炙前后抗炎活性, 同时评价醋炙前后主要差异成分对炮制增效的影响, 以期对乳香醋炙增效机制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

AI-F211AE 型电磁炉, 浙江爱仕达电器股份有限公司; FW80 微型高速万能试样粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; Waters Xevo TQ-s micro 质谱仪、Waters Binary Solvent Manager、Waters Sample Manager-FTN, 沃特世公司; CP225D 型电子天平, 德国赛多利斯公司; LWFS31310T 实验室水纯化系统, 颇尔富迪生物分析仪器(上海)有限公司; AC-120H 型超声波, 德国 MRC 公司。MCO-20AIC 型二氧化碳培养箱, 日本 Sanyo 公司; Laboratory Centrifuges 3K15 型高速冷冻离心机, Sigma 公司; Multiskan MK3 型酶标仪, 美国热电集团; HVE-50 型高压锅, 日本 Hirayama 公司。

1.2 试剂与材料

乳香购自北京仟草中药饮片有限公司, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定, 上述乳香为橄榄科植物乳香树 *B. carterii* Birdw. 树皮渗出的树脂。进一步分析显示符合《中国药典》2020 年版规定。龙门米醋, 3 年陈酿, 批号 20130623, 北京六必居食品有限公司; 甲醇 (批号 20160504)、甲酸 (批号 20150421), 北京化工厂; KBA、AKBA 对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号分别为 111710-200601、11710-200601; α -乳香酸、 β -乳香酸、 α -ABA 及 β -ABA 对照品, 美国 Chromadex 公司, 批号分别为 00002550-T9K、00002550T9A、00002565-101、

00002565-T9E; 榄香醇酸对照品, 法国 Extrasynthese 公司, 批号 P260-P262; β -榄香酮酸对照品, 成都德思特生物科技有限公司, 批号 JOT-11233; 9,11-去氢- α -乳香酸、9,11-去氢- β -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸、tsugaric acid A 为实验室自制; 各对照品质量分数均 $\geq 98\%$, 可用于含量测定。

色谱纯乙腈和甲醇为美国 Fisher 公司产品; 水为超纯水。人单核细胞白血病细胞系 U937 细胞株购自武汉大学中国典型培养物保藏中心; 0.22 μ m 滤膜, 批号 12850160, Pall 公司; 聚山梨酯 80 (批号 20140925)、无水乙醇 (批号 20260504), 北京化工厂; CCK-8 检测试剂盒, 批号 CK04, 日本 DOJINDO 公司; TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒, 批号 20170823、20170823、20170823, 北京四正柏公司; 磷酸盐缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS), 批号 20170620, 上海索莱宝生物科技有限公司; 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA), Sigma 公司, 批号 SLBS0478V; 1640 培养基, 批号 1854890, Gibco 公司; LPS, 批号 L4391, Sigma 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 1478702)、青霉素和链霉素 (penicillin-streptomycin, PS, 批号 15140-122)、0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶 (批号 25200-056), 均为 Gibco 公司产品。

2 方法与结果

2.1 不同炮制温度和炮制时间醋乳香的制备

根据炮制规范中规定^[4], 文火是指 80~120 $^{\circ}$ C, 中火是指 120~150 $^{\circ}$ C。在前期研究结果^[7]和预实验基础上, 采用 2 种炮制温度 100 $^{\circ}$ C 文火 (W) 和 130 $^{\circ}$ C 中火 (Z) 炮制。即取乳香 200 g, 分别采用文火 (设定电磁炉温度 100 $^{\circ}$ C) 和中火 (设定电磁炉温度 130 $^{\circ}$ C), 待锅底温度达到设定温度后投入乳香, 不断翻炒, 按照 10:1 的比例在出锅前 1 min 喷入米醋, 分别炒制 5、7、9、11 min, 摊开晾凉, 得到不同炮制温度 and 不同炮制时间的醋乳香, 样品编号分别为 W-5、W-7、W-9、W-11, Z-5、Z-7、Z-9、Z-11 (W 代表文火, Z 代表中火, 数字代表炮制时间)。为了突出炮制温度的作用, 研究增加文火炒制 20、30 min 样品, 样品编号分别为 W-20、W-30。同一条件样品平行制作 3 份。

2.2 乳香炮制前后成分含量变化研究

2.2.1 对照品溶液制备 分别取 KBA、AKBA、榄香醇酸、 β -榄香酮酸、tsugaric acid A、9,11-去氢- α -

乳香酸、9,11-去氢- β -乳香酸、 α -乳香酸、 β -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸、 α -ABA、 β -ABA 适量，精密称定，加入甲醇分别制成约 1 mg/mL 的溶液，作为对照品储备液。分别精密吸取上述 13 个对照品储备液适量，混合，加入甲醇制成上述各成分质量浓度分别为 78.28、59.28、45.08、79.56、73.40、90.42、139.08、78.42、71.28、125.46、85.68、69.22、78.54 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取乳香和各醋乳香适量，粉碎，过 100 目筛。取约 0.1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 10 mL 甲醇，称定质量，超声处理（功率 250 W、频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，0.22 μ m 滤膜滤过，取续滤液，即得各供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（100 mm $\times$ 2.1 mm，1.7 μ m）；流动相 A 为 0.1% 甲酸+5 mmol/L 乙酸铵水溶液，流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液，梯度洗脱程序：0~5 min，88%~99% B；5~5.01 min，99%~88% B；5.01~10 min，88% B。弱洗溶剂为水-乙腈（95：5），强洗溶剂为异丙醇。体积流量 0.3 mL/min；柱温 40 $^{\circ}$ C，自动进样器温度 10 $^{\circ}$ C。进样量 2~10 μ L。

