

炮制对化州柚花柠檬苦素类含量及抑菌功效影响

【摘要】目的：探究利用蒸制法和发酵法炮制化州柚花，对比炮制前后活性成分含量变化以及抑菌功效影响，以期扩大化州柚花的应用范围。**方法：**采用 HPLC 法测定活性成分柠檬苦素和诺米林的含量，以微量酶标仪法评价抑菌功效。**结果：**经炮制后，化州柚花各炮制品的柠檬苦素和诺米林含量及抑菌率存在显著差异，蒸制 1h、2h 可提高化州柚花柠檬苦素含量，酵母 4d、8d、12d、平菇 4d、8d、12d 和毛霉 8d、12d 发酵品对马拉色菌抑制效果对比生品都有所提升，毛霉 8d、12d 和平菇 12d 发酵品对痤疮丙酸杆菌的抑制效果对比生品有所提升。**结论：**适当的蒸制可提高化州柚花的柠檬苦素的含量，为了提高化州柚花对马拉色菌和痤疮丙酸杆菌的抑制效果可选用毛霉菌发酵 12d。

【关键词】化州柚花；蒸制；发酵；柠檬苦素；含量测定；抑菌

Effect of concoction on the content of citrullinated bitters and antibacterial efficacy of *Citrus grandis* 'Tomentosa' Flos

[Abstract]**Objective:**To investigate the effect of using steam and fermentation methods to concoct *Citrus grandis* 'Tomentosa' Flos, compare the changes in the content of active ingredients before and after concoction and the effect of antibacterial efficacy, in order to expand the application of *Citrus grandis* 'Tomentosa' Flos. **Methods:**The content of the active ingredients, citrulline and nomilin, was determined by HPLC and the antibacterial efficacy was evaluated by microenzymatic standard method.**Results:** After concoction, there were significant differences in the citrulline and nomillin contents and antibacterial efficacy of each concoction of *Citrus grandis* 'Tomentosa' Flos.Steaming for 1h and 2h can increase the content of citrulline of *Citrus grandis* 'Tomentosa' Flos, yeast 4d, 8d, 12d, flat mushroom 4d, 8d, 12d and Trichoderma 8d, 12d fermented products have improved the inhibition effect of *Malassezia* compared with raw products, Trichoderma 8d, 12d and flat mushroom 12d fermented products have improved the inhibition effect of *Propionibacterium acnes* compared with raw products **Conclusion:** Proper steaming can improve the content of citrinin of *Citrus grandis* 'Tomentosa' Flos. In order to improve the inhibitory effect of *Citrus grandis* 'Tomentosa' Flos on *Malassezia* and *Propionibacterium acnes* can be fermented with Trichoderma for 12d.

[Keywords]*Citrus grandis* 'Tomentosa' Flos steaming fermentation
Limonin content determination bacterial inhibition

目 录

1 前言	1
2 材料与仪器	2
2.1 实验仪器.....	2
2.2 实验材料和试剂.....	2
2.3 供试菌种.....	3
3 实验方法	4
3.1 化州柚花炮制工艺.....	4
3.1.1 发酵法	4
3.1.2 蒸制法	4
3.2 柠檬苦素和诺米林 HPLC 含量测定.....	5
3.2.1 样品溶液的配制	5
3.2.2 对照品混合溶液的配制	5
3.2.3 色谱条件	5
3.2.4 标准曲线的绘制	5
3.2.5 精密度实验	5
3.2.6 重复性实验	5
3.2.7 稳定性实验	6
3.2.8 加样回收率实验	6
3.2.9 样品的含量测定	6
3.3 抑菌实验.....	6
3.3.1 化州柚花提取液制备	6
3.3.2 培养基和溶液的配制	6
3.3.3 菌悬液的制备	7

