

花生壳木犀草素的研究进展

路立峰¹, 李赫宇², 李增绪¹, 郑丹¹, 吕艳¹

(1. 山东药品食品职业学院, 山东 威海 264210; 2. 天津市益倍健生物技术有限公司, 天津 300457)

摘要: 对花生壳中木犀草素的提取、纯化、含量测定和药理活性研究进行综述, 并对其进一步开发提出展望。

关键词: 花生壳; 木犀草素; 研究进展

Research Progress of the Luteolin from Peanutshell

LU Li-feng¹, LI He-yu², LI Zeng-xu¹, ZHENG Dan¹, LÜ Yan¹

(1. Shandong Drug and Food Vactional College, Weihai 264210, Shandong, China; 2. Tianjin Ubasichealth Nutrition Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: The extraction, purification, assay and pharmacological studies of the luteolin from peanutshell and the further research were reviewed.

Key words: peanutshell; uteolin; further research

花生是世界上最重要的5大油料作物之一,其生产遍及世界各地;花生壳是豆科一年生草本植物落花生(*Arachishypogaea* L.)的干燥果壳,近年来随着花生的种植面积在逐年增大,随之而来花生壳年产量已达450万t,但大部分被当作燃料烧掉或作废弃物丢弃,因此花生壳的开发利用潜力巨大,如何合理利用开发花生壳,具有十分重要的现实意义。目前我国对花生壳的综合利用水平有待提高,充分挖掘并利用花生壳中的成分势在必行,将其广泛用于食品、保健品、医药和化工等行业。

1 提取

1.1 回流提取法

王超等^[1]首先通过单因素试验,考察在影响花生壳中木犀草素的5个提取因素乙醇体积分数、回流温度、回流次数、回流时间、料液比,确定了回流温度影响最显著;然后通过正交试验,研究乙醇回流提取花生壳中木犀草素的因素影响和工艺条件,并对提取工艺条件进行优化。确定为选择70%乙醇溶液作溶剂,按照料液比(g/mL)为1:20,控制温度85℃,提取1.5h,木犀草素的提取量可达7.41mg/g。

1.2 碱处理法

丁爱凤等^[2]针对影响花生壳中木犀草素碱液提取工艺的有关因素,进行单因素分析和正交试验探讨,确定最佳优化工艺条件为:选择20倍于花生壳重量的0.2mol/L氢氧化钠溶液,在95℃下提取2次,每次时间1.0h。碱提酸沉后,沉淀物用乙酸乙酯萃取,减压浓缩,蒸干,出膏率0.64%,干膏中含木犀草素达19.50%。

1.3 萃取法

肖淑娟等^[3]选用木犀草素、丙烯酰胺、乙二醇二甲基丙烯酸酯、偶氮二异丁腈分别作模板分子、功能单体、交联剂、引发剂,在一定条件下,采用分子印迹技术,合成了木犀草素分子印迹聚合物。再用固相萃取柱(SPE)为固定相,上样,甲醇为流动相进行洗脱,收集洗脱液,对洗脱液进行印迹聚合物(MIPs)进行识别特性及分离能力的定性分析。结果表明,该印迹聚合物能较好的吸附并选择木犀草素,所得到的木犀草素96.2%的纯度远远高出硅胶柱20%,且MIPs-SPE柱稳定性好,洗脱再生后可反复使用。

1.4 超声提取法

肖淑娟等^[4]报道超声波辅助法提取花生壳木犀草素具有高效、节能、省时的优点,超声提取后用紫外分光光度法测定其含量,确定最佳工艺条件为:70%乙醇为提取溶剂,料液比为1:10(g/mL),提取3次,每次15min。

李洪娟^[6]以40目花生壳粉为原料,在单因素试验基础上,选取提取时间、料液比、提取温度、乙醇体积分数等为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 设计正交试验,紫外可见分光光度法测定木犀草素含量,计算提取率,考察了在4个影响因素中,料液比>乙醇体积分数>提取时间>提取温度,并确定了超声波法提取木犀草素最佳工艺为30倍量70%乙醇60℃下提取30 min。

1.5 纤维素酶法

丁桂峰等^[9]用纤维素酶改善花生壳通透性,以乙醇为溶媒,考察了影响因素中的酶解温度、酶解液pH值、酶用量及酶解时间,确定了纤维素酶法在酶解温度50℃,酶解液pH值5.2,酶用量0.10%,酶解时间1.5 h时,从花生壳提取的木犀草素比未预处理法的提高将近2倍。

