

结合抗炎指标优化东北铁线莲挥发油提取工艺

李长艳¹ 田淑霞^{1,2} 张婧娴¹ 肖霄³ 郭澄¹ 杜江² 韩永龙^{1,3}

(1 上海交通大学附属第六人民医院, 上海, 200233; 2 贵阳中医学院, 贵阳, 550025; 3 上海中医药大学, 上海, 201203)

摘要 目的:结合抗炎指标优选水蒸气蒸馏法提取东北铁线莲挥发油的工艺。方法:选取东北铁线莲。以挥发油提取率、NO 抑制率和两者的加权评分为指标,通过正交试验考察过筛目数、药液比和回流时间对东北铁线莲挥发油的水蒸气蒸馏法提取工艺的影响,优选最佳试验方案。结果:各因素对挥发油提取率、NO 抑制率和加权评分的影响顺序为过筛目数 > 药液比 > 回流时间;最佳提取工艺为过筛目数 3#,药液比 1:10,回流时间 12 h;挥发油提取率 0.072%,NO 抑制率 117.411%,加权评分 97.979。结论:水蒸气蒸馏法提取的东北铁线莲挥发油抗炎作用明显,优化的工艺稳定可靠。

关键词 东北铁线莲;挥发油;水蒸气蒸馏法;正交试验设计;提取率;一氧化氮;抑制率

Optimization of Extraction Technology of Volatile Oil from Clematis Mandshurica Combined with Anti-inflammatory Index

Li Changyan¹, Tian Shuxia^{1,2}, Zhang Jingxian¹, Xiao Xiao³, Guo Cheng¹, Du Jiang², Han Yonglong^{1,3}

(1 Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China; 2 Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 3 Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To optimize steam distillation extraction process of volatile oil from Clematis Manshurica combined with anti-inflammatory index. **Methods:** With the volatile oil extraction rate, inhibition rate of NO and weighting score as indexes, effect of mesh number, liquid ratio and reflux time on steam distillation process of volatile oil from Clematis Manshurica were investigated by orthogonal test to optimize the best test scheme. **Results:** Effects of three factors on volatile oil extraction rate, inhibition rate of NO and weighting score were in order of mesh number, liquid ratio, and reflux time; Optimal extraction technology was followed: mesh number was 3#, liquid ratio was 1:10, and reflux time was 12 h; volatile oil extraction rate was 0.072%, the inhibition rate of NO was 117.411%, weighting score was 97.979. **Conclusion:** The volatile oil extracted from steam distillation method has significant anti-inflammatory effect and the optimized process is stable and reliable.

Key Words Clematis manshurica; Volatile oil; Steam distillation; Orthogonal test; Extraction rate; RAW264.7 cell; NO; Inhibition rate; Anti-inflammation

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.11.053

东北铁线莲(*Clematis manshurica* Rupr.)是毛茛科铁线莲属植物,其根及根茎可作为中药威灵仙入药,具有通络止痛、祛风湿之功效,在临床上主要用于风湿痹痛,肢体麻木,筋脉拘挛,屈伸不利等证候。目前,已有学者对东北铁线莲花、果中的挥发性成分进行了研究分析^[1-2],还有学者研究证明东北铁线莲的醇提取物和少数单体可以通过抑制炎症反应递质的产生发挥抗炎作用、缓解关节炎症状^[3-8],对东北铁线莲根茎中挥发油的相关研究报道较少。本实验采用水蒸气蒸馏法提取东北铁线莲中挥发油,结合抗炎指标通过正交试验筛选挥发油的最佳提取工艺,为进一步开发利用东北铁线莲挥发油提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞 RAW264.7 细胞购于中国科学院上海

生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 药品及试剂 东北铁线莲购于上海虹桥中药饮片有限公司(批号 160307),经鉴定为毛茛科铁线莲属东北铁线莲(*Clematis manshurica* Rupr)的干燥根茎;二甲基亚砜(DMSO, ACS, 批号:520C039, 国药集团化学试剂有限公司);DMEM(Dulbecco minimum essential medium)培养基(维森特生物科技有限公司,批号:319006013);磷酸缓冲盐溶液(PBS, bio-sharp 公司,批号:171860);胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司,批号:20170710);脂多糖(LPS, Sigma 公司,批号:017M4112V);MTT(Solarbio 公司,批号:303H0528);NO 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,批号:20170919)。

