

植物中单糖的样品前处理及色谱分析方法 研究进展

张英^{1,3}, 晋艳², 李海芳³, 林金明^{3*}

(1. 北京化工大学理学院, 北京 100029; 2. 云南省烟草农业科学研究院, 玉溪 653100; 3. 清华大学化学系, 北京 100084)

摘 要: 植物中单糖的提取从传统的固-液萃取发展到超声萃取、微波辅助萃取等, 实现了样品和溶剂用量少、萃取速度快、绿色环保等目的。纯化过程通常使用固相萃取柱, 其填料从商业化的 C_{18} 柱、 NH_2 柱和离子交换柱, 到分子印迹固相萃取柱、离子液体优化的萃取柱, 结构和功能上不断完善。因单糖多数不具有紫外吸收和荧光性质, 在分离检测中, 人们采取了多种方法来解决这一问题, 以满足色谱分析的需要。本文综述了植物中单糖的样品前处理方法及色谱分析方法。针对单糖提取、纯化、分离检测存在的问题以及解决方案进行了论述, 并对植物中单糖的色谱分析方法的发展进行了展望。

关键词: 单糖; 植物样品; 前处理; 色谱分析; 衍生化

Development of sample pretreatment and chromatography analysis of monosaccharides in plants

ZHANG Ying^{1,3}, JIN Yan², LI Hai-Fang³, LIN Jin-Ming^{3*}

(1. Faculty of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Science, Yuxi 653100, China; 3. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China;)

ABSTRACT: The extraction methods of saccharides from plants were developed from solid-liquid extraction to ultrasonic extraction and microwave assisted extraction, and achieved the results of sample and solvent consumption, high speed and environment friendly. The solid phase extraction was adopted into purification process, and its packings have been modified all the way on structures and functions, the materials varied from C_{18} , NH_2 , ion exchange column to molecularly imprinting materials and optimized ionic liquid column. As to detection, different methods were developed for monosaccharides to meet the requirements of chromatographic analysis, because most of them lack UV absorption and fluorescence properties. In this paper, the development of sample pretreatment methods and chromatographic analysis of monosaccharides in the plant samples was reviewed. The extraction, purification, separation and detection of monosaccharides from different samples were discussed.

KEY WORDS: monosaccharide; plant samples; pretreatment; chromatographic analysis; derivatization

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20110002110052)及云南绿色烟叶生产研究项目(准 2011YN01)

Fund: Supported by Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education Project (20110002110052) and Yunnan green leaf production research project (2011YN01)

*通讯作者: 林金明, 教授, 主要研究方向为微流控芯片-质谱连用细胞代谢物分析、化学发光分析新方法研究、复杂样品前处理技术与色谱分析。E-mail: jmlin@mail.tsinghua.edu.cn

*Corresponding author: LIN Jin-Ming, Professor, Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China. E-mail: jmlin@mail.tsinghua.edu.cn

糖类物质作为光合作用的主要产物,在植物中有着丰富的积累,不但对其生长、成熟有着重要作用,同时是动物的主要能量来源,参与调节生物体多种生命活动。如茶叶中的茶多糖,包含阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖等水溶性多糖,具有降血糖、降血脂、增强免疫力等作用^[1,2]。*D*-阿洛糖是自然界中稀有的单糖之一,具有多种功能性质,如免疫抑制剂、抗炎性、抗氧化剂、抗增殖性等^[3,4]。自然界中含量相当丰富的糖,如甘露糖^[5]和阿拉伯糖^[6],能有效减少脂多糖诱导的急性肺损伤^[5],以及降低高血糖物质的损害^[6]。

糖类物质,根据聚合度可分为单糖(聚合度为1)、寡糖(聚合度为2~9)和多糖(聚合度大于9)三种。单糖作为糖类物质的最基本单元,通过共价键聚合形成结构更为复杂的寡糖或多糖。人们很早就开始关注糖类物质的分离分析,结构鉴定以及应用。而单糖的分析仍是解决糖类物质结构鉴定的最重要的途径之一^[7],是分析多糖或聚糖的必要手段。

单糖分析检测的难度来自于它的结构。1),单糖具有多个羟基,有很高的亲水性,在植物中有比较高的溶解性,同时植物样品基体复杂,干扰物多,给提取带来了一定的困难;2),单糖结构具有相似性,其中不少是彼此的差向异构体^[7],化学性质相近,增大了分离的难度;3),单糖没有荧光特性,而且并不是所有的单糖都有紫外吸收,即使有紫外吸收也在很短的波长范围内,很难与干扰物分开。在过去的70多年里,不同的方法被应用于解决这些问题。本文从单糖的植物样品前处理、单糖分离及检测两个方面综述了近年来这一研究的进展。

