

# 在线超声提取 96 孔盘技术高通量快速测定 全叶马兰中果聚糖成分

田尚衣<sup>1,2</sup> 万泓志<sup>1</sup> 黄国辉<sup>2</sup> 杨允菲<sup>\* 1</sup> 张义飞<sup>1</sup> 邵帅<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( 东北师范大学草地科学研究所, 植被生态科学教育部重点实验室, 长春 130024)

<sup>2</sup>( 东北师范大学生命科学学院生物基础实验教学中心, 长春 130024)

**摘 要** 采用在线动态超声提取装置对全叶马兰果聚糖成分进行提取, 用效应面方法优化了在线提取条件。提取溶剂为纯水, 待测样品为 5 mg, 提取条件为超声功率是 496 W, 溶剂流速 0.63 mL/min, 溶剂体积 4.69 mL; 用 96 孔盘联合酚硫酸程序对果聚糖进行高通量快速检测, 果聚糖的加标回收率为 98.3%~105.7%, 相对标准偏差为 2.9%~4.1%, 全叶马兰果聚糖含量为 17.60%。15 min 内可分析 24 个样品。试剂用量较常规比色分析减少了 95%。本方法快速、准确, 特别适合天然植物资源生态研究中数以百计的大样本统计调查。

**关键词** 全叶马兰; 果聚糖; 高通量分析; 在线动态超声提取; 96 孔盘; 苯酚

## 1 引 言

全叶马兰(*Kalimeris integrifolia*) 是菊科植物, 其根部含有大量的果聚糖是重要的天然植物多糖, 具有抑制病原体在结肠内滋生<sup>[1]</sup>、增加钙的吸收<sup>[2]</sup>、防便秘<sup>[3]</sup>和降低结肠癌风险<sup>[1]</sup>等特殊功效。

近年来, 在线动态超声辅助提取日益受到重视<sup>[4]</sup>。以往超声辅助提取多见于静态形式, 动态超声辅助提取植物多糖并不多见。96 孔盘测试技术基于光度法<sup>[5]</sup>, 其多通道光路垂直照射, 可在 6~10 s 内完成 96 个样品的测试。本研究采用在线超声提取与 96 孔盘酚硫酸光度法联用进行全叶马兰中果聚糖的高通量快速测定。应用效应面方法(RSM) 优化了在线动态超声提取条件<sup>[6]</sup>, 比较了在线提取与离线提取对果聚糖提取产率的影响; 化学比色法与 96 孔盘比色法对果聚糖分析准确度及分析效率的影响。本方法具有实验步骤少、数据准确及分析效率高等优点。适用于植物多糖研究及柱色谱分离多糖的检测。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

PCR-680(美国 BIO-RAD 公司); JY92 II 型超声波发生器(宁波新芝科器研究所); BS-100A 自动部分收集器(上海沪西分析仪器有限公司); BT01-100/YZ1515 恒流泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

菊粉(Lnulun) 标样(德国 Marck 公司); 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和苯酚(分析纯)。果聚糖标准贮备液(1.00 g/L) 的制备: 准确称取菊粉 0.0500 g, 用少量超纯水在 60 ℃水浴下充分溶解并定容至 50 mL; 5% (m/V) 苯酚。

全叶马兰采集于松嫩草地, 处于萌发期(4 月)。新鲜植物样品于 105 ℃杀青 15 min 后, 80 ℃烘至恒重。取根部粉碎, 过 40 目筛, 存放于干燥器中。

### 2.2 实验方法

**2.2.1 在线动态超声提取程序** 准确称取 0.00480~0.00500 g 样品装入样品腔内, 按图 1 所示连接在线提取装置。操作流程为: 调节蠕动泵的流速及超声发生器的功率, 将样品腔放置在超声探头下 1 cm 处固定好, 连接在线提取装置并检查是否有漏液处, 同时启动蠕动泵、超声发生器和时间计数器, 根据时间计数器准确定量接收样品中果聚糖提取液 4.7 mL。