3.3.4 样品液浓度梯度稀释	7
3.3.5 96 孔细胞培养板的准备	8
3.3.6 微量酶标仪法的建立	8
4 实验结果	9
4.1 炮制品外观特征.....	9
4.1.1 蒸法	9
4.1.2 发酵法	9
4.2 柠檬苦素和诺米林 HPLC 含量测定.....	9
4.2.1 系统适用性实验	9
4.2.2 标准曲线绘制的结果	10
4.2.3 精密度实验结果	11
4.2.4 重复性实验结果	11
4.2.5 稳定性实验结果	12
4.2.6 加样回收率实验结果	12
4.2.7 化州柚花及其炮制品种柠檬苦素、诺米林的含量测定结果	13
4.3 抑菌实验.....	14
4.3.1 抑制马拉色菌实验结果	14
4.3.2 抑制痤疮丙酸杆菌实验结果	15
5 讨论和结论	18
5.1 讨论.....	18
5.1.1 化州柚花蒸法	18
5.1.2 化州柚花发酵法	18
5.2 结论.....	19
参考文献	20

致谢 21

附录 A 蒸制化州柚花图 22

附录 B 化州柚花发酵生长情况图 23

1 前言

化州柚花，是芸香科柑橘属化州柚(*Citrus grandis* ‘*Tomentosa*’)的干燥花蕾，别名橘红花，柚花，历代本草著作中大多记载其未成熟或近成熟的干燥外层果皮，即化橘红的药用价值，对其花的记载甚少，首次提及柚花于《本草纲目》：“柚，树、叶皆似橙……其花甚香”^[1]。化州柚花的成分主要是黄酮类^[2]、挥发油^[3]以及柠檬苦素类^[4]。现代有关化州柚花化学成分的研究主要是对比化州柚的叶、果皮、花的研究，孙国玲^[5]等的研究表明柠檬苦素在柚花中的含量相较于果更高。柠檬苦素类化合物 (Limonoids)是一系列含呋喃环的三萜类化合物，具有高度生物活性，常见柠檬苦素类似物有：柠檬苦素、诺米林等。柠檬苦素类的提取方法主要有超声辅助提取法^[6]、溶剂浸提法^[7]、超临界萃取法^[8]，常用提取溶剂主要是乙醇、二氯甲烷、丙酮等。柠檬苦素类含量测定方法主要有紫外分光光度法^[9]、HPLC 色谱法^[10]等。

本实验通过蒸制和发酵化州柚花，研究炮制对化州柚花活性成分含量变化以及抑制马拉色菌和痤疮丙酸杆菌功效影响，为化州柚花的开发应用提供科学依据，有较好的研究意义。

2 材料与仪器

2.1 实验仪器

本实验所用主要仪器如下（见表 1）。

表 1 实验仪器

仪器名称	型号	生产厂家
万分之一电子天平	XB 220A	深圳市深博瑞仪器仪表有限公司
二两装高速中药粉碎机	111B	瑞安市永历制药机械有限公司
超声清洗器	KQ-500	昆山市超声仪器有限公司
超净工作台	HCB-1300V	海尔生物医疗股份有限公司
多功能微孔板读数仪 (酶标仪)	Varioskan LUX	赛默飞世尔科技
送风定温恒温箱	DKL610C	重庆雅马拓科技有限公司
恒温恒湿箱	SPX-250C	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
手提式压力蒸汽灭菌器	JSM280-18	宁波久兴医疗器械有限公司
水浴恒温振荡器	SHA-B	常州奥华仪器有限公司
高效液相色谱仪	Thermo U3000	赛默飞世尔科技（中国）有限公司

2.2 实验材料和试剂

2.2.1 实验材料

本实验所用的化州柚花药采购于中山市上橘堂药业有限公司，经广东药科大学中山校区田素英高级实验师鉴定是化州柚花（*Citrus grandis* ‘Tomentosa’）