1 植物中单糖的样品前处理方法

从植物中获取单糖的方式有两种,一种是直接萃取,获得游离的单糖,另一种是从多糖中解离单糖,进而分析。

游离单糖的萃取难点是由于植物细胞壁的支持保护作用,细胞结构难以破碎。为了更好地破碎细胞,一般需要对样品磨碎过筛。研究发现,样品粒径<50 μm 可以获得最高的糖类物质萃取率。常见的提取方式有液固萃取^[8,9]、超声萃取^[10-12]、微波辅助萃取以及加速溶剂萃取等^[13]。在超声萃取过程中,超声波独具的物理特性能促使植物细胞组织破壁变形,使得细胞和细胞间的糖类物质进入溶剂,被提取出来。Tavares等^[10]在室温下将磨成粉状的谷物超声5分钟,

提取果糖、葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、乳糖和蔗糖六种糖类物质。为了更好地破碎植物细胞壁,使得植物细胞中的物质得以释放,微波辅助萃取方式被应用于植物样品的提取。在微波作用下,细胞中极性物质产生大量热能,使得压力上升,最终导致了细胞破碎,细胞中的物质溢出,提高提取效率(如图1)。Yoshida等^[13]采用微波萃取方法从玉米淀粉生产的废弃物中萃取到了葡萄糖、木糖和阿拉伯糖。李攻科等^[14]将超声场、微波场以及磁场应用于植物萃取中,提出了多场混合固-液-固分散萃取方式,实现了烟草中有机氯残留的检测,对植物中单糖提取有一定的指导意义。

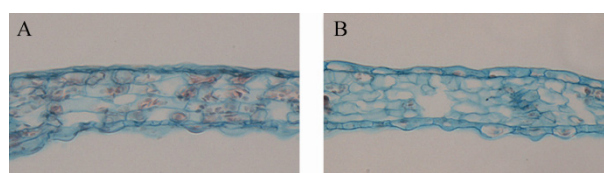


图1 微波萃取效果(A 微波萃取之前 B 微波萃取之后)^[15]
Fig. 1 The results of microwave assisted extraction (MAE) (A before MAE B after MAE)^[15]

植物中单糖检测的另一个来源是多糖降解,也是多糖结构鉴定的一个重要步骤。多糖降解的方法有酶解法和化学降解法。两种方法都是通过破坏糖单体之间的化学键形成单糖实现降解。Raessler等^[16]对此研究进行了详细论述。

萃取后的溶剂经过离心沉淀后,去除不溶性杂质,溶液需要进一步纯化才能分析。这一步通常通过固相萃取柱实现。固相萃取柱用溶剂预先活化后,样品加载到固相填料上,目标物质被保留,用合适的溶剂进一步淋洗。根据萃取填料的不同,糖类物质通常使用水、稀硫酸或者水与有机溶剂的混合物作为淋洗剂。

常用于糖类物质进行进样前纯化的固相萃取柱有SPE C_{18} 柱、氨基柱和离子交换柱^[17]。三者纯化糖类物质的机制不尽相同。 C_{18} 柱对糖类物质没有保留,糖类物质和干扰物经活化后的SPE C_{18} 柱后,糖类物质进入溶液,杂质保留在固相萃取柱上。而氨基固相萃取柱对极性物质有保留,且萃取柱上的氨基与糖类物质的羟基形成氢键(如图2),导致糖类物质在氨基固相萃取柱上有保留。因此,样品经过氨基固相萃取柱后,弱极性杂质未被保留进入洗出液,糖类物质及其他极性物质被保留在萃取柱上,经过合适的淋洗液淋洗后,糖类物质被洗出,而其他极性物质则被保留在萃取柱上。为了将特定的糖类物质从其它糖类

物质中提取出来,分子印迹材料作为填料被应用到固相萃取中。分子印迹能够通过三维结构和特定的结合位点实现对目标化合物的特异性识别,将特定的糖类物质从其他物质中,或从其他糖类物质中提取出来^[18]。Tian 等^[8]在离子液体修饰的多孔聚合物上修饰氨基基团,并将修饰过的材料填充在 SPE 柱中,使用该 SPE 柱从苦丁茶的水溶物中富集到了核糖、木糖、果糖、葡萄糖四种单糖。

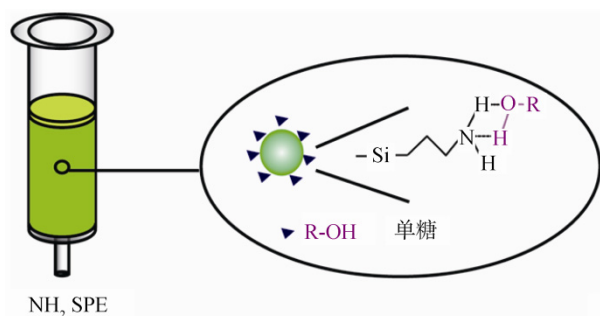


图2 氨基固相萃取柱纯化糖原理

Fig. 2 The principle of amino solid phase extraction purified monosaccharide sample

