

亚麻叶中活性物质提取工艺优化研究

郭亮¹, 赵爱萍²

(1. 甘肃省产品质量监督检验东部分中心, 甘肃 天水 741000;

2. 天水市药品检验检测中心, 甘肃 天水 741000)

摘要: 为筛选制定出亚麻叶中五种活性物质的最佳提取工艺, 以亚麻叶中提取的苾草素、绿原酸、异苾草素、牡荆素、异牡荆素 5 种成分的含量作为指标, 通过单因素试验研究含醇量、提取时间、固液比、提取次数、提取温度对 5 种成分提取效果的影响; 并利用 $L_9(3^4)$ 正交试验法方法, 优选最佳的提取工艺。确定的最佳提取工艺为乙醇溶液浓度 75%、料液比 1:15 (g/mL)、提取次数 2 次、提取时间 1.5 h、温度 80 °C。该提取工艺是一种适合于亚麻叶中有效成分提取的有效方法, 可为亚麻叶研究和开发利用提供参考。

关键词: 亚麻叶; 五种成分; 提取工艺; 正交试验法

中图分类号: S563.2

文献标志码: A

文章编号: 2097-2172(2023)06-0553-05

doi: 10.3969/j.issn.2097-2172.2023.06.014

Study on the Process Optimization of Active Substances Extraction from Flax Leaves

GUO Liang¹, ZHAO Aiping²

(1. Gansu Province Product Quality Inspection East Branch Centre, Tianshui Gansu 741000, China;

2. Tianshui Drug Inspection and Test Centre, Tianshui Gansu 741000, China)

Abstract: To optimize the extraction process of five active substances from flax leaves, taking the contents of orientin, chlorogenic acid, isoorientin, vitexin and isovitexin extracted from flax leaves as indicators, the effects of alcohol content, extraction time, solid-liquid ratio, extraction times, and extraction temperature on the extraction effects for the five substances were studied by single factor experiment, the optimum extraction process was selected by $L_9(3^4)$ orthogonal method. Results showed that the optimum extraction process was determined as ethanol content at 75%, solid-liquid ratio at 1:15 (g/mL), extraction for 2 times and extraction time for 1.5 h at the temperature of 80 °C. This extraction process is an effective method suitable for the extraction of effective substances from flax leaves, which can provide reference for the research, development and utilization of flax leaves.

Key words: Flax leaf; Five ingredient; Extraction process; Orthogonal method

亚麻(*Linum usitatissimum*)为亚麻科亚麻属植物, 为重要的纤维、油料和药用植物^[1-2]。其茎叶主治肝风头痛、刀伤出血, 风邪入窍, 口不能言^[3]。有研究表明, 亚麻茎叶中含 5 种天然黄酮类物质^[4], 此类黄酮物质具有抗氧化、抑制炎症、抗肿瘤、抗糖尿病、抗肝损伤、抗病毒、舒张血管、抗心律失常等多种作用^[5-9]。亚麻叶种植广泛, 较金银花、牡荆等药用植物, 来源易得且价格低廉, 将其作为苾草素等黄酮类活性成分的提取原料具明显的经济效益, 前期实验室对亚麻叶

中 5 种活性物质的提取研究采用室温下甲醇超声处理的方法^[10], 这种提取方式具有局限性, 面临着甲醇残留量过高的问题, 不适宜大规模开发与利用。为此, 我们改用乙醇进行提取, 同时引入乙醇浓度、提取温度、提取次数、液料比等因素, 使用 C_8 色谱柱, 以梯度洗脱的方法测定提取量, 通过正交试验进行优化^[11-12], 获得一种以绿原酸、苾草素、异苾草素、牡荆素、异牡荆素为指标的最佳提取工艺, 为亚麻叶进一步研究和开发利用提供技术储备。

收稿日期: 2023-03-13

基金项目: 甘肃省天水市科技支撑计划(2020-NCK-7969)。

作者简介: 郭亮(1983—), 男, 甘肃天水人, 工程师, 硕士, 主要从事药物分析方面的工作。Email: 2956857401@qq.com。

通信作者: 赵爱萍(1971—), 女, 甘肃天水人, 副主任药师, 主要从事药物分析方面的工作。Email: 49542356@qq.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪；电子天平(Precisa XR 205SM)用于称量标准品；电子天平(Mettler Toledo EL204-IC)用于称量样品。GZX-GF-MBS 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司)。