Flos)。马铃薯购于中山市和大福百货商场。鲁氏毛霉（*Mucor rouxianus*，批号 SHBCCD81891）由上海暄科生物科技有限公司提供，酿酒酵母（*Saccharomyces Cerevisiae*，批号 ATCC9763）由广东环凯微生物科技有限公司提供，平菇（抗病 265），由武汉周玉麟食用菌研究所提供。

2.2.2 实验试剂

本实验所用主要试剂如下（见表 2）。

表 2 主要试剂

试剂名称	规格	批号	生产厂家
柠檬苦素对照品	20mg	201019	成都值标化纯生物技术有限公司
诺米林对照品	20mg	200412	成都值标化纯生物技术有限公司
酮康唑	25g	C14617899	上海麦克林生化科技有限公司
注射用青霉素钠	0.48g	06141205	北京悦康凯悦制药有限公司
石油醚	AR,500mL	20220301	天津市大茂化学试剂厂
二氯甲烷	AR,500mL	2020070111	天津富宇精细化工有限公司
甲醇	AR,500mL	2022100111	广东广试试剂科技有限公司
甲醇	HPLC,4L	2022100131	广州化学试剂厂
95%乙醇	AR,500mL	2021030219	广州化学试剂厂
乙腈	HPLC,4L	21101130G11 9	天津市彪仕奇科技发展有限公司
酵母浸膏	BR,500g	20210326	南京全隆生物技术有限公司
蛋白胨	BR,250g	2105212	西陇科学有限公司
琼脂	BR,500g	200808003	广东环凯微生物科技有限公司

可溶性淀粉	AR,500g	20200830	永太试剂
L-半胱氨酸	100g	02702425	江苏艾康
乙酸钠	AR,500mL	20200427	天津市福晨化学试剂厂
牛肉膏	100g	RH411595	罗恩试剂
磷酸氢二钠	AR,500g	20130107	天津市福晨化学试剂厂
磷酸二氢钠	AR,500g	20140326	天津市福晨化学试剂厂
橄榄油	AR,500mL	20210425	国药集团化学试剂有限公司
葡萄糖	AR,500g	20210810	国药集团化学试剂有限公司
麦芽糖	BR,25g	20210322	国药集团化学试剂有限公司

2.3 供试菌种

本实验所使用菌种如下：马拉色菌(*Malassezia furfur*)、痤疮丙酸杆菌(*Cutibacterium acnes*)，由广东药科大学中山校区微生物实验室提供。

3 实验方法

3.1 化州柚花炮制工艺

3.1.1 发酵法

培养基配制 选择马铃薯—葡萄糖培养基^[11]，马铃薯削皮，切成小块，称量 40g 左右置于 500mL 烧杯中，加蒸馏水 200mL，煮沸 30min 即可。用 4 层纱布趁热过滤，向马铃薯滤液中加入 4g 葡萄糖，补充蒸馏水至 200mL，即得液状培养基，倒入 500mL 锥形瓶中，在 205.8kPa，120℃条件下，高压蒸汽灭菌 30 分钟，并标记编号后备用。

活化菌株取 1g 安琪酵母，置于 50mL 马铃薯—葡萄糖液体培养基中，30℃，转速 120r·min⁻¹ 摇床活化培养 24h；毛霉菌无需活化。将平菇菌种从冰箱保鲜层取出后，置于水浴锅 25℃初步活化 5 分钟。将平菇菌种接种于马铃薯—葡萄糖培养基上，平菇置于温度 30℃、湿度 30%~70%避光活化培养 7 天。

药性基质配制 称取化州柚花粉末（过筛 65 目）27 份，每份约 20g 于组培瓶中，以药材一水（1:3）比例加水混匀。在 205.8kPa，120℃条件下，高压蒸汽灭菌 30min，取出后备用。

接种发酵 在无菌环境下，挑取已活化一周的平菇菌丝各 6 份，接种在药性基质中。取出已活化 24 小时的酵母菌液，吸取 6mL 菌液接种于药性基质中。取 4g 毛霉菌粉，兑入 80mL 无菌水，搅拌混匀，过滤得菌液，取 6mL 菌液加入药性基质中。