1.3 仪器 0.22 μm 有机相针式滤器(上海安普科学仪器有限公司);药筛(言锦丝网加工厂);DFY-

基金项目:上海市科学技术委员会民生科技支撑计划专项(14401972002);上海市第六人民医院东院院人才课题(2014010)

作者简介:李长艳(1984.09—),女,硕士,主管药师,临床药师,研究方向:临床药学,E-mail:lichangyan4u@163.com

通信作者:韩永龙(1957.06—),男,博士,主任药师,博士研究生导师,研究方向:中药药剂学,E-mail:yonglongh@126.com

300 型高速万能粉碎机(上海新诺仪器设备有限公司);TC-15 型套式恒温器(海宁市新华医疗器械厂);圆底烧瓶,挥发油测定器,球形冷凝管(上海人贵仪器设备有效公司);CKX31SF 型倒置显微镜(Olympus 公司);SIMPLICITY 型超纯水系统(Millipore 公司);微量加样器(Eppendorf 公司);TDL-80-2B 型低速离心机(上海安亭科学仪器厂);ALLEGRAX-22R 型高速离心机(Beckman 公司);SW-CJ-2FD 型洁净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);HWS24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);Epoch 型酶标仪(BioTek 公司)。

2 方法

2.1 正交试验设计 选取饮片过筛目数、药液比、回流时间为考察因素,每个因素取 3 个水平,按 L9 (34)正交表进行试验。以挥发油提取率、NO 抑制率为指标,分别占加权评分 70%、30%,以综合评分值对实验结果进行直观分析和方差分析(因素水平见表 1,试验安排见表 2)。

NO 抑制率 = (1 - (实验组 NO 含量 - 对照组 NO 含量)/(模型组 NO 含量 - 对照组 NO 含量)) × 100%

综合评分 = 各组提取率/最高组提取率 × 70 + 各组 NO 抑制率/最高组 NO 抑制率 × 30

表 1 东北铁线莲挥发油的水蒸气蒸馏工艺正交试验因素水平

水平	A 过筛目数	B 药液比	C 回流时间(h)
1	1 号筛	10	5
2	2 号筛	12	8
3	3 号筛	15	12

2.2 水蒸气蒸馏法提取东北铁线莲挥发油 东北铁线莲粉碎至相应目数后,准确称取 150 g 置圆底烧瓶中,加入相应比例的蒸馏水,30 ℃ 浸泡 12 h,依次连接冷凝装置及接收装置,电热套加热保持微沸,回流相应时间后收集挥发油并计算提取率。

2.3 工作液的配制 9 次试验所得挥发油分别加

DMSO 配制浓度为 10⁵ μg/mL 母液, -20 ℃ 保存,实验时用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基依次稀释成 100 μg/mL、10 μg/mL、1 μg/mL 实验工作液。LPS 加 PBS 配制浓度为 1.25 mg/mL 母液,分装于 -20 ℃ 保存,实验时用 10% FBS 培养基稀释成 100 μg/mL 模型工作液。

2.4 细胞培养与给药

2.4.1 RAW264.7 细胞培养 RAW264.7 细胞在 37 ℃,5% CO₂ 条件下,用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养液传代培养。

2.4.2 RAW264.7 细胞活力检测 RAW264.7 细胞按 3 × 10⁴/孔接种于 96 孔板中,培养箱中培养 12 h 后吸去原培养基,更换 2% 胎牛血清(FBS)培养基饥饿 12 h。饥饿后,实验组每孔分别加入不同浓度的实验工作液 100 μL;阴性对照组和模型组均加入 10% FBS 培养基 100 μL(均设 6 个复孔)。培养 1 h 后,模型组和实验组每孔加入 1 μL 脂多糖(LPS)工作液(此时 LPS 浓度为 1 μg/mL),继续培养 36 h。36 h 后观察细胞状态,吸取上层培养液至离心管,每孔加入新鲜培养液 100 μL,再加入新配制的 5 mg/mL MTT 液 10 μL,37 ℃ 避光孵育 4 h,终止培养。吸去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,置摇床上低速振荡 10 min 后,用酶标仪于 490 nm 处测量各孔的吸光度值(A_{490 nm})。

