

化橘红提取物的制备工艺优化及其降脂作用

李锦坤¹, 金刚亮¹, 王艳慧², 冼少华³, 赵俊鑫¹, 余俊朗¹, 刘浩帆¹, 谭耀康¹, 温骏炜¹, 熊平^{1*}
(1. 华南农业大学材料与能源学院, 广东广州 510642)(2. 广州市香雪制药股份有限公司, 广东广州 510663)(3. 国药集团德众(佛山)药业有限公司, 广东佛山 528000)

摘要: 采用单因素试验和 L₉(3⁴) 正交试验设计法, 以加水量、提取次数、提取时间和提取温度为考察对象, 以化橘红柚皮苷质量分数和干浸膏质量分数为考察指标, 确定化橘红最佳提取工艺参数; 并通过饲喂高脂饲料建立混合型高脂血症小鼠模型, 探讨化橘红提取物对实验小鼠高脂血症的降脂作用。结果表明, 化橘红水提物的优选制备工艺参数为: 以水作为溶媒, 料液比 1:30, 提取温度 70 ℃, 提取 3 次, 每次 60 min。在此工艺条件下, 化橘红水提物柚皮苷质量分数为 56.15 mg/g, 传统工艺主要以乙醇为溶媒, 此工艺可为化橘红水提提供参考。与模型组相比, 化橘红高剂量组胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平分别降低了 47.11%, 36.84% 和 65.18%, 肝指数和 Lee's 指数显著降低, 血清谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 水平分别降低了 56.68% 和 56.63%, 且可以改善肝细胞肿胀变性, 减轻脂滴沉积以及脂肪空泡形成。结果说明, 化橘红提取物对混合型高脂血症模型小鼠有降脂作用。

关键词: 化橘红; 提取物; 工艺优化; 降血脂

文章编号: 1673-9078(2024)10-250-258

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.0892

Optimization of the Preparation of *Exocarpium Citri grandis* Extract and Its Lipid Level-lowering Effects

LI Jinkun¹, JIN Gangliang¹, WANG Yanhui², XIAN Shaohua³, ZHAO Junxin¹, YU Junlang¹, LIU Haofan¹,
TAN Yaokang¹, WEN Junwei¹, XIONG Ping^{1*}

(1. College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510663, China)

(3. Sinopharm Group Dezhong (Foshan) Pharmaceutical Co. Ltd., Foshan 528000, China)

Abstract: The optimal extraction conditions of *exocarpium Citri grandis* were determined using a single-factor test and an orthogonal test. The effects of water addition, extraction frequency, extraction time, and extraction temperature were investigated; the mass fractions of naringin and dry extract were used as evaluation indexes. Furthermore, a combined hyperlipidemia mouse model was established by feeding mice a high-fat diet to investigate the lipid level-lowering effects of *exocarpium Citri grandis* extract. The results showed that the optimal conditions for preparing the aqueous extract of

引文格式:

李锦坤, 金刚亮, 王艳慧, 等. 化橘红提取物的制备工艺优化及其降脂作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(10): 250-258.

LI Jinkun, JIN Gangliang, WANG Yanhui, et al. Optimization of the preparation of *exocarpium Citri grandis* extract and its lipid level-lowering effects [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 250-258.

收稿日期: 2023-07-23

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1706702)

作者简介: 李锦坤 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品, E-mail: 1401645119@qq.com; 共同第一作者: 金刚亮 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品与分子药理学, E-mail: 1522088743@qq.com

通讯作者: 熊平 (1969-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 分子药理学及中药药理学, E-mail: xp0000542003@scau.edu.cn

exocarpium *Citri grandis* were as follows: solvent, water; solid-liquid ratio, 1:30; and extraction temperature, 70 °C; the extraction was performed three times (60 minutes each time). Under these conditions, the naringin content in the aqueous extract of exocarpium *Citri grandis* was 56.15 mg/g. Traditional processes mainly use ethanol as the solvent; this process can provide a reference for aqueous extraction of Exocarpium Citri Grandis. The high-dose exocarpium *Citri grandis* group showed 47.11%, 36.84%, and 65.18% lower levels of TC, TG, and LDL-C, respectively, significantly lower liver index and Lee's index values, and 56.68% and 56.63% lower serum ALT and AST levels, respectively, than the model group. The high-dose group also showed milder liver cell swelling and degeneration and reduced lipid droplet deposition and fat vacuole formation. The results indicate that the exocarpium *Citri grandis* extract exerts lipid level-lowering effects on mice with combined hyperlipidemia.