1.6 微波法

熊清平等^[7]研究微波辅助提取花生壳中木犀草素的最佳工艺条件。以木犀草素提取率为指标条件,高效液相法测定其含量,应用单因素和正交试验,分别考察影响微波辅助提取的三个因素:微波时间、料液比及提取时间,筛选最佳工艺条件。结果表明,微波辅助提取木犀草素微波时间2.0 min,料液比1:6,提取时间4 h时,提取工艺有较好的稳定性。在木犀草素含量、提取率及收率方面,微波辅助提取工艺比传统的乙醇回流提取工艺更具有优势。

2 纯化

周萍等^[8]选择DI01、AB-8、HPD100、HPD400、HPD100(药用级)、HPD600、DA201等7种型号的大孔吸附树脂为固定相,水为洗脱液,对花生壳提取液进行洗脱,通过比较洗脱前后总黄酮及木犀草素的含量,考察静态吸附容量和洗脱率,筛选确定出7种大孔树脂中DI01型树脂对花生壳提取液进行精制纯化的效果最佳。DI01型树脂纯化后,总黄酮提高了近5倍,含量达到56.8%;同时木犀草素提高了近4倍,含量可达9.65%。

3 含量测定

3.1 分光光度法

杨增明等^[9]对8省17份花生壳药材利用分光光度法,以木犀草素为对照品,测定总黄酮含量,结果显示,在17份花生壳药材中黄酮类成分含量在0.25%~1.42%之间,含量差异较大。

周萍等^[10]用三氯化铝-乙酸钾比色法测定总黄酮含量,对花生壳中总黄酮建立含量测定方法,结果显

示总黄酮在1.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好, $r=0.9992$,平均加样回收率100.3%($n=9$),所建立的方法操作简便快速,结果准确可靠;并认为在11份不同产区、年份的花生壳中山东产花生壳的含量最高。

3.2 间接原子吸收法

徐文峰等^[11]以木犀草素为对照品,对花生壳进行提取处理后,利用碱式醋酸铅与木犀草素分子结构上的酚羟基络合,生成难溶于水的铅盐沉淀,再用原子吸收法对上清液中剩余的 Pb^{2+} 测定浓度,从而间接测定花生壳中木犀草素的含量。此法简单快速。

3.3 高效液相色谱法

唐丽萍等^[12]用甲醇作溶剂超声处理辽宁、山东等7个省区18份花生壳样品,以 C_{18} 键合硅胶为填充剂,柱温30℃,甲醇:乙醇:乙酸(50:50:1)为流动相,波长254 nm波长下进行检测,结果显示,在0.1744 μg ~1.744 μg 范围内木犀草素成良好的线性关系,并且在7个省区中山东、河南产的花生壳含有较高的木犀草素含量。

丁爱凤等^[13]用高效液相色谱法对我国8个省区不同品种的120份花生壳样品(其中45份中间型、31份普通型、23份珍珠豆型、14份龙生型、7份多粒型)进行木犀草素的含量测定。结果表明,在5种类型的花生壳中,中间型、多粒型和珍珠豆型木犀草素含量比龙生型和普通型含量高。

王晴晴等^[14]采用Kromasil C_{18} 柱(200 mm \times 4.6 mm, 5 μm),乙腈和0.1%甲酸水溶液梯度洗脱,流速为1.0 mL/min,检测波长340 nm,柱温27℃,同时测定花生壳木犀草素、绿原酸和3,4-二咖啡酰奎尼酸含量。结果表明三种成分质量浓度分别在17.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~276 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~58.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与色谱峰面积呈现良好的线性关系,RSD分别为0.71%,1.49%,0.44%。建立和完善了花生壳资源产业开发中质量标准,此方法具有快速、准确可靠、重现性好的优点。

3.4 荧光法

张志恒等^[15]根据木犀草素与人血清白蛋白(HSA)分子中某些氨基酸结合后,引起荧光强度降低、荧光峰位变化,确定木犀草素对HSA的结合。通过木犀草素在不同温度下对HSA的荧光猝灭作用,遵循Stern-Volmer方程计算,确认静态猝灭是HSA荧光强度被猝灭的原因,而且有较强的荧光猝灭作用。根据Forster理论,通过计算木犀草素与HSA间的结合常数和结合位点数,说明木犀草素对HSA的猝灭能力较强,主要

