

不同炮制方法对衢枳壳药效指标成分含量及抗氧化活性的影响^Δ

王璐^{1*}, 汪丽霞², 吴婷婷^{1,3}, 赵四清², 郑美瑜¹, 陆胜民^{1#}(1.浙江省农业科学院食品科学研究所, 杭州 310021; 2.浙江省常山县农业特色产业发展中心, 浙江常山 324200; 3.中国计量大学生命科学学院, 杭州 310018)

中图分类号 R943.1; R283.1

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2022)07-0830-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.07.11



摘要 目的 研究不同炮制方法对衢枳壳中药效指标成分含量及其抗氧化活性的影响。方法 根据2020年版《中国药典》(四部)炮制通则和2015年版《浙江省中药炮制规范》中相关炮制方法制备衢枳壳的蒸制、煮制、醋炙、酒炙、麸炒、麸制、蜜制样品。检测不同衢枳壳样品中水分、灰分的含量;采用高效液相色谱法测定不同衢枳壳样品中药效指标成分柚皮苷和新橙皮苷的含量;采用DPPH、ABTS⁺自由基清除实验和总还原力实验考察不同衢枳壳样品的抗氧化活性。结果 衢枳壳不同样品中的水分、灰分、柚皮苷、新橙皮苷含量均符合2015年版《浙江省中药炮制规范》中的相关规定,其中柚皮苷的含量从高到低依次为未炮制样品>蜜制样品>麸制样品>煮制样品>醋炙样品>酒炙样品>麸炒样品>蒸制样品,新橙皮苷含量从高到低依次为未炮制样品>煮制样品>麸制样品>蜜制样品>醋炙样品>蒸制样品>酒炙样品>麸炒样品。衢枳壳煮制、麸制和麸炒样品对DPPH自由基的清除能力较好[半数抑制浓度(IC₅₀)分别为7.49、8.37、10.22 mg/mL],煮制、蒸制、麸制样品对ABTS⁺自由基的清除能力较好(IC₅₀分别为1.76、2.03、2.72 mg/mL);另外,与酒炙和蜜制样品相比,衢枳壳未炮制样品及其他炮制品均具有较好的总还原能力。结论 衢枳壳经不同方法炮制后的药效指标成分含量均有所降低,但均符合2015年版《浙江省中药炮制规范》中的相关规定,且部分炮制品的抗氧化活性较未炮制样品有所增强。

关键词 衢枳壳;炮制;含量测定;抗氧化活性

Effects of different processing methods on the contents of the pharmacodynamic index components and antioxidant activity of *Citrus aurantium*

WANG Lu¹, WANG Lixia², WU Tingting^{1,3}, ZHAO Siqing², ZHENG Meiyu¹, LU Shengmin¹(1. Institute of Food Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 2. Changshan County Agricultural Characteristic Industry Development Center of Zhejiang Province, Zhejiang Changshan 324200, China; 3. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects of different processing methods on the contents of the pharmacodynamic index components in *Citrus aurantium* and their antioxidant activity. **METHODS** According to the general principles of 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (volume IV) and the relevant processing methods in 2015 edition of *Processing Specifications of Traditional Chinese Medicine in Zhejiang Province*, the samples of *C. aurantium* were prepared by steaming with water, boiling with water, stir-frying with vinegar, stir-frying with wine, stir-frying with bran, processing with bran and processing with honey. The contents of moisture and ash in different products of *C. aurantium* were detected. The contents of naringin and neohesperidin in different products of *C. aurantium* were determined by high performance liquid chromatography. The antioxidant activity of different products was investigated by DPPH and ABTS⁺ radical scavenging experiments and the total reducing power test. **RESULTS** The contents of moisture, ash, naringin and neohesperidin were in line with the relevant requirements in 2015 edition of *Processing Specifications of Traditional Chinese Medicine in Zhejiang Province*. The content of naringin in descending order was as follow: unprocessed sample>sample processed with honey>sample processed with bran>sample boiled with water>sample stir-fried with vinegar>sample stir-fried with wine>sample stir-fried with bran>sample steamed with water. The content of neohesperidin in descending order was as follow: unprocessed sample>sample boiled with water>sample processed with bran>sample processed with honey>sample stir-fried with vinegar>sample steamed with water>sample stir-fried with wine>sample stir-fried with bran. The samples after boiling with water, processing with bran, and stir-fried with bran had better DPPH radicals scavenging ability (IC₅₀ were 7.49, 8.37 and 10.22 mg/mL, respectively). The samples after boiling with water, steaming with water, and processed with bran had better ABTS⁺ radicals scavenging ability (IC₅₀ were 1.76, 2.03 and 2.72 mg/mL, respectively). In addition, compared with sample stir-fried with wine and processed with honey, unprocessed sample and other processed products of *C. aurantium* had better total reducing ability. **CONCLUSIONS** After processing, the contents of the main pharmacodynamic

^Δ 基金项目:浙江省农业重大技术协同推广计划项目(No.2020XTTGZY03)

* 助理研究员,博士。研究方向:药用植物活性成分研究与开发。E-mail:wanglu1286@163.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:植物活性成分加工与综合利用。E-mail:lushengmin@hotmail.com

index components in *C. aurantium* have been reduced, but they were also in line with the relevant requirements in 2015 edition of *Processing Specifications of Traditional Chinese Medicine in Zhejiang Province*. The antioxidant ability of some processed products has been enhanced.