Key words: exocarpium *Citri grandis*; extract; process optimization; lipid-lowering

化橘红 (*Citri grandis* Exocarpium), 又称化州橘红、七爪红、毛橘红等, 最早记载于《本草纲目拾遗》, 为芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* 'Tomentosa' 或柚 *C. grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥外层果皮, 包括正毛、副毛、光青、光黄等品种; 化橘红果实多于夏季采收, 经沸水微烫, 果皮经过加工、干燥制成化橘红。橘红树始种于梁代, 已有 1 500 年的使用历史, 尤以广东化州种植为佳, 具有“治痰症如神”之功效, 被列为十大南药之首^[1]。化橘红含有多糖、黄酮、香豆素和挥发油等活性物质, 其中, 柚皮苷和野漆树苷是其指标性成分^[2]。研究发现, 柚皮苷具有抗炎、止咳、抗氧化等活性, 是一种相对安全的物质^[3,4]。化橘红作为传统的中药, 已被证实具有清热祛痰、促进消化、降血糖、降血脂、免疫调节、心肌保护等作用, 因此化橘红也被当成一种健康食品被广泛应用^[5,6]。

高脂血症是现代社会比较常见的一种脂质代谢紊乱疾病, 其特征是异常升高的胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和降低的高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平^[7], 主要跟饮食习惯、运动频率等相关, 随着人们饮食结构和生活方式的改变, 如高热量饮食的过度摄入和长期久坐不动等, 使得高脂血症的患病率逐年增加^[8,9]。而长期高脂血症会导致心血管疾病患病几率的增加, 从而增加死亡率^[10]。所以, 对于高脂血症的预防和治疗成为一个重要问题, 临床上主要用他汀类药物和贝特类药物进行治疗, 但是, 其不良反应及其禁忌症在一定程度上给患者造成困扰。

当前, 化橘红的研究主要集中在本草古籍考证、种质资源、种植栽培、质量控制、鉴别、柚皮苷含量、止咳化痰、解酒、抗炎等方面^[11,12], 而在其他生物活性方面的研究较少。虽然, 在祛痰止咳方面,

人们对化橘红防治中医狭义概念之“痰”有一定的研究验证和科学认识; 但对中医广义的痰, 即所谓“无形之痰”(血管内“痰湿”), 是否仍会产生作用, 还未见相关研究报道。本研究以柚皮苷为考察指标, 考察了化橘红水提的最优工艺条件, 并以中试生产得到的化橘红提取物为考察对象, 探讨了化橘红提取物对高脂饲料所致混合型高脂血症模型小鼠的影响, 为化橘红在中医理论上“化痰、健脾”的功效提供现代科学内涵和阐释, 也通过挖掘化橘红潜在功能(譬如降脂减肥、血管保护等可能的作用), 为其高值化利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

化橘红药材由广州市香雪制药有限公司提供(批号: HP-200501), 由广州市药检所候惠婵主任中药师鉴定。降脂试验所用化橘红提取物委托广州市香雪制药有限公司中试生产。

柚皮苷标准品(批号: 10236-47-2), 上海诗丹德标准技术服务有限公司; 辛伐他汀片(批号: 0026723), 杭州默沙东制药有限公司; 甘油三酯试剂盒(批号: 20220612)、胆固醇试剂盒(批号: 20220611)、低密度脂蛋白胆固醇试剂盒(批号: 20220611)、高密度脂蛋白胆固醇试剂盒(批号: 20220612)、谷草转氨酶试剂盒(批号: 20220612)、谷丙转氨酶试剂盒(批号: 20220612), 均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

FA1004N 型电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; UV-5500PC 型紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司; Cytation 5 型多功能酶标仪, 美

国 BioTek ; GS-15R 型台式低温高速离心机, 美国 Beckman ; ECLIPSE 型倒置显微镜, 日本尼康。

1.3 实验动物

60 只 SPF 级 KM 雄性小鼠, 6~8 周龄, 购自南方医科大学实验动物中心, 动物许可证号为 SCXK (粤) 2016-0041。高脂饲料和基础饲料购自广东省医学实验动物中心, 生产许可证号: 粤饲证 (2019) 05073, 试验方案通过华南农业大学动物伦理委员会审核批准 (No.2021e008)。

1.4 化橘红提取工艺研究

1.4.1 单因素考察

分别考察不同料液比 (1:10、1:15、1:20、1:25、1:30), 温度 (50、55、60、65、70、75、80 °C), 时间 (40、50、60、70、80 min), 提取次数 (1、2、3、4 次) 等单因素对化橘红提取效果的影响。

1.4.2 正交实验设计

在单因素试验基础上, 以料液比 (1:20、1:25、1:30)、提取温度 (60、65、70 °C)、提取时间 (50、60、70 min)、提取次数 (1、2、3 次) 4 个因素为研究对象, 以化橘红中柚皮苷质量分数和干膏质量分数的综合加权结果作为评价指标, 进行 $L_9(3^4)$ 4 因素 3 水平正交试验, 筛选化橘红提取的最佳工艺参数。

1.4.3 柚皮苷质量分数测定方法

将干燥的化橘红片打成粗粉后, 通过热水浸提法进行提取, 参照文献^[13]的方法进行处理后, 在 420 nm 下测定样品吸光度值。根据测得不同样品溶液的吸光度和标准曲线方程计算样液中柚皮苷质量浓度, 进而计算出质量分数。标准曲线以吸光度对柚皮苷质量浓度得到 $y=21.098x+0.006$, $R^2=0.994$ 。

$$w_1 = \frac{c \times v \times n}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

w_1 —柚皮苷质量分数, %;

c —柚皮苷质量浓度, g/L;

v —提取液总体积, mL;

n —稀释倍数;

m —化橘红粉质量, g。

1.4.4 化橘红干膏质量分数的测定

将提取液在 65 °C 条件下进行减压旋转蒸发浓缩, 再置于真空干燥仪中冷冻干燥 48 h, 取出后迅

速进行精密称定, 记录质量。根据公式 2 计算干膏质量分数。

$$w_2 = \frac{m_1}{m} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

w_2 —干膏质量分数, %;