依赖于疏水能力。同时用同步荧光光谱分析,木犀草素与 HSA 中的色氨酸结合后,降低了氨基酸残基的疏水性,是木犀草素对 HSA 构象产生的原因。

4 药理活性

4.1 体外抗氧化

杨颖等^[16]通过建立 DPPH、TBA 和 Xan-XOD 3 个体外抗氧化模型,对用 70%乙醇提取的花生壳离心后的上清液进行评价,结果显示,花生壳提取物在清除 DPPH 试验中优于 BHT 的抗氧化效果,其 IC_{50} 为 $7 \mu\text{g/mL}$;花生壳提取物在抗油脂过氧化试验中表现出了较高的抗氧化能力,其抗亚麻油脂过氧化效果明显高于 BHT, IC_{50} 大豆油中为 0.017%,花生油中为 1.19%,亚麻油中为 0.027%;花生壳提取物在 NH_2OH -Xan-XOD 系统中显示出清除过氧化氢、超氧自由基和 OH 的能力, IC_{50} 为 0.2 mg/mL 。木犀草素是花生壳提取物中主要的抗氧化物质,木犀草素含量越高,抗氧化能力越强,抗氧化能力与木犀草素含量成正相关关系。

4.2 体外抗菌

陈春涛等^[17]用甲醇回流提取,选取 4 种有机溶剂(按极性由小到大顺序)进行梯度萃取,滤纸片法跟踪纯化组分测定抑菌活性,结果表明乙酸乙酯组分中不仅黄酮类成分含量较高,而且抑菌活性较强,酸碱沉淀法、柱层析法纯化后,得到 1、2、3 3 种化合物。其中 1 号在 3 种组分中抑菌范围最广、作用最强,2 号木犀草素其次,3 号最弱。1 号在抑制金黄色葡萄球菌、青霉、枯草杆菌和酿酒酵母活性方面作用最强,抑菌谱最广。而 2 号仅对枯草杆菌和金黄色葡萄球菌起到一定的抑制作用;3 号则对酿酒酵母、金黄色葡萄球菌表现出一定的抑菌活性。

4.3 体外抗炎

张毅等^[18]以小鼠单核/巨噬细胞系(RAW264.7 细胞)为研究对象,对数生长期的细胞设脂多糖(LPS)处理组(模型组),木犀草素低、中、高剂量处理组和空白对照组,加入药物后再加入 LPS 继续培养,结果表明,木犀草素在 LPS 诱导下,中高剂量组较低剂量组、对照组能显著抑制细胞前列腺素(PGE₂)的生成;电泳迁移率变动分析(EMSA)检测,说明中、高剂量木犀草素能显著抑制 NF- κ B 的 DNA 结合活性;逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定,说明木犀草素愈高,抑制 COX-2 mRNA 水平愈显著,Western blot 法测定 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 和环氧合酶 2(COX-2)蛋白的表达,观察木犀草素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞核因子 κ B(NF- κ B)和 COX-2 表达及 NF- κ B DNA 结合

活性的影响。木犀草素的抗炎作用可能与其能抑制核内 NF- κ B 的表达和 DNA 结合活性从而下调 COX-2 的表达有关。

4.4 抗肿瘤

胡春萍等^[19]报道木犀草素对肺癌细胞株 A549 的生长有显著的抑制作用,细胞术检测细胞周期发现随木犀草素浓度的增大,周期蛋白 cyclin A、p-CDC2 和 p-Rb 的表达逐渐抑制,木犀草素能将 A549 阻滞于 G2 期。就细胞凋亡率而言,木犀草素处理组明显高于未处理组,主要依据是 Hoechst 33258 核染色,Annexin V-FITC/PI 双染后使 A549 处于凋亡或坏死。木犀草素在促使受 JNK 磷酸化控制的 BAX 进入线粒体引起细胞凋亡的同时,还可通过使 NF- κ B(p65)的磷酸化水平显著降低,抑制 MEKK1 使细胞凋亡。细胞经木犀草素、TNF- α 刺激后,用免疫荧光染色显示木犀草素处理后的 A549 很好的阻滞了受 TNF- α 刺激的 p65 入核,使转录因子的作用无法发挥,加速细胞凋亡。