2.2.4 质谱条件 质谱采用 ESI 源，毛细管电压为 3.5 kV，离子源温度为 150 $^{\circ}$ C，去溶剂温度为 550 $^{\circ}$ C，去溶剂气体 1000 L/h，碰撞气体体积流量 0.25 mL/h。采用多反应监测模式（multiple reaction monitoring, MRM）进行扫描。主要质谱检测参数见表 1，混合对照品及乳香供试品提取离子流色谱图（extraction ion chromatogram, EIC）见图 1。

表 1 13 个乳香酸成分主要质谱检测参数

Table 1 Information for MRM parameters of 13 boswellic acids

编号	化合物	相对分子质量	MRM 转换	椎孔电压/V	碰撞电压/eV	离子模式	保留时间/min
1	KBA	470.68	469.63 $\rightarrow$ 407.64	20	25	ESI ⁻	2.05
2	AKBA	512.75	511.23 $\rightarrow$ 59.06	10	20	ESI ⁻	2.64
3	榄香醇酸	454.70	455.35 $\rightarrow$ 355.83	30	40	ESI ⁻	3.12
4	β -榄香酮酸	456.71	453.61 $\rightarrow$ 339.29	10	30	ESI ⁻	3.21
5	tsugaric acid A	498.75	497.45 $\rightarrow$ 437.51	10	40	ESI ⁻	3.78
6	9,11-去氢- α -乳香酸	454.70	453.49 $\rightarrow$ 397.49	3	30	ESI ⁻	3.70
7	9,11-去氢- β -乳香酸	454.70	453.49 $\rightarrow$ 397.49	3	30	ESI ⁻	3.94
8	α -乳香酸	456.71	455.71 $\rightarrow$ 409.95	30	30	ESI ⁻	4.10
9	β -乳香酸	456.71	455.71 $\rightarrow$ 409.95	30	30	ESI ⁻	4.25
10	3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸	496.73	495.58 $\rightarrow$ 58.93	3	12	ESI ⁻	4.93
11	3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸	496.73	495.58 $\rightarrow$ 58.93	3	12	ESI ⁻	5.18
12	α -ABA	498.75	497.25 $\rightarrow$ 59.25	10	20	ESI ⁻	5.26
13	β -ABA	498.75	497.25 $\rightarrow$ 59.25	10	20	ESI ⁻	5.52

2.2.5 线性关系考察 取混合对照品溶液，用甲醇分别稀释 2、5、10、20、50、100、200 倍，得到不同质量浓度的对照品稀释液。将混合对照品溶液与各稀释液依次进样分析。以峰面积为纵坐标（Y），以对照品质量浓度为横坐标（X），绘制标准曲线，计算回归方程，结果见表 2。

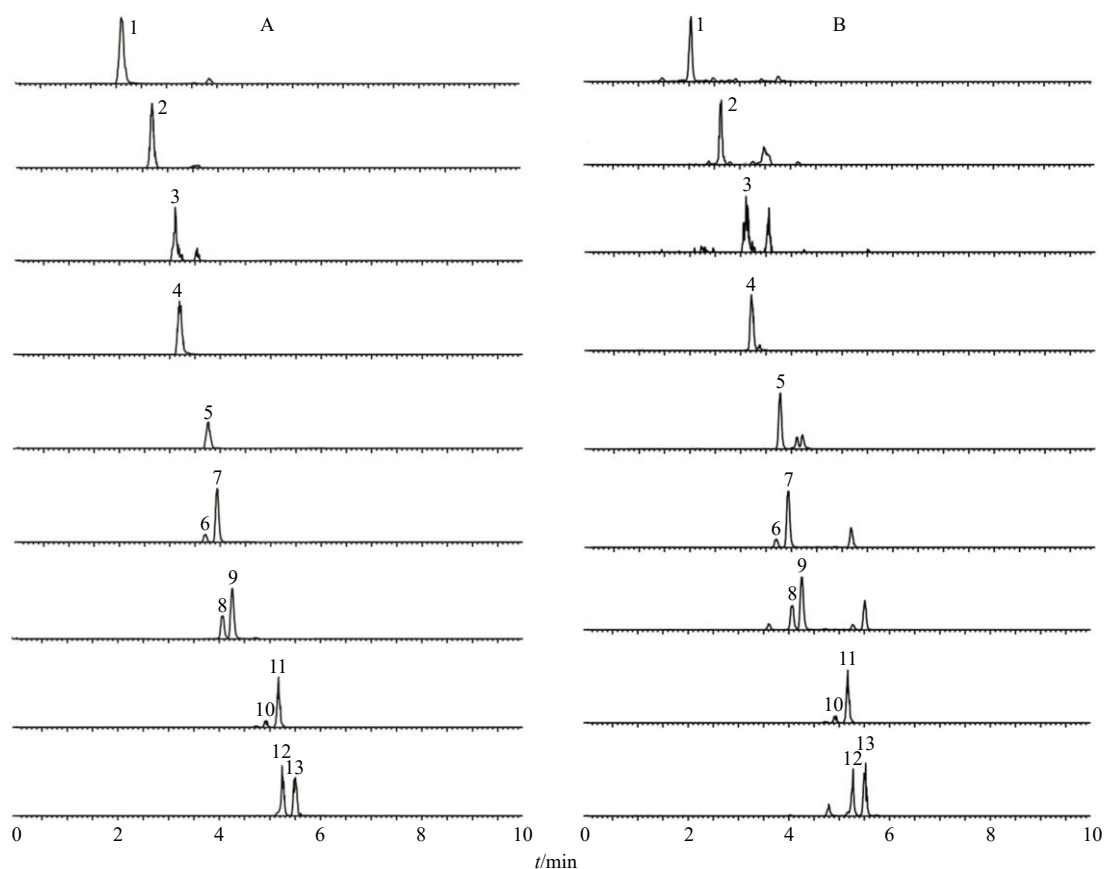
2.2.6 精密度试验 取混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录各化合物色谱峰。结果见表 3，各主要色谱峰峰面积的 RSD 均小于 6.0%，表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 按“2.2.3”项下方法，平行制