m_1 —干膏质量, g;

m —化橘红粉质量, g。

1.5 化橘红提取物对混合型高脂血症模型小鼠降脂作用的影响

1.5.1 实验动物分组与给药处理

随机选取 4~5 周龄 SPF 级雄性 KM 小鼠 60 只, 在实验室条件下适应观察 5 d。随机分 2 组, 10 只小鼠给予维持饲料作为空白对照组, 50 只小鼠给予高脂饲料作为模型组。模型组给予高脂饲料 2 周后, 模型组 TC、TG 水平与空白对照组相比有显著性差异即视为造模成功, 造模成功后, 将模型组随机分为 5 组, 分别为模型组、辛伐他汀组、化橘红提取物高、中、低剂量组, 每组 10 只。分组完成后, 空白对照组和模型组灌胃给予等量蒸馏水, 辛伐他汀组灌胃给予 1 mg/kg-BW 的辛伐他汀溶液, 化橘红提取物高、中、低剂量组分别灌胃给予 6.40、3.20、1.60 g/kg-BW 的化橘红提取物溶液, 每天 1 次, 连续给予 10 周, 每 5 d 称取一次小鼠体质量。

1.5.2 取材

于末次灌胃后, 禁食不禁水 12 h, 记录小鼠最终体质量和体长, 以及终期空腹体质量; 采用摘眼球法取血, 采血后分离血清; 然后处死小鼠, 取肝脏组织, 预冷生理盐水漂洗后, 滤纸吸干水, 称取质量; 然后将肝组织转移至 4% 多聚甲醛溶液中固定, 置于 4 °C 保存。

1.5.3 Lee's 指数和肝脏指数测定

根据小鼠肝脏质量 m_3 、体质量 m_2 和体长 L , 分别计算 Lee's 指数和肝脏指数。

$$w_3 = \frac{\sqrt[3]{m_2}}{L} \times 10^3 \quad (3)$$

$$w_4 = \frac{m_3}{m_2} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

w_3 —Lee's 指数, g/cm;

w_4 —肝脏指数, %;

m_2 —体质量, g;

L —体长, cm;

m_3 —肝脏质量, g。

1.5.4 血清生化指标测定

采集血液样品后, 室温静置 4 h, 然后用 4 °C 低温离心机以 4 000 r/min 离心 15 min, 吸取上层血清转移至 1 mL 干净离心管中, 按照试剂盒说明书操作方法进行测定。

1.5.5 肝组织病理学检查

取出固定于 4% 多聚甲醛溶液的肝组织, 依次进行浓度梯度脱水, 石蜡包埋、切片、苏木素伊红 (HE) 液染色、封片; 另取部分固定的肝脏组织, 同样方法制片, 采用油红 O 染色, 光学显微镜下观察组织病理形态学变化, 拍照记录。

1.5.6 统计分析

实验数据均采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, GraphPad Prism 8.0.2 软件进行绘图, 比较各组差异显著性, 结果以平均值 ± 标准差表示, 工艺验证重复三次。

2 结果与讨论

2.1 提取工艺单因素试验结果

2.1.1 料液比对柚皮苷质量分数的影响

随着料液比的增大, 化橘红提取物柚皮苷质量分数随溶媒用量的增加而增大, 料液比 1:25 时的柚皮苷质量分数显著大于料液比 1:20, 此后当料液比再增大至 1:30 时, 柚皮苷质量分数有所增加, 但增加幅度不大, 基本达到最大质量分数, 见表 1 所示, 因此, 选取最佳提取料液比为 1:25。

表 1 料液比对柚皮苷质量分数的影响

Table 1 Effect of material-liquid ratio on the mass fraction of total naringin

料液比/(m/V)	柚皮苷/(mg/g)
1:10	21.45 ± 1.02
1:15	33.47 ± 0.96
1:20	41.87 ± 0.95
1:25	48.68 ± 0.41
1:30	49.99 ± 0.19

2.1.2 提取温度对柚皮苷质量分数的影响

在 65~70 °C, 化橘红提取物柚皮苷质量分数逐渐增加, 而当提取温度继续升高时, 柚皮苷质量分数反而下降, 分析认为, 柚皮苷属于双氢黄酮

类化合物, 可能其化合物结构易受温度影响, 以致温度升高条件下, 柚皮苷质量分数发生变化有关, 见表 2, 结合生产中节能降耗, 因此, 选取最适提取温度 70 °C。

表 2 提取温度对柚皮苷质量分数的影响

Table 2 Effect of temperature on the mass fraction of total naringin

提取温度/°C	柚皮苷/(mg/g)
60	42.44 ± 0.27
65	45.57 ± 1.09
70	50.98 ± 0.51
75	49.07 ± 0.41
80	45.89 ± 0.43

2.1.3 提取时间对化橘红质量分数的影响

提取时间 60 min 时, 提取的化橘红柚皮苷质量分数最大, 此后随着提取时间增加, 柚皮苷质量分数稍有下降, 这可能是由于长时间提取使部分不稳定的黄酮类成分被破坏, 从而导致柚皮苷质量分数略微下降, 见表 3 所示, 因此, 选取最适提取时间为 60 min。