KEYWORDS *Citrus aurantium*; processing; content determination; antioxidant activity

枳壳是芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实^[1]。四川、江苏、浙江、湖南、江西是枳壳的主产地,川枳壳、苏枳壳、衢枳壳、湘枳壳、江枳壳是枳壳的主要商品规格^[2]。衢枳壳 *C. aurantium* Changshan-huyou, 又称“胡柚片”,是常山柚橙的干燥未成熟果实(即常山柚橙小青果)^[3],于2015年收载于《浙江省中药炮制规范》^[4],是浙江省“浙新八味”中药材培育品种之一,主产地为浙江省衢州市常山县^[5-6]。

衢枳壳性微寒,味苦、辛、酸,具有行滞消胀、止咳化痰、宽胸理气、清热解毒等功效^[7],其主要成分包含黄酮类、三萜类、甾体类、酚酸类、香豆素类和挥发油类等^[8-13]。其黄酮类成分具有降血脂^[14]、降血糖^[15-16]、抗炎^[17]、保肝^[18]等药理活性。然而,衢枳壳生品较辛燥,经炮制可缓和峻烈之性^[19]。因此,本研究以常山县衢枳壳未炮制样品为原料,按煮制、蒸制、醋炙、酒炙、麸炒、麸制、蜜制等方法分别对其进行炮制,并根据2020年版《中国药典》^[1,20]和2015年版《浙江省中药炮制规范》^[4]中的相关规定,考察不同炮制方法对衢枳壳药效指标成分(柚皮苷和新橙皮苷)的影响。

活性氧自由基是氧原子失去电子后形成的一种自由基,机体中过量的活性氧自由基会抢夺电子致使细胞蛋白质畸变并使正常细胞和组织遭到损坏^[21]。相关研究表明,活性氧自由基是促使机体衰老、引发疾病甚至癌变的重要原因^[22-24]。研究表明,柚皮苷和新橙皮苷均具有抗氧化活性^[25-26]。因此,本研究将对不同炮制方法获得的衢枳壳样品进行抗氧化研究以评价其药效,以期规范该药材的炮制工艺,为其不同炮制品的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

ME204E型万分之一分析天平购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司, LG-01型高速中药粉碎机购自瑞安市百信制药机械有限公司, HERAEUS MEGAFUGE 11R型高速离心机购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, SX2-2.5-12型马弗炉购自上海博迅实业有限公司, KQ-500DB型数控超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司, LC-2030C 3D Plus型高效液相色谱仪购自岛津企业管理(中国)有限公司, UV-800型紫外-可见分光光度计购自岛津(上海)实验器材有限公司。

1.2 主要药品与试剂

衢枳壳未炮制样品购自常山县鸿春果业专业合作社;黄酒(乙醇体积分数 $\geq 12\%$)购自浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司;米醋购自济南宜和食品有限公司;蜂

蜜购自上海冠生园食品有限公司;柚皮苷对照品(纯度 $\geq 98\%$)、新橙皮苷对照品(纯度 $\geq 98\%$)、抗坏血酸(纯度 $\geq 99\%$)均购自上海源叶生物科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;铁氰化钾(分析纯)、三氯乙酸(分析纯)、三氯化铁(分析纯)均购自天津市致远化学试剂有限公司;蒸馏水为实验室自制。

2 方法与结果

2.1 衢枳壳的炮制方法

本研究所采用的衢枳壳炮制方法主要参考2020年版《中国药典》(四部)炮制通则^[20]和2015年版《浙江省中药炮制规范》中衢枳壳相关炮制方法^[4],具体如下所示。

2.1.1 蒸制 精密称取未经炮制的衢枳壳56.0 g,置于蒸架上,向容器底部加入1 000 mL蒸馏水,蒸制约300 min,待衢枳壳完全蒸透后,取出并在45℃烘箱中干燥。

2.1.2 煮制 精密称取未经炮制的衢枳壳100.0 g,加入700 mL蒸馏水,大火煮沸后转文火再煮约120 min,待切开药材内无白心时取出,并在45℃烘箱中干燥。

2.1.3 醋炙 精密称取未经炮制的衢枳壳150.0 g,加入600 mL米醋,搅拌均匀后闷润60 min,待液体收干后,用文火炒至药材颜色变深时取出,摊凉,备用。

