

多糖类物质的离子色谱检测技术研究

分析化学专业硕士研究生 刘婷

指导教师 周光明教授

摘要

离子色谱(IC)是高效液相色谱(HPLC)的一种,是分析阴离子和阳离子的一种液相色谱方法。对难以用其他仪器和方法分析的常见阴离子、阳离子、有机酸和有机胺类等组分的分析,离子色谱法具有选择性好,灵敏度高,快速,简便,并可同时测定多组分等的突出优点。基于上述优点,离子色谱法自1975年问世以来发展迅速,已经在环境监测、电力、半导体工业、食品、石油化工、医疗卫生和生化等领域得到广泛应用,已有数十项成为有关权威机构的标准方法。鉴于糖类化合物分子具有电化学活性及在强碱溶液中呈离子化状态,Roxklin 等于1983年首先报道了用阴离子交换色谱柱分离,脉冲安培检测器测定糖的新方法(简称HPAEC)^[1]。用离子色谱法检测糖类,寻求操作简单,结果准确的检测体系,值得每一位分析化学学者进行深入研究。

本文包括两个部分。第一部分是文献综述,这部分结合多糖的利用价值及提取方法,评述了近十年离子色谱检测技术的发展以及其它相关领域在多糖类物质检测中的研究和应用。第二部分是研究报告。首先研究了绿茶中茶叶多糖的最佳提取方法和离子色谱检测茶叶多糖中的2种单糖的技术,在建立了高效,便捷的分析方法的同时选择了最佳的提取条件。利用温水浸提绿茶茶叶,超声辅助乙酸水解绿茶粗多糖,以METROSEP CARB 1(150×4.0 mm)阴离子交换柱为分离柱,以6.0 mmol/L NaOH溶液为洗脱液,在32℃的条件下对绿茶粗多糖水解液进行检测,实现了对绿茶粗多糖中的葡萄糖和甘露糖两种单糖的完全分离和定量检测。在此研究基础上,对其他不同种类茶叶多糖进行了分析研究,进一步优化实验条件,由对单纯两种单糖的分析拓展到同时分析检测四种单糖,取得了良好的试验效果,并且打破了多种单糖需要进行梯度淋洗才可实现分离的复杂方法,实现了固定浓度淋洗液直接分离多种单糖的高效方法。基于此,将该法的应用延伸到真菌类和中药领域,分别检测了香菇多糖和山药多糖,取得了良好的实验效果;从而进一步验证了该方法的应用价值。但在以上研究过程中,存在着对多糖水解液果糖检测方面的不足,突出表现为灵敏度低、分析时间过长等缺点。为了完善检测方法,继续优化实验条件,对果糖的检测方法进行改进,建立快速、高效检测多糖中的果糖的离子色谱检测方法,实验取得了很好的效果,得到了高的灵敏度和准确度,以及低的检测限。

一. 绿茶中茶多糖的提取与离子色谱检测方法研究

本文在不同浸提条件下提取绿茶粗多糖的基础上,建立了用高效阴离子交换分离-脉冲安培

检测 (HPAE-PAD), 在 32℃ 的条件下分离测定绿茶茶叶多糖中的葡萄糖和甘露糖 2 种单糖的分析方法。以 METROSEP CARB 1 (150×4.0 mm) 阴离子交换柱为分离柱, 6.0 mmol/L NaOH 溶液为淋洗液, 淋洗液流速为 1.0 mL/min, 总分析时间为 35 min。在优化的分离条件下, 葡萄糖和甘露糖的检出限分别为 0.125 mg/L 和 2.0 mg/L (进样体积 20 μL, 峰高定量)。用 20 mg/L 葡萄糖和甘露糖的混标溶液连续 7 次进样, 两种单糖峰高的相对标准偏差分别为 5.79% 和 14.15%, 保留时间的相对标准偏差分别为 2.08% 和 2.19%。样品测定的回收率为 94.9%~97.5%。用所建立的方法快速、有效分离了绿茶茶叶多糖中的葡萄糖和甘露糖, 同时确定了茶叶多糖的最佳提取条件。

二. 离子色谱法测定各种茶叶中的茶多糖研究

建立了用高效阴离子交换分离-脉冲安培检测分离测定不同种茶叶多糖中的半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖的分析方法。以 METROSEP CARB 1 (150×4.0 mm) 阴离子交换柱为分离柱, 以 6.0 mmol/L NaOH 溶液为淋洗液在 32℃ 的条件下将 4 种单糖从分离柱上洗脱, 淋洗液流速为 1.0 mL/min, 总分析时间为 45 min。在优化的分离条件下 4 种单糖的检出限为 0.125 mg/L ~2.0 mg/L (进样体积 20 μL, 峰高定量)。用 20 mg/L 的半乳糖、葡萄糖、甘露糖和 30 mg/L 的果糖混标溶液连续 7 次进样, 峰高的相对标准偏差为 5.82%~14.19%, 保留时间的相对标准偏差为 2.03%~2.26%。样品测定的回收率为 91.8%~99.3%。用所建立的方法快速、有效分析了 4 种常见茶叶多糖, 得到了满意的检测结果。