备 6 份乳香供试品溶液，依次进样测定，记录样品中各待测物色谱峰峰面积，计算质量分数。结果见表 3，各成分质量分数的 RSD 均小于 6.0%，表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样测定，记录各成分色谱峰。结果见表 3，各成分峰面积的 RSD 均小于 6.0%，表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 取“2.1”项下醋乳香 6 份，精密加入与醋乳香中各待测成分等量的对照品，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定并计算



A-混合对照品的 EIC 色谱图 B-醋乳香供试品 EIC 色谱图 1-KBA 2-AKBA 3-榄香醇酸 4-β-榄香酮酸 5-tsugaric acid A 6-9,11-去氢-α-乳香酸 7-9,11-去氢-β-乳香酸 8-α-乳香酸 9-β-乳香酸 10-3-乙酰-9,11-去氢-α-乳香酸 11-3-乙酰-9,11-去氢-β-乳香酸 12-α-ABA 13-β-ABA
A-EIC chromatograms of standard B-EIC chromatograms of sample of raw *Olibanum* 1-KBA 2-AKBA 3-elmolic acid 4-β-elmolic acid 5-tsugaric acid A 6-9,11-dehydro-α-boswellic acid 7-9,11-dehydro-β-boswellic acid 8-α-boswellic acid 9-β-boswellic acid 10-acetyl-9,11-dehydro-α-boswellic acid 11-3-acetyl-9,11-dehydro-β-boswellic acid 12-α-ABA 13-β-ABA

图 1 混合对照品溶液和乳香供试品溶液的 EIC 色谱图

Fig. 1 Typical EIC chromatograms for standard and sample of raw *Olibanum*

表 2 13 个乳香酸成分的回归方程及线性范围

Table 2 Regression equation and linear range of 13 boswellic acids

编号	化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	KBA	$Y=683.37 X+4026$	0.996 1	0.391 4~78.28	0.125
2	AKBA	$Y=238.46 X+338.51$	0.997 8	0.296 4~59.28	0.174
3	榄香醇酸	$Y=12.286 X+58.941$	0.996 7	0.225 4~45.08	0.089 2
4	β-榄香酮酸	$Y=109.71 X+327.14$	0.995 0	0.397 8~79.56	0.241
5	tsugaric acid A	$Y=772.68 X+7458$	0.996 9	0.367 0~73.40	0.097 8
6	9,11-去氢-α-乳香酸	$Y=301.72 X-78.616$	0.997 8	0.452 1~90.42	0.426
7	9,11-去氢-β-乳香酸	$Y=308.75 X-41.78$	0.998 2	0.695 4~139.08	0.078 5
8	α-乳香酸	$Y=253.1 X-21.289$	0.996 2	0.392 1~78.42	0.314
9	β-乳香酸	$Y=307.25 X-20.514$	0.996 6	0.356 4~71.28	0.169
10	3-乙酰-9,11-去氢-α-乳香酸	$Y=76.662 X+7.366 7$	0.996 2	0.627 3~125.46	0.543
11	3-乙酰-9,11-去氢-β-乳香酸	$Y=78.234 X-3.008 4$	0.994 6	0.428 4~85.68	0.288
12	α-ABA	$Y=1 117.6 X-236.07$	0.994 1	0.346 1~69.22	0.078 6
13	β-ABA	$Y=1 016.2 X-30.84$	0.998 1	0.392 7~78.54	0.129

表 3 13 个乳香酸成分的精密性、重复性、稳定性及回收率试验结果 ($n = 6$)

Table 3 Results of precision, repeatability, stability and recovery tests of 13 boswellic acids ($n = 6$)