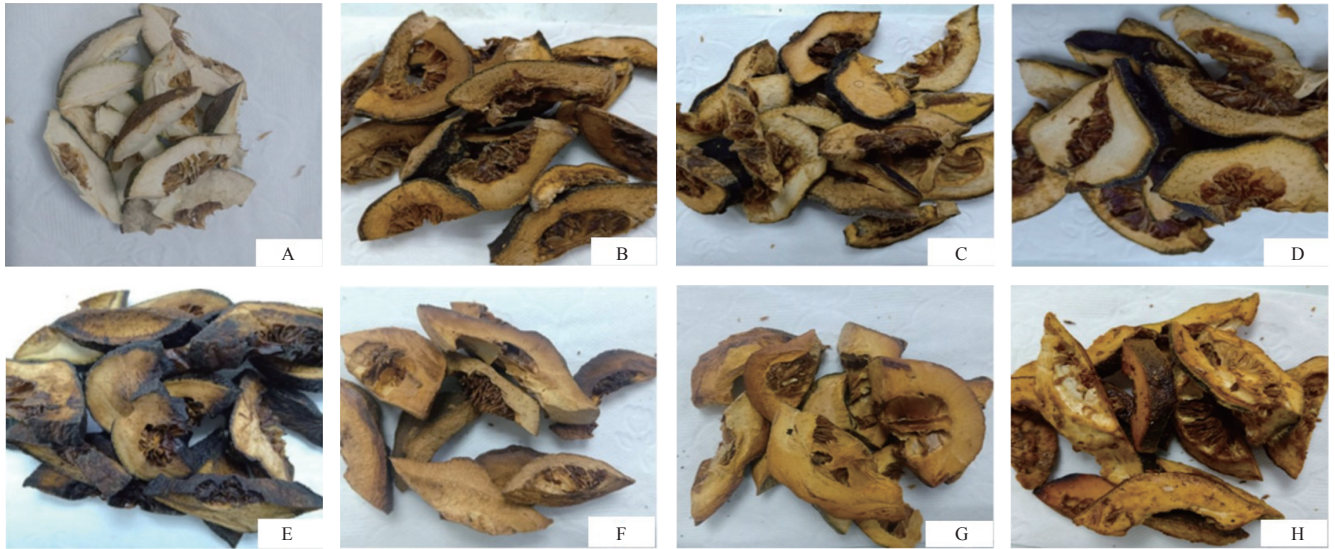
2.1.4 酒炙 精密称取未经炮制的衢枳壳150.0 g,加入黄酒200 mL,搅拌均匀后闷润60 min,用文火炒至香气逸出,待药材颜色变深时取出,晾凉,并在45℃烘箱中干燥。

2.1.5 麸炒 精密称取适量麸皮置热锅中翻动,待其开始起烟时,投入未经炮制的衢枳壳(麸皮与衢枳壳的质量比为10:1),迅速翻炒至衢枳壳表面呈深黄色或颜色变深时取出,筛去麸皮,摊凉,备用。

2.1.6 麸制 向200 g麸皮中加入炼蜜60 g,炒干至不粘手制得蜜制麸皮。取适量蜜炙麸皮置热锅中翻动,待其开始冒烟时,投入未经炮制的衢枳壳(蜜制麸皮与衢枳壳的质量比为10:1),迅速翻炒至衢枳壳表面呈深黄色或颜色变深时取出,筛去蜜炙麸皮,摊凉,备用。

2.1.7 蜜制 取蜂蜜加入适量沸水稀释,然后加入未经炮制的衢枳壳(蜂蜜与衢枳壳的质量比为1:4),搅拌均匀后闷润60 min,用文火炒至衢枳壳表面棕黄色且不粘手时,取出晾凉,备用。

上述未经炮制的衢枳壳和经不同炮制方法所制得的衢枳壳炮制品如图1所示。由图1可见,衢枳壳未炮制样品及其经过麸炒、麸制、蜜制的炮制品与2020年版《中国药典》和2015年版《浙江省中药炮制规范》中对应



A: 衢枳壳未炮制样品; B: 衢枳壳蒸制样品; C: 衢枍壳煮制样品; D: 衢枍壳醋炙样品; E: 衢枍壳酒炙样品; F: 衢枍壳麸炒样品; G: 衢枍壳麸制样品; H: 衢枍壳蜜制样品