三. 香菇多糖和山药多糖的离子色谱检测方法研究

建立了离子色谱法分离测定香菇多糖和山药多糖的分析方法。以 METROSEP CARB 1 (150×4.0 mm) 阴离子交换柱为分离柱, 脉冲安培检测, 以 7.0 mmol/L NaOH 溶液为淋洗液, 淋洗液流速 1.0 mL/min, 总分析时间为 35 min。在优化的分析条件下, 3 种单糖的检测限分别为半乳糖 0.125 mg/L, 葡萄糖 0.5 mg/L, 甘露糖 1.0 mg/L (进样体积 20 μL, 峰高定量), 用 30 mg/L 的标准样品混合溶液连续进样 6 次, 峰高的相对标准偏差为 1.79%~3.52%, 保留时间的 RSD 为 3.07%~3.29%, 样品测定的回收率为 96.3%~99.5%。运用上述方法分离检测香菇多糖和山药多糖, 得到了良好的分离效果和较高的检测灵敏度, 分析结果令人满意。

四. 离子色谱法检测多糖水解液中果糖的研究

建立了阴离子交换分离-脉冲安培检测分析检测多糖水解液中的果糖的离子色谱方法, 并且分别讨论了峰高和峰面积两种不同分析定量方法的准确度。用 METROSEP CARB 1 (150×4.0 mm) 阴离子交换柱为分离柱, 以 100 mmol/L NaOH 溶液为淋洗液, 流速为 1.0 mL/min, 总分析时间为 13 min。在优化的色谱条件下, 果糖的最低检出限为 0.4 mg/L (进样体积 20 μL)。用 10 mg/L 果糖标准溶液连续进样 7 次, 峰高的相对标准偏差为 1.64%。峰面积的 RSD 为 3.43%, 保留时间的 RSD 为 0.36%。样品的加标回收率为 94.6%~96.1% (峰高定量) 和 93.2%~95.6 (峰面积定量)。用所建立的方法快速、准确的分析了三种茶叶多糖水解液, 分析结果令人满意。

关键词: 离子色谱 脉冲安培检测 多糖 茶叶 香菇 山药

Studies of Detecting Polysaccharides with IC

Speciality: Analytical Chemistry

Postgraduate: Liu Ting

Tutor: Prof. Zhou Guangming

Abstract

Ion Chromatography is a branch of the High Performance Liquid Chromatography and it is a liquid chromatography method for the determination of the anions and cations. IC has good selectivity, high sensitivity, rapidity, simplicity and can detect various components simultaneously for the determination of the common cations and anions, the organic acids and amines which were difficult to detected by other analytical methods. Based on these advantages, since 1975 IC has a rapid development and has been widely used in many fields , such as environmental monitoring, electric power, semiconductor, foods, petroleum and chemical industry, medical and health, biochemistry and so on. At the meantime there are already in dozens of IC methods become the standard method for the authority. Ground on the state of ionization in alkali and the electrochemical activity of the sugars, Roxklin had reported the method that use the anion exchange column and pulsed amperometric detection to determined the polysaccharides in 1983. Due to it's simply manipulate and accurately results, using IC for determining sugars deserves people's concern and study.

The thesis consists of two parts. One is a review related to the application and the extraction of the polysaccharides, and makes an evaluation on the development of the IC detection technology and the other fields' detection in recent ten years. The other is a research report which is composed of four components as follows. First of all, do the research on the extraction and the determination of glucose and mannose which are the two kinds of tea polysaccharides in green tea with IC technology. A fast, simple method was established and the best extract condition was chosen at the same time. Using the warm water to distill the green tea and ultrasound component with the HAc to hydrolyze the tea polysaccharides, take the METROSEP CARB1(150×4.0 mm) anion exchange column as the chromatograph IC separation, at 32℃ using the 6.0mmol/L NaOH as the mobile phase. The glucose and the mannose were totally separated and determined. Consideration of the top research, applying this system to the four kinds of teas, improving the condition, enlarge the application from the only two monosaccharides to four kinds of monosaccharides, after that good results were be gotten. This method broke the usual method that need gradient mobile phase, only need one fixed flow liquid which can easily separated the polysaccharides. Then apply this method to determine the polysaccharides which are distracted from the mushroom and the CommonYan Rhizome, good

results were gotten and the method was be optimized. But in these researches, there are also some disadvantages, such as the determination of the fructose, clearly manifest as the low sensitivity and the long determine time that cost. For the development of the method, go on to improve the condition, and a fast, accurate method for determining fructose by IC was established with a high accuracy and low detection limite.

1. The studies of the extractionand and the Ion Chromatography determination of tea polysaccharides in Green Tea

A method for determine tea polysaccharides of glucose and mannose in green tea by high performance anion exchange with pulsed amperometric detection was established, based on the different distill methods. The chromatograph separation was established on METROSEP CARB 1 (150×4.0 mm) anion exchange column, using 6.0 mmol/L NaOH at 1.0 mL/min in flow rate. The total analysis time is 35 min. The detection limits of 0.125 mg/L~2.0 mg/L (20 µL injection, using the peak height for the quantitative analysis) were achieved under the optimal conditions. The RSDs of peak height for the seven consecutive determinations of 20 mg/L glucose and mannose were 5.79% and 14.15% respectively, and the RSDs of reserve time were 2.08% and 2.19%. The recovery percentages of the sample detection were 94.9%~97.5%. Glucose and mannose were be determined fast and effectively, at the meantime, the best distill condition was be chosen.