1.1.2 试剂 绿原酸标准品(批号110753-200413)和牡荆素(批号 111687-200602)均购自中国食品药品检定研究院；荭草素 [批号must-15015042213, 纯度 99.26%(HPLC)]、异荭草素 [批号 must-15071112 纯度99.61%(HPLC)]、异牡荆素 [批号 must-14122411 纯度 99.86%(HPLC)]均购自成都曼思特生物科技有限公司；乙腈(色谱纯, 德国默克公司生产, 批号 JB087430)；分析纯甲酸来自市售(天津致远化学试剂, 批号 20201108)。

1.1.3 供试材料 亚麻叶采自甘肃省天水市秦州区中梁乡农田, 为本地油用型亚麻品种。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制 精称荭草素等 5 种标准品, 加甲醇超声溶解, 定容至 50.00 mL 容量瓶中, 制成质量浓度分别为 400.8、190.0、394.8、170.0、374.8 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液作为标准储备液；分别吸取标准储备液 5.00 mL 至 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定制成混合标准中间溶液；准确吸取上述混合标准中间溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 加甲醇定容至 5.00 mL, 配制成混合标准系列工作液。

1.2.2 色谱测定 色谱测定条件为：色谱柱 Inert-

sil C₈ (4.6 × 250 mm, 3.5 μm)；流动相 A (乙腈), 流动性 B (0.1%甲酸水溶液), 梯度洗脱, 0 ~ 30 min(13%A), 30 ~ 50 min(13% ~ 30%A), 50 ~ 60 min (13%A)；柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ ；流速为 1.0 mL/min；进样量为 10 μL ；检测波长为 350 nm。分别取标准品溶液、样品溶液测定, 记录色谱(图 1)。结果显示, 标准品和供试品溶液色谱图中, 亚麻中荭草素等 5 种成分的保留时间一致。理论塔板数、拖尾因子、分离度等各项指标均符合《中国药典》2020 版通则系统适用性的要求。

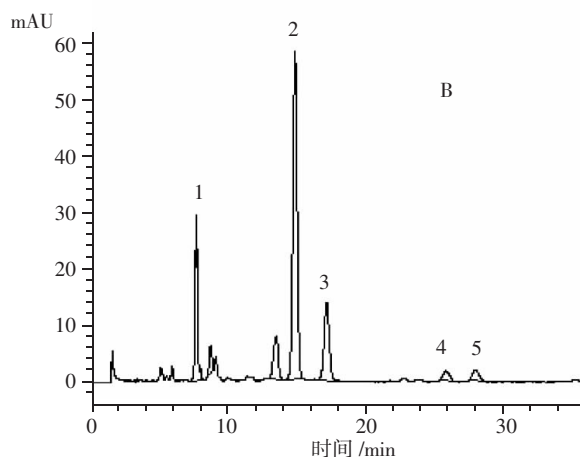
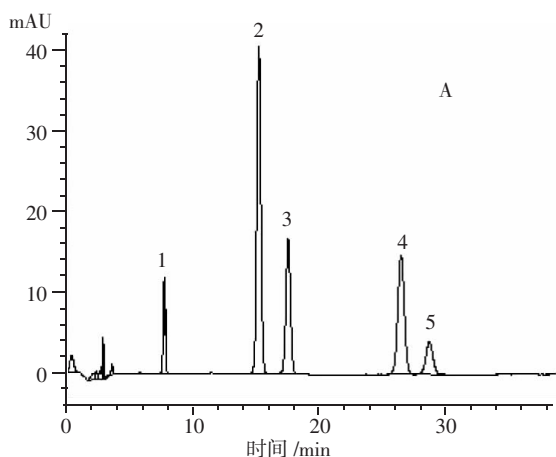
1.2.3 线性关系考察 精准吸取混合标准系列工作液 10 μL , 按 1.2.2 的色谱条件测定, 以峰面积值为纵坐标(Y), 浓度为横坐标(X), 绘制标准曲线, 得回归方程(表 1)。

