

# Optimization of the Extraction Technology of Antioxidant Substances from the *Peganum harmala* L. by Uniform Design

Yinping Li<sup>1\*</sup>, Yanhui Zhang<sup>1</sup>, Gulimeikereyi-Tuniyazi<sup>1</sup>, Delida·Mulatibieke<sup>1</sup>, Dilinuer·Malike<sup>1</sup>, Qing He<sup>2</sup>, Zhufeng Geng<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang Normal University, Urumqi Xinjiang

<sup>2</sup>School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin

<sup>3</sup>Analytic and Testing Center, Beijing Normal University, Beijing

Email: \*xinjiang20041021@163.com

Received: Sep. 3<sup>rd</sup>, 2019; accepted: Sep. 16<sup>th</sup>, 2019; published: Sep. 23<sup>rd</sup>, 2019

## Abstract

In order to optimize the extraction process of antioxidants in *Peganum harmala* L., different solvent extraction combined uniform design method were employed in this research. With the inhibition rate of DPPH scavenging free radical antioxidant activity as the test index, the experimental data of uniform design were analyzed by quadratic polynomial stepwise regression. Methanol was selected to be the optimum extraction solvent with an inhibition of 76.64%. The optimum extraction conditions are as follows: extract is 3 times; extraction time is 20 min; liquid-solid ratio is 1:14 g/mL. At this time, the inhibition rate of scavenging DPPH free radical antioxidant activity of methanol extract from *Peganum harmala* L. was 75.13%, which was the best extraction process.

## Keywords

*Peganum harmala* L., Extraction Solvent, Uniform Design Method, Antioxidant Activity of DPPH

# 基于均匀设计法优化骆驼蓬抗氧化物质提取工艺

李茵萍<sup>1\*</sup>, 张艳慧<sup>1</sup>, 古丽美克热依·吐尼亚孜<sup>1</sup>, 德丽达·木拉提别克<sup>1</sup>, 迪丽努尔·马力克<sup>1</sup>, 何清<sup>2</sup>, 耿珠峰<sup>3</sup>

<sup>1</sup>新疆师范大学, 化学化工学院, 新疆 乌鲁木齐

\*通讯作者。

文章引用: 李茵萍, 张艳慧, 古丽美克热依·吐尼亚孜, 德丽达·木拉提别克, 迪丽努尔·马力克, 何清, 耿珠峰. 基于均匀设计法优化骆驼蓬抗氧化物质提取工艺[J]. 计算生物学, 2019, 9(3): 52-58. DOI: 10.12677/hjcb.2019.93008

<sup>2</sup>天津大学, 化工技术学院, 天津

<sup>3</sup>北京师范大学, 分析测试中心, 北京

Email: \*xinjiang20041021@163.com

收稿日期: 2019年9月3日; 录用日期: 2019年9月16日; 发布日期: 2019年9月23日

## 摘要

为探寻骆驼蓬中抗氧化物质的最佳提取方法, 采用不同极性溶剂提取与均匀设计法相结合进行试验。以骆驼蓬为研究对象, DPPH清除自由基抗氧化活性抑制率为测试指标, 对均匀设计实验数据进行二次多项式逐步回归分析。结果筛选甲醇作为最佳提取溶剂, 其抑制率为76.64%。得到最优提取工艺条件: 提取3次, 提取时间20 min, 料液比1:14 g/mL, 通过验证此时骆驼蓬的甲醇提取物DPPH清除自由基抗氧化活性的抑制率为75.13%, 为最佳提取工艺。

## 关键词

骆驼蓬, 提取溶剂, 均匀设计法, DPPH抗氧化活性

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

骆驼蓬(*Peganum harmala* L.)是蒺藜科骆驼蓬属植物[1], 该属植物以生物碱类成分为主, 以及含有多糖、黄酮、多酚等成分[2] [3] [4] [5]。药理活性广, 具有祛风湿、消肿、止咳[6], 抗肿瘤、抗病毒、抗糖尿病、抗白血病等多方面药理作用[7] [8] [9] [10]。前人研究骆驼蓬总生物碱和多糖都具有一定的抗氧化活性[11] [12]。然而, 对骆驼蓬不同极性溶剂提取物抗氧化活性测定未见报道。近年来, 本课题组在开展骆驼蓬代谢组学研究过程中[13] [14], 以骆驼蓬为原料, 通过多种溶剂提取, 优选出甲醇作为提取溶剂, 并以清除 DPPH 自由基的抗氧化性活性为指标, 采用单因素和均匀设计法进行提取工艺优化, 目的是探索出一条有效的提取工艺路线, 从而为后续代谢组学研究提供可靠的提取方法。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 仪器和材料

KQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SPECORD 200 型紫外分光光谱仪(德国耶拿分析仪器股份公司); BSA224S 型分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 2KD-4025 型真空干燥箱(上海智城分析仪器制造有限公司)。

DPPH, 抗坏血酸, 百灵威公司; 骆驼蓬样本于 2013 年 9 月在新疆昌吉地区采集, 经新疆师范大学生命科学学院李进教授鉴定为骆驼蓬 *Peganum harmala* L., 经干燥后粉碎备用, 凭证标本号: 20130929, 现存放于北京师范大学分析测试中心; 水为超纯水; 其余试剂为分析纯。

## 2.2. 试验方法

标准曲线的制作：准确称取 DPPH 3.9 mg，用甲醇定容到 50 mL 棕色容量瓶中，配制成质量浓度为  $7.8 \times 10^{-2}$  mg/mL 的标准储备液，置冰箱中闭光保存备用(现用现配)。分别吸取 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 的储备液用甲醇定容到 4 mL，配置质量浓度分别为 0, 1.7, 3.5, 7.8, 15.6, 23.4, 31.2, 39.0, 46.8  $\mu\text{g/mL}$  标准使用液。用紫外-可见分光光度计测定上述标准溶液在 516 nm 波长处的吸光度，以 DPPH 浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制标准曲线，回归线性方程为： $y = 0.0158x$ ， $R^2 = 0.9996$ ，结果表明在 DPPH 浓度为 1.7~46.8  $\mu\text{g/mL}$  线性范围内浓度与吸光度呈良好的线性关系，充分说明该方法可准确测定抗氧化活性[15]。

供试品溶液的制备：骆驼蓬植物样本干燥、粉碎、过 40 目筛、精密称取骆驼蓬干粉 2 份，每份 100 mg，置 50 mL 离心试管中，分别使用甲醇、正己烷、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇溶液作为提取溶剂，同一溶剂超声连续提取 3 次，每次 20 min，3 次过滤后的滤液合并，减压浓缩至干后得到浸膏样品，用甲醇配置成浓度为 1 mg/mL 的试液，使用 1.2.3 方法测定样品的清除 DPPH 自由基能力的抑制率 IR 值。

抗氧化活性的测定：测定方法同文献[16]并加以改进。在 0.2 mL 的 DPPH (浓度：23.4  $\mu\text{g/mL}$ ，溶剂为甲醇)加入 0.2 mL 试液后摇匀，暗处静置 30 min。无水甲醇作参比溶液，516 nm 处测定其吸光度值  $A_j$ ；同时测定 0.2 mL 的 DPPH (浓度：23.4  $\mu\text{g/mL}$ ，溶剂为甲醇)加入 0.2 mL 无水甲醇混合液的吸光度值  $A_i$ ；再测定 0.2 mL 试液与 0.2 mL 无水甲醇混合液的吸光度值  $A_c$ 。通过公式(1)计算试液对 DPPH 的抑制率 IR：

$$IR = (1 - (A_i - A_j) / A_c) \times 100 \quad (1)$$

式中： $A_c$  为未加测定液时 DPPH 的吸光度；

$A_j$  为测定液在测定波长吸光度；

$A_i$  为加测定液后 DPPH 的吸光度；

IR 为 DPPH 的抑制率。

数据分析：标准曲线试验数据的统计分析结果采用 Microsoft Excel 软件；不同极性溶剂提取显著性差异分析采用邓肯式新复极差法进行方差分析，使用 SPSS Statistics 20.0 软件完成；骆驼蓬提取工艺采用均匀设计实验法，试验测定数据使用多元二次逐步回归分析方法，运用 Matlab (2012b)软件完成。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 清除 DPPH 自由基抗氧化性物质提取溶剂的选择