王焕等^[20]则采用建立模型对照、5-氟尿嘧啶阳性对照、木犀草素实验组,以肺癌转移结节总数为指标,考察对小鼠 Lewis 肺癌和 4T1 乳腺癌自发性肿瘤转移和被动转移;通过计算胸腺指数、脾脏指数,考察对荷瘤免疫的影响。结果表明,木犀草素能显著减少小鼠 Lewis 和 4T1 肺转移结节数,并明显抑制转移,使小鼠的免疫反应得以增强,从而实现抑制肿瘤细胞迁移及免疫调节,达到抗癌目的。

4.5 抗抑郁

刘毅等^[21]采用 10 种应激方法,对小鼠进行慢性不可预知性温和应激(CUS),建立了抑郁模型,对小鼠行为进行检测及氧化损伤测定。结果显示,糖水消耗实验反应出小鼠“快感缺失”;旷场实验、悬尾实验和强迫游泳实验显示小鼠紧张程度增加,兴趣丧失,表现出对周围环境绝望,活动能力下降,经木犀草素灌胃后,抑郁样行为得到改善。氧化损伤测定显示,提高超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)活性,降低丙二醛(MDA)含量,使得氧自由基和过氧化氢清除,小鼠脑组织抗氧化活性提升,氧化/抗氧化平衡改善,应激损伤抑制,是木犀草素治疗抑郁的机制。

4.6 镇痛

刘圆等^[22]比较生理盐水、乙酰水杨酸、木犀草素抗炎镇痛实验,对小鼠灌胃给予木犀草素(1 mg/kg/d , ig)后,发现木犀草素能很好地延缓由热刺激引起的疼痛反应的潜伏期(痛阈);同时在 10、20 min 内木犀草素也能明显减少对经腹腔注射醋酸后的小鼠扭体次数,抑制率分别为 30%、25%;木犀草素能加快吸收,

改善血液循环,通过抑制神经末梢,降低刺激敏感性,使二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀及角叉菜引起的大鼠足肿胀症状明显减轻,木犀草素抗炎镇痛效果明显。

4.7 保护心血管

印媛君等^[23]采用培养 1 d~3 d 的乳鼠心肌细胞,作为对照组、模型组、不同浓度的木犀草素预处理组,预处理 2 h 后,用一定浓度的 H_2O_2 氧化损伤 2 h,检测各组噻唑蓝 MTT 值,确定选择木犀草素预处理组浓度是 $100 \mu\text{mol/L}$ 。观察小鼠同组别细胞形态学观察、心肌细胞搏动频率测定、Hoechst33342-PI 双染和荧光染料罗丹明 Rh123 染色,检测培养上清液乳酸脱氢酶 LDH、丙二醛 MDA 及超氧化物歧化酶 SOD 活性,表明木犀草素组大、中剂量能较好地保护受 H_2O_2 损伤的乳鼠心肌细胞;心肌细胞搏动频率显著回升;双染后呈现蓝色细胞系,少见碎核、未见坏死细胞;提高对 Rh123 的摄取能力,减少细胞线粒体损伤程度,保护氧化损伤的心肌细胞。影响木犀草素作用机制的因素有:心肌细胞活力、心肌细胞膜、抗氧化损伤能力、细胞膜损伤、心肌细胞线粒体膜电位及功能等因素。

4.8 糖尿病

刘涛等^[24]对 60 只采用高脂高糖饮食加腹腔注射链脲霉素建立糖尿病模型的雄性大鼠,随机分为 5 组,每组 12 只,木犀草素低、中、高剂量组每日分别灌以不同剂量的木犀草素,模型组每日灌以定量生理盐水,持续 56 d。再建立大鼠大脑中动脉永久性缺血模型,术后 24 h 断头取脑,用细胞凋亡检测试剂法(TUNEL 法)观察大鼠脑细胞凋亡,原位杂交法测定脑组织 HSP70 mRNA 及 FasmRNA 的表达。结果表明,随木犀草素剂量增大,凋亡细胞呈下降趋势,抑制糖尿病脑梗死大鼠神经细胞凋亡能力越强;木犀草素对大鼠脑组织 HSP70 mRNA 表达,与其剂量呈现正相关,剂量越大, HSP70 的表达越显著;对 FasmRNA 的表达,则呈负相关,剂量越大, FasmRNA 表达越不显著,可较好地保护糖尿病后的脑组织,降低脑梗发生率。

5 应用前景

花生壳中含有十分丰富的木犀草素,而木犀草素又具有良好的抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗抑郁、保护心血管等性能,加大对植物资源花生壳的开发力度,变废为宝,将木犀草素应用在食品中做天然抗氧化剂和防腐剂,具有广阔的开发前景。