编号	化合物	RSD/%			回收率	
		精密性	重复性	稳定性	均值/%	RSD/%
1	KBA	2.71	3.54	4.11	93.54	3.67
2	AKBA	1.34	1.29	1.25	90.38	4.18
3	榄香醇酸	2.65	2.85	1.68	94.44	2.59
4	β -榄香酮酸	1.72	2.96	1.58	92.59	3.36
5	tsugaric acid A	2.76	3.40	3.92	92.90	4.01
6	9,11-去氢- α -乳香酸	1.89	2.76	2.49	93.08	3.69
7	9,11-去氢- β -乳香酸	1.39	2.24	2.59	90.72	2.04
8	α -乳香酸	2.68	1.32	2.47	104.62	3.36
9	β -乳香酸	2.41	4.10	2.16	108.90	2.55
10	3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸	2.64	1.73	3.62	94.58	4.26
11	3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸	1.98	1.19	3.16	91.97	4.58
12	α -ABA	2.47	1.25	2.14	90.37	1.81
13	β -ABA	1.74	3.53	2.88	106.13	2.91

各待测成分的回收率。结果见表 3, 各成分的平均加样回收率为 90.38%~108.9%, RSD 为 1.81%~4.58%。

2.2.10 含量测定 分别取“2.1”项下不同炮制条件制得的醋乳香, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶

液, 测定 13 种成分含量, 结果见表 4。结果显示, 相同炮制时间, 随着炮制温度的升高, 榄香醇酸、 β -榄香酮酸、tsugaric acid A、9,11-去氢- α -乳香酸、9,11-去氢- β -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸、 α -ABA、 β -ABA 在醋炙之后含量升高, 而 KBA、AKBA、 α -乳香酸、 β -乳香酸在醋炙后含量呈降低趋势; 同一炮制温度下, 随着炮制时间的延长, 榄香醇酸、 β -榄香酮酸、tsugaric acid A、9,11-去氢- α -乳香酸、9,11-去氢- β -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸、 α -ABA、 β -ABA 在醋炙之后含量升高, KBA、AKBA、 α -乳香酸、 β -乳香酸在醋炙后含量呈降低趋势。中火炮制比文火炮制含量变化趋势明显, 受温度和时间影响最大的成分是 9,11-去氢结构类乳香酸。中火炮制了 11 min 后, 醋乳香中 α 型 9,11-去氢结构乳香酸升高了 4~5 倍, β 型 9,11-去氢结构乳香酸升高了 8 倍。

2.2.11 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件。2 组间比较用多元线性回归分析法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。多元线性回归分析结果 (表 5) 表明, 以各乳香酸成分含量为因变量, 炮制温度、炮制时间均与其独立相关。炮制时间和炮制温度的偏回归系数 (β) 的 P 值均 < 0.05 , 有统计学意义, 即炮制时间和炮制温度和对各成分含量之间存在线性关系。榄香醇酸、 β -榄香酮酸、tsugaric acid A、9,11-去氢- α -乳香酸、9,11-去氢- β -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸、 α -

表 4 不同炮制温度和时间醋乳香中各乳香酸成分含量及与生品比较变化率 ($n = 3$)

Table 4 Contents and rate compared with raw *Olibanum* of 13 boswellic acids in raw *Olibanum* and vinegar-processed *Olibanum* under different temperature and time ($n = 3$)

样品	KBA		AKBA		榄香醇酸		β -榄香酮酸		tsugaric acid A	
	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%
乳香	4.902 2	—	42.794 8	—	0.928 1	—	1.428 9	—	0.234 9	—
W-5	4.604 9	-6.06	41.464 7	-3.11	1.262 1	35.99	1.940 9	35.83	0.892 1	279.73
W-7	4.498 4	-8.24	40.481 9	-5.40	1.558 2	67.89	2.166 8	51.64	1.325 3	464.13
W-9	4.485 2	-8.51	40.182 4	-6.10	1.842 2	98.49	2.355 8	64.87	1.298 2	452.59
W-11	4.324 1	-11.79	39.711 7	-7.20	1.917 2	106.57	2.483 9	73.83	1.501 3	539.04
W-20	4.219 3	-13.93	38.673 3	-9.63	2.143 9	131.00	2.758 8	93.07	1.5681	567.48
W-30	4.281 9	-12.65	37.184 7	-13.11	2.084 3	124.58	2.846 8	99.23	1.584 2	574.33
Z-5	4.465 4	-8.91	39.874 3	-6.82	1.797 2	93.64	2.338 8	63.68	1.336 2	468.77
Z-7	4.259 1	-13.12	38.214 4	-10.70	2.144 7	131.09	2.547 9	78.31	1.602 3	582.03
Z-9	4.097 3	-16.42	36.904 9	-13.76	2.370 9	155.46	2.921 6	104.46	1.648 2	601.57
Z-11	4.082 1	-16.73	35.423 8	-17.22	2.434 3	162.29	3.412 7	138.83	1.996 3	749.74