2. The determination of tea polysaccharides with Ion Chromatography

A method for the determination of tea polysaccharides of galactose, glucose, mannose and fructose by high performance anion exchange with pulsed amperometric detection was established. The chromatograph separation was established on METROSEP CARB 1 (150×4.0 mm) anion exchange column, using 6.0 mmol/L NaOH at 1.0 mL/min in flow rate and at 32°C. The total analysis time is 45 min. The detection limits of 0.125 mg/L~2.0 mg/L (20 µL injection, using the peak height for the quantitative analysis) were achieved under the optimal conditions. The RSDs of peak height for the seven consecutive determinations of 20 mg/L galactose, glucose, mannose and 30 mg/L fructose were 5.82%~14.19%, and the RSDs of reserve time were 2.03%~2.26%. The recovery percentages of the sample detection were 91.8%~99.3%. Four kinds of tea polysaccharides were fast and effectively determined, and the results of the determination were satisfying.

3. Studies of the determination of the lentinan and the dioscoreaopposita polysaccharides by IC

This article applies the used of the IC technology to the fungus and Chinese traditional medicines

field and a fast determining method has been established. The chromatograph separation was established METROSEP CARB 1(150×4.0 mm) anion exchange column, with pulsed amperometric detection. Using 7.0 mmol/L NaOH at 1.0 mL/min in flow rate. The total analysis time is 35min. The detection limits was 0.125~1.0 mg/L(20 μ L injection,using the peak height for the quantitative analysis) were achieved under the optimal conditions. The RSDs of peak height for six consecutive determinations of 30 mg/L standard sample were 1.79%~3.52%,and the RSDs of reserve time were 3.07%~3.29%. The recovery percentages of the sample detection were 96.3%~99.5%. The system was applied for the determination of lentinan and dioscoreaopposita, good separation and high detection sensitivity were achieved, and the results of the determination were satisfying.

4. The determination of the fructose by IC

A method for determination of fructose in hydrolyzing polysaccharides by high performance anion exchange with pulsed amperometric detection was established. And the accuracy that use the peak height and peak area for quantitative analysis were discussed. The chromatograph separation was established on METROSEP CAR 1(150×4.0 mm) anion exchange column, using 100 mmol/L NaOH at 1.0 mL/min in flow rate. The total analysis time is 13min. The detection limits of 0.4 mg/L(20 μ L injection) was achieved under the optimal conditions. The RSDs of peak height for seven consecutive determination of 10 mg/L fructose was 1.64%, the RSDs of peak area 3.43%, and the RSDs of reserve time 0.36%. The recovery percentages of sample detection were 94.6%~96.1%(using peak height) and 93.2%~95.6%(using peak area). Three kinds of tea polysaccharides were fast and effectively determined, and the results of the détermination were satisfying.

Keywords: anion exchange, pulsed amperometric detection, polysaccharide, tea, mushroom, dioscorea opposita

独创性声明

学位论文题目： 多糖类物质的离子色谱检测技术研究

本人提交的学位论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中引用他人已经发表或出版过的研究成果，文中已加了标注。

学位论文作者： 刘婷 签字日期： 2009 年 4 月 27 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解西南大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权西南大学研究生部可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书，本论文：☐不保密，☐保密期限至 年 月止）。

学位论文作者签名： 刘婷 导师签名： 周光明

签字日期： 2009 年 4 月 27 日 签字日期： 2009 年 4 月 27 日

第一部分 文献综述

一 序言

糖类是自然界中存在最多的有机化合物,也是重要的生物高分子化合物和信息物质。多糖分布广泛,在高等植物、细菌、真菌、藻类以及动物体内含量丰富。20 世纪 60 年代以来,人们逐渐发现多糖具有复杂多样的生物活性和功能^[2-10],如多糖有免疫调节功能可作为广谱免疫促进剂,作为药物可以治疗风湿病,慢性病毒性肝炎,癌症等;还具有抗病毒,抗感染,抗辐射,抗凝血,降血糖,降血脂,消除氧化自由基,促进核酸与蛋白质的生物合成等作用。多糖的分析方法也有很多,且日益受到人们的关注和研究。

二 多糖类的简介及提取和分析方法

1. 多糖类化合物的定义和分类

多糖是由多个单糖分子缩合、失水而成,是一类分子机构复杂且庞大的糖类物质。凡符合高分子化合物概念的碳水化合物及其衍生物均称为多糖。有由一种类型的单糖组成的葡萄糖、甘露聚糖、半乳聚糖等。由二种以上的单糖组成的杂多糖,含有氨基糖的葡糖胺葡聚糖等,在化学结构上实属多种多样。就分子量而论,有从 0.5 万个分子组成的到超过 106 个的多糖。由糖苷键结合的糖链,至少要超过 10 个以上的单糖组成的聚合糖才称为多糖。比 10 个少的短链的称为寡糖。不过,就糖链而论即使是寡糖,在寡糖上结合了蛋白质和脂类的,就整个分子而论,如果是属于高分子,则从广义上来看也属于多糖,因此特称为复合多糖或复合糖质。

2. 多糖的提取方法

多糖为大分子化合物,易溶于水,通常采用水提醇沉法^[11],但耗时较长,且提取效率不高。为了提高多糖的提取效率,在水提醇沉法的基础上发展了碱提取法^[10],酸提取法^[12]。此两种方法在大大提高多糖提取率的同时,由于多糖不耐酸碱,因此会使部分多糖分解,也存在着一定的不足。