表 1 5 种活性成分回归方程和线性范围。

成分	回归方程	R ²	线性范围 / ($\mu\text{g/mL}$)
绿原酸	$Y=6\ 158.65X-8\ 391.07$	0.999 4	8.02~80.20
荭草素	$Y=7\ 772.28X-9\ 446.27$	0.999 7	3.77~27.72
异荭草素	$Y=1\ 3516.4X-9\ 883.34$	0.999 2	7.89~70.85
牡荆素	$Y=1\ 0671.3X-5\ 738.60$	0.999 1	2.55~25.50
异牡荆素	$Y=1\ 2145.3X-1\ 1703.2$	0.999 2	7.44~74.43

1.2.4 亚麻叶提取工艺流程及测定 将采集所得新鲜亚麻叶置电热恒温鼓风干燥箱中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至干。提取工艺流程为：干燥→粉碎→称重(精准称取 3.5 g)→加入提取溶剂(乙醇 35 mL)→称重→回流提取→离心→定容。

将提取液稀释至标准品线性范围内, 经



1.绿原酸 2.异荭草素 3.荭草素 4.牡荆素 5.异牡荆素

图1 混合标准品(A)和亚麻叶样品溶液(B)的HPLC

0.45 μm 微孔滤膜过滤, 按照 1.2.2 条件测定提取液中荜草素等 5 种成分的浓度, 计算提取量。

$$\text{提取量(含量)} = (C \times V) / M$$

式中, C 为成分浓度; V 为体积, M 为样品称取量。

1.2.5 单因素试验 基础试验条件为乙醇溶液浓度 70%, 料液比 1:20 g/mL, 回流提取时间 1.5 h, 提取温度 75 $^{\circ}\text{C}$, 提取 1 次(设计的基础试验条件, 在后面单因素筛选计中, 只改变单因素参数, 其他参数未发生变化)。单因素筛选试验设计: 乙醇溶液浓度(30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%)、时间(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h)、料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70 g/mL)、提取次数(1、2、3 次)、提取温度(65、70、75、80、85、90 $^{\circ}\text{C}$), 每个单因素试验设计两次平行试验, 以提取物平均值之和筛选因素水平。

1.2.6 正交试验 综合单因素实验数据, 以浓度、时间、次数、料液比等 4 因素为变量, 建立 3 水平正交试验 $L_9(3^4)$, 因素与水平设计见表 2。从 5 个因素经单因素试验选取了其中四个, 因温度对提取量影响不大, 最终为 4 因素 3 水平, 以各成分提取总量为指标, 利用正交试验法, 筛选出最佳提取工艺。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇浓度对亚麻叶中各成分提取量的影响

由图 2 可见, 随着乙醇浓度的增加, 亚麻叶中绿原酸、异荜草素、荜草素的提取量均呈先增加后降低趋势, 当乙醇浓度达 70% 时, 亚麻叶中绿原酸、异荜草素、荜草素的提取量达最大值, 之后随乙醇含量的增加而逐渐减小; 而浓度对牡荆素、异牡荆素的影响不大。通过以上分析, 可将

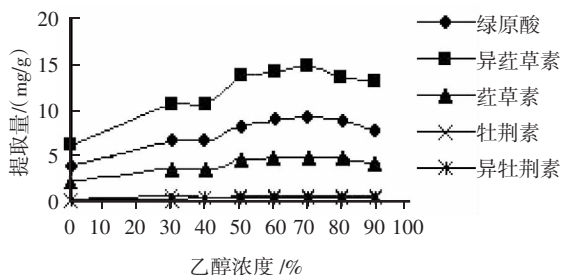


图 2 乙醇浓度对亚麻叶中 5 种成分提取量的影响

含醇量因素水平设在 65%、70%、75%。

2.1.2 提取时间对亚麻叶中各成分提取量的影响

由图 3 可知, 随着提取时间的增加, 亚麻叶种绿原酸的提取量变化不大, 而荜草素、异荜草素、异牡荆素的提取量均呈先上升后下降趋势, 在 1.5 h 达最大值。提取物分散到溶剂中需要一定时间, 时间越长, 提取量越大, 但当扩散达到平衡后, 继续增加时间对提取量的影响不大, 且时间过长导致其他杂质溶出竞争分散系, 使提取量有所下降。通过以上分析, 可将提取时间因素水平设在 1.0、1.5、2.0 h。