**2.2.2 效应面方法(RSM) 优化在线动态超声提取条件** RSM 用于果聚糖提取过程参数的优化, 根据三因素、三水平的 Box-Behnken 实验设计, 产生 17 次组合实验(表 1)。根据预实验, 固定提取样品用量

2010-11-11 收稿; 2011-01-09 接受

本文系国家自然科学基金项目(No. 30770397) 和东北师范大学生物学基地项目(No. J0830627) 资助

\* E-mail: yangyf@nenu.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

(0.0050 g), 规定在线超声提取过程中 3 个重要参数的优化范围: 超声功率 (180, 360 和 540 W), 提取溶剂体积 (1, 3 和 5 mL) 和溶剂的流速 (1, 1.5 和 3 mL/min)。每个自变量在低、中、高实验水平分别以 -1, 0, +1 编码。Box-Behnken 的实验设计及结果见表 1。每个实验重复 3 次, 但 5 个中心点除外。通常, 一个二次多项式方程的通式可由式 (1) 表示:

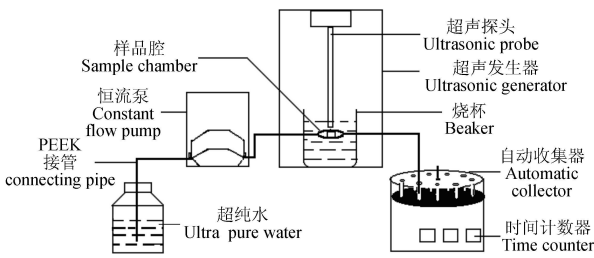


图 1 在线动态超声提取系统  
Fig. 1 On line dynamic sonication assisted extraction system

$$Y = \beta_0 + \sum_i \beta_i X_i + \sum_i \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j$$

(1)

式中,  $Y$  是因变量(果聚糖产率),  $X_i$  和  $X_j$  是自变量(过程参数),  $\beta_0$  是截距系数,  $\beta_i$  是线性系数,  $\beta_{ii}$  是二次项系数,  $\beta_{ij}$  是相互作用系数<sup>[7]</sup>。

在模型中, 用最小二乘法计算每个变量的系数; 用  $F$  检验判断每个变量及模型的显著性 ( $P < 0.05$ ), 方差分析评价各因子相互作用影响的显著性; 统计模型的准确度由确定系数  $R^2$  描述。所有计算程序由软件 Design Expert Software 7.1.3 进行综合分析, 建立数学模型并作出相应的三维变量曲面图, 对过程参数与果聚糖提取产率进行直观的量化分析。

表 1 BBD 实验设计  
Table 1 Box-Behnken experimental design

| 序号<br>No. | 提取条件 Extraction conditions |                             |                                    | 提取率<br>Extraction rate (%) | 序号<br>No. | 提取条件 Extraction conditions |                             |                                    | 提取率<br>Extraction rate (%) |
|-----------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|
|           | 功率 ( $X_1$ )<br>Power (W)  | 体积 ( $X_2$ )<br>Volume (mL) | 流速 ( $X_3$ )<br>Flow rate (mL/min) |                            |           | 功率 ( $X_1$ )<br>Power (W)  | 体积 ( $X_2$ )<br>Volume (mL) | 流速 ( $X_3$ )<br>Flow rate (mL/min) |                            |
| 1         | - 1(180)                   | - 1(1)                      | 0(1)                               | 7.91                       | 9         | 0(360)                     | - 1(1)                      | - 1(0.5)                           | 8.51                       |
| 2         | + 1(540)                   | - 1(1)                      | 0(1)                               | 10.18                      | 10        | 0(360)                     | + 1(5)                      | - 1(0.5)                           | 15.87                      |
| 3         | - 1(180)                   | + 1(5)                      | 0(1)                               | 12.41                      | 11        | 0(360)                     | - 1(1)                      | + 1(1.5)                           | 11.12                      |
| 4         | + 1(540)                   | + 1(5)                      | 0(1)                               | 16.84                      | 12        | 0(360)                     | + 1(5)                      | + 1(1.5)                           | 11.53                      |
| 5         | - 1(180)                   | 0(3)                        | - 1(0.5)                           | 8.27                       | 13        | 0(360)                     | 0(3)                        | 0(1)                               | 15.58                      |
| 6         | + 1(540)                   | 0(3)                        | - 1(0.5)                           | 15.63                      | 14        | 0(360)                     | 0(3)                        | 0(1)                               | 15.63                      |
| 7         | - 1(180)                   | 0(3)                        | + 1(1.5)                           | 12.46                      | 15        | 0(360)                     | 0(3)                        | 0(1)                               | 14.69                      |
| 8         | + 1(540)                   | 0(3)                        | + 1(1.5)                           | 10.54                      | 16        | 0(360)                     | 0(3)                        | 0(1)                               | 15.29                      |
|           |                            |                             |                                    |                            | 17        | 0(360)                     | 0(3)                        | 0(1)                               | 14.98                      |