表 3 提取时间对柚皮苷质量分数的影响

Table 3 Effect of time on the mass fraction of total naringin

提取时间/min	柚皮苷/(mg/g)
40	22.34 ± 0.24
50	29.76 ± 0.50
60	42.38 ± 0.47
70	38.88 ± 1.19
80	36.44 ± 0.55

2.1.4 提取次数对化橘红质量分数的影响

随着提取次数增加, 化橘红提取物中柚皮苷质量分数逐渐增加, 提取 4 次的柚皮苷质量分数略高于提取 3 次, 但从实际生产能耗及生产成本分析, 提取次数增加所带来的柚皮苷质量分数增加的实际价值不及节能降耗, 见表 4, 因此, 选取提取次数 3 次。

表 4 提取次数对柚皮苷质量分数的影响

Table 4 Effect of times on the mass fraction of total naringin

提取次数	柚皮苷/(mg/g)
1	42.32 ± 0.38
2	46.33 ± 0.34
3	50.28 ± 0.68
4	51.42 ± 0.77

2.2 正交试验

表 5 正交试验结果

No.	A	B	C	D	质量分数/%		综合评分/%	
					柚皮苷	干浸膏		
1	1	1	1	1	3.35	7.67	20.23	
2	1	2	2	2	4.68	9.07	25.93	
3	1	3	3	3	5.46	10.87	30.65	
4	2	1	2	3	5.88	11.56	32.80	
5	2	2	3	1	4.18	9.49	25.13	
6	2	3	1	2	4.81	11.39	29.57	
7	3	1	3	2	4.70	10.78	28.39	
8	3	2	1	3	5.59	11.26	31.57	
9	3	3	2	1	5.25	10.02	28.87	
K ₁					76.81	81.42	81.37	74.23
K ₂					87.50	82.63	87.60	83.89
K ₃					88.83	89.09	84.17	95.02
R					4.01	2.56	2.08	6.93

A₃B₃C₂D₃

正交试验结果见表 5，各因素的主次顺序为 $D > A > B > C$ 。即最佳组合为 $A_3B_3C_2D_3$ ，即提取工艺参数料液比 1:30、提取温度 70℃、提取时间 60 min、提取次数 3 次，化橘红提取物柚皮苷质量分数为 56.15 mg/g。

根据权重分配，以柚皮苷质量分数（占权重 0.6）和干浸膏质量分数（占权重 0.4）计算出正交试验的综合得分，作为选择最优实验方案的依据之一。

综合得分 = 干浸膏质量分数 / (最高干浸膏质量分数 × 0.4 × 10) + 柚皮苷质量分数 / (最高柚皮苷质量分数 × 0.6 × 10)

2.3 化橘红提取物对混合型高脂血症模型小鼠降脂作用的实验结果

2.3.1 高脂血症模型的建立

小鼠适应性饲养 5 d 后，将小鼠分为空白对照组和模型组，空白对照组饲养基础饲料，模型组饲养高脂饲料，2 周后眼眶取血进行血清血脂水平的测定，结果显示模型组 TG、TC 水平与空白对照组比较有显著差异，说明模型建立成功，结果见表 6。

2.3.2 化橘红提取物对受试小鼠体质量的影响

实验期间，每 5 d 称重记录各组小鼠的体质量，实验持续周期为 12 周。饲喂高脂饲料 2 周后，受试小鼠体质量较饲喂基础饲料的小鼠体质量有所增加，但无显著差异性 ($P > 0.05$)。实验结束时，称量并记录各组小鼠体质量，数据显示，与空白对照组小鼠相比，模型组小鼠体质量显著增加 ($P < 0.01$)，与模型组小鼠相比，化橘红提取物组小鼠体质量与模型组差异显著 ($P < 0.05$)，并且体质量的差异随着剂量的增加而增加，并呈剂量依赖性。以上表明，化橘红提取物在一定程度上能够减轻小鼠的体质量，并且其效果与辛伐他汀组的效果接近。结果见图 1。

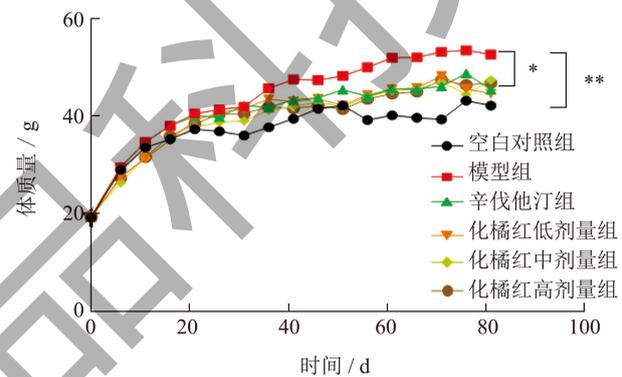


图 1 化橘红提取物对受试小鼠体质量的影响

Fig.1 The effect of *Citri grandis exocarpium* extract on the body mass of test mice