2 植物中单糖的色谱分析

上述提到的单糖分离分析有两大难点:结构的相似性以及几乎无发色团。为了解决这两个问题,人们开发了多种色谱分离分析手段。每种色谱分离分析方法各有自己的优点,因此为了更准确地分析单糖,建议多种方法结合使用。

2.1 色谱层析法

色谱层析法是一种简单、快速、有效的单糖分析方法,它具有费用低、操作简单以及较好的选择性等优点,能够平行分析多个样品,能够对相同或者不同的色谱条件进行重现。因此,使用色谱层析法对多种单糖进行连续分析成为可能。同时,由于糖类物质具有很弱的紫外吸收,因此二苯胺-苯胺-磷酸(DPA)通常用于色谱层析法检测^[19],比液相色谱结合示差折光检测器、蒸发光散射检测器或烟雾检测器的灵敏度更高^[20]。

色谱层析法可以耦合的检测比较多,如紫外检测器、荧光检测器、傅立叶变换红外检测器以及质谱检测器。质谱检测器常用于检测层析得到的未知点。层析质谱联用的方法已经用于分离检测各类大小分

子,在单糖的检测中比较少^[21]。

2.2 高效液相色谱分析

单糖的高效液相色谱分析主要有两个重点:一个是多样化的分离模式,即色谱柱的开发和使用;一个是多样化检测器的使用。这两点相互独立又相互联系。

2.2.1 色谱柱的开发和使用

在各类用于单糖分析的色谱柱中,离子交换柱、亲水色谱柱和反相柱是三种比较典型的柱子。

阴离子交换色谱是迄今为止最常用的糖醇和糖类的分离分析方法。高效阴离子交换柱通常通过具有季铵基的官能化的乳胶层包裹表面磺化的聚合物形成,用碱性流动相平衡。碱性化合物表现为弱酸性,其 pKa 值在 12~14 之间。因此,在碱性溶液中,糖类物质带负电荷的含氧阴离子。相对 pKa 值的细微差异有利于个体的单糖的色谱分离。该技术主要优点是,在定量过程中,不需要对样品进行纯化或者对单糖进行衍生化。但是,端基异构体形式的单糖,在没有衍生化时,遇到高 pH 时产生迅速的变旋现象,在色谱上只有一个峰。而对醛糖、酮糖、糖醛酸、氨基糖的分离结果往往效果比较好, Raessler 等^[16]对阴离子交换色谱在植物的单糖分离检测的应用进行了综述。Zhang 等^[7]开发了一种分析完整的单糖,包括大多数中性、氨基和酸性糖的方法。每种单糖的检测限均达到 $12.5 \times 10^{-3} \text{ nmol}$,并且该方法避免了单糖衍生化带来的麻烦。

亲水作用色谱柱常用于极性物质的分离,且已经有人总结了亲水作用色谱柱对复杂基质中极性物质的分离及应用^[22,23]。亲水作用色谱柱能够轻松地分离阴离子色谱柱不能分离的糖类物质,如岩藻糖、果糖、蔗糖、乳糖和棉子糖等;也能轻松分离阴离子色谱不能实现有效分离的中性单糖,如 D-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-果糖、D-葡萄糖。Gao 等^[24]采用一种简单的亲水相互作用色谱-质谱联用的方法来检测己糖、核糖和脱氧核糖中的非对映单糖,采用氨基键合的色谱柱结合乙腈/甲醇/水三相流动相的方式对这些单糖进行了分离并采用 SIM 模式进行检测。方法检测限达到 0.9~5.1 nmol/L。

亲水色谱柱在使用过程中需要对温度和流动相进行着重优化^[25],这些影响着单糖对检测器的响应。虽然,亲水色谱柱能够对单糖实现简单快速的分离,但是对于酸性的单糖,亲水作用色谱的直接分离效

果仍然不是很理想。

由于单糖几乎没有紫外吸收,也没有荧光特性且具有很强的极性,因此,反相柱很少用于单糖的直接分离。人们提出了通过衍生化将糖类物质转变为具有紫外吸收或可产生荧光的物质,然后再使用色谱进行分离分析的间接检测方法。该方法克服了直接检测方法灵敏度低、选择性差的缺点,而且使得糖类衍生物可以通过荧光或紫外的方法痕量检出^[26]。

在液相色谱中,常用于糖类物质检测的衍生化试剂有氨基吡啶类荧光衍生化试剂(如 2-氨基吡啶)、酰肼类荧光衍生试剂(如 *N,N*-二甲基氨基萘-5-磺酰肼)、苯胺类荧光衍生试剂(如 2-氨基苯甲酸)、氨基苯甲酸酯类荧光衍生试剂。氨基吡啶类荧光衍生化试剂是较早用于糖类物质分离分析的荧光试剂,通过还原性胺化作用衍生中性和氨基糖类。但该类衍生化试剂通常有以下缺点:不同结构的糖类物质导致不同的衍生反应方式;因为这类衍生试剂的氨基团有位阻现象和电子钝化现象,所以与糖类物质结合时会导致去糖基化反应,从而干扰糖的分析。