2.2.3 96孔盘酚硫酸比色定量分析方法

参考文献[8]的酚硫酸方法进行改进, 在 96-孔盘的每个孔中, 平行 3 次加入标准溶液系列 5 个浓度点即 20, 40, 60, 80 和 100 mg/L, 空白试剂和样品溶液各 20 mL, 加入 125 mL 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 放入烘箱中 80 ℃ 加热 10 min 取出, 立即垂直快速加入 60 mL 5% (m/V) 苯酚溶液, 放入 PCR-680 紫外-可见读数器上测量 490 nm 处的吸光值。计算样品中果聚糖的含量。

2.2.4 加热水提方法 准确称取 0.0490~0.0500 g 样品于 10 mL 比色管中, 加入 8 mL 超纯水, 置于 60 ℃ 水浴浸提 40 min, 然后加超纯水定容至 10 mL。其它比色测量步骤同上。

3 结果与讨论

3.1 在线动态超声提取实验条件的优化

应用效应面方法, 根据 BBD 设计了 17 次组合实验, 得到在线动态超声提取的二次多项式回归方程:  
$$Y = 15.42 + 1.51X_1 + 2.35X_2 - 0.34X_3 + 1.84X_1^2 - 1.78X_2^2 - 1.90X_3^2 + 0.55X_1X_2 - 2.32X_1X_3 - 1.71X_2X_3$$
 (2)  
式中,  $Y$  是果聚糖的提取产率,  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  分别是在线动态超声提取系统中的超声功率、溶剂体积和溶剂流速。在线超声提取实验模型中, 模型显著性的方差分析结果见表 2。  $F$  值检验显示, 模型方程是极显著的 ( $P < 0.0001$ ), 说明模型的拟合程度很好; 确定系数  $R^2 = 0.9838$ , 表明拟合模型中 98.38% 的变化在研究值范围内, 仅有 1.62% 的数据不能由模型解释。同时, 校正系数  $R^2_{adj} = 96.29\%$ 、相对标准偏差  $RSD = 4.50\%$ , 表明此模型有较高的精密度和可靠性。说明应用该模型进行在线动态提取所得预测果聚糖产率接近实际产率, 优化的过程参数合理。

由软件(Design Expert software7. 1. 3)绘制的 3-D 效应曲面(图 2)解释了参数间的相互作用及获得最大提取产率各参数的最佳水平。图 2 表明, 当一个参数保持在中间水平(0) 时, 另两个参数对提取率的影响。由此得出最优化的超声功率为 496 W, 溶剂提取体积为 4. 69 mL, 溶剂提取流速为 0. 63 mL/ min。最大的预测提取率为 17. 77%。在优化的条件下, 6 次平行实验的平均提取率为 17. 60%。此结果与预测值基本一致, 证明此优化提取模型是有效的。

表 2 模型拟合统计分析  
Table 2 Fit statistics analysis for model

| 项目<br>Item | 标准偏差<br>SD | 平均值<br>Mean | 相对标准偏差<br>RSD (%) | 确定系数<br>$R^2$ | 校正系数<br>$R_{adj}^2$ | 模型准确度<br>Adeq. precision |
|------------|------------|-------------|-------------------|---------------|---------------------|--------------------------|
| 测定值 Value  | 0. 58      | 12. 79      | 4. 50             | 0. 9838       | 0. 9629             | 18. 770                  |