发酵后处理将发酵后的药性基质连同菌丝体一同挖出，置于玻璃培养皿中平铺散开，经鼓风干燥箱 55℃干燥 4h 后取出（期间每隔 15 分钟翻散粉末以防假干），再研末过筛 65 目，分装标记备用。

3.1.2 蒸制法

称取化州柚花 3 份，每份约 10g 平铺于玻璃培养皿中，向蒸锅中加水，将装有化州柚花的 3 个培养皿放置于蒸架上，盖上锅盖，武火加热至“圆气”后，转文火并开始计时，将化州柚花在 1、2、3h 依次取出，做 3 次平行对照。待所有化州柚花蒸好后，一同置于鼓风干燥箱中以 55℃干燥 4 小时。取出化州柚花后粉碎过筛 65 目，分装标记即得样品。

3.2 柠檬苦素和诺米林 HPLC 含量测定

3.2.1 样品溶液的配制

将化州柚花对照药材与 12 种化州柚花炮制品粉碎，过 65 目筛，精密称量 0.5g 于 50mL 具塞锥形瓶中，精密移取 25mL 石油醚，以频率 40kHz、功率 400w 超声提取 30min，过滤，保留滤渣并挥干，向滤渣中加入 25mL

二氯甲烷，以频率 40kHz、功率 400w 超声提取 30min，过滤，并用二氯甲烷少量多次润洗滤渣，收集滤液，滤液于 60℃蒸干，用甲醇溶解并定容至 5mL，经 0.45μm 微孔滤膜滤过，作为供试品溶液。

3.2.2 对照品混合溶液的配制

取柠檬苦素对照品和诺米林对照品，精密称定，用甲醇溶解，配制成 0.08mg·mL⁻¹ 的对照品混合母液。

3.2.3 色谱条件

色谱柱: HypersilODS₂C₁₈ 色谱柱 (4.6mm×250mm); 流动相: 乙腈 A, 0.1% 磷酸水溶液 B (55%A-45%B); 检测波长: 210nm; 进样量: 5μL; 流速: 1mL·min⁻¹; 柱温 35℃。

3.2.4 标准曲线的绘制

以柠檬苦素和诺米林为指标性成分，精密移取“3.2.2”项配制的对照品混合溶液 1、2、3、4、5、6mL 于 10mL 容量瓶中，加甲醇定容至刻度线，按“3.2.3”项下的色谱条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制诺米林和柠檬苦素的标准曲线。

3.2.5 精密度实验

取“3.2.2”项配制的对照品混合溶液，按“3.2.3”项下的色谱条件测定，平行进样 6 次，测得柠檬苦素、诺米林对照品的峰面积，计算 RSD 值 (%)。

3.2.6 重复性实验

精密称取 0.5g 化州柚花粉末 6 份，按“3.2.1”项下操作得样品液，以“3.2.3”项下色谱条件测定柠檬苦素和诺米林的峰面积，计算 RSD (%)，考察本实验所用提取方法得到的样品液是否具有良好重复性。

3.2.7 稳定性实验

精密称取 0.5g 化州柚花粉末，按“3.2.1”项下操作获得供试液，分别在

0、4、8、12、16、24h 以“3.2.3”项下色谱条件测定柠檬苦素和诺米林的峰面积，计算 RSD 值（%），考察稳定性。

3.2.8 加样回收率实验

精密称取 6 份化州柚花粉末于 50mL 碘量瓶中，分别加入合适量的柠檬苦素和诺米林对照品，依据“3.2.1”项下操作，制得 6 份供试液。按“3.2.3”项下色谱条件测定峰面积。依据“3.2.4”项下绘制所得标准曲线，计算测得含量，计算回收率与 RSD 值（%），评价本实验所用方法样品回收情况。