图1 衢枍壳未炮制样品及炮制品实物图

饮片和炮制品的描述一致。麸炒后的衢枍壳炮制品颜色略有加深,偶有焦斑;麸制后的炮制品表面颜色相对较浅,呈深黄色,且在棱角处微具焦斑;蜜制后的炮制品表面呈黄褐色,略具光泽,较为滋润。整体而言,衢枍壳经炮制后颜色均不同程度地加深,外果皮颜色由绿褐色变为墨绿色或黑色,纵切面颜色由黄褐色变为焦褐色,其中醋炙样品、煮制样品和蒸制样品的颜色均逐渐加深,这可能是由于所采用的炮制方法均有加热过程,且加热“火候”不同导致的^[27-29]。酒炙法炮制的衢枍壳样品颜色最深,可能是由于在炮制过程中,较高浓度的乙醇更容易在衢枍壳表面致密的细胞结构中流动和渗透,且在加热过程中,乙醇更容易使衢枍壳细胞结构部分炭化。

2.2 水分与灰分含量的检测

2.2.1 水分含量的检测 将衢枍壳未炮制样品及其炮制品分别用粉碎机粉碎,经40目筛过筛后制得粉末样品,然后分别精确称取每种样品粉末各5.00 g,置于预先干燥至恒重(即干燥前后的质量差小于0.005 g)的玻璃称量皿中,再置于(100±5)℃烘箱中干燥5 h,然后置于干燥器中冷却0.5 h,记录各炮制品的质量;再次将各炮制品放入烘箱中干燥1 h,然后冷却、称质量,反复重复上述步骤直至干燥至恒重,再计算样品中的水分含量:水分含量(%)=($M_0 - M_1$)/ $M_0 \times 100$,其中 M_0 是样品的初始质量(在本研究中取值5.00 g), M_1 是干燥至恒重后样品的质量。每组样品平行测定6次,取平均值,结果见表1。

2.2.2 灰分含量的检测 参考2020年版《中国药典》(四部)灰分测定法^[20]检测衢枍壳未炮制样品及其炮制品中的灰分。将待测样品粉碎后,过二号筛,精确称取各样品粉末2.5 g,置于干燥至恒重的坩埚中,称定质量(精确

表1 不同炮制方法制备的衢枍壳炮制品的水分、灰分含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

衢枍壳样品	水分含量/%	灰分含量/%
未炮制样品	10.50±0.54	3.46±0.21
蒸制样品	6.05±0.32	4.79±0.29
煮制样品	5.92±0.11	4.69±0.19
醋炙样品	4.94±0.05	3.09±0.37
酒炙样品	6.70±0.19	3.74±0.51
麸炒样品	2.76±0.09	5.03±0.60
麸制样品	8.28±0.07	3.77±0.55
蜜制样品	5.60±0.39	5.19±0.30

至0.01 g);再将坩埚整体置于马弗炉中,缓缓加热至600℃使样品完全炭化并保持恒重(加热过程中避免样品燃烧)。根据炭化后样品残渣的质量计算样品的灰分含量:灰分含量(%)=($H_0 - H_1$)/ $H_0 \times 100$,其中 H_0 是样品的初始质量(在本研究中取值2.5 g), H_1 是炭化至恒重后样品的质量。每组实验平行检测6次,取平均值,结果见表1。

2.2.3 测定结果分析 2015年版《浙江省中药炮制规范》和2020年版《中国药典》对衢枍壳未炮制样品及其炮制品的规定是:衢枍壳未炮制样品及其炮制品的水分含量应低于12.0%,灰分含量应低于7.0%。由表1可见,衢枍壳未炮制样品及其炮制品的水分含量符合2015年版《浙江省中药炮制规范》中相关规定^[4]。经炮制后,衢枍壳炮制品的水分含量均有所降低,其中经麸炒后降低幅度最大,可能是由于加热的干燥麸皮不仅可以吸附一定水分,还能使衢枍壳表面加热得更均匀。在灰分检测中,蜜制样品的灰分含量略高于其未炮制样品和其他炮制品,可能是由于蜂蜜的流动性较差且自身灰分含量较高,经加热后其黏度和密度均进一步增加,从而更容易附着于衢枍壳的表面,增大衢枍壳的灰分含量。

2.3 柚皮苷和新橙皮苷的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters SunFire C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 磷酸溶液-乙腈 (80:20, V/V); 检测波长为 283 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 ℃; 进样量为 10 μL。

2.3.2 混合对照品溶液的配制 精确称取柚皮苷和新橙皮苷对照品各 5.0 mg 于同一棕色量瓶中, 用 90% 乙醇溶解并定容至 10 mL, 即得上述 2 种成分质量浓度均为 0.5 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的配制 将衢枳壳未炮制样品及其炮制品分别用粉碎机粉碎, 过 100 目筛后, 精确称取各样品粉末 10.0 g, 分别用 100 mL 90% 乙醇超声 (功率 200 W, 频率 40 kHz, 下同) 萃取 4 h, 过滤, 取滤液用 90% 乙醇定容至 100 mL; 取 1 mL 该溶液用无水乙醇稀释 2 倍, 再以 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