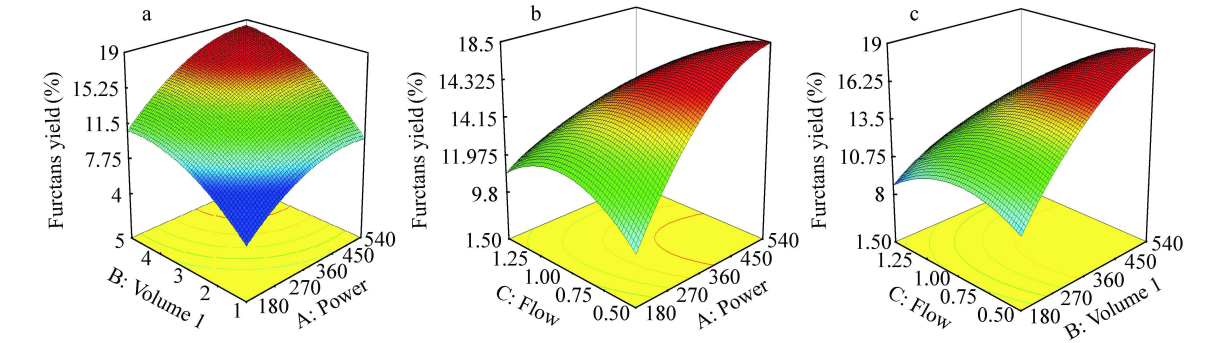


图 2 提取变量对果聚糖产率影响的效应曲面的 3D 图  
Fig. 2 Response surface plots (3-D) showing the effects of variables ( $X_1$ : ultrasonic power;  $X_2$ : flow rate of solvent;  $X_3$ : volume of solvent) on the response  $Y$  (fructans yield)

3.2 优化 96 孔盘酚硫酸比色定量分析方法

文献[ 8] 提出的酚硫酸比色方法适用于常量化学分析。因此, 在应用酚硫酸程序于 96 孔盘时, 考察了温度, 浓  $H_2SO_4$  的体积和 5% (m/ V) 苯酚溶液体积对吸光值的影响。

分别考察了 5 个温度( 50、60、80、100 和 110  $^{\circ}C$ ) 时的吸光值。其它实验条件是 20 mL 100 ng/ L 标准溶液, 150 mL 浓  $H_2SO_4$  及 50 mL 5% (m/ V) 苯酚。将 96 孔盘放入烘箱中实施不同温度。实验表明, 80  $^{\circ}C$  时吸光值最大, 故实验温度选为 80  $^{\circ}C$ 。

考察 50, 75, 100, 125, 150 和 175 mL 浓  $H_2SO_4$  时的吸光值影响。温度为 80  $^{\circ}C$ , 其它实验条件同上。实验表明, 浓  $H_2SO_4$  的体积为 125 mL 时, 吸光值最大。

考察 20, 40, 60, 80 和 100 mL 5% (m/ V) 苯酚时的吸光值。浓  $H_2SO_4$  取 125 mL, 其它实验条件同上。实验表明, 5% (m/ V) 苯酚的体积为 60 mL 时, 吸光值最大。在 490 nm 波长处测定果聚糖标准系列溶液的吸光值  $A$ , 得回归方程  $A = 0. 0205 + 8. 7913C$ , 相关系数  $r = 0. 9994$ 。在 20~ 100 mg/ L 范围内线性关系良好。

3.3 96 孔盘酚硫酸方法有效性的认证

在加标回收实验中, 将 3 个浓度水平的标准溶液( 以蒸馏水为对照) 平行测定 6 次, 按表 3 所示加到对照品及 0. 0500 g 样品粉末中, 充分混匀放置 24 h, 样品粉末用氮气流干燥。根据空白信号的信噪比 ( $S/N = 3$ ) 计算得出果聚糖的检出限为 10 mg/ L, 回收率为 98. 3%~ 105. 7%, 相对标准偏差为 2. 9%~ 4. 1%。结果表明, 本方法重现性较好, 精密度较高。

3.4 全叶马兰样品分析

从表 3 可知, 全叶马兰根部样品可溶性果聚糖含量为 17. 60% ( $n = 6$ ), 与预测结果 17. 77% 非常接近。由此可见, 全叶马兰可以作为果聚糖生产的优良植物资源。分析结果表明, 在线提取与离线提取对果聚糖提取率基本一致, 但在线提取节省试剂和时间, 减少对提取物的污染; 化学比色法的结果略好于 96 孔盘比色法, 但 96 孔盘的分析效率远远高于化学比色法, 试剂用量节省了 95%。