细胞活力 = (药物孔 A 值 - 调零孔 A 值)/(阴性对照孔 A 值 - 调零孔 A 值) × 100%

2.4.3 NO 含量测定 收集至离心管的上层培养液,4 000 r/min 离心 5 min,取上清。采用 NO 检测试剂盒测定上清中 NO 含量,具体操作按试剂盒说明书进行。

2.5 数据处理 正交试验结果采用正交设计助手 II 软件和 SPSS 19.0 统计软件进行直观分析和方差分析。采用 GraphPad5.02 作图,组间比较采用 test 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

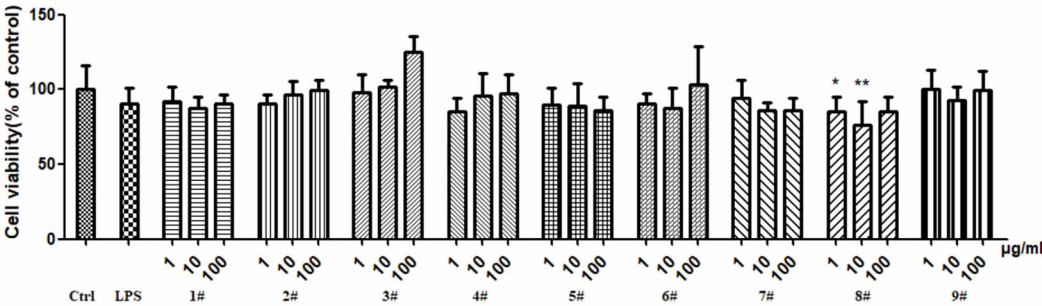


图 1 加药刺激 36 h 后细胞活力

注:与对照组比较,* P < 0.05

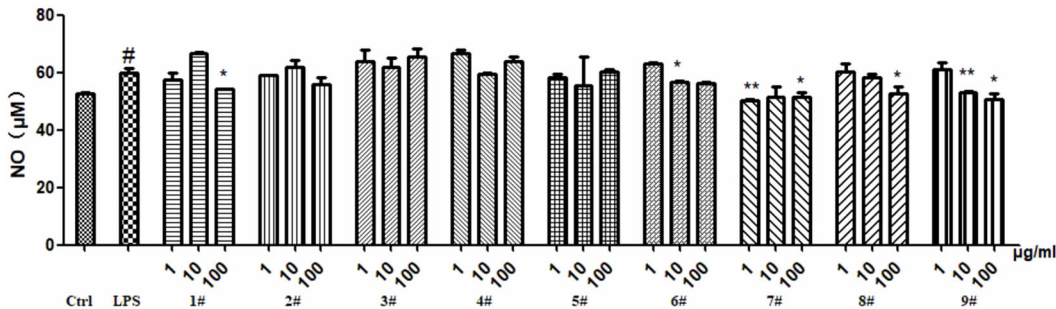


图2 加药刺激 36 h 后 NO 含量

注:与 control 组比较, * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, $\Delta P < 0.05$

3 结果

3.1 NO 的抑制率 1、7、8、9[#]挥发油均有效,其中 7[#]对 NO 抑制作用最强(图 2);1~9[#]挥发油对 NO 的抑制率即挥发油浓度为 100 μg/mL 时对 NO 的抑制率。由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 A>B>C,即过筛目数对提取效果的影响最大,其次为药液比。见表 2。[我院威灵仙注射液含生药 1 g/mL,而 100 μg/mL 挥发油最多含生药 0.5 g/mL]

方差分析表明,因素 A、B、C 对挥发油得率的影响均无统计学意义。见表 3。确定最佳提取条件为 A₃B₁C₃,即过筛目数 3[#],药液比 1:10,回流时间 12 h。