参考文献:

[1] 王超,林娇,周建新.乙醇回流法提取花生壳中木犀草素工艺条件

优化[J].粮食与食品工业,2013,20(6):29-32

- [2] 丁爱凤,汪海峰,杨晓蓉,等.花生壳中木犀草素提取工艺探讨[J].中国粮油学报,2005,20(4):92-95
- [3] 肖淑娟,李红霞,于守武.分子印迹固相萃取法提取花生壳中木犀草素[J].化工进展,2010,29(2):293-296
- [4] 肖淑娟,李红霞,于守武.超声波辅助法提取花生壳中木犀草素[J].河北理工大学学报,2008,30(2):96-99
- [5] 李洪娟.花生壳中木犀草素的超声提取工艺[J].湖北农业科学,2010,49(5):1183-1185
- [6] 丁桂峰,潘浪胜,高文姬.纤维素酶预处理花生壳工艺条件优化[J].应用化工,2012,41(6):996-999
- [7] 熊清平,张强华,石莹莹,等.花生壳中木犀草素的微波辅助提取工艺研究[J].中国酿造,2011,234(9):30-33
- [8] 周萍,汝海龙,蒋惠娣.大孔吸附树脂对花生壳总黄酮的纯化研究[J].大理学院学报,2007,6(2):10-12
- [9] 杨增明,王文静,龚云麒,等.不同产地花生壳药材中总黄酮含量的测定[J].中国民族民间医药杂志,2004,71(6):359-360
- [10] 周萍,胡碧波,朱倩,等.花生壳总黄酮及木犀草素含量[J].中药材,2006,29(8):769-771
- [11] 徐文峰,廖晓玲,高志强,等.间接原子吸收法测定花生壳中木犀草素的含量[J].分析化学,2007,35(11):1685
- [12] 唐丽萍,龚云麒,吴小燕,等.不同产地花生壳中木犀草素的 HPLC 测定[J].花生学报,2005,34(2):1-4
- [13] 丁爱凤,汪海峰,杨晓蓉,等.不同品种、类型花生壳中木犀草素含量的初探[J].中国油脂,2005,30(5):51-55
- [14] 王晴晴,张盛,李银花,等.HPLC 同时测定花生壳中绿原酸、3,4-二咖啡酰奎尼酸和木犀草素[J].农产品加工·学刊,2011(6):69-70
- [15] 张志恒,李彩瑞,马晶军,等.荧光法研究木犀草素与人血清白蛋白的相互作用[J].光谱学与光谱分析,2008,28(5):1135-1139
- [16] 杨颖,宋曙辉,王文琪,等.花生壳提取物的三种体外抗氧化方法的综合比较[J].食品研究与开发,2010,31(9):41-44
- [17] 陈春涛,马庆一,高玉美,等.花生壳中木犀草素等抑菌活性成分的提取、纯化与研究[J].食品科学,2003,24(5):84-88
- [18] 张毅,王旭光.木犀草素的体外抗炎机制研究[J].广州中医药大学学报,2007,24(3):231-234
- [19] 胡春萍,蔡雪婷,胡婷婷,等.木犀草素诱导非小细胞肺癌细胞株 A549 凋亡和 G2 周期阻滞[J].中国中药杂志,2012,37(9):1259-1263
- [20] 王焕,王荔.木犀草素抗肿瘤转移作用[J].中国医院药学杂志,2010,30(22):1915-1917
- [21] 刘毅,蓝诺,刘莉,等.木犀草素对慢性不可预知性温和应激所致小鼠抑郁的改善作用[J].时珍国医国药,2013,24(6):1382-1384
- [22] 刘圆,李园园,冯婷婷,等.木犀草素镇痛抗炎作用的实验研究[J].齐齐哈尔医学院学报,2010,31(15):2368-2370
- [23] 印媛君,余美荣,蒋福生,等.木犀草素预处理减轻 H_2O_2 诱导的乳鼠心肌细胞凋亡[J].基础医学与临床,2013,33(12):1576-1580
- [24] 刘涛,张俊会,李娜.木犀草素对糖尿病脑梗死大鼠神经细胞凋亡及 HSP70 mRNA、Fas mRNA 表达的影响[J].中国医药导报,2014,11(1):21-23

收稿日期:2015-03-02