表 3 方法的加标回收率及相对标准偏差  
Table 3 Recovery and RSD (%) of method( *n*= 6)

| 样品果聚糖含量<br>Fructans content from<br>samples (%) | 加入标准品糖浓度<br>Concentration of standards<br>added (mg/g) | 实测糖含量<br>Sugar content<br>measured (%) | 回收率<br>Recovery<br>(%) | 相对标准偏差<br>RSD<br>(%) |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|----------------------|
| 17.60                                           | 10                                                     | 22.88                                  | 105.7                  | 3.5                  |
|                                                 | 20                                                     | 27.53                                  | 99.2                   | 4.1                  |
|                                                 | 30                                                     | 32.34                                  | 98.3                   | 2.9                  |

References

1 van Loo J, Clune Y, Collins J K. *Br. J. Nutr.*, **2007**, 93(1): S91~ S98  
2 Abrams S A, Griffin I J, Hawthorne K M, Liang L, Gunn S K, Darlington G, Ellis K J. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 82(1): 471~ 476  
3 Nyman M. *Br. J. Nutr.*, **2002**, 87(2): S163~ S168  
4 Tadeo J L, Sánchez Brunete C, Albero B, Gardá Valcárcel A I. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217(16): 2415~ 2440  
5 Shand C A, Williams B L, Coutts G. *Talanta*, **2008**, 74(4): 648~ 654  
6 Chen L, Zeng Q, Wang H. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 648(2): 200~ 206  
7 Zhu T, Heo H J, Row K H. *Carbohydrate Polymers*, **2010**, 82(1): 106~ 110  
8 Du Bois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. *Anal. Chem.*, **1956**, 28(3): 350~ 356

Dynamic Ultrasound-assisted Extraction and High throughput  
for Analysis of Fructans from *Kalimeris Integrifolia*  
by 96-Well Format

TIAN Shang-Yi<sup>1,2</sup>, WAN Hong Zhi<sup>1</sup>, HUANG Guo Hui<sup>2</sup>, YANG Yun Fei<sup>\*1</sup>, ZHANG Yi Fei<sup>1</sup>, SHAO Shuai<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>(Institute of Grassland Science, Northeast Normal University, Key Laboratory of Vegetation Ecology,  
Ministry of Education, Changchun 130024)

<sup>2</sup>(Central Laboratory of General Biology, School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024)

**Abstract** An on-line method was developed for the extraction and determination of fructans in plant samples. Fructans was extracted with water by ultrasound assisted, and directly introduced into a well of 96-well format which was reacted with concentrated sulphuric acid and 5% phenol for fast quantifying fructans. Response surface methodology (RSM) along with Box-Behnken design (BBD) was applied to optimize the critical variables of the extraction conditions of dynamic ultrasound-assisted extraction (DUAEE) system for fructans yield from *Kalimeris integrifolia*. Three factors such as ultrasonic power, flow rate of solvent and volume of solvent were investigated. The optimum extraction conditions were ultrasonic power 496 W, flow rate of solvent 0.63 mL/min, and volume of solvent 4.69 mL. Under these conditions, the maximum fructans yield was 17.60%. In addition, the single factor test was employed to optimize the major experimental parameters for the phenol-sulphuric acid procedure on 96-well microplate. The calibration curves of the proposed method under the optimised conditions corresponded very closely to a linear relationship ( $R \geq 0.99$ ) over the concentration range from 20 to 100 mg/L for inulin. RSD of the method were 2.9% – 4.1%, respectively. In this study, only small amount of sample, i.e. 5 mg, can meet the demand of the extraction. All of the analysis steps were completed in less than 15 min, and 96 samples could be analysed in 1 h using a 96-well format.

**Keywords** *Kalimeris integrifolia*; Fructans; High-throughput analysis; Dynamic ultrasound-assisted extraction; 96-Well format; Phenol

(Received 11 November 2010; accepted 9 January 2011)