注：与模型组相比：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

2.3.3 化橘红提取物对受试小鼠血脂水平的影响

高脂血症主要特征是血脂异常以及脂质代谢紊乱，同时也会增加多种慢性疾病的患病风险，血清 TC 水平的异常升高，一方面是高脂血症发病的重要方面，也是动脉粥样硬化的独立危险因素，血清 TG 水平的增加可以一定程度上预测心血管疾病的发病危险，血清 LDL-C 水平减少与主要心血管事件的减少有关，血清 HDL-C 的功能主要是将胆固醇转移至肝脏进行代谢^[14]。给予高脂饲料 12 周后，模型组血清血脂水平与空白对照组相比，模型组血清 TG、TC 以及 LDL-C 水平显著升高，差异有统计学意义，表明混合型高脂血症小鼠模型稳定良好。与模型组小鼠比较，化橘红低、中、高剂量组 TC 水平分别降低了 16.37%、40.92%、47.11%，LDL-C 水平分别降低了 54.46%、58.93%、65.18%，化橘红中、高剂量组 TG 水平分别降低了 45.26%、36.84%，且化橘红高剂量组降低血脂的效果接近辛伐他汀组，

各个组别血清 HDL-C 水平差异无统计学意义, 结果见表 7。以上结果表明, 化橘红在降低小鼠血脂方面, 具有一定的效果。研究发现, 柚皮苷具有调控脂肪代谢的作用^[15], 而化橘红的主要活性成分为柚皮苷, 化橘红提取物可能是通过调节肝脏相关胆固醇合成的酶, 如 PPAR- α 、CPT-1、UCP2 相关蛋白的表达, 从而降低血清胆固醇和甘油三酯水平。

闫伊狄等^[16]通过提取柚皮中的柚皮苷作用于小鼠进行降脂研究, 发现柚皮苷给药组使受试小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平分别降低了 21.31%、29.02%、8.93%, 谭超等^[17]对柚皮苷进行血脂代谢研究, 发现柚皮苷高剂量组使大鼠血脂 TC、TG、LDL-C 水平分别降低了 46.91%、46.42%、52.63%, 以上结果表明, 柚皮苷有降血脂作用。本研究通过制备化橘红水提物并作用于混合型高脂血症小鼠也表现出良好的结果。

2.3.4 化橘红提取物对受试小鼠 Lee's 指数和肝脏指数的影响

Lee's 指数能够反应小鼠的肥胖程度, 肝脏指数能够反应肝脏在长期高脂饮食影响下的异常变化情况^[18], 长期高脂饮食会导致小鼠体质量增加, 肝脏异常。本实验观察到模型组小鼠的 Lee's 指数和肝脏指数显著增加, 表明模型组小鼠体质量增加, 肝脏可能发生肿大增生。经过化橘红提取物干预后, 与模型组比较, 化橘红提取物中、高剂量组对混合型高脂血症模型小鼠肝脏指数分别降低了 13.04%、10.31%, 差异具有统计学意义, 化橘红提取物低、中剂量组受试小鼠 Lee's 指数与模型组相比降低了 4.00%、6.28%, 差异具有统计学意义, 以上结果表明, 化橘红提取物对高脂血症模型小鼠体质量减轻有一定作用, 并且可能对肝脏具有一定的保护作用, 结果见表 8。

表 6 高脂饲料饲养两周后实验小鼠血清血脂水平 (mmol/L)

Table 6 Serum lipid levels in test mice fed with high-fat diet for two weeks

组别	TG	TC	LDL-C	HDL-C
空白对照组	0.63 ± 0.13	1.19 ± 0.21	0.45 ± 0.17	4.22 ± 0.65
模型组	0.91 ± 0.17*	1.90 ± 0.26**	0.53 ± 0.22	4.15 ± 0.73

注: 与空白对照组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 7 化橘红提取物对受试小鼠血脂的影响 (mmol/L)

Table 7 The effect of *Citri grandis* exocarpium extract on blood lipids of test mice

组别	TG	TC	LDL-C	HDL-C
空白对照	0.75 ± 0.21	1.26 ± 0.29	0.36 ± 0.10	4.59 ± 0.60
模型	0.95 ± 0.14	5.01 ± 0.85	1.12 ± 0.45	4.79 ± 0.98
辛伐他汀	0.74 ± 0.23*	3.35 ± 0.80**	0.71 ± 0.24**	4.34 ± 1.31
化橘红低剂量组	1.19 ± 0.44	4.19 ± 0.69**	0.51 ± 0.12**	4.96 ± 0.76
化橘红中剂量组	0.52 ± 0.06**	2.96 ± 0.85**	0.46 ± 0.16**	4.36 ± 0.45
化橘红高剂量组	0.60 ± 0.10**	2.65 ± 0.69**	0.39 ± 0.15**	4.21 ± 0.56

注: 与模型组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 8 化橘红提取物对受试小鼠 Lee's 指数和肝指数的影响

Table 8 The effect of *Citri grandis* exocarpium extract on Lee's index and liver index of test mice

组别	小鼠体质量/g	肝湿重/g	肝脏指数/%	Lee's 指数
空白对照组	41.34 ± 3.85	1.45 ± 0.11	3.57 ± 0.28	316.83 ± 8.86
模型组	54.64 ± 3.93	2.82 ± 0.29	5.14 ± 0.28	330.68 ± 19.84
辛伐他汀组	43.59 ± 3.88	1.99 ± 0.23	4.57 ± 0.46	323.41 ± 10.18
化橘红低剂量组	45.37 ± 2.03	2.46 ± 0.19	5.40 ± 0.29	317.46 ± 8.57*
化橘红中剂量组	42.18 ± 3.75	1.84 ± 0.26	4.47 ± 0.32**	309.91 ± 8.82**
化橘红高剂量组	42.74 ± 3.78	2.01 ± 0.36	4.61 ± 0.68**	323.53 ± 10.13