2.2.2 多样化检测器的使用

虽然二极管阵列检测器^[27]、质谱^[28]、紫外检测器、荧光检测器、脉冲安培检测器^[29]被广泛应用在衍生化的单糖检测中,但是仍有不少检测器被用于单糖的直接检测,以避免柱前或柱后的衍生化。

蒸发光散射检测器^[30]和示差折光检测器^[31]都是通用型检测器,但是前者灵敏度比后者高,对温度变化不敏感,基线稳定,适合与梯度洗脱液相色谱联用。然而,蒸发光散射检测器在比较窄的范围内响应是线性的,当线性范围跨越多个数量级时,由于检测原理和粒径分布的原因,响应并不是线性的^[32]。Pazourek^[32]采用单点校正法对蒸发光散射响应函数进行指数校正,并应用到糖类化合物的亲和色谱模式分析中,得到标准曲线,线性良好(质量系数 < 5%)。电雾检测器(CAD)是一种独特的技术,HPLC 洗脱液经雾化器中氮气的作用而雾化,其中较大的液滴在碰撞器的作用下经废液管流出,较小的溶质(分析物)液滴在室温下干燥,形成溶质颗粒。同时,用于载气的氮气流形成的第二股氮气流经过电晕式装置(含高压铂金丝电极)形成带正电荷的氮气颗粒,与溶质颗粒反向相遇时经碰撞使溶质颗粒带上正电。为了消除由带有过多正电荷的氮气所引起的背景电流,在含溶质颗粒的气流流入静电检测计之前,通过一种称之为离子井的装置(带有低负电压)使迁移率较大的颗粒(即粒度较小的氮气颗粒)的电荷中和,而迁移率小的带电颗粒把它们的电荷转移给一个颗粒收集器,最后用一个高灵敏度的静电检测器测出带电溶质的信号电流。由此产生的信号电流与溶质(分析物质)的含量成正比(如图 3)^[33]。电雾式检测器

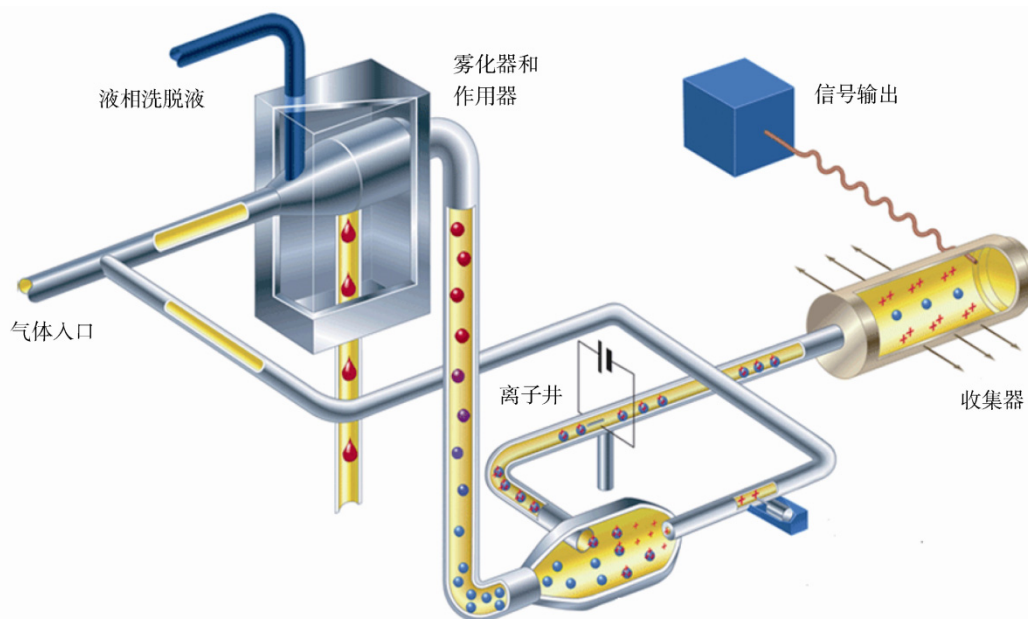


图3 电雾式检测器原理^[37]

Fig.3 The principle of charged aerosol detection^[37]

已经被应用于糖类检测^[34,35],与示差折光检测器和蒸发光散射检测器相比,具有更低的检测限^[36]。电雾式检测器的应用可能有助于解决无合适参考物下单糖的检测。