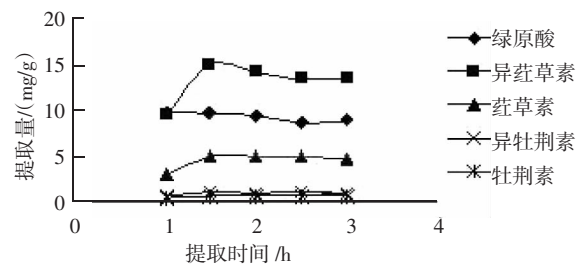


图 3 提取时间对亚麻叶中 5 种成分提取量的影响

2.1.3 料液比对亚麻叶中各成分提取量的影响

图 4 表明, 随着料液比的增加, 亚麻叶中绿原酸、异荜草素、荜草素的提取量均呈先增加后下降趋势, 此过程中在料液比 1:20 g/mL 时提取量显著增加, 之后变幅不大, 而浓度对牡荆素、异牡荆素的影响不大。通过以上分析, 料液比因素水平设在 1:15、1:20、1:25 g/mL 可保证提取量的同时节约溶剂。

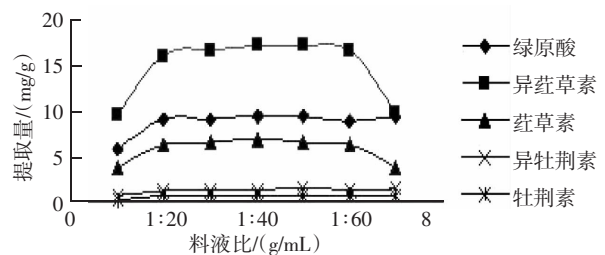


图 4 料液比对亚麻叶中 5 种成分提取量的影响

2.1.4 提取次数对亚麻叶中各成分提取量的影响

由图 5 可知, 随提取次数增加, 提取量明显减少,

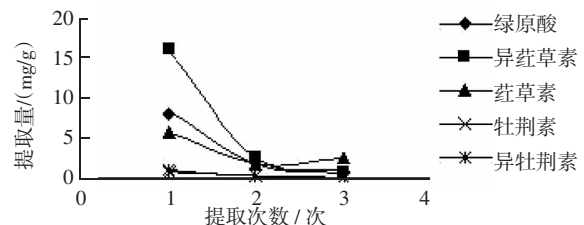


图 5 提取次数对亚麻叶中 5 种成分提取量的影响

第 3 次的提取量仅为第 1 次的 0.4% ~ 0.7%，因此，提取次数以 2 次为宜，为全面考虑，将 3 次列入水平考察范围内。

2.1.5 提取温度对亚麻叶中各成分提取量的影响

图 6 表明，随着提取温度的增加，亚麻叶中 5 种成分的提取量总体变化不显著。故提取温度因素水平不再进行正交试验考察。综合 5 种物质的提取量，为了使有毒成分生氰糖苷充分水解，考虑提取温度定为 80 °C [13-14]。

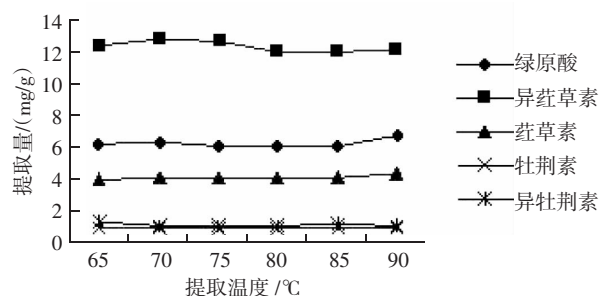


图 6 提取温度对亚麻叶中 5 种成分提取量的影响

2.2 正交试验

综合以上单因素试验数据，运用 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 设计正交试验，以确定最佳工艺条件。因素与水平设计见表 2，正交试验设计与结果见表 3，方差结果见表 4。