谢红旗^[13]等,利用酶法提取香菇多糖,将香菇 500 g,粉碎,加适量水,加入 1.5%中性蛋白酶在 50℃和 pH4.8 条件下酶解 60 min,加水至 10 L,然后升温至 95℃,使生物酶失活,在 95℃温度下药物提取器中恒温提取 2 h,滤布过滤,收集滤液。酶解法可以大大提高多糖的提取效率,并且降低蛋白质含量。但药品价格较贵,温度控制严格,操作成本较高。

现发展出用超声波和微波辅助多糖提取法。李俊^[14]等,利用超声波辅助提取罗汉果多糖,取干燥、粉碎的罗汉果 100 g 根据实验条件加入 50℃热水,超声波提取 3 次,每次 5 min,合并各次提取液,减压浓缩;往浓缩液中加入 95%乙醇使罗汉果多糖沉淀,高速离心 15 min 得到沉淀,用丙酮洗涤 5 次,在 -50℃下冷冻干燥,得罗汉果粗多糖。经过实验证明,超声波辅

助提取多糖明显提高多糖的提取率。微波辅助提取是利用微波能的加热效应来加速溶剂对固体样品中目标化合物的提取的新技术。邓永智^[15]等利用微波辅助提取法通过正交实验法从海水小球藻中提取多糖,在 70℃,功率为 600 W,提取时间为 30 min 的条件下海水小球藻中的多糖可以得到较好的提取。超声波和微波辅助提取多糖操作简单,且不会引入杂质,是很好的多糖提取方法。

3. 多糖的分析方法

3.1 多糖的含量分析

由于糖类具有还原性,在多糖的定量测定方面可以根据糖的还原性进行测定,也可将糖转化成为糖醛衍生物进行测定。

经典的多糖测定方法为苯酚-硫酸法^[16]和蒽酮-硫酸法^[17],均以无水葡萄糖为对照品,分光光度法测定,计算含量。这两种方法快速、方便、准确,但这两种测定方法对有色样品都不理想,苯酚-硫酸法受样品颜色的影响更大,因此常多用蒽酮-硫酸法测定有色样品的总糖含量。汪东风^[18]利用蒽酮-硫酸法测定同一品种的红茶、绿茶和乌龙茶的多糖含量,结果分别为 0.85%±0.01%, 1.41%±0.06%, 和 2.63%±0.27%,傅博强等^[19]认为这一结果偏低,主要是以葡萄糖作标准曲线的原因,并提出以校正因子修正测定结果,同时测定了江西婺源的红茶、绿茶和乌龙茶的茶多糖含量,分别为 3%~3.5%、4.17%~6.35%、3.10%~3.53%。比较两种计算方法的结果,相差很大,一方面是因品种、加工方法等的差异导致的,另一方面是因为用作计算校正因子的茶多糖为非纯品,使得校正因子偏大而导致的。

最近有学者比较研究了苯酚-硫酸法和间接碘量法^[20]测定灵芝多糖,间接碘量法可分别测定样品中总糖和还原糖的含量,消除了样品还原性杂质的干扰,所测结果更接近实际多糖含量。通过改进间接碘量法,使滴定过程不需要在沸腾状态下进行,从而除去了温度条件对滴定结果的干扰,使反应更易控制。间接碘量法具有干扰少准确度高的特点,但与苯酚-硫酸法相比,操作过程较为烦琐。

多糖含量的测定还有 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法,该方法操作简单,快速,灵敏度高,杂质干扰较小。王红英^[21]等利用该法测定麦冬多糖含量,精确度高,重现性好。是一种可取的多糖常规测定方法。

3.2 多糖的组分分析

多糖组分的分离测定方法目前主要有高效液相色谱法(HPLC),气相色谱法(GC),薄层色谱法(TLC),高效毛细管电泳法(HPCE)等。

杨兴斌^[22]等采用 1-苯基-3 甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生化反相高效液相色谱法,建立了 9 种常见单糖的分离模式,并成功地用于当归多糖的单糖组成分析,具有良好的重现性,结果表明,当归多糖由甘露糖,鼠李糖,葡萄糖醛酸,半乳糖醛酸,葡萄糖,半乳糖及阿拉伯

糖 7 种单糖组成, 其摩尔比为 0.57: 1.00: 0.13: 3.06: 8.16: 7.17: 12.69。该方法灵敏快速, 准确, 方便, 可在线大批量分析。

邓永智^[15]等, 在 MS 参数 VF-5MS 毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm 美国 Varian 公司); 进样口温度 280℃; 柱箱起始温度 120℃, 3℃/min 至 210℃, 保持 4 min; 载气为高纯氦气, 流速 1.0 mL/min; 离子化模式为 EI-Auto, 离子化能量 70 eV 离子阱温度 180℃; 接口温度 280℃; 质量扫描范围 40-550 amu 的条件下, 利用气相色谱-质谱联用法分析了海水小球藻多糖的单糖组成。

颜军^[23]等通过斑点分离度, 清晰度, 有无拖尾现象及展层时间等方面, 利用薄层色谱法快速分析了多糖的单糖组成, 通过实验确定了适合的展开剂为展开系统 (乙酸乙酯: 吡啶: 无水乙醇: 水=8: 2: 1: 2), 合适的显色剂为苯胺-二苯胺磷酸显色剂。