2.3 气相色谱分析

糖类化合物在高温下容易发生形变,经过硅烷化后可以用气相色谱进行分离分析。糖类物质衍生化后,通常为甲基醚,乙酸盐,三氟乙酸盐和三甲基甲硅烷基醚类物质。这些衍生物具有良好的挥发性和稳定性,使得三甲基硅烷醚成为气相色谱分析糖类物质最常用的衍生物。通常硅烷化作用以六甲基二硅氮烷(HMDS)和三甲基氯硅烷(TMCS)作为衍生化试剂,吡啶作为溶剂。其他试剂,如 *N*-三甲基硅烷咪唑(TMSI), *N*-甲基-*N*-三甲基甲硅烷(MSA), *N*-三甲基甲硅烷二乙胺(TMSDEA), *N*-三甲基甲硅烷二甲胺(TMSDMA), *N*-甲基-*N*-三甲基甲硅烷三氟乙酰氨(MSTFA), *N*, *O*-双(三甲基硅基)乙酰胺(BSA)和 *N*, *O*-双(三甲基硅基)三氟乙酰胺(BSTFA)也被用于不同温度不同反应时间下的甲硅烷基化反应。表 1 列出部分常用的糖类物质衍生化后的质谱检测方法。

Becker 等^[43]对于不同的衍生化方法进行了考查,三甲基硅烷化(TMS)方法提供的质谱图比三氟乙酰胺(TFA)提供的更为简单,而且对吡喃糖和呋喃糖有比较明确的区分。TMS 方法具有更少的基质效应,因此检测限和相对标准偏差更低。

2.4 毛细管电泳分析

在毛细管电泳中,糖类化合物在不带电荷的情况下,不能得到有效分离和直接检测。但是,强碱性

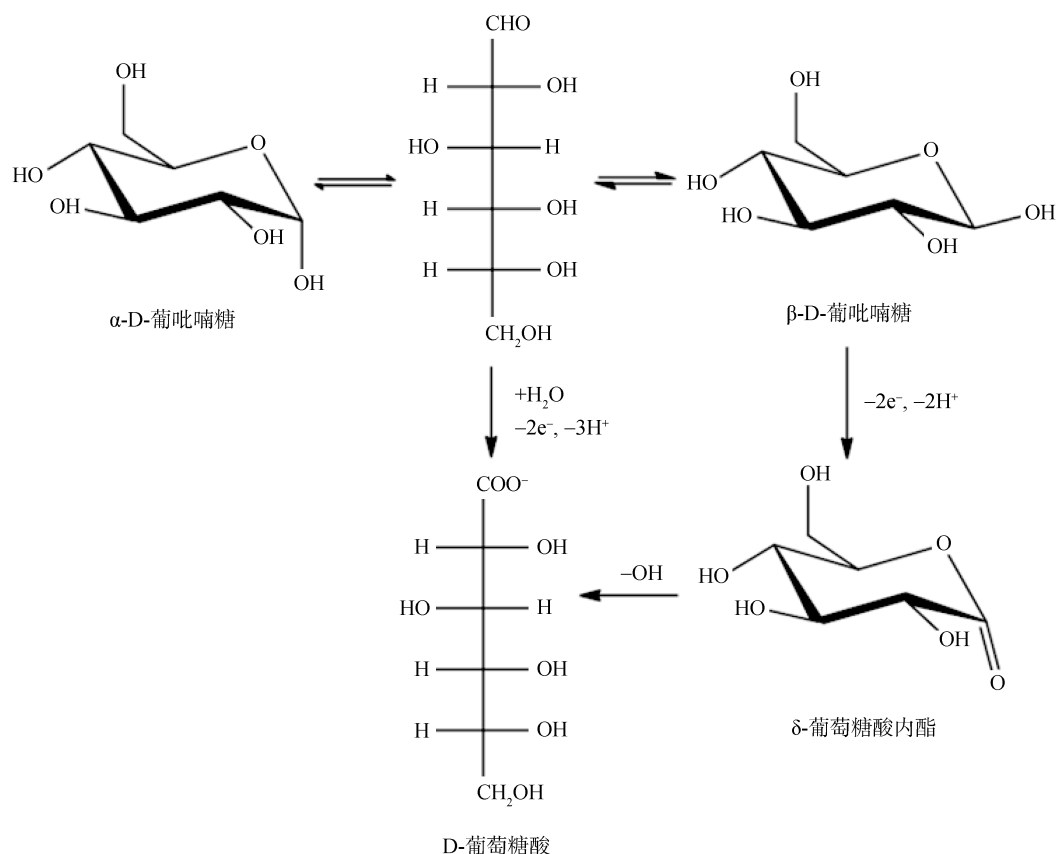
电解液(pH > 12.5)能够引起糖类物质的离子化、变旋光、烯醇化和异构化等一系列的级联反应,生成五碳烯二醇化阴离子,使得糖类物质得到有效分离^[44-46],在紫外范围内可以检测^[47]。可能的机制如图 4。这种五碳烯二醇化阴离子在波长为 270 nm 有有效吸收,且摩尔吸光系数大约为 40,因此检测限和定量限在 0.01~0.05 mmol/L 范围内。