注: 与模型组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

肝脏作为机体脂类合成重要的器官,对脂类的代谢方面起着十分重要的作用。当长期摄入高脂饮食时,脂类合成相关的蛋白活性被激活,从而合成大量的脂类物质,当超过肝脏本身的负荷时,合成的脂类物质会沉积在肝脏组织,使得肝细胞脂质沉积,肝脏肿大,肝脏质量增加;同时长期高脂饮食也会导致机体与脂类氧化相关的蛋白活性受到抑制,进一步增加肝脏脂肪堆积的危险,并进一步诱发相关代谢综合征的发生^[19,20]。

2.3.5 化橘红提取物对受试小鼠血清ALT和AST的影响

长期高脂饮食作用下,肝脏脂质合成增多并逐渐积累于肝细胞中,过量沉积在肝细胞的脂质可能导致肝细胞膜结构不完整,进而影响肝细胞本身的正常功能,导致肝细胞损伤,从而释放出ALT和AST^[21]。转氨酶(尤其是ALT)是急性肝细胞损伤的敏感标志,只要有1%的肝细胞坏死,可使血中酶活性增高1倍,因此,测定混合型高脂血症模型小鼠血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的酶活性,可以一定程度反映化橘红提取物对混合型高脂血症模型小鼠肝脏的影响。

实验结果见表9所示,与空白对照组相比,模型组小鼠血清ALT和AST水平均显著升高,差异有统计学意义,表明模型小鼠肝脏出现异常,肝功能受损;与模型组相比,化橘红低、中、高三个剂量组血清AST水平分别降低了3.28%、31.48%、55.46%,ALT水平分别降低了51.06%、53.58%、56.68%,并呈现剂量依赖性,差异具有统计学意义,以上结果表明,化橘红提取物在一定程度上可以改善高脂饮食诱导的肝脏损伤。

表9 化橘红提取物对受试小鼠血清AST和ALT的影响(U/L)

Table 9 The effect of *Citri grandis* exocarpium extract on serum AST and ALT in test mice

组别	AST	ALT
空白对照组	20.98 ± 4.30	14.31 ± 8.93
模型组	51.17 ± 9.12	54.11 ± 8.24
辛伐他汀组	36.73 ± 5.38	30.18 ± 4.57
化橘红低剂量组	49.49 ± 4.97	26.48 ± 9.25**
化橘红中剂量组	35.06 ± 6.65**	25.12 ± 5.87**
化橘红高剂量组	22.79 ± 3.75**	23.44 ± 7.65**

注:与模型组相比:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

张淑霞等^[22]通过对柚皮苷对急性肝损伤小鼠作用的研究,发现柚皮苷低剂量组使小鼠血清ALT、

AST分别下降47.87%、34.27%,臧宾宾等^[23]通过对脂多糖诱导的肝损伤的研究,发现柚皮苷给药组能够显著降低血清ALT和AST水平,一定程度上能够改善小鼠肝损伤。以上结果表明,柚皮苷对肝损伤有一定的保护作用。本文也呈现出良好的结果。

2.3.6 受试小鼠肝脏肉眼观察结果

由图2可知,与空白对照组小鼠比较,受试小鼠肝脏均出现不同程度的肿胀现象,以模型组小鼠肝脏组织体积增大明显,有大量肉眼可见的脂肪粒沉积在肝组织细胞中,外观色泽暗淡,呈深褐色,肝脏质地有明显沙粒感和油腻感,质地粗糙,弹性下降。与模型组小鼠肝组织比较,辛伐他汀组和化橘红提取物各剂量组小鼠肝组织的沙粒感和油腻感减轻,弹性较好,其中,辛伐他汀组和化橘红提取物高剂量组小鼠肝组织颜色相对较深褐色浅。