耿越^[24]等采用高效毛细管电泳法测定玉米花粉多糖中单糖的组成, 样品经水解后, 经 α -萘胺衍生化, 电泳条件为: 缓冲液为 75 mmol/L 硼砂溶液 (pH 9.5); 柱温 22℃; 电压 16kV; 检测波长 200 nm; 气压进样, 进样时间为 5 s。测得玉米花粉多糖主要由葡萄糖, 阿拉伯糖和半乳糖 3 种单糖组成。该方法操作简单, 精度高, 可成为测定多糖中单糖组分的方法。周蓉^[25], 季宇彬^[26]等也利用高效毛细管电泳法成功分析了甘草多糖以及龙葵多糖的单糖组分。

综合各类方法 HPLC 分离速度快, 分辨率高, 分离效率好, 重现性好, 不破坏样品的优点。但糖类本身没有紫外吸收, 只能采用示差折光监测器 (RI) 或蒸发光散射检测器 (ELSD) 检测。RI 分辨率低, 而 ELSD 效果虽好却价格昂贵。另外采用 HPLC 分析时, 色谱柱的选择比较困难。一般采用氨基柱但分离效果不够理想, 而专用糖柱又十分昂贵。用 GC 测定糖类时, 由于糖本身没有足够的挥发性, 所以必须在气相色谱分析之前预先转化成易挥发以及对热稳定的衍生物。此外, 由于糖的异构化, 在某些衍生物的制备过程中, 还会产生衍生物的异构化, 使色谱分析时每种糖产生多个峰, 这往往影响组分的分离和定量。TLC 是一种微量而快速的分析方法, 它兼备了柱层析和纸层析两者的优点而且操作方便, 设备简单, 容易掌握, 便宜, 灵活的特点。但样品不能回收, 展开剂和显色剂的选择也要求严格。HPCE 技术具有样品用量少, 时间短, 灵敏度高, 分离效果明显的特点, 在糖类物质的检测方面具有独特的优势^[27-29]。

近年来, 离子色谱法测定糖类逐渐引起学者们的重视, 鉴于糖类化合物分子具有电化学活性及在强碱溶液中呈离子化状态。常用浓度为 0.01~0.2 mol/L NaOH 与 NaAc 作梯度淋洗。用金电极的脉冲安培监测器检测^[30-33]。Cai^[34]等用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法直接同时分析了血清中多种糖类, 利用梯度洗脱在 16 min 内将葡萄糖、核糖、麦芽糖、异麦芽糖分离开来, 再直接用脉冲安培法检测, 无需衍生。Tommaso^[35]等也用该法成功分离测定了牛奶中的单糖及多糖组分, 效果良好。离子色谱法, 操作简单, 结果准确, 是一种快速、便捷的检测方法。但由于离子色谱对进样样品要求较高, 样品前处理步骤要求严格, 但从总体看来 IC 在糖类检测方面具有自身突出优势。

3.3 多糖的结构分析

多糖的结构分析在近年来采用了许多先进的仪器设备,分析方法和手段都有了很大的提高。主要有紫外光谱法、红外光谱法和核磁共振分析法,现分别介绍如下:

紫外光谱分析^[36]:多糖样品溶于水放置一夜,在 10000 r/min 下离心 20 min,上清液加入乙醇沉淀。沉淀用乙醚、丙酮洗涤,真空干燥,进行紫外扫描,在 270~280 cm 处有强吸收峰。

红外光谱分析:利用红外光谱,主要可以鉴定多糖中是否含有硫酸基(1260~1210 cm^{-1})及硫酸基的取代位置(800~950 cm^{-1})。红外光谱扫描茶叶多糖具有一般多糖类的特征吸收峰(4000~6500 cm^{-1}),黄柱宪^[37]等从茶叶废渣中提取出来的灰色多糖 TPS-3 在 3415~3280 cm^{-1} 和 1665~1635 cm^{-1} 处均有一般多糖物质的特征吸收峰。

核磁共振分析:应用 ^{13}C NMR 可以鉴别多糖中糖苷键位置,确认多糖中是否有甲氧基取代及其取代的位置和硫酸基的取代位置。利用 ^1H NMR 进一步确认多糖结构。林晓之^[38]等就对海藻多糖的组成及结构利用 FT-IR 和 ^{13}C NMR 两种光谱手段做了深入的研究,从而确定了各类海藻多糖的结构组成。

在糖的结构分析方面,还常用一些利用物理和化学性质分析多糖的方法。

周林^[39]等,利用多糖的粘度性质测定了水溶液中裂褶多糖的分子量。还常见利用渗透压法,蒸汽压法,端基法,光散射法,超过滤法^[40]等。

利用化学方法分析多糖中单糖的组成的主要是通过水解,使多糖中单糖相互间连接的糖苷键断裂,释放出单糖,再运用色谱手段,对单糖进行定性定量。常用的水解方法有硫酸水解法^[41],盐酸水解法^[42]和三氟乙酸水解法^[43]等。硫酸水解法使用硫酸因具有一定的氧化性,会破坏一部分多糖,使分析结果准确度降低;盐酸水解法虽避免了氧化性,但耗时太长,不实用;三氟乙酸水解法使用的三氟乙酸性较大,也具有一定的局限性。邓永智^[15]等,利用超声辅助水解法,则是一种方便、快速,水解较为彻底的方法。当超声波作用时间为 90 min,超声波功率为 300 W,水解液为 1 mol/L 乙酸时,效果最好。