称取 100 mg 供试品骆驼蓬粉末各两份，分别加入甲醇、正己烷、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇溶液作为提取溶剂，每次 5 mL，超声提取三次，每次超声功率 500 W，温度控制在 25℃，每次 20 min，合并萃取液，浓缩后干燥，得到浸膏。用无水甲醇配置成浓度为 1 mg/mL 的试液，测定 DPPH 自由基清除能力，测定方法同 2.2。对于不同极性的溶剂提取样本得到的 DPPH 抑制率(IR)数据进行方差分析(如表 1 所示)，采用邓肯式新复极差法。通过数据分析，可以看出，在 95%置信区间内， $p < 0.05$  的条件下不同提取溶剂提取所得的结果差异显著，其中所测得的抗氧化性(IR 值)由高到低的顺序分别是：甲醇 > 正己烷 > 乙酸乙酯 > 丙酮 > 氯仿 > 正丁醇，甲醇、正己烷和乙酸乙酯、氯仿和丙酮、正丁醇之间提取效果差异均极显著。从单因素方差分析试验结果可以确定骆驼蓬的最优提取溶剂为甲醇。

**Table 1.** Result and variance analysis of DPPH antioxidants scavenging free radicals extracted by different extracting solvents  
**表 1.** 不同提取溶剂提取清除自由基 DPPH 抗氧化物质结果及方差分析

样品序号	提取溶剂	抗氧化性(IR) %
1	正己烷	29.18 ± 1.6 b
2	氯仿	18.96 ± 2.14 c
3	丙酮	20.22 ± 1.56 c
4	乙酸乙酯	28.72 ± 2.35 b
5	正丁醇	10.97 ± 2.09 d
6	甲醇	74.64 ± 3.85 a

注：同列不同小写字母表示组间差异显著( $\alpha = 0.05$ )。

### 3.2. 骆驼蓬甲醇提取工艺的研究

称取 0.1 g 供试品骆驼蓬粉末各两份，分别加入甲醇溶液作为提取溶剂，采用均匀设计法的因素水平表的参数进行提取[17]，以 DPPH 自由基清除能力为评价指标，每个因素设置 7 个水平，按照均匀设计表  $U_7(7^6)$  试验方案进行设计，均匀试验的因素水平表及结果见表 2~表 3。均匀实验三个因素取值  $x_1$  是提取次数：1~3 次； $x_2$  是提取时间：10~70 min； $x_3$  是加水量(液料比)：8~14 倍，合并萃取液，浓缩后干燥，得到浸膏样品，精密称取质量。使用无水甲醇配置成浓度为 1 mg/mL 的试液，测定 DPPH 自由基清除能力，测定方法同 2.2。采用均匀设计法来考察骆驼蓬的甲醇提取工艺，用 Matlab 软件模型回归分析[18]。

**Table 2.** Level table of conditional factors for extraction of antioxidants  
**表 2.** 抗氧化物质提取条件因素水平表

因素	水平						
	1	2	3	4	5	6	7
$x_1$ (提取次数/次)	1	1	2	2	3	3	3
$x_2$ (提取时间/min)	10	20	30	40	50	60	70
$x_3$ (液料比)	8	9	10	11	12	13	14

**Table 3.** Optimum extraction conditions of antioxidants using  $U_7(7^6)$   
**表 3.** 采用  $U_7(7^6)$  抗氧化物质提取条件优化方案

试验号	因素			指标		相对百分误差(%)
	提取条件			DPPH 自由基抑制率		
	X1	X2	X3	Y1 (实验值)	Y2 (预测值)	
1	1 (1 次)	2 (20)	3 (10)	56.34	57.33	-1.76
2	2 (1 次)	4 (40)	6 (13)	57.53	60.80	-5.68
3	3 (2 次)	6 (60)	2 (9)	64.29	63.68	0.96
4	4 (2 次)	1 (10)	5 (12)	69.52	67.38	3.07
5	5 (3 次)	3 (30)	1 (8)	67.18	70.26	-4.59
6	6 (3 次)	5 (50)	4 (11)	72.04	73.73	-2.35
7	7 (3 次)	7 (70)	7 (14)	74.96	77.20	-2.99

依据均匀设计实验,使用 Matlab (2012b)软件对实验测定结果进行统计分析,通过对数据进行多元二次逐步回归分析,得到回归方程(2):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 = 37.9461 + 7.6590x_1 - 0.0338x_2 + 1.1795x_3 \quad (2)$$