毛细管电泳可以通过高 pH 值的碱性溶液使糖类物质转换成烯醇式在紫外波长为 195nm 处进行检测,但是这样低的波长不利于选择性检测,产生干扰,灵敏度低。为了克服糖类物质难离子化、缺乏发光团和亲水性高等缺点^[48],在糖类物质的毛细管电泳检测中,常常对其进行衍生化。常用的衍生化试剂有 1-苯基-3-甲基吡唑啉酮^[49], 1-(4-异丙基)苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮^[50], 2,3-萘二胺^[51]等。

糖类化合物不经过衍生化也可以采用毛细管电泳分离并进行间接检测。在毛细管电泳中,这种检测模式需要一个载体电解液和具有强紫外吸收的探针。当离子化的糖化合物与探针离子交叉流过检测器时,离子化的糖类化合物会使紫外吸收减弱出现倒峰,用适当的软件使谱图翻转 180°,就会得到相应的电泳图谱。尽管这种方法看似向通用型检测进了一步,但是仍存在一些不足。强电解质溶液会与空气中的二氧化碳生成碳酸酯,出现在电泳图谱中;由于样品杂质的干扰,往往会有很强的系统峰出现。尽管如此,仍有不少研究人员做了糖类化合物非衍生化的电泳检测。常用的强电解质溶液有山梨酸, 1-萘基羧酸,均苯三甲酸^[52], 甘氨酸-甘氨酸^[53]等。

表 1 糖类化合物气相衍生化检测
Table 1 Derivatization detection of saccharides in GC

检测物质	衍生化试剂	检测器	参考文献
棉子糖、葡萄糖、蔗糖	<i>N</i> , <i>O</i> -双(三甲基硅基)三氟乙酰胺/六甲基二硅氮烷	MS	Qureshi 等 ^[38]
核糖、果糖、半乳糖	三甲基氯硅烷/ <i>N</i> -三甲基硅烷咪唑	MS	Rodríguez-Sánchez 等 ^[39]
葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、木糖	<i>N</i> -甲基- <i>N</i> -三甲基甲硅烷三氟乙酰氨/三甲基氯硅烷	TOF	Kim 等 ^[40]
<i>D</i> -(-)-阿拉伯糖, <i>L</i> -鼠李糖, 1,6-脱水- β - <i>D</i> -葡萄糖, <i>D</i> -(+)-木糖, 核糖, <i>D</i> -(+)-甘露糖, <i>D</i> -(-)-果糖, <i>D</i> -(-)-半乳糖, <i>D</i> -(+)-葡萄糖, 景天庚酮糖等	<i>O</i> -双(三甲基硅基)三氟乙酰胺(BSTFA)/三甲基氯硅烷(TMCS)	MS/MS	Gómez-González 等 ^[41]
蔗糖、岩藻糖、纤维二糖、昆布二糖、松二糖等	六甲基二硅氮烷	MS	De la Fuente 等 ^[42]

图4 糖类物质在强碱性条件下可能的检测机制^[47]Fig.4 Carbohydrate detection mechanism in strong alkaline conditions^[47]

3 结 论

植物中单糖的提取从传统的固-液萃取发展到超声萃取、微波辅助萃取等,实现了样品和溶剂用量少、萃取速度快、绿色环保等目的。纯化过程一般使用固相萃取柱,萃取柱的填料从商业化的 C_{18} 柱、 NH_2 柱和离子交换柱,到分子印迹固相萃取柱、离子液体优化的萃取柱,结构和功能上不断完善,不断提高材料的富集效率以提高方法的检测限和灵敏度。高富集倍数、高选择性以及可重复利用和使用便携性是未来糖前处理材料的可能发展方向。而在检测过程中,更为复杂多样。因单糖多数不具有紫外吸收和荧光性质,人们从通用型检测器的使用到单糖衍生化的多样性,从液相色谱、气相色谱以及毛细管电泳多种色谱分离手段,提出了各种各样的解决方法,使得单糖的检测逐步向全面、快速、高灵敏度发展。

参考文献

- [1] Jun X, Deji S, Ye L, *et al.* Comparison of in vitro antioxidant activities and bioactive components of green tea extracts by different extraction methods [J]. *Int J Pharm*, 2011, 408(1): 97-101.
- [2] Stodt U, Engelhardt UH. Progress in the analysis of selected tea constituents over the past 20 years [J]. *Food Res Int*, 2013, 53 (2): 636-648
- [3] Hirata Y, Saito M, Tsukamoto I, *et al.* Analysis of the inhibitory mechanism of *D*-allose on MOLT-4F leukemia cell proliferation [J]. *J BiosciBioeng*, 2009, 107(5): 562-568.
- [4] Tanaka S, Sakamoto H. Effects of *D*-allose on the endocytic activity of dendritic cells and the subsequent stimulation of T cells [J]. *Cell Immunol*, 2011, 271(1): 141-146.
- [5] Xu XL, Xie QM, Shen YH, *et al.* Mannose prevents lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. *Inflamm Res*, 2008, 57(3): 104-110.
- [6] Song YB, Kim B, Choi MJ, *et al.* Protective effect of arabinose and sugar beet pulp against high glucose-induced oxidative stress in LLC-PK1 cells [J]. *Food Chem*, 2012, 134(1): 189-194.