续表 4

样品	9,11-去氢- α -乳香酸		9,11-去氢- β -乳香酸		α -乳香酸		β -乳香酸	
	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%
乳香	0.109 4	—	0.438 1	—	14.852 6	—	44.193 7	—
W-5	0.209 6	91.59	1.496 3	241.54	14.493 5	-2.42	43.952 9	-0.54
W-7	0.317 4	190.13	1.874 1	327.78	14.043 8	-5.45	43.454 1	-1.67
W-9	0.385 7	252.56	2.267 9	417.67	14.153 1	-4.71	43.180 5	-2.29
W-11	0.464 9	324.95	2.480 8	466.26	14.032 4	-5.52	42.949 8	-2.81
W-20	0.489 6	347.53	2.735 7	524.45	13.992 5	-5.79	42.862 6	-3.01
W-30	0.439 4	301.65	2.770 2	532.32	13.883 4	-6.53	42.682 4	-3.42
Z-5	0.365 4	234.00	2.109 1	381.42	14.011 4	-5.66	43.193 1	-2.26
Z-7	0.468 1	327.88	2.847 9	550.06	13.752 1	-7.41	42.760 6	-3.24
Z-9	0.527 0	381.72	3.462 0	690.23	13.561 9	-8.69	42.084 2	-4.77
Z-11	0.644 1	488.76	3.964 1	804.84	13.593 0	-8.48	41.883 3	-5.23

样品	3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸		3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸		α -ABA		β -ABA	
	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%	$\omega/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	变化率/%
乳香	0.102 4	—	0.429 4	—	13.162 7	—	20.181 6	—
W-5	0.208 0	103.13	0.824 7	92.06	13.443 6	2.13	21.750 9	7.78
W-7	0.278 5	171.97	1.997 9	365.28	13.762 8	4.56	22.181 1	9.91
W-9	0.368 2	259.57	2.691 2	526.73	14.253 2	8.28	23.282 0	15.36
W-11	0.422 3	312.40	2.864 1	567.00	15.482 9	17.63	24.181 8	19.82
W-20	0.467 2	356.25	3.120 8	626.78	15.863 6	20.52	25.260 7	25.17
W-30	0.470 8	359.77	3.393 9	690.38	16.2836	23.71	25.841 6	28.05
Z-5	0.293 6	186.72	2.260 1	426.34	14.852 4	12.84	23.153 1	14.72
Z-7	0.444 8	334.38	3.049 9	610.27	15.493 4	17.71	24.741 8	22.60
Z-9	0.581 9	468.26	3.849 3	796.44	16.484 1	25.23	25.940 8	28.54
Z-11	0.626 2	511.52	4.175 8	872.47	18.783 9	42.71	28.762 5	42.52

*样品编号中 RX 代表乳香, W 代表文火, Z 代表中火, 数字代表炮制时间/min

*RX represented raw *Olibanum*, W represented mild fire, Z represented medium fire, the numbers represented processing time/min

ABA、 β -ABA 的 β 值为正数, 即其含量随着炮制温度的升高、炮制时间的延长而升高, 2 个因素中炮制温度的标准化偏回归系数 (β') 的绝对值更大, 对上述成分的含量影响更大; KBA、AKBA、 α -乳香酸、 β -乳香酸的 β 值为负数, 其含量随着炮制温度的升高、炮制时间的延长而降低, 炮制温度的 β' 更小, 对上述 4 个成分含量的影响更大。

2.3 乳香醋炙前后抗炎活性对比研究

2.3.1 药物制备 取乳香和醋乳香 (中火 11 min) 粉末约 5 g, 称定质量, 分别加入 95%乙醇 75 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液减压回收溶剂至干, 残渣用无水乙醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 得乳香和醋乳香提取物溶液。

取 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸约 20 mg, 精密称

定, 以无水乙醇溶解, 并定容于 10 mL 量瓶中, 得单体成分溶液。

取乳香粉末约 5 g, 称定质量, 加入 95%乙醇 75 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液减压回收溶剂至干, 得乳香残渣, 另取 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸约 20 mg, 精密称定, 与乳香残渣混合, 用无水乙醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 得乳香+单体成分溶液。

取地塞米松约 4 mg, 称定质量, 以无水乙醇溶解, 并定容于 10 mL 量瓶中, 稀释 100 倍, 得地塞米松溶液。

吸取 2 mL 10%聚山梨酯 80 的 PBS 溶液于 15 mL 离心管中, 将离心管置于涡旋振荡器上, 开启振荡器, 使溶液始终保持涡旋状态。吸取上述各提取

表 5 乳香中各乳香酸成分含量影响因素的多元线性回归分析

Table 5 Multivariate linear regression analysis of factors for boswellic acids content in vinegar-processed *Olibanum*