对回归方程采用逐步回归分析法进行优化,使用3种统计检验方法对模型进行检验。1、相关系数  $R$ ,若相关系数  $|R|$  在 0.8~1 范围内,一般地可以判断回归变量之间的相关性比较强,从本实验所得到的  $R^2 = 0.9296$ ,可知  $|R| = 0.9641$ ,由此可以判定各回归变量之间具有较强的线性相关性;2、F 检验法:如果当  $F > F_{1-\alpha}(k, n-k-1)$  时,拒绝原来假设的同时,完全可以认为因变量  $y$  与各个自变量  $x$  (自变量:  $x_1, x_2, \dots, x_k$ ) 之间存在显著地线性相关性,接受原来的假设,则认为因变量  $y$  与自变量  $x$  之间线性相关性不明显。本例数据显示  $F = 13.2128 > F_{1-0.05}(3,3) = 9.28$  (查表),由此可以得出因变量  $y$  与自变量  $x$  之间具有显著地线性相关性;3、 $p$  值检验法:假设当  $p < \alpha$  ( $\alpha$  为预定显著水平),则说明因变量  $y$  与自变量  $x$  (自变量:  $x_1, x_2, \dots, x_k$ ) 之间存在显著地线性相关性。本例回归分析结果显示  $p = 0.0310 < \alpha = 0.05$ ,说明因变量  $y$  与自变量  $x$  之间具有显著地线性相关性。依据以上三种统计检验方法检验结果显示,说明因变量  $y$  与自变量  $x$  (自变量:  $x_1, x_2, \dots, x_k$ ) 之间存在显著线性相关性:因而模型(2)从整体来看可用性很大。方程中各项试验因子的回归系数和  $t$  检验结果如表 4 所示。由表 4 可知,提取次数( $\beta_0$ ),液料比( $\beta_1$ )对抗氧化物质的提取结果影响极显著,通过对方程模拟可以得到骆驼蓬中抗氧化物质提取的最优条件为:提取次数是 3 次,提取时间是 20 min,料液比 1:14 g/mL 是最佳提取条件,其中提取次数是主要因素,液料比是次要因素,而超声时间是负相关(表 4)。

**Table 4.** Calculation results of MATLAB program  
**表 4.** MATLAB 程序的计算结果

回归项	偏相关	参数置信区间
$\beta_0$	37.9461	17.4764~58.4157
$\beta_1$	7.6590	3.3229~11.9951
$\beta_2$	-0.0338	-0.04197~0.1520
$\beta_3$	1.1795	-0.5055~2.8646
$R^2 = 0.9296$ $R = 0.9641$	$F = 13.2128$	$p = 0.0310$

利用数学模型模拟优化的实验条件(表 5)和与均匀设计试验中测定结果最高的试验号(7 号)进行对比验证试验,采用数理统计软件 SPSS Statistics 20.0 软件对所得到的实验结果进行单因素方差分析,实验方案如表 6 所示,在  $\alpha < 0.01$  的水平,两种不同提取条件下,骆驼蓬甲醇提取物 DPPH 自由基清除能力具有极其显著的差异,结果表明,相同测定条件下,根据模型优化的实验条件更佳,说明对影响骆驼蓬抗氧化物质提取工艺的 3 个因素水平进行均匀设计,得到最佳提取工艺条件完全是可靠的。

**Table 5.** Optimized results of extraction conditions  
**表 5.** 提取条件的优化结果

最高指标时各因素组合			
Y	X1	X2	X3
75.13	3	20	1:14

**Table 6.** Verification test scheme and results  
**表 6.** 验证试验方案及结果

实验编号	因素			抑制率% IR
	提取次数	提取时间	液料比	
7	3	70	1:14	74.96 B
优化组合	3	20	1:14	75.13 A

注：同列不同大写字母表示组间差异极显著( $\alpha = 0.01$ )。

## 4. 结论

本文以 DPPH 自由基清除率为指标，通过使用不同极性溶剂提取骆驼蓬中的抗氧化性物质，从而筛选出甲醇作为提取溶剂；采用均匀设计实验方法优化骆驼蓬抗氧化性物质提取工艺。对试验所得结果采用多元线性回归计算方法和逐步回归分析，建立回归模型，通过对方程分析及预测，找到最优条件。试验得出骆驼蓬中抗氧化性物质的最佳提取工艺条件是：提取次数 3 次，提取时间 20 min，料液比 1:14 g/mL。利用最佳提取工艺，得到的骆驼蓬抗氧化抑制率为 75.13%，说明此优化的提取工艺有效可行。抗氧化实验结果表明，骆驼蓬 6 个不同极性提取部分中均含有抗氧化活性物质，因溶剂极性不同，提取部位中化学成分有明显差异，所以其活性有所差异。整体而言，骆驼蓬甲醇提取物抗氧化性效果较好，DPPH 清除自由基抑制率为 74.64%，与其它溶剂提取物相比，抑制率明显增加，具有显著性差异。该工艺路线简单，成本低，有机溶剂使用量少，能够为本课题组后续代谢组学研究提供可靠的方法。