表 2 正交试验设计和实验结果

序号	A	B	C	D (空白)	提取率 (%)	NO 抑制 率(%)	综合 评分
1	1	1	1	1	0.031	81.250	49.501
2	1	2	2	2	0.046	57.143	58.339
3	1	3	3	3	0.031	-75.446	12.160
4	2	1	2	3	0.027	-54.018	13.378
5	2	2	3	1	0.064	-2.679	61.584
6	2	3	1	2	0.036	50.000	46.915
7	3	1	3	2	0.072	117.411	97.979
8	3	2	1	3	0.061	101.786	83.561
9	3	3	2	1	0.040	125.893	68.889
K1	40.000	53.619	59.992	59.991			
K2	40.626	67.828	46.869	67.744			
K3	83.476	42.655	57.241	36.366			
R	43.476	25.173	13.123	31.378			

表 3 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
过筛目数	3726.763	2	2.325	19.000	>0.05
药液比	955.807	2	0.596	19.000	>0.05
回流时间	287.386	2	0.179	19.000	>0.05
误差	1602.83	2			

3.2 验证试验 称取东北铁线莲粉末(过 3[#]筛)3 份,每份 150 g,按优选的提取工艺进行 3 次验证试

验。结果挥发油提取率分别为 0.078%、0.079% 和 0.079%,NO 抑制率分别为 143.615%、135.881% 和 129.251%,综合评分分别为 99.118、97.855 和 96.999,说明优化的水蒸气蒸馏法提取工艺稳定可靠。

4 讨论

威灵仙和东北铁线莲挥发油的提取一般采用有机溶剂提取法^[2]、水蒸气蒸馏法^[1,9-10]和超临界 CO₂萃取技术^[11],傅瑶等^[11]利用正交试验优化威灵仙挥发油的超临界萃取工艺,挥发油得率为 0.44%。本工艺研究表明,水蒸气蒸馏法提取东北铁线莲挥发油的收率较低,但利用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞炎性反应模型证明了东北铁线莲挥发油的抗炎活性。小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞来源于小鼠腹腔,是一类能够进行稳定传代培养的免疫细胞,在机体炎性反应中发挥重要作用^[12-13]。以 LPS 诱导 RAW264.7 细胞可以模拟机体的炎性反应,是目前常用的体外炎性反应细胞模型^[14-15]。LPS 刺激与炎性反应有关的一氧化氮合酶的表达,促使 NO 水平升高^[16],NO 是由一氧化氮合酶催化合成的气体分子,具有介导炎性反应的作用^[17],因此抑制机体 NO 的产生是治疗炎性反应的重要手段。结果表明水蒸气蒸馏法提取的东北铁线莲挥发油具有显著的抗炎作用,且优选的提取工艺稳定、可靠,为东北铁线莲挥发油中有效成分及其药理作用的研究提供了重要参考依据。

参考文献

[1]辛广,孟河,李铁纯. 千山东北铁线莲花挥发油成分研究[J]. 鞍山师范学院学报,2000,2(3):68-70.
[2]杨美林,朱惠京,李淑子. 东北铁线莲果的挥发油化学成分研究[J]. 中草药,1997(4):204.
[3]Park EK, Ryu MH, Kim YH, et al. Anti-inflammatory effects of an ethanolic extract from Clematis mandshurica Rupr[J]. J Ethnopharmacol,2006,108(1):142-147.
[4]Dilshara MG, Lee KT, Kim HJ, et al. Anti-inflammatory mechanism of