3.2.9 样品的含量测定

将化州柚花对照药材、3 份蒸制样品（蒸 1、2、3h）和 12 份发酵品（以酵母菌、平菇菌、毛霉菌各发酵（4、8、12d）按“3.2.1”项下操作获得样品液，做 3 组平行，按“3.2.3”项下色谱条件测定柠檬苦素与诺米林对应峰面积，依据“3.2.4”项下绘制所得标准曲线，计算测得含量。

3.3 抑菌实验

3.3.1 化州柚花提取液制备

将化州柚花对照药材与 12 种化州柚花炮制品粉碎，过 65 目筛，精密称量 0.25g 于 50mL 碘量瓶中，精密移取 10mL 60%乙醇，以频率 40kHz、功率 400w 超声提取 30min，过滤，取续滤液，121℃高压灭菌 15min，得质量浓度为 25mg·mL⁻¹ 的化州柚花及各炮制品母液。

3.3.2 培养基和溶液的配制

马拉色菌液体培养基配制：用电子天平称量麦芽糖 4g，酵母浸膏 0.4g，葡萄糖 4g，蛋白胨 4g，橄榄油 4g 于锥形瓶中，加入 200mL 无菌双蒸水加热溶解后，121℃高压灭菌 15min 备用。

马拉色菌固体培养基：用电子天平称量麦芽糖 4g，蛋白胨 1g，琼脂 2g，酵母浸膏 0.3g，单硬脂酸甘油酯 0.2g 于锥形瓶中，加入无菌双蒸水 90mL，甘油

10mL 加热溶解后，121℃高压灭菌 15min 备用。

痤疮丙酸杆菌液体培养基：用电子天平称量胰蛋白胨 2g，葡萄糖 1g，酵母浸膏 0.6g，可溶性淀粉 0.2g，牛肉膏 2g，氯化钠 1g，乙酸钠 0.6g，L-半胱氨酸 0.1g 于锥形瓶中，加入 200mL 无菌双蒸水加热溶解，121℃高压灭菌 15min 备用。

磷酸盐缓冲溶液配制：称取 35.8gNa₂HPO₄·12H₂O 溶于适量无菌双蒸水中并定容至 500mL，称取 31.202gNaH₂PO₄·2H₂O 溶于适量无菌双蒸水中并定容至 1000mL，通过调配两种溶液的比例，调 pH 至 6.8，室温保存备用。

酮康唑对照液配制：精密称量 0.008g 酮康唑，用适量的 PBS 溶液溶解，定容至 20mL，质量浓度为 0.4mg·mL⁻¹。

青霉素钠溶液配制：精密称量 0.01g 青霉素钠，用适量的 PBS 溶液溶解，定容至 50mL，质量浓度为 0.2mg·mL⁻¹。

3.3.3 菌悬液的制备

从冰箱中拿出两种菌种，在超净工作台中将菌种接种于相应的固体培养基中，接种后放入恒温恒湿培养箱中培养，马拉色菌在 28℃培养 48h，痤疮丙酸杆菌在 37℃厌氧培养 72h。菌液培养完成后在超净工作台上用接种环取培养板中的单菌落于马拉色菌和痤疮丙酸杆菌对应的液体培养基中，将装有菌液的液体培养基置于水浴恒温振荡器中培养，设置振荡器的温度为 30℃，转速为 100r·min⁻¹，痤疮丙酸杆菌厌氧培养 72h，马拉色菌培养 48h，即得菌液。在质控要求范围内，根据原菌液的浓度稀释至 10⁸CFU·mL⁻¹ 即可。

3.3.4 样品液浓度梯度稀释

采用二倍递减稀释法，取 90 支 5mL 灭菌试管，分为 15 组，分别为：1 组生品，12 组炮制品，2 组阳性对照（酮康唑和青霉素钠），每组 6 支试管，标号 1~6 号，每组每个试管中加入 2mL 无菌 PBS 溶液，另在每组 1 号试管中加入 2mL 样品液，摇匀，移取 2mL 混合液加入 2 号试管，以此类推，重复上述操作至 6 号试管。最终生品及各炮制品的浓度为 0.3906mg·mL⁻¹~12.5000mg·mL⁻¹，酮康唑浓度为 0.00625mg·mL⁻¹~0.20000mg·mL⁻¹，青霉素钠浓度为