三. 茶多糖的简介和分析方法

茶多糖(Tea—polysaccharides,简称TPS)是茶叶中具有特殊生物活性的一类与蛋白质结合在一起的酸性多糖或酸性糖蛋白。药理研究表明,茶多糖具有显著的降血糖效果和免疫活性,使茶多糖有望成为预防与治疗糖尿病及心血管疾病,提高免疫功能的天然药物。

1. 茶多糖的性质

1.1 茶叶中的单糖和双糖

单糖和双糖构成茶叶中可溶性糖类的主要成分。单糖是一类不能再被水解的最简单的糖类物质,在茶鲜叶中,以游离态或苷的结合状态而存在。双糖则是有两个相同或不同的单糖

分子缩合而成。游离单糖主要有阿拉伯糖（含量约为干物的 0.4%），鼠李糖（痕量），果糖（0.73%），葡萄糖（0.15%），半乳糖（痕量）和甘露糖（痕量）。双糖有蔗糖（0.64%~2.52%）。麦芽糖在茶鲜叶中很少以游离状态存在。以糖苷形式存在的糖基成分有葡萄糖，半乳糖和阿拉伯糖等^[44, 45]。

1.2 茶叶中的水不溶性多糖

一般多糖常由几百个甚至几千个单糖基组成，其中由一种单糖组成的多糖为均多糖（homosaccharide）如淀粉。有两种以上单糖组成的为杂多糖（heterosaccharide），如果胶。

茶叶中的多糖类物质占茶叶干重的 25%~30%。主要有纤维素（4.3%~8.9%），半纤维素（3.0%~9.5%），淀粉（0.2%~2.0%）和果胶（11%）左右等。构成植物支持组织的纤维素和半纤维素是水不溶的，淀粉则难溶于水，果胶物质的溶解性则与其甲酯化程度，是否带有支链结构有关。多糖均不溶于乙醇或其它的有机溶剂，无还原性也无甜味。

淀粉是一种贮藏物质，难溶于水，冲泡时通常不能被利用，营养价值不大。但在茶叶加工中由于酶或水热作用，可被水解转化成可溶性糖类，对提高茶的滋味，香气和汤色有一定意义。

纤维素、半纤维素是构成植物细胞壁的主要成分。化学性能比较稳定，在一般的茶叶加工中几乎无变化。但在获砖、康砖以及普洱茶等特殊查类加工中，由于微生物的大量繁殖，分泌大量酶类，包括纤维素酶，可分解纤维素形成水溶性糖类。在普洱茶渥堆工序中由于微生物的大量繁殖（原菌落数 50 个/克样，渥堆中最高时可达 366507 个/克样），粗纤维显著下降（原料粗纤维 18.65%，渥堆完毕仅为 14.09%），可溶性糖则显著增加（原料 4.68%，出堆达 7.84%）^[46]。

1.3 茶叶中的活性多糖

有一类复合多糖，主要由葡萄糖、阿拉伯糖、果糖、木糖、半乳糖及鼠李糖等组成的聚合度大于 10 的聚糖，为多聚糖（Polysaccharide），简称多糖。但这一类多糖具有复杂的多方面的生理功能。

在茶叶中也含有一类水溶性多糖，因具有多种生物活性而逐渐被人们所重视，只是目前对它的研究相对较少。这类水溶性多糖也被称为茶叶活性多糖（Tea Polysaccharide, TPS）或是茶叶多糖，茶多糖。

1.3.1 组成

粗老茶叶富含茶叶多糖，粗茶叶多糖（Crude Tea Polysaccharide）为多糖、蛋白质，果胶，灰分和其他成分的混合物。分子量约为 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 的水溶性复合多糖。其主要成分为葡萄糖、阿拉伯糖、核糖、半乳糖、甘露糖、糖及果糖。汪东风^[47]等，对茶叶多糖成分中对降血糖的有效成分的确定为葡萄糖:阿拉伯糖:核糖=1.7:5.7:4.7。分子量为 107000。五种单糖组成如表 1。

表 1：五种单糖组成^[48]

	阿拉伯糖	木糖	果糖	葡萄糖	半乳糖	总量
含量	0.10	0.04	0.11	0.81	0.76	1.81
百分比	5.52	2.21	6.08	44.20	41.99	100.00

黄桂宪^[37]等,从广西绿茶中分离纯化出 3 种茶叶多糖,即浅黄色的 TPS-1,灰白色的 TPS-2 和灰色的 TPS-3,其总糖含量分别为 48.28%、57.71%及 40.02% (硫酸-蒽酮法测定)。TPS-1 含 L-岩藻糖、D-甘露糖、L-阿拉伯糖及 D-果糖,组成百分比为 3.51:14.78:20.46:61.25。TPS-2 含 D-木糖、L-阿拉伯糖、D-果糖及 D-葡萄糖,构成比为 4.39:16.22:79.39 (有一个峰置后,为 D-葡萄糖),TPS-3 含 L-鼠李糖及 D-果糖,构成比为 100 (D-果糖太低,被 L-鼠李糖掩盖),此外,TPS-3 还含有锌、锰、硒等多种对人体有益的微量元素,见表 2。

表 2：TPS-3 中微量元素含量组成(%)