因变量	自变量	β	β'	P 值	95%置信区间	因变量	自变量	β	β'	P 值	95%置信区间
KBA	炮制时间	-0.015	-0.653	0.033	-0.028~-0.002	α -乳香酸	炮制时间	-0.018	-0.526	0.044	-0.036~-0.001
	炮制温度	-0.260	-0.759	0.018	-0.460~-0.060		炮制温度	-0.474	-0.891	0.004	-0.744~-0.203
AKBA	炮制时间	-0.179	-0.746	0.006	-0.286~-0.072	β -乳香酸	炮制时间	-0.048	-0.612	0.034	-0.091~-0.005
	炮制温度	-3.027	-0.832	0.003	-4.655~-1.400		炮制温度	-0.971	-0.822	0.010	-1.621~-0.321
榄香醇酸	炮制时间	0.031	0.674	0.020	0.007~0.055	3-乙酰-9,11-去 氢- α -乳香酸	炮制时间	0.011	0.658	0.041	0.001~0.022
	炮制温度	0.561	0.804	0.009	0.190~0.932		炮制温度	0.180	0.704	0.032	0.021~0.340
β -榄香酮酸	炮制时间	0.039	0.728	0.017	0.009~0.069	3-乙酰-9,11-去 氢- β -乳香酸	炮制时间	0.086	0.703	0.025	0.015~0.158
	炮制温度	0.603	0.735	0.016	0.149~1.056		炮制温度	1.341	0.719	0.023	0.252~2.431
tsugaric acid A	炮制时间	0.024	0.639	0.040	0.001~0.046	α -ABA	炮制时间	0.133	0.670	0.027	0.020~0.245
	炮制温度	0.418	0.746	0.022	0.081~0.755		炮制温度	2.308	0.767	0.015	0.603~4.012
9,11-去氢- α - 乳香酸	炮制时间	0.009	0.578	0.074	-0.001~0.019	β -ABA	炮制时间	0.191	0.717	0.019	0.042~0.339
	炮制温度	0.167	0.720	0.035	0.016~0.318		炮制温度	2.979	0.739	0.017	0.729~5.229
9,11-去氢- β - 乳香酸	炮制时间	0.055	0.587	0.048	0.001~0.109						
	炮制温度	1.136	0.801	0.014	0.311~1.961						

物溶液、单体成分溶液、乳香+单体成分溶液和地塞米松溶液 100 μ L, 逐滴加入离心管中, 边涡旋边滴加, 然后加入 PBS 至 10 mL 混合均匀后, 即得。

2.3.2 U937 细胞培养 将 U937 细胞放入 37~40 $^{\circ}$ C 水浴中复苏, 加入 1~3 mL 含 10% FBS、1% PS 的 1640 培养液混合后, 离心 3 min (1000 r/min)。弃上清, 另加入培养液后放入 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱培养。3~4 d 后更换培养液。观察细胞生长至 80~90% 汇合度时, 进行传代培养。细胞培养 1 周后进行铺板和给药。

2.3.3 细胞炎症模型的建立 调整细胞数为 1×10^6 个/孔, U937 细胞在含有 100 ng/mL PMA 的培养基中, 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 48 h 后, 弃去培养基, 采用 PBS 清洗 2 遍。将培养基更换成含有 100 ng/mL LPS 溶液细胞培养基, 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 48 h。

2.3.4 对细胞生长的影响 选取指数生长期的 U937 细胞, 吹打成单细胞悬液, 以 1×10^4 个/孔的密度接种到 96 孔板, 向每孔加入含有 100 ng/mL PMA 的培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, 弃去培养基, 采用 PBS 清洗 2 遍后, 加入不同质量浓度 (5、10、25、50、100、200 μ g/mL) 的醋乳香提取物溶液和地塞米松, 每个质量浓度设置 6 个复孔。孵育 48 h 后, 向每孔加入 10 μ L CCK-8, 于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 培养箱中孵育 3 h, 采用酶标

仪在 450 nm 处测定吸光度 (*A*) 值。结果显示, 质量浓度大于 50 μ g/mL 会对细胞的活力造成显著的影响, 故确定乳香和醋乳香提取物给药质量浓度为 25 μ g/mL, 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸为醋乳香中的等量质量浓度。依据文献报道^[15]确定地塞米松的剂量 0.1 μ mol/L 对细胞生长无明显抑制作用。

2.3.5 炎症因子检测 按照“2.2.3”项下方法处理细胞, 组别分别设定为空白组、模型组、乳香组、醋乳香组、单体 (3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸) 组和乳香+单体 (3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸) 组。细胞处理完成后, 收集上清液, 采用 ELISA 方法测定 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量。结果如表 6 所示。各给药组中细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量均低于模型组, 且具有统计学意义 ($P < 0.01$ 、0.05), 可见乳香、醋乳香及单体成分均能够有效地抑制细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 分泌。比较乳香与醋乳香这 2 组给药组数据, 可以发现醋乳香给药组上清液中这 3 种炎症细胞因子含量较乳香组显著减少, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明与乳香比较, 醋乳香抑制炎症细胞模型分泌 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的效果更强, 乳香醋炙后确有抗炎作用的增效。比较乳香和乳香+单体组, 可以发现乳香+单体组的细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 含量较乳香组显著减少 ($P < 0.05$), 单体成分对乳香的抗炎活性确有改善作用。