2.3.4 精密度试验 取“2.3.2”项下混合对照品溶液 6 份, 每份 2.0 mL, 分别于 0、24、72 h 时按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 并计算日内精密度和日间精密度的 RSD。结果显示, 柚皮苷和新橙皮苷的日内精密度 RSD 分别为 1.19%、1.23%, 日间精密度 RSD 分别为 2.01%、1.97%, 表明该方法精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取同一未炮制样品粉末 0.1 g, 共 6 份, 分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 然后按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积并按外标法计算柚皮苷和新橙皮苷含量。结果显示, 柚皮苷和新橙皮苷含量的 RSD 分别为 2.31%、2.53%, 表明方法的重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 将“2.3.2”项下混合对照品溶液用 90% 乙醇分别稀释成质量浓度为 5.0、2.5、0.5 mg/mL 的溶液, 再将混合对照品溶液及其稀释溶液于 -80 ℃ 条件下放置 30 d 后, 考察长期稳定性。将上述混合对照品溶液及其稀释溶液于 25 ℃ 条件下放置 8 h 后, 考察短期稳定性。将上述混合对照品溶液及其稀释溶液经 3 次冷冻 (-80 ℃)-解冻 (25 ℃) 循环后, 考察冻融稳定性。结果显示, 在上述实验条件下, 混合对照品溶液及其稀释溶液中柚皮苷和新橙皮苷含量的 RSD 均小于 15%, 表明上述检测样品中柚皮苷和新橙皮苷的稳定性良好。

2.3.7 线性关系的考察 精密称取“2.3.2”项下混合对照品溶液 5 mL, 用无水乙醇稀释成柚皮苷和新橙皮苷质量浓度均分别为 0.500、0.250、0.125、0.063、0.031、0.016 mg/mL 的线性工作溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 记录 2 种成分的峰面积。以各成分质量浓度为横坐标 (x)、峰面积为纵坐标 (y) 进行线性拟合。结果, 柚皮苷的回归方程为 $y=67\ 774\ 134x-171\ 433$ ($r=0.999\ 3$), 线性范围为 0.016~0.500 mg/mL; 新橙皮苷的回归方程为 $y=41\ 914\ 299x+134\ 326$ ($r=0.999\ 0$), 线性范围为 0.016~0.500 mg/mL。这表明上述 2 种成分在各自检测质量浓度范围内的线性关系均良好。

2.3.8 加样回收率试验 取同一未炮制样品粉末 0.1 g, 共 6 份, 分别加入柚皮苷和新橙皮苷质量浓度均为 0.125 mg/mL 的混合对照品溶液 (由“2.3.2”项下混合对照品溶液稀释而得) 5 mL, 超声提取 4 h 后, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取滤液按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积并计算加样回收率。结果显示, 柚皮苷和新橙皮苷的平均加样回收率分别为 99.52%、99.47%, RSD 分别为 1.06%、1.37%。

2.3.9 含量测定 分别取衢枳壳未炮制样品及其炮制品, 按照“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积并按外标法计算各成分含量。每种样品平行操作 3 次, 结果见表 2。

表 2 不同炮制方法制备的衢枳壳炮制品中柚皮苷和新橙皮苷的含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/mL}$)

衢枳壳样品	柚皮苷	新橙皮苷
未炮制样品	4.92±0.53	4.82±0.21
蒸制样品	4.03±0.72	4.00±0.26
煮制样品	4.31±0.84	4.39±0.67
醋炙样品	4.30±0.50	4.08±0.86
酒炙样品	4.15±0.29	3.58±0.43
麸炒样品	4.13±0.46	3.18±0.22
麸制样品	4.61±0.74	4.10±0.80
蜜制样品	4.83±0.37	4.09±0.43

根据 2015 年版《浙江省中药炮制规范》中炮制衢枳壳的相关要求: 按干燥品计算, 衢枳壳药材及其炮制品中柚皮苷不得少于 4.0%, 新橙皮苷不得少于 3.0%。由表 2 可见, 衢枳壳未炮制样品及其炮制品中柚皮苷和新橙皮苷的含量均符合该要求, 其中柚皮苷的含量从高到低依次为未炮制样品>蜜制样品>麸制样品>煮制样品>醋炙样品>酒炙样品>麸炒样品>蒸制样品; 新橙皮苷含量从高到低依次为未炮制样品>煮制样品>麸制样品>蜜制样品>醋炙样品>蒸制样品>酒炙样品>麸炒样品。由此可知, 衢枳壳经炮制后, 其中柚皮苷和新橙皮苷的含量均有所降低, 这与文献[30]报道的结果相一致。在所有炮制方法中, 经蜜制、麸制和煮制的衢枳壳炮制品中的柚皮苷、新橙皮苷含量均高于其他炮制品, 表明这 3 种炮制方法对衢枳壳药效成分的保留效果较好。