- [7] Zhang Z, Khan NM, Nunez KM, *et al.* Complete monosaccharide analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(9): 4104–4110.
- [8] Tian M, Bi W, Row KH. Separation of monosaccharides by solid-phase extraction with ionic liquid-modified microporous polymers [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(22): 3151–3157.
- [9] Hu R, Lin L, Liu T, *et al.* Dilute sulfuric acid hydrolysis of sugar maple wood extract at atmospheric pressure [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(10): 3586–3594.
- [10] Jager AV, Tonin FG, Tavares MFM. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(4): 586–594.
- [11] Sharma U, Bhandari P, Kumar N, *et al.* Simultaneous determination of ten sugars in *Tinosporacordifolia* by ultrasonic assisted extraction and LC-ELSD [J]. *Chromatographia*, 2010, 71(7/8): 633–638.
- [12] Harvey DJ. Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(17): 1196–1225.
- [13] Yoshida T, Tsubaki S, Teramoto Y, *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of carbohydrates from industrial waste of corn starch production using response surface methodology [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(20): 7820–7826.
- [14] Zhou T, Xiao X, Li G. Hybrid field-assisted solid-liquid-solid dispersive extraction for the determination of organochlorine pesticides in tobacco with gas chromatography [J]. *Anal Chem*, 2011, 84: 420–427.
- [15] Zhang HF, Yang XH, Wang Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2011, 22: 672–688.
- [16] Raessler M. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants [J]. *Trends Anal Chem*, 2011, 30: 1833–1843.
- [17] Baik YS, Cheong WJ. Development of SPE for recovery of polysaccharides and its application to the determination of monosaccharides composition of the polysaccharide sample of a lactobacillus KLB 58 [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(10): 1509–1515.
- [18] Okutucu B, Önal S, Telefoncu A. Noncovalently galactose imprinted polymer for the recognition of different saccharides [J]. *Talanta*, 2009, 78(3): 1190–1193.
- [19] Zhang Z, Xiao Z, Linhardt RJ. Thin layer chromatography for the separation and analysis of acidic carbohydrates [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2009, 32(11/12): 1711–1732.
- [20] Morlock GE, Sabir G. Comparison of two orthogonal liquid chromatographic methods for quantitation of sugars in food [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2011, 34(10/11): 902–919.
- [21] Fuchs B, Süß R, Nimptsch A, *et al.* MALDI-TOF-MS directly combined with TLC: a review of the current state [J]. *Chromatographia*, 2009, 69: 95–105.
- [22] Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402: 231–247.
- [23] Bernal J, Ares A M, Pól J, *et al.* Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 7438–7452.
- [24] Gao Q, Nilsson U, Ilag LL, *et al.* Monosaccharide compositional analysis of marine polysaccharides by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399: 2517–2529.
- [25] Liu Z, Lou Z, Ding X, *et al.* Global characterization of neutral saccharides in crude and processed *Radix Rehmanniae* by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 2833–2840.
- [26] Wu X, Jiang W, Lu J, *et al.* Analysis of the monosaccharide composition of water-soluble polysaccharides from *Sargassum fusiforme* by high performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2014, 145: 976–983.
- [27] Maury D, Couderc F, Czaplicki J, *et al.* Optimized conditions for 2-aminobenzamide labeling and high - performance liquid chromatography analysis of *N*-acylated monosaccharides [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24: 343–346.
- [28] Zhang P, Wang Z, Xie M, *et al.* Detection of carbohydrates using a pre-column derivatization reagent 1-(4-isopropyl) phenyl-3-methyl-5-pyrazolone by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878: 1135–1144.
- [29] Shifflett JR, Jones LA, Limowski ER, *et al.* Comparison of segmented flow analysis and ion chromatography for the quantitative characterization of carbohydrates in tobacco products [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 11714–11722.
- [30] Sun BS, Gu LJ, Fang ZM, *et al.* Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC-ELSD [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50: 15–22.
- [31] Templeton DW, Quinn M, Van Wychen S, *et al.* Separation and quantification of microalgal carbohydrates [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1270: 225–234.
- [32] Pazourek J. Monitoring of mutarotation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(6/7): 974–981.
- [33] Vehovec T, Obreza A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(10): 1549–1556.