## 致 谢

感谢北京师范大学资源学院杜树山老师。

## 基金项目

本项目得到以下基金项目的支持：新疆师范大学博士科研启动基金(No.XJNUBS1901)；新疆师范大学自治区教学改革与研究项目(No.ZJG2019-06)

## 参考文献

- [1] 宋立人. 现代中药学大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [2] Shang, X.F., Guo, X., Li, B., et al. (2016) Microwave-Assisted Extraction of Three Bioactive Alkaloids from *Peganum harmala* L. and Their Acaricidal Activity against *Psoroptes cuniculi* in Vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, **192**, 350-361.
- [3] 全庆华, 姬瑞芳, 袁将, 等. 骆驼蓬多糖提取及对秀丽隐杆线虫多聚谷氨酰胺聚集毒性的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(11): 954-959.
- [4] 张普照, 王俊儒, 姚伟琴, 等. 骆驼蓬地部总黄酮提取工艺的优化[J]. 西北农业学报, 2005, 14(5): 114-117.
- [5] 罗建民, 李君, 王成虎, 等. 福林法测定骆驼蓬不同部位中多酚含量[J]. 理化检验(化学分册), 2013, 49(2): 232-233.
- [6] 赵婷, 王长虹, 王峥涛. 骆驼蓬属植物中生物碱类化学成分及其药理活性研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(5): 333-339+345.
- [7] 李凯, 薛小青, 张洪亮. 骆驼蓬有效成分的提取工艺及抗肿瘤机制研究进展[J]. 新疆中医药, 2015, 33(2): 80-82.
- [8] Roudaina, B., Lamjed, B., Adele, P., et al. (2018) Anti HSV-2 Activity of *Peganum harmala* (L.) and Isolation of the Active Compound. *Microbial Pathogenesis*, **114**, 291-298. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.017>
- [9] Baky, A., Rahman, A., Mekawi, E., Ibrahim, E.A. and Shalapy, N.M. (2016) The Anti-Diabetic and Anti-Lipidemic Effects of *Peganum harmala* Seeds in Diabetic Rats. *Der Pharmacia Lettre*, **8**, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2016/7389864>

- 
- [10] 刘俊玲, 乌庆超, 王朝晖, 等. 去氢骆驼蓬碱诱导急性白血病 Jurkat 细胞凋亡及其机制[J]. 光明中医, 2012, 27(2): 242-244.
- [11] 赵静. 骆驼蓬总生物碱正交提取工艺与抗自由基活性研究[J]. 中兽医医药杂志, 2014, 33(1): 48-53.
- [12] 李雪, 张鸣, 常国华, 等. 骆驼蓬粗多糖抗氧化性的研究[J]. 中国食品添加剂, 2016(1): 85-88.
- [13] Li, Y.P., He, Q., Geng, Z.F., *et al.* (2018) NMR-Based Metabolomic Profiling of *Peganum harmala* L. Reveals Dynamic Variations between Different Growth Stages. *Royal Society Open Science*, **5**, Article ID: 171722. <https://doi.org/10.1098/rsos.171722>
- [14] Li, Y.P., He, Q., Du, S.S., *et al.* (2018) Study of Methanol Extracts from Different Parts of *Peganum harmala* L. Using <sup>1</sup>H-NMR Plant Metabolomics. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2018**, Article ID: 6532789. <https://doi.org/10.1155/2018/6532789>
- [15] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, **28**, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- [16] 郭雪峰, 岳永德, 孟志芬, 等. 用清除羟自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(2): 508-511.
- [17] 鲁静, 牛晓静, 段晓颖. 均匀设计法优选淫羊藿多糖提取工艺[J]. 中国现代中药, 2019, 21(1): 95-98.
- [18] 叶峰. 运用 MATLAB 软件进行回归分析建模[J]. 成都航空职业技术学院学报, 2007, 23(2): 44-47.