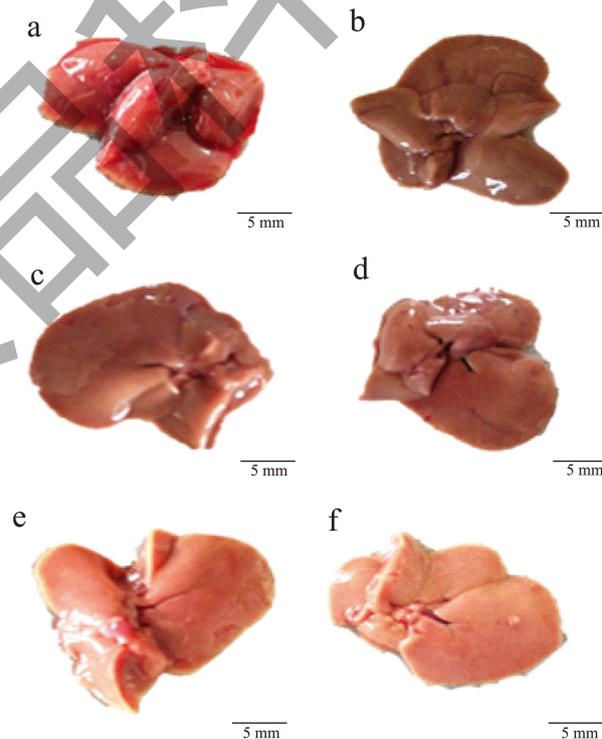


图2 肝组织肉眼观察

Fig.2 Visual observation of liver tissue

注:图a为空白对照组,图b为模型组,图c为辛伐他汀组,图d为化橘红低剂量组,图e为化橘红中剂量组,图f为化橘红高剂量组。图3、图4同。

2.3.7 受试小鼠肝组织病理组织学检查结果

2.3.7.1 HE染色观察

肝脏是调控机体脂质代谢的重要器官,经长期饲喂高脂饲料诱导的混合型高脂血症模型小鼠,肝脏脂质蓄积严重,导致肝质量增大,出现脂肪肝病

变。通过肝组织切片、HE 染色病理学检查，如图 3 所示，空白对照组小鼠的肝细胞形态大小正常，围绕中央静脉向周围呈放射状排列的肝索排列整齐，未见空泡样变性和脂滴产生，无炎细胞浸润；模型组小鼠肝索排列无序，体积明显增大，中央静脉周边及其胞质可见大量空泡样病变及脂滴，可见弥漫性肝细胞脂肪变性；与模型组比较，化橘红提取物各受试剂量组小鼠肝细胞形态明显改善，大小接近正常，肝索排列较整齐，可见少量细胞空泡样病变及脂滴，胞质可见少量空泡，肝细胞脂肪变性程度减轻。

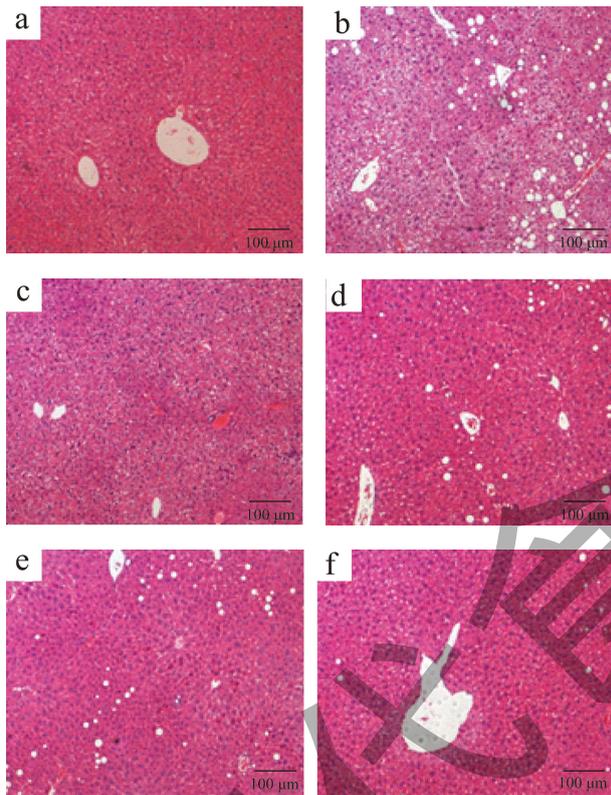


图 3 受试小鼠肝脏病理组织学检查 (HE 染色, ×10)

Fig.3 Pathological and histological examination of the liver of the test mice (HE staining, ×10)

2.3.7.2 油红 O 染色观察

采用油红 O 染色，肝组织细胞中脂滴呈红色，核呈蓝色。油红 O 染色结果显示，如图 4 所示，空白对照组小鼠肝细胞形态正常，肝细胞结构完整，肝索排列有序，肝小叶、中央静脉、汇管区形态结构未见明显异常。模型组小鼠肝细胞排列紊乱、肿胀变性，肝组织被大量炎性细胞浸润，出现大量大小不一的圆形空泡样脂滴。经化橘红提取物连续干预 10 周后，其中，化橘红提取物中、高剂量组小鼠肝细胞较为整齐，肝细胞内脂滴空泡数量明显减少，炎性细胞浸润明显减轻。

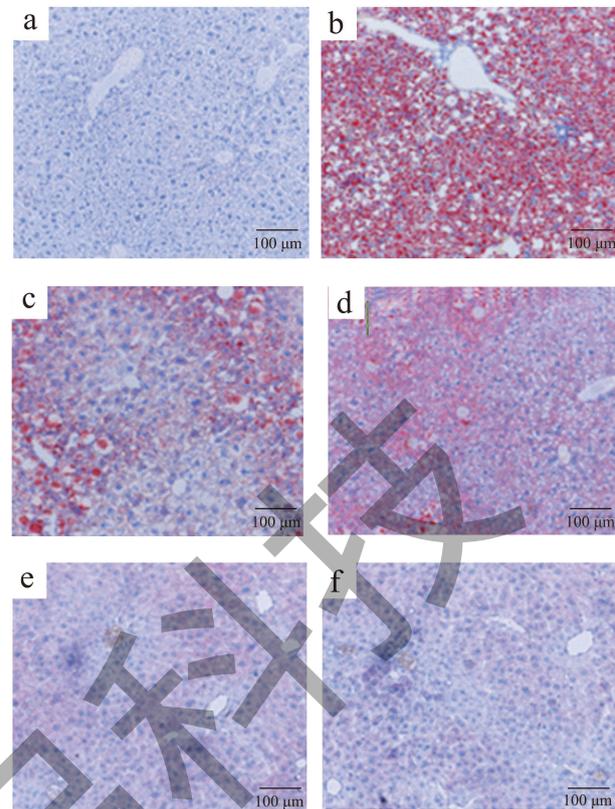


图 4 受试小鼠肝组织油红 O 染色结果 (油红 O 染色, ×10)