2.4 不同炮制方法对衢枳壳抗氧化活性的影响

2.4.1 待测样品的制备 向衢枳壳未炮制样品及其炮制品粉末中加入无水乙醇适量, 均分别制成质量浓度为 2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/mL 的系列混悬液, 于常温密闭环境下静置 24 h 后超声 20 min, 然后以 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 即得待测样品。

2.4.2 不同炮制方法对衢枳壳清除 DPPH 自由基能力的影响 分别取“2.4.1”项下待测样品 1.5 mL, 加入 80 μg/mL DPPH-乙醇溶液 1.5 mL, 反应 30 min, 采用紫外-可见分光光度计于 517 nm 波长处检测吸光度值, 记为 A_1 ; 以无水乙醇替代待测样品为空白组, 同法检测吸光度值, 记为 A_0 。每组实验平行检测 3 次, 再计算衢枳壳

未炮制样品及其炮制品的DPPH自由基清除率,具体计算公式为DPPH自由基清除率(%)=(1-A_i/A₀)×100^[31-32],然后再通过GraphPad Prism 9.0软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。结果显示,衢枳壳未炮制样品及其炮制品对DPPH自由基的IC₅₀拟合情况较好,拟合系数均大于0.90。另外,衢枳壳煮制、麸制、麸炒样品的IC₅₀均较低,表明这3种炮制品对DPPH自由基的清除能力较强。结果见表3。

表3 不同炮制方法对衢枳壳自由基清除能力的影响

衢枳壳样品	清除DPPH自由基		清除ABTS ⁺ 自由基	
	IC ₅₀ /(mg/mL)	拟合系数	IC ₅₀ /(mg/mL)	拟合系数
未炮制样品	16.78	0.973 7	6.94	0.982 0
蒸制样品	12.75	0.966 8	2.03	0.975 7
煮制样品	7.49	0.963 9	1.76	0.983 0
醋炙样品	18.30	0.970 5	8.99	0.932 1
酒炙样品	10.48	0.986 4	4.70	0.995 1
麸炒样品	10.22	0.948 1	5.71	0.982 7
麸制样品	8.37	0.974 9	2.72	0.997 5
蜜制样品	13.40	0.952 5	8.88	0.991 1

2.4.3 不同炮制方法对衢枳壳清除ABTS⁺自由基能力的影响 将7 mmol/L ABTS⁺溶液与2.5 mmol/L过硫酸钾溶液以1:1(体积比)混匀,置于暗处,在室温条件下反应12 h,即得到ABTS⁺混合溶液;用蒸馏水将上述ABTS⁺混合溶液稀释10倍,即得ABTS⁺工作液。取“2.4.1”项下待测样品各1 mL,加入ABTS⁺工作液2 mL,混匀,置于室温条件下反应10 min,采用紫外-可见分光光度计于734 nm波长处检测其吸光度值,记为A_{样品};以无水乙醇代替待测样品,同法检测吸光度值,记为A_{空白};以无水乙醇代替ABTS⁺工作液,同法检测吸光度值,记为A_{对照}。每组实验平行检测3次,计算衢枳壳未炮制样品及炮制品的ABTS⁺自由基清除率,具体计算公式为ABTS⁺清除率(%)=[1-(A_{样品}-A_{对照})/A_{空白}]×100^[33-34],再计算IC₅₀。结果显示,衢枳壳煮制、蒸制和麸制样品的IC₅₀均较低,表明上述3种衢枳壳炮制品对ABTS⁺自由基较为敏感,可在较低浓度下达到清除ABTS⁺自由基的目的。结果见表3。

2.4.4 不同炮制方法对衢枳壳总还原力的影响 分别取“2.4.1”项下待测样品(质量浓度均为16 mg/mL)2.5 mL于试管中,加入0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(pH6.6)2.5 mL,混匀;再加入1%铁氰化钾溶液2.5 mL,置于50℃水浴条件下反应20 min后,迅速置于冰水中,加入10%三氯化铁溶液2.5 mL,混匀,静置;取上清液2.5 mL,加入1%三氯化铁溶液0.5 mL和蒸馏水2.5 mL,混匀,以4 000 r/min离心15 min,取上清液,采用紫外-可见分光光度计于700 nm波长处测定吸光度值^[35]。以抗坏血酸代替待测样品为对照组,同法检测。吸光度值越高,表明样品的总还原力越强^[35]。每组实验平行检测3次。采用SPSS 17.0统计软件对实验数据进行Duncan's多重差异显著性分析,检验水准α=0.05。结果显示,与衢枳壳未炮制样品比较,其酒炙和蜜制样品的吸光度值均显

著降低(P<0.05)。由此可知,与衢枳壳酒炙和蜜制样品相比,衢枳壳未炮制样品及其他炮制品均具有较好的总还原能力。结果见表4。

表4 不同炮制方法对衢枳壳总还原能力的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)