元素	Ca	Me	Fe	Mg	Zn	Cr	Cu	Co	Ge	Se
含量	2.40	98.9	83.0	660	32.3	0.254	0.613	0.111	0.313	0.368

1.3.2 含量^[49]

乌龙茶中茶叶多糖含量高与红、绿茶,它们的含量比为 3:1:2。乌龙茶中的茶多糖含量达 2.63%左右,均为六级红茶的 3.1 倍,六级绿茶的 1.07 倍。茶叶中茶多糖的含量低档茶高于高档茶,并且茶多糖含量随茶叶的粗老程度的增加而递增。

1.3.3 性质

由于多糖为生物活性高分子化合物,其成分会因为分离方法的不同而异。且粗提物常是多糖的混合物。多糖的活性与分子量,粘度,溶解度,初级结构和高级结构都有关。不同化学组成的多糖,其结构和化学性质势必存在一定差异,生理功能也会有所不同^[50-52]。

A. 一般性质

经分离纯化的茶叶多糖为粉末状固体,不易潮解,无味,溶于水,不溶于有机溶剂,在浓 H₂SO₄ 存在时可与 α -萘酚作用,界面会出现紫色圈,茶叶多糖水解前与费林试剂呈阳性反应。将茶叶多糖样品点于滤纸上,用甲苯胺染色呈蓝色。

B. 粗茶叶多糖(CTPS)的理化性质

CTPS 溶于水,沸水中溶解率约 76%,不溶于高浓度的有机溶剂,如醇,醚,丙酮等。在加热处理后,量会变少,不耐热,不耐酸碱,在 pH<5.0 或 pH>7.0 时,会发生分解。

1.3.4 提取

最早茶叶多糖的提取方法比较简单,茶叶多糖组成中常含有类脂类物质,因此,在 1970 年代,茶叶多糖又称脂多糖,1986 年 10 月,清水岑夫^[47]在日本生药会上发表题为“从茶叶中

制取糖尿病的药物为例探讨降血糖作用”的报告。清水岑夫系用冷水、温水和沸水三种浸提方法抽提浸出物,再对番茶的冷水浸提物在碱性条件下用乙醚、醋酸和丁醇依次萃取除脂类、茶多酚等成分,将水层经透析,过葡萄糖凝胶柱,测知水层有效成分为一复合多糖。该多糖体是由葡萄糖、阿拉伯糖、核糖组成,分子量约为 4×10^4 。谢晓风^[53]等将茶叶与预处理后,用温水浸提 1d,乙醇沉淀,沉淀物反复用乙醚、丙酮和无水乙醇洗涤,冷冻干燥后得灰白色粉状茶叶多糖。Mori M^[20]等分别用水、乙醚和丁醇作为萃取剂从茶叶中制备出具降血糖及抗糖尿病用的茶叶复合多糖,其组成以 L-阿拉伯糖、D-核糖和 D-葡萄糖为基本结构。所以不同的提取工艺所得到的茶多糖在组成上有较大的差异。

1.3.5 纯化

茶多糖的进一步纯化有多种方法:如 DEAE-纤维素柱层析,凝胶层析分离,凝胶电泳法与 HPLC 法等。茶多糖用少量水溶解后,再通过 Sephadex G-75 柱 (2.6 cm×80 cm) 与 Sephadex G-150 柱 (1.5 cm×60 cm) 层析,可进一步纯化。用 0.1 mol/LNaCl 洗脱,收集含糖部分,透析后透析,真空低温干燥可得茶多糖纯品^[55~57]。

2. 茶多糖的功能

活性多糖的保健功能是目前保健食品功能因子中研究最为炙热的研究热点,近年来,有大量有关活性多糖保健功能的研究报道。而茶叶活性多糖也是其中重要的一个部分。概括起来,这些研究主要集中在活性多糖的增强免疫调节,抗肿瘤,抗突变,降血脂,抗病毒,降血糖,抗凝血,抗溃疡,抗氧化等方面^[58~61, 51]。

2.1 防辐射效果

早在 1970 年代,中国农业科学院茶叶所与天津卫生防疫站^[62],用茶叶多糖粗制品做了小白鼠急性放射病防治试验,小白鼠皮下注射给药后照射 ^{60}Co ,照射剂量为 766~840 伦 (R)。结果显示,茶叶多糖的防辐射效果显著,提高成活率达 30%。

2.2 抗凝血及抗血栓作用

据王淑如等^[63]报道,茶叶多糖体内、体外均可显著延长血凝时间。灌胃给药 50 mg/kg,小鼠凝血时间可延长 319%,在混合人血浆中加入不同量的茶叶多糖,37℃孵育 10 min,作复钙时间测定,结果表明,0.05 mg 的茶叶多糖即可延长复钙时间,0.4 mg 可完全抑制血浆凝固。实验表明,茶叶多糖明显延长血栓形成时间,缩短血栓长度,从而起到抗血栓的药理作用。

2.3 降血糖作用

给小白鼠腹腔注射茶叶多糖,12 h 以后,血糖含量比对照下降了 12%,差异达 P (0.01 水平),24 h 后,血糖含量虽下降了 6.28%,但差异未达显著水平^[64]。王丁刚^[65]等报道,给正