- [34] Hu DJ, Cheong KL, Zhao J, *et al.* Chromatography in characterization of polysaccharides from medicinal plants and fungi [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(1): 1–19.
- [35] Hutchinson JP, Remenyi T, Nesterenko P, *et al.* Investigation of polar organic solvents compatible with corona charged aerosol detection and their use for the determination of sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. *Anal ChimActa*, 2012, 750: 199–206.
- [36] Shaodong J, Lee WJ, Ee JW, *et al.* Comparison of ultraviolet detection, evaporative light scattering detection and charged aerosol detection methods for liquid-chromatographic determination of anti-diabetic drugs[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51: 973–978.
- [37] McCarthy R, Gamache P, Asa D. Development and evaluation of corona charged aerosol detection (CAD): a new universal detector for HPLC[J]. *LabPlus international*, June, 2005.
- [38] Qureshi MN, Stecher G, Sultana T, *et al.* Determination of carbohydrates in medicinal plants-comparison between TLC, mf-MELDI-MS and GC-MS[J]. *Phytochem Anal*, 2011, 22: 296–302.
- [39] Rodríguez-Sánchez S, Hernández-Hernández O, Ruiz-Matute AI, *et al.* A derivatization procedure for the simultaneous analysis of iminosugars and other low molecular weight carbohydrates by GC-MS in mulberry (*Morus sp.*) [J]. *Food Chem*, 2011, 126: 353–359.
- [40] Kim J, Choi JN, John KMM, *et al.* GC-TOF-MS and CE-TOF-MS-Based Metabolic Profiling of Cheonggukjang (Fast-Fermented Bean Paste) during Fermentation and Its Correlation with Metabolic Pathways [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(38): 9746–9753.
- [41] Gómez-González S, Ruiz-Jiménez J, Priego-Capote F, *et al.* Qualitative and quantitative sugar profiling in olive fruits, leaves, and stems by gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) after ultrasound-assisted leaching [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 12292–12299.
- [42] De la Fuente E, Sanz ML, Martínez-Castro I, *et al.* Development of a robust method for the quantitative determination of disaccharides in honey by gas chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1135: 212–218.
- [43] Becker M, Zweckmair T, Forneck A, *et al.* Evaluation of different derivatisation approaches for gas chromatographic–mass spectrometric analysis of carbohydrates in complex matrices of biological and synthetic origin [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1281, 115–126.
- [44] Vočyánová B, Opekar F, Tůma P, *et al.* Rapid determinations of saccharides in high-energy drinks by short-capillary electrophoresis with contactless conductivity detection[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404: 1549–1554.
- [45] Tůma P, Málková K, Samcová E, *et al.* Rapid monitoring of mono- and disaccharides in drinks, foodstuffs and foodstuff additives by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection[J]. *Anal ChimActa*, 2011, 698: 1–5.
- [46] Oliver JD, Gaborieau M, Hilder EF, *et al.* Simple and robust determination of monosaccharides in plant fibers in complex mixtures by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1291: 179–186.
- [47] Rovio S, Yli-Kauhaluoma J, Sirén H. Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28: 3129–3135.
- [48] Sarazin C, Delaunay N, Costanza C, *et al.* New avenue for mid-UV-range detection of underivatized carbohydrates and amino acids in capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem*, 2011, 83: 7381–7387.
- [49] Xia L, Sun ZW, Li GL, *et al.* A sensitive analytical method for the component monosaccharides of the polysaccharides from a Tibetan herb *Potentilla anserina* L. by capillary zone electrophoresis with UV detector [J]. *Eur Food Res Technol*, 2010, 230: 715–722.
- [50] Zhang P, Wang ZF, Xie MM, *et al.* Detection of carbohydrates using a pre-column derivatization reagent 1-(4-isopropyl) phenyl-3-methyl-5-pyrazolone by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878: 1135–1144.
- [51] Kuo CY, Wang SH, Lin CC, *et al.* Application of 2,3-Naphthalenediamine in Labeling Natural Carbohydrates for Capillary Electrophoresis [J]. *Molecules*, 2012, 17: 7387–7400.
- [52] Descroix S, Varenne A, Goasdoué N, *et al.* Non-aqueous capillary electrophoresis of the positional isomers of a sulfated monosaccharide [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 987: 467–476.
- [53] Gürel A, Hızal J, Öztekin N, *et al.* CE determination of carbohydrates using a dipeptide as separation electrolyte [J]. *Chromatographia*, 2006, 64: 321–324.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



张英, 硕士研究生, 主要研究方向为复杂样品前处理及新材料制备。
E-mail: buct-ying@139.com



林金明, 教授, 主要研究方向为微流控芯片-质谱连用细胞代谢物分析、化学发光分析新方法研究、复杂样品前处理技术与色谱分析。
E-mail: jmlin@mail.tsinghua.edu.cn