表 2 正交试验因素与水平

水平	因素			
	A 乙醇浓度 / %	B 料液比 / (g/mL)	C 提取次数 / 次	D 提取时间 / h
1	65	1 : 15	1	1.0
2	70	1 : 20	2	1.5
3	75	1 : 25	3	2.0

表 3 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	提取量 / (mg/g)					
					绿原酸	异荭草素	荭草素	牡荆素	异牡荆素	提取总量
1	1	1	1	1	15.94	16.03	5.55	1.01	1.10	39.63
2	1	2	2	2	11.62	12.10	8.35	1.18	1.11	34.36
3	1	3	3	3	10.70	2.36	7.02	1.18	1.12	22.38
4	2	1	2	3	19.99	19.29	6.92	1.26	1.31	48.77
5	2	2	3	1	11.31	11.56	8.21	1.18	1.14	33.40
6	2	3	1	2	9.57	0.95	5.97	1.03	0.98	18.50
7	3	1	3	2	19.00	21.12	9.86	1.12	1.39	52.49
8	3	2	1	3	10.12	10.64	7.73	1.08	1.01	30.58
9	3	3	2	1	10.97	2.98	6.97	1.16	1.11	23.19
k_1	32.123	46.963	29.570	32.073						
k_2	33.557	32.780	35.440	35.117						
k_3	35.420	21.357	36.090	33.910						
R	3.297	25.606	6.520	3.044						

表 4 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	16.394	2	1.163	19.000	
B	987.361	2	70.070	19.000	*
C	77.390	2	5.492	19.000	
D	14.091	2	1.000	19.000	
误差	14.09	2			

采用正交试验直观分析法，由表 3 中 R 值可知，影响亚麻叶中绿原酸、异荭草素、荭草素、牡荆素、异牡荆素成分提取的因素主次为 B > C > A > D，即料液比 > 提取次数 > 乙醇浓度 > 提取时间，最佳提取条件为 $A_3B_1C_3D_2$ ，且 B 因素对试验结果有显著影响，其余各因素无显著影响。因第 3 次的提取量仅为第 1 次的 0.4% ~ 0.7%，资源利用率低，考虑最佳工艺为乙醇溶液浓度 75%、料液比 1 : 15 g/mL、提取时间 1.5 h、提取次数设定为 2 次。

2.3 重复性试验

精准称取 1.2.4 工艺流程制备的亚麻叶样品 5 份，按 1.2.2 下色谱条件测定，计算亚麻叶中绿原酸、异荭草素、荭草素、牡荆素、异牡荆素提取量的相对标准偏差 (RSD) 值 ($n=5$) 分别为 1.36%、1.82%、0.99%、1.42%、1.71%，表明该提取工艺重复性良好。

2.4 回收率试验

精确称取已知提取量的亚麻叶样品 6 份，按提取量 100% 精准加入稀释后的对照品溶液，换算加入的量为：绿原酸 80.16 mg、荭草素 76.00 mg、异荭草素 39.48 mg、牡荆素 3.40 mg、异牡荆素 4.69 mg，按优化工艺流程制备供试品，1.2.2 下色谱条件测定提取量，计算回收率，RSD 值结果见

表5 样品加标回收检测结果

成分	回收率1	回收率2	回收率3	回收率4	回收率5	回收率6	回收率均值	RSD
绿原酸	93.12	89.52	92.24	92.91	89.99	93.12	91.95	1.84
荭草素	97.28	96.44	95.15	97.43	96.63	97.28	96.58	0.94
异荭草素	92.37	92.86	91.98	92.44	93.32	92.37	92.41	0.55
牡荆素	82.97	82.42	85.54	81.79	84.38	82.97	83.18	1.83
异牡荆素	84.95	85.52	82.08	86.52	86.45	2.13	84.47	2.13