表 6 乳香醋炙前后及单体成分对巨噬细胞分泌细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effects of monomer components and *Olibanum* before and after processes on cytokines secreted by macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)
空白	38.88 ± 11.73	5.52 ± 0.74	15.72 ± 4.84
模型	122.07 ± 32.63 ^{###}	9.62 ± 1.41 ^{###}	45.21 ± 9.61 ^{###}
乳香	79.25 ± 22.72 ^{*Δ}	7.71 ± 1.27 ^{*Δ}	31.04 ± 13.25 ^{**Δ}
醋乳香	48.92 ± 14.69 ^{**}	5.97 ± 1.43 ^{**}	18.65 ± 9.88 ^{**}
乳香+单体	61.99 ± 10.73 ^{**}	6.64 ± 0.55 ^{**}	20.09 ± 7.23 ^{**}
单体	81.26 ± 20.72 [*]	8.31 ± 0.67 [*]	36.61 ± 7.71 ^{**}
地塞米松	33.38 ± 6.95 ^{**}	5.45 ± 0.46 ^{**}	10.93 ± 4.64 ^{**}

与空白组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$;

与醋乳香组比较: ^Δ $P < 0.05$; 与乳香+单体组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{###} $P < 0.01$ vs blank group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs vinegar-processed *Olibanum* group; ^{*} $P < 0.05$ vs raw *Olibanum* + monomer group

3 讨论

根据结构类型可将 13 个乳香酸成分分为齐墩果烷型、乌苏烷型和甘遂烷型,以进一步从结构类型角度分析各成分含量变化与结构转化的关系。齐墩果烷型和乌苏烷型的乳香酸成分中,11 位含有羰基的乳香酸成分(KBA)含量下降,含有 9、11 位去氢结构的 4 个乳香酸成分(9,11-去氢- α -乳香酸、9,11-去氢- β -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸)在醋炙之后含量增加,推测与 11 位羰基在酸和热的作用下发生反应,生成具有热稳定性的 π - π 共轭结构 9,11-去氢结构有关^[13]。此外,3 位含有羟基乳香酸成分(α -乳香酸、 β -乳香酸)醋炙后含量略显降低,3 位含有乙酰基乳香酸成分(3-乙酰-9,11-去氢- α -乳香酸、3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸、 α -ABA、 β -ABA)含量升高,推测 3 位羟基在酸性条件下与醋中乙酸酯类成分的乙酰基上 C 原子发生亲核取代,生成 3 位乙酰基的新成分。甘遂烷型的乳香酸类成分(榄香醇酸、 β -榄香酮酸)在醋炙之后含量显著升高,其含量变化的原因仍需进一步的研究来阐明。

在含量变化幅度方面,9,11-去氢结构乳香酸炮制后含量变化最为显著,尤其是 β 型 9,11-去氢结构乳香酸,经中火炮制 11 min 含量变化率可增加 8 倍以上,文火炮制即使加热 20、30 min 之久,其含量变化仍没有中火炮制显著。因此,乳香中乳香酸类成分在炮制过程中随温度和时间的变化,可能与它

们的结构有关。

乳香在临床应用中有确切的抗炎疗效,可用于骨关节炎等炎症疾病的治疗^[17-19]。同时也有乳香对角叉菜胶及右旋葡萄糖苷诱导的骨关节炎^[20]、胶原蛋白诱导的类风湿关节炎^[21]发挥抗炎作用的相关实验研究报道。

传统炮制理论认为,醋炙可使乳香增效。在明确乳香醋炙前后主要含量变化成分后,本研究遵循化学成分变化而引起药理作用改变的研究思路进一步深入。U937 细胞来源于人单核细胞白血病细胞系,PMA 诱导成为成熟巨噬细胞。LPS 可以诱导 U937 细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)、NO 等炎症细胞因子及炎症介质,是一种经典的炎症细胞模型^[22]。研究表明,LPS 主要通过脂多糖结合蛋白 CD14 受体和 Toll 样受体 4 等信号转导途径,激活转录因子细胞 NF- κ B 和活化蛋白-1,引起各种细胞因子和炎症介质的过度表达,进而促发炎症瀑布连锁反应^[23]。既往已有大量研究选用 LPS 诱导的 U937 炎症细胞模型进行中药抗炎作用有效成分的筛选和鉴定,并获得成功^[24-27]。

本研究选用 LPS 诱导的 U937 炎症细胞模型,对比乳香醋炙前后抗炎活性的同时,针对炮制前后差异成分的抗炎活性进行评价。3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸在醋炙后含量升高接近 8 倍,研究将与醋乳香等剂量的 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸成分加入到乳香中,模拟醋乳香含量,以观察其对乳香抗炎活性的影响。体外抗炎实验表明,醋乳香对于炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的抑制作用明显优于乳香,而醋炙后含量提升最为显著的 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸成分展现出了较好的抗炎作用,其与乳香协同的抗炎效果接近醋乳香,可见炮制后含量增加的 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸成分可能是乳香醋炙增效的药效物质基础之一。

本实验对不同炮制温度和时间醋乳香中的 13 个乳香酸成分进行绝对定量分析并对比其含量变化趋势,证实炮制温度对乳香中乳香酸类成分的影响较显著。相比于传统研究中人们关注较多的 5 种乳香酸类成分,具有 9,11-去氢结构的 4 种乳香酸成分、榄香醇酸、 β -榄香酮酸、tsugaric acid A 等成分在炮制过程中的含量变化更为显著,其中尤以 β 构型的 9,11-去氢结构乳香酸即 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸变化幅度最大。