衢枳壳样品	吸光度值	衢枳壳样品	吸光度值
未炮制样品	0.234±0.079 ^a	麸炒样品	0.168±0.065 ^a
蒸制样品	0.144±0.058 ^a	麸制样品	0.140±0.050 ^a
煮制样品	0.146±0.064 ^a	蜜制样品	0.086±0.019 ^{ab}
醋炙样品	0.147±0.049 ^a	抗坏血酸	1.159±0.039 ^b
酒炙样品	0.121±0.034 ^{ab}		

a:与抗坏血酸比较,P<0.05;b:与未炮制样品比较,P<0.05

3 讨论

浙江衢州地区产出的衢枳壳已入选“浙新八味”药材培育名单,然而目前衢枳壳在枳壳销售市场中所占份额较低,且相关研究较少。经笔者查询发现,在2015年版《浙江省中药炮制规范》中收录了衢枳壳未炮制样品及其麸炒、麸制、蜜制样品的炮制方法和质量评价标准^[1]。因此,在此基础上,本研究根据该炮制规范并结合2020年版《中国药典》中所述的炮制方法^[1],采用蒸制、煮制、醋炙、酒炙等7种方法对衢枳壳未炮制样品进行炮制并考察其炮制品的品质。

本研究结果显示,尽管经过不同方法炮制后,衢枳壳炮制品中柚皮苷、新橙皮苷的含量与其未炮制样品相比均有所下降,但仍符合2015年版《浙江省中药炮制规范》中炮制衢枳壳的相关要求。经蜜制、麸制和煮制后的衢枳壳炮制品中柚皮苷含量较高,分别为(4.83±0.37)、(4.61±0.74)、(4.31±0.84) mg/mL,经过煮制、麸制和蜜制的衢枳壳炮制品中新橙皮苷含量较高,分别为(4.39±0.67)、(4.10±0.80)、(4.09±0.43) mg/mL。进一步研究不同炮制方法对衢枳壳抗氧化活性的影响,结果发现,衢枳壳未炮制样品及其炮制品均具有一定的清除自由基能力以及总还原力,但其对DPPH自由基和ABTS⁺自由基的IC₅₀存在较大差异。衢枳壳未炮制样品及其炮制品对ABTS⁺自由基的IC₅₀均小于对DPPH自由基的IC₅₀,这可能是由于衢枳壳中水溶性和醇溶性的抗氧化活性成分均可被ABTS⁺自由基清除法检测,而DPPH自由基清除法仅针对有机溶剂体系^[36-37]。经煮制、麸制和麸炒的衢枳壳炮制品对DPPH自由基的清除能力较好(IC₅₀分别为7.49、8.37、10.22 mg/mL),这可能是由于衢枳壳经过上述3种方法炮制后,样品中的抗氧化活性成分能够提供更多电子与DPPH自由基的孤对电子配对,使吸光度值降低。经煮制、蒸制、麸制后的衢枳壳炮制品对ABTS⁺自由基的清除能力较好(IC₅₀分别为1.76、2.03、2.72 mg/mL)。