$0.003125\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 0.1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.3.5 96 孔细胞培养板的准备

本次实验所需微量 96 孔细胞培养板全部用紫外灯照射 30min 左右后，进行如下操作：

A1:在每一列 1~6 号从低浓度到高浓度依次用移液枪加入 200 μL 样品液，然后再加入 200 μL 菌液；

A2:在每一列 7~12 号孔从低浓度到高浓度依次用移液枪加入 200 μL 样品液，然后再加入 200 μL 灭菌 PBS 溶液。

B1:在每一列 1~6 号用移液枪加入 200 μL 菌液和 200 μL 灭菌 PBS 溶液；

B2:在每一列 7~12 号孔用移液枪加入 200 μL 灭菌液体培养基和 200 μL 灭菌 PBS 溶液。按上述操作设置 3 个平行组。

阳性对照液：分别在两块细胞培养板中加入 3.3.2 操作中的酮康唑梯度稀释液和青霉素钠梯度稀释液。

3.3.6 微量酶标仪法的建立

3.3.5 中所得 96 孔细胞培养板，测定抑制马拉色菌的细胞培养板板于 32℃ 培养 48h，测定抑制痤疮丙酸杆菌的细胞培养板于 37℃ 培养 72h 后，测定 530nm 波长处的光密度,重复 3 次，并计算抑制率（式 1）。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{A1 - A2}{B1 - B2}\right) \times 100\% \quad (\text{式 1})$$

式 1 中：A1:样品组含菌液吸光值；A2:样品组不含菌液吸光值；B1：空白组含菌液吸光值；B2：空白组不含菌液吸光值。

表 3 反应液组成

单位 (μL)	A1	A2	B1	B2
样品液	200	200	0	0

菌液	200	0	200	0
磷酸盐缓冲液	0	0	200	200
液体培养基	0	200	0	200
总体积	400	400	400	400

4 实验结果

4.1 炮制品外观特征

4.1.1 蒸法

蒸制后的化州柚花见附录 A 中图 A1，随着蒸制时间增长，化州柚花表面颜色逐渐加深。经品尝，蒸制 1h 的炮制品苦味更加明显，且缠绕舌上，经久不退。

4.1.2 发酵法

按“3.1.1”项方法发酵化州柚花，培养情况见附录 B 中图 B1、图 B2、图 B3。

酵母发酵 接种酵母菌菌液后，在 4d、8d、12d 发酵过程中药性基质外观没有明显的改变，而药性基质一直呈湿润状态，说明菌液与药性基质充分混匀，随着发酵天数的增加，其醇香味逐渐浓郁，在烘干粉末过程中，有较明显的黏手感。

毛霉发酵 接种毛霉菌液后，4d 发酵品中，药性基质表面迅速布满黄白色菌丝，说明毛霉菌在化州柚花基质上生长良好，且活性强。在 8d、12d 发酵品中，菌丝包裹了整个药性基质，菌丝逐渐形成菌块，颜色加深成棕褐色，说明毛霉菌在生长过程中产生一些代谢产物，使某些成分发生变化，其发酵品在烘干过程中有较重的氨醇味。

平菇发酵 接种平菇菌种后，在 4d 发酵品中，药性基质表面开始长出一颗颗平菇子实体，外层呈棉絮状；在 8d 发酵品中，菌丝体增大，开始大量覆盖在表面，有些部分可见黄绿色细粉产生；在 12d 发酵品中，菌丝分布均匀，并有爬壁现象，打开瓶盖皆可闻到平菇特有的芳香味。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。

如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/947045165200006062>