体外抗炎活性研究表明, 醋乳香的抗炎活性优于乳香, 而 3-乙酰-9,11-去氢- β -乳香酸对乳香醋炙抗炎活性增效有一定的贡献作用。相信在明确这些成分的活性以及药效作用的基础上, 能够进一步为乳香醋炙增效机制研究提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 233.
- [2] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 第 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 217-218.
- [3] 于江泳, 张村. 全国中药饮片炮制规范辑要: 2016 版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 226.
- [4] 北京中药饮片炮制规范 [S]. 2010: 168.
- [5] 福建省中药饮片炮制规范 [S]. 2012: 127-128.
- [6] 广西壮族自治区中药饮片炮制规范 [S]. 2007: 223.
- [7] 宁张弛, 宋志前, 王淳, 等. 炮制温度和时间对醋乳香外观颜色及 6 种乳香酸含量的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(3): 508-515.
- [8] 蔡红蝶, 宿树兰, 周卫, 等. 乳香属药用植物中乳香酸类化学成分、生物活性及其作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2175-2181.
- [9] Zhang Y, Ning Z, Lu C, *et al.* Triterpenoid resinous metabolites from the genus *Boswellia*: Pharmacological activities and potential species-identifying properties [J]. *Chem Cent J*, 2013, 7(1): 153.
- [10] Cuaz-Pérolin C, Billiet L, Baugé E, *et al.* Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF- κ B inhibitor acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in LPS-challenged ApoE^{-/-} mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(2): 272-277.
- [11] 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.
- [12] 乔立俊, 刘一兵, 李松梅, 等. 炮制时间对醋乳香五种有效成分含量的影响 [J]. 中国基层医药, 2018, 25(14): 1849-1851.
- [13] Ning Z, Wang C, Liu Y, *et al.* Integrating strategies of herbal metabolomics, network pharmacology, and experiment validation to investigate frankincense processing effects [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1482.
- [14] 袁仁智, 唐鹏, 雍志强, 等. 牛膝干预肾虚血瘀型多囊卵巢综合征的成分靶点和通路分析 [J]. 世界中医药, 2020, 15(22): 3375-3382.
- [15] 郑韵, 余科, 李昶. 地塞米松对小鼠骨细胞白细胞介素-6 及核因子 κ B 受体活化因子配体表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(4): 580-584.
- [16] 王文芳, 傅杰, 张春霞, 等. 乳香酸药理活性研究进展 [J]. 生命的化学, 2015, 35(4): 537-542.
- [17] Gupta I, Gupta V, Parihar A, *et al.* Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with bronchial asthma: Results of a double-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study [J]. *Eur J Med Res*, 1998, 3(11): 511-514.
- [18] Kimmatkar N, Thawani V, Hingorani L, *et al.* Efficacy and tolerability of *Boswellia serrata* extract in treatment of osteoarthritis of knee: A randomized double blind placebo controlled trial [J]. *Phytomedicine*, 2003, 10(1): 3-7.
- [19] Gupta I, Parihar A, Malhotra P, *et al.* Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis [J]. *Eur J Med Res*, 1997, 2(1): 37-43.
- [20] Singh G B, Atal C K. Pharmacology of an extract of salai guggal ex-*Boswellia serrata*, a new non-steroidal anti-inflammatory agent [J]. *Agents Actions*, 1986, 18(3/4): 407-412.
- [21] Umar S, Umar K, Sarwar A H, *et al.* *Boswellia serrata* extract attenuates inflammatory mediators and oxidative stress in collagen induced arthritis [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(6): 847-856.
- [22] 刘孟楠, 任维, 张伟, 等. 蛭龙活血通瘀胶囊抑制 NLRP3 炎症小体活化抗 U937 巨噬细胞焦亡的机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(6): 156-161.
- [23] Manimtim W M, Hasday J D, Hester L, *et al.* *Ureaplasma urealyticum* modulates endotoxin-induced cytokine release by human monocytes derived from preterm and term newborns and adults [J]. *Infect Immun*, 2001, 69(6): 3906-3915.
- [24] 徐荔, 何小鹏, 柴旺, 等. 黄芪多糖对内毒素诱导巨噬细胞产生 TNF- α 、IL-1 β 及 NO 的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(5): 503-504.
- [25] 王长文, 马洪波, 张铎, 等. 茶多糖对 LPS 活化单核巨噬细胞内活性氧的影响 [J]. 中国兽医杂志, 2014, 50(3): 21-23.
- [26] 毛峻琴, 程晓莉. 木瓜中四个三萜类化合物对单核细胞产生白介素-6 的影响 [J]. 药学实践杂志, 2002, 20(4): 222-224.
- [27] 赵树铭, 彭永正, 蒋纪恺, 等. 磷脂酶 A₂ 抑制剂的研究: 粉防己碱对 U937 细胞磷脂酶 A₂ 和前列腺素生成的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 1999, 24(4): 368-370.

[责任编辑 郑礼胜]