综上所述,衢枳壳经炮制后的药效指标成分含量均有所降低,但均符合2015年版《浙江省中药炮制规范》相关要求,且部分炮制品的抗氧化活性较未炮制样品有所增强。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版,2020:385.
- [2] 赵维良,黄琴伟,张文婷,等.中药材衢枳壳的基源植物研究[J].中国现代应用药学,2019,36(13):1652-1655.
- [3] 赵维良.法定药用植物志:华东篇:第1册[M].北京:科学出版社,2018:1353.
- [4] 浙江省食品药品监督管理局.浙江省中药炮制规范[S].北京:中国医药科技出版社,2015:110-121.
- [5] 许守超,陈屠梦,包绍印,等.衢枳壳的药理作用研究进展[J].中国高科技,2019(10):26-28.
- [6] 杨波,汪丽霞,王满姬.常山胡柚衢枳壳产业发展概况[J].浙江柑橘,2019,36(2):7-9.
- [7] 叶爱琴,蒋剑平,李润,等.衢枳壳黄酮对高脂血症金黄地鼠降血脂作用及其机制研究[J].中国现代应用药学,2020,37(16):1938-1946.
- [8] 包绍印,许守超,陈天翔,等.基于遗传神经网络的衢枳壳中橙皮苷提取工艺优选的研究[J].中药材,2018,41(11):2632-2635.
- [9] 刘小娟,方月娟,夏道宗,等.衢枳壳总黄酮提取工艺的优化及其抗氧化活性[J].中成药,2020,42(7):1687-1691.
- [10] LI C, GU H, DOU H, et al. Identification of flavanones from peel of *Citrus Changshan-Huyou* Y.B.chang, by HPLC-MS and NMR[J]. Eur Food Res Technol, 2007, 225(5/6):777-782.
- [11] 陈嘉景,彭昭欣,石梅艳,等.柑橘中类黄酮的组成与代谢研究进展[J].园艺学报,2016,43(2):384-400.
- [12] 骆杨丽,曲玮,梁敬钰.柑橘属植物化学成分和药理作用研究进展[J].海峡药学,2012,24(7):1-6.
- [13] 裘美燕,冯杉,王婷婷,等.柑橘属药用植物香豆素类化学成分研究进展[J].化工管理,2018(11):9-10.
- [14] 朱春华,周先艳,沈正松,等.柑橘降血脂活性成分及机理研究进展[J].公共卫生与预防医学,2018,29(2):74-79.
- [15] 王笑笑,王思为,方月娟,等.衢枳壳不同组分体外降糖活性研究及4种黄酮组分含量分析[J].中国现代应用药学,2017,34(10):1418-1423.
- [16] 郑慧,王思为,钟松阳,等.衢枳壳提取物改善2型糖尿病db/db模型小鼠肾脏氧化损伤的作用研究[J].浙江中西医结合杂志,2020,30(2):105-108,178.
- [17] JIANG J P, YAN L, SHI Z, et al. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Qu Zhi Ke (peel of *Citrus Changshan-Huyou*) on non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of NF- κ B and MAPKs[J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153082.
- [18] SHI Z, LI T, LIU Y W, et al. Hepatoprotective and anti-oxidative effects of total flavonoids from qu Zhi Qiao (fruit of *Citrus paradisi* cv.Changshanhuoyou) on nonalcoholic steatohepatitis *in vivo* and *in vitro* through Nrf2-ARE signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 483.
- [19] 庞春蓉.麸炒和麸烘炮制枳壳对其质量影响的对比研究[J].内蒙古中医药,2014,33(36):88,93.
- [20] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版,2020:31,114,234.
- [21] 朱本占,毛莉,范瑞梅,等.天然抗氧化剂麦角硫因保护铜所致DNA和蛋白质氧化损伤的作用机理[J].科学通报,2011,56(27):2283-2288.
- [22] 吴焯,王强,修成奎,等.人参-三七-川芎提取物延缓过氧化氢诱导的内皮细胞衰老中线粒体氧化应激的作用[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(24):17-24.
- [23] 刘芳,常钰玲,宋艳梅,等.氧化还原调节、有氧糖酵解、自噬在肿瘤中的作用及其相互关系[J].中国生物制品学杂志,2022,35(2):239-245,250.
- [24] 麻恒,傅攀峰,邓在春,等.线粒体相关的慢性阻塞性肺疾病氧化应激机制和抗氧化治疗的研究进展[J].现代实用医学,2021,33(12):1675-1677.
- [25] 刘丹,孙厚良,李润琴.柚皮甙抗氧化活性与心血管疾病关系的研究进展[J].中国民族民间医药,2012,21(13):34,36.
- [26] 徐坤勇,郭建忠,颜娟,等.响应曲面法优化枳壳中柚皮苷与新橙皮苷的提取工艺及抗氧化研究[J].现代中药研究与实践,2021,35(1):66-72.
- [27] 梁真.中药炮制“火候”刍议[J].西部中医药,2018,31(1):25-27.
- [28] 卢芳国,张世鹰,吴治彦,等.中药煎煮的容器、溶媒、时间、火候因素[J].中医杂志,2016,57(1):78-80.
- [29] 张金莲.“风眼片枳壳”缓燥炮制机理研究[D].武汉:湖北中医药大学,2018.
- [30] 刘雅莉,邓桂珠,贤明华,等.枳壳炮制前后指纹图谱及主要黄酮类成分含量的变化[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(2):113-118.
- [31] 王燕萍,贾旭森,王艳,等.不同干燥方式对淫羊藿黄酮类成分含量及抗氧化活性影响[J].中草药,2021,52(14):4193-4200.
- [32] 刘仙俊,李文华,孙红艳,等.橘子不同部位活性成分含量及其体外抗氧化能力研究[J].食品研究与开发,2021,42(17):13-18.
- [33] 秦汝兰,王丹萍,苗东禹,等.不同干燥方法对牡丹草化学成分及抗氧化活性的影响[J].北方园艺,2021(16):123-129.
- [34] 张华,周志钦,席万鹏.15种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较[J].食品科学,2015,36(11):64-70.
- [35] 何晓梅,陈存武,宋程,等.大别山栽培白及不同部位总酚含量测定及其抗氧化活性研究[J].中成药,2022,44(2):656-660.
- [36] 路艳珍.苹果叶中活性成分的分离分析及活性评价研究[D].北京:北京化工大学,2019.
- [37] 郭丹.西红花花瓣总黄酮的提取纯化及抗氧化活性的研究[D].杭州:浙江工业大学,2016.

(收稿日期:2021-10-19 修回日期:2022-02-12)

(编辑:唐晓莲)