表5,结果表明,该提取工艺稳定可靠。

3 讨论与结论

亚麻叶中含有的荭草素、绿原酸、异荭草素、牡荆素、异牡荆素等5种成分是很多中药材质量控制的重要指标,具有多方药理活性^[15]。前期研究发现,亚麻叶中这几种成分含量相对较多,且相比于金银花、竹叶、牡荆等药用植物,亚麻在我国种植广泛,其叶价格低廉,来源易得;而乙醇回流提取法提取率和安全性高^[16-17],用乙醇回流提取法提取亚麻叶中荭草素、绿原酸、异荭草素、牡荆素、异牡荆素具有实用性好、可操作性强的特点,易于实现亚麻叶活性成分提取的大规模生产应用。本试验建立亚麻叶中这5种活性成分提取工艺,对亚麻叶的进一步开发利用具有现实意义,为其进一步分离、纯化这些活性成分,研究提取物其他药理和生物活性提供技术储备。通过正交试验得出,工艺中料液比是影响亚麻叶中荭草素、绿原酸、异荭草素、牡荆素、异牡荆素5种成分提取率的主要因素,其余因素影响相对较小;其提取工艺最佳参数为乙醇溶液浓度75%、温度80℃、料液比1:15、提取次数2次,提取时间为1.5h。该研究获得了亚麻中荭草素、绿原酸、异荭草素、牡荆素、异牡荆素5种成分提取的粗品,但其各自的分离纯化工艺以及不同采收时间、不同产地的亚麻叶中这5种活性物质的含量变化都有待继续研究。

参考文献:

- [1] 徐朗然,黄成就. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2] 李雅珊,孙华. 亚麻成分提取方法及功效研究综述[J]. 天津科技,2018,45(4):53-56;61.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977.
- [4] Ibrahim RK Chromatographic and rpectrophotometric evidence for the occurrence of mixed O- and C-glycoflavones

in flax(bum usitatissimum) cotyledons[J]. Biophys. Acta, Igz., 1969, 192(3): 549-552.

- [5] 罗成,李艳,龙建纲,等. 异荭草素的药理作用[J]. 航天医学与医学工程,2016,29(5):381-384.
- [6] 袁莉,吴雨晨,任晓萌,等. 荭草素和异荭草素抗氧化活性及对肝癌细胞增殖的影响[J]. 食品科学技术学报,2013,31(6):21-27.
- [7] 于海瑶,李石化,孙丽艳,等. 异荭草素对胃癌细胞自噬作用的研究[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(12):36-38.
- [8] 邵莹,吴启南,乐巍,等. 碳苷黄酮保护心肌缺血损伤作用的研究进展[J]. 中草药,2015,46(1):128-139.
- [9] 任静娜,饶本龙,马宏昕,等. 异牡荆素对大鼠心室肌细胞瞬时外向钾电流的影响[J]. 中国中药杂志,2017,42(24):4864-4869.
- [10] 赵爱萍,王振宇,魏晓慧,等. HPLC法测定亚麻叶中5种成分含量[J]. 中药材,2016,39(4):826-828.
- [11] 张燕南,贺子军,刘刚. 响应面法优化荭草异荭草素提取工艺[J]. 北方园艺,2020(7):124-131.
- [12] 张峻菁,冯珊珊. 正交设计法优选蒲桃中总黄酮的提取工艺[J]. 今日药学,2015,25(8):571-573.
- [13] 郭嵩明,杨锦杰,桂雨豪,等. 不同处理方法降低橡胶籽粕中生氰糖苷含量的效果[J]. 食品科技,2015,40(12):60-63.
- [14] 宋崑,王慕华,邓颖,等. 不同处理方法对亚麻仁脱毒效果的研究[J]. 食品工业,2017,38(12):193-195.
- [15] 张才煜,张本刚,杨秀伟. 亚麻子化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志,2005(5):19-24.
- [16] 曾建光,徐雨生,徐翔,等. 乙醇冷回流与超声波辅助提取葛根药材总黄酮[J]. 湖北农业科学,2023,62(1):157-161.
- [17] 郝梦超,安超娜,王乙颖,等. 金银花黄酮的提取工艺及其药理活性研究进展[J]. 饮料工业,2022,25(5):71-75.