- α -viniferin regulates lipopolysaccharide-induced release of proinflammatory mediators in BV2 microglial cells [J]. *Cell Immunol*, 2014, 290(1):21-29.
- [5] Dilshara MG, Lee KT, Lee CM, et al. New compound, 5-O-isoferuloyl-2-deoxy-D-ribo- γ -lacton from *Clematis mandshurica*: Anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(1):14-23.
- [6] Lee CW, Park SM, Zhao R, et al. Hederagenin, a major component of *Clematis mandshurica* Ruprecht root, attenuates inflammatory responses in RAW 264.7 cells and in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2):528-537.
- [7] Dilshara MG, Lee KT, Jayasooriya RG, et al. Downregulation of NO and PGE2 in LPS-stimulated BV2 microglial cells by trans-isoferulic acid via suppression of PI3K/Akt-dependent NF- κ B and activation of Nrf2-mediated HO-1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18(1):203-211.
- [8] Li Y, Zheng JY, Liu JQ, et al. Succinate/NLRP3 Inflammasome Induces Synovial Fibroblast Activation; Therapeutical Effects of Clematichinenoside AR on Arthritis [J]. *Front Immunol*, 2016, 7:532.
- [9] 江滨, 贾向云, 丁靖坤, 等. 威灵仙和显脉旋复花挥发油成分的研究和比较 [J]. *中国中药杂志*, 1990, 15(8):40-42, 64.
- [10] 黄际薇, 张永明, 黄亚非. 喉咽灵口服液、野菊花和威灵仙挥发油化学成分比较 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2012, 51(4):68-72.
- [11] 傅瑶, 李颜, 霍炎, 等. 威灵仙挥发油的超临界萃取工艺优化及 GC-MS 分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(7):41-45.
- [12] Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation [J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 4(3):281-286.
- [13] Szliszka E, Skaba D, Czuba ZP, et al. Inhibition of inflammatory mediators by neobavaisoflavone in activated RAW264.7 macrophages. *Molecules*, 2011, 16(5):3701-372.
- [14] Song Y, Dou H, Gong W, et al. Bis-N-norgliovictin, a small-molecule compound from marine fungus, inhibits LPS-induced inflammation in macrophages and improves survival in sepsis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 705(1-3):49-60.
- [15] Cheng X, Gao D, Chen B, et al. Endotoxin-Binding Peptides Derived from Casein Glycomacropeptide Inhibit Lipopolysaccharide-Stimulated Inflammatory Responses via Blockade of NF- κ B activation in macrophages [J]. *Nutrients*, 2015, 7(5):3119-3137.
- [16] IPS F, KKA S, Samarakoon KW, et al. A fucoidan fraction purified from *Chnoospora minima*; a potential inhibitor of LPS-induced inflammatory responses [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104(Pt A):1185-1193.
- [17] Tewtrakul S, Tansakul P, Panichayupakaranant P. Effects of rhinacanthins from *Rhinacanthus nasutus* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor- α releases using RAW264.7 macrophage cells [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(6-7):581-585.
- (2017-12-31 收稿 责任编辑: 杨觉雄)
- (上接第 2879 页)
- [16] 刘琦, 王利娟, 邹亚楠, 等. HPLC 法测定复方扶芳藤合剂中人参皂苷 Rb1 的含量 [J]. *山东化工*, 2015, 18(1):83-85.
- [17] 翁砚, 王晓非, 刘同帅, 等. HPLC 法测定人参皂苷 Rg3、Rh1 的含量 [J]. *长春中医药大学学报*, 2016, 32(2):256-258.
- [18] 杨艳文, 孟凡双, 邵玉钢, 等. 高效液相色谱法同时测定人参制剂中 20 种人参皂苷方法的建立 [J]. *食品科学*, 2016, 37(22):131-135.
- [19] 李慧, 许亮, 温美佳, 等. 不同产地人参皂苷成分含量 UPLC 法测定及质量评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 10(6):1963-1968.
- [20] Ning C, Gao X, Wang C, et al. Ginsenoside Rg1 protects against acetaminophen-induced liver injury via activating Nrf2 signaling pathway in vivo and in vitro [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2018, 98:58-68.
- [21] Yang K, Luo Y, Lu S, et al. Salvianolic Acid B and Ginsenoside Re Synergistically Protect Against Ox-LDL-Induced Endothelial Apoptosis Through the Antioxidative and Antiinflammatory Mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:662.
- [22] Li J, Li R, Li N, et al. Mechanism of antidiabetic and synergistic effects of ginseng polysaccharide and ginsenoside Rb1 on diabetic rat model [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 158:451-460.
- (2018-08-06 收稿 责任编辑: 王明)