Fig.4 Oil Red O staining results of liver tissue of test mice (Oil Red O staining, ×10)

3 结论

在本研究中，通过正交实验筛选出最佳工艺：以水作为溶媒，料液比 1:30，提取温度 70 °C，提取 3 次，每次 60 min。在此工艺条件下，化橘红水提物柚皮苷质量分数为 56.15 mg/g。通过对混合型高脂血症模型小鼠血脂四项，肝脏 ALT 和 AST 指标检测，以及病理切片的观察，化橘红提取物能够一定程度降低高脂饮食引起的血脂异常升高，具有改善肝脏脂质蓄积和保肝作用，对混合型高脂血症模型小鼠有降脂作用。

参考文献

- [1] 王艳慧.化橘红的研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2017,19(6):1076-1082.
- [2] YING P, HU M J, QI L, et al. Flavonoids derived from exocarpium *Citri grandis* inhibit LPS-induced inflammatory response via suppressing MAPK and NF-κB signalling pathways [J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30: 564-580.
- [3] JIANG K, SONG Q, WANG L, et al. Antitussive expectorant

- and anti-inflammatory activities of different extracts from exocarpium *Citri grandis* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 156: 97-101.
- [4] LUO Y L, ZHANG C C, LI P B, et al. Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke [J]. International Immunopharmacology, 2012, 13(3): 301-307.
- [5] KONG F S, DING Z D, ZHANG K, et al. Optimization of extraction flavonoids from exocarpium *Citri grandis* and evaluation its hypoglycemic and hypolipidemic activities [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 262: 113-178.
- [6] SU Z P, QIN Y R, ZHANG K, et al. Inclusion complex of exocarpium *Citri grandis* essential oil with β -cyclodextrin: characterization, stability, and antioxidant activity [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(6): 1592-1599.
- [7] WALID H E T, ABEER T. Natural products for controlling hyperlipidemia: review [J]. Archives of Physiology and Biochemistry, 2019, 125: 128-135.
- [8] HE N N, YE H H. Exercise and hyperlipidemia [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2020, 1228: 79-90.
- [9] REN C Y, ZHANG S, HONG B, et al. Germinated brown rice relieves hyperlipidemia by alleviating gut microbiota dysbiosis [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2023, 22(3): 945-957.
- [10] YAO Y S, LI T D, ZENG Z H. Mechanisms underlying direct actions of hyperlipidemia on myocardium: an u-pdated review [J]. Lipids in Health and Disease, 2020, 19: 23.
- [11] 刘影, 庞富. 化橘红有效成分柚皮苷的研究进展[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(2): 8-10.
- [12] 钟楚楚, 吴孟华, 余品皓, 等. 橘红与化橘红采制、炮制及功效的古今演变探析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(18): 4865-4874.
- [13] 杨稼俊, 胡爱军, 杨瑶, 等. 柚皮中柚皮苷的提取工艺研究[J]. 农产品加工, 2020, 8: 36-38, 43.
- [14] PIETARI R, JOEL T R, NINA J M, et al. Polygenic hyperlipidemias and coronary artery disease risk [J]. Circulation: Genomic and Precision Medicine, 2020, 13(4): e002725.
- [15] 吴泳江, 王敬, 王琪, 等. 柚皮苷的生物学功能及在畜禽生产中的应用[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(7): 9-12, 24.
- [16] 闫红狄, 孟鑫, 于小磊, 等. 柚皮中柚皮苷提取及其降血脂作用[J]. 食品科技, 2021, 46(12): 230-236.
- [17] 谭超, 肖红波. 柚皮苷对大鼠PCSK9-LDLR表达及血脂代谢的影响[J]. 动物医学进展, 2018, 39(5): 91-93.
- [18] 刘婷, 苏洁, 王娅君, 等. 复方铁皮石斛叶超微粉改善高脂血症小鼠的脂质代谢作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 18-24.
- [19] MAJA S R, GERMAN P, BENJAMIN S M, et al. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels [J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2008, 294(5): E809-E993.
- [20] WAN Z X, JARED R M, LAURA C, et al. Evidence for the role of AMPK in regulating PGC-1 alpha expression and mitochondrial proteins in mouse epididymal adipose tissue [J]. Obesity, 2013, 22(3): 730-738.
- [21] 刘洋, 张洪义, 赵刚. 高脂血症患者腹腔镜胆囊切除术后ALT和AST水平的变化及意义[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(3): 526-529.
- [22] 张淑霞, 张雪涟, 卢珊, 等. 柚皮苷对酒精诱导急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(1): 61-66.
- [23] 臧宾宾, 李华, 杨颖, 等. 柚皮苷通过抑制Kupffer细胞的焦亡改善脂多糖诱导的肝损伤[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(3): 1122-1132.