常小白鼠口服剂量为 50 mg/kg 和 100 mg/kg 茶叶多糖, 7h 后血糖浓度分别下降 14%和 17%。腹腔注射剂量为 25 mg/kg 和 50 mg/kg, 7 h 后血糖浓度分别下降了 48%和 52%, 24 h 后给药组与对照组血糖浓度无差异。进一步用四氢嘧啶诱导高血糖模型小鼠, 腹腔注射茶叶多糖, 剂量为 100 mg/kg, 7 h 和 24 h 分别剪尾取血, 结果表明, 7 h 后血糖降低了 47%, 差异达及显著水平, 24 h 后血糖浓度虽有所下降, 但未达到显著水平。

糖尿病本质是血糖的来源和去路间失去正常状态下的动态平衡, 表现在: 一方面葡萄糖生成增多, 另一方面糖的利用减弱, 从而引起血糖浓度过高及糖尿。茶叶多糖具有降血糖作用, 说明茶叶多糖具有修复糖代谢紊乱的作用。据 KenlChi I^[66]报道, 给糖尿病患者饭后饮用 200 ml 内含 45 mg 茶叶多糖的饮料, 2 周后血糖浓度显著下降, 胆固醇及甘油三酯总含量也下降, 4 周后所有患者都已好转。现有制备含有茶叶多糖作为降血糖和抗糖尿病用的药物和健康食品的专利^[67]。

2.4 增强机体免疫功能

据汪东风等^[64]报道, 对小白鼠皮下注射茶叶多糖, 然后腹腔注射羊红细胞免疫, 6 d 后静脉取血, 观察凝集程度并计算抗体积数, 结果表明, 茶叶多糖浓度在 3.0 mg/mL~10.0 mg/mL 范围内具有血清凝集素为指标的体液免疫增强作用, 其中以浓度 3.0 mg/mL 效果最佳, 与对照相比差异达 $P(0.001)$ 水平, 而浓度为 1.5 mg/mL 时无上述作用。

另外, 茶叶多糖还具有促进单核巨噬细胞系统吞噬功能, 增强机体自我保护能力。据王丁刚报道, 给小鼠皮下注射茶叶多糖, 7 d 后静脉注射 2%的碳素墨水, 剂量为 0.1 mg/kg, 2 min 和 5 min 取血观测小鼠碳粒廓清情况。结果表明, 茶叶多糖剂量为 25 mg/kg 和 50 mg/kg 时, 小鼠碳粒廓清速率分别增加 60%和 83%。

2.5 对心血管系统的若干药理作用

据王丁刚^[67]等报道, 茶叶多糖对心血管系统具有以下药理作用: 降血压及减慢心率作用, 茶叶多糖 22.5 mg/kg 十二指肠给药, 20 min 后可使麻醉大鼠血压下降 72 mmHg, 心率减慢 15%; 耐缺氧作用, 注射给药 50 mg/kg 和 100 mg/kg 茶叶多糖, 正常小鼠在常压下存活时间分别延长 59%和 66%, 用异丙肾上腺素的小鼠存活时间分别延长 31%和 29%; 增加冠状动脉流量, 心脏插管侧支注入 1.0 mg/mL 茶叶多糖 0.4 mL, 可增加离体豚鼠心脏冠脉血流量 37%。

2.6 降脂作用

Mori M 等^[68, 69]报道, 用热水抽提绿茶, 经超滤得到多糖提取物。注射给药, 剂量为 100 mg/kg 或灌胃给药, 剂量为 1000 mg/kg。结果表明, 该多糖提取物可明显降低高脂鼠的血浆总胆固醇及中性脂水平。汪东风等报道, 给正常小鼠腹腔注射 0.2 mL/只, 浓度为 4.0 mg/mL 的茶叶多糖, 血清甘油三酯含量, 给药组在 12 h 及 24 h 后均比对照组降低约 1%, 血清胆固醇

含量, 给药组在 12 h 后比对照组低约 1.5%, 24 h 后均低 6.0%, 但均未达到显著水平。

3. 现存在的研究方法

3.1 电泳分析^[37, 44, 70]

醋酸纤维薄膜, pH10.0 硼酸盐缓冲液 (0.2 mol/L), 电压 250 V, 20 min, 甲苯胺蓝染色。黄桂宪等用 2×8 cm 醋酸纤维薄膜电泳分析其分离的三种 TPS, 均呈单一的蓝色带, 这三种茶叶多糖都是均一的。

3.2 含量分析^[71-73]

用硫酸-蒽酮法测定 TPS 中总糖的含量, 以吡唑-硫酸法测定其中糖醛酸含量。

3.3 成分分析

3.3.1 离子交换法^[74]

王元风等首次采用 D315 阴离子交换树脂从茶叶中分离出了不同结构的多糖、水溶性中性多糖 (NTPS) 和酸性多糖 (ATPS) 并对其单糖组分进行了分析。NTPS 以中性多糖为主, 6.82% 半乳糖醛酸, 中性部分由半乳糖组成。ATPS 以酸性多糖为主, 33.02% 半乳糖醛酸, 中性部分有鼠李糖, 阿拉伯糖和半乳糖组成。

两种茶多糖按照 200 和 400 mg/kg·d 的剂量连续给四氧嘧啶糖尿病小鼠 12 d, 发现能抑制四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖的升高, 有很好的降血糖效果。

NTPS 和 ATPS 分别过 DEAE-Sephrose FF 阴离子交换柱 (2.6 cm×50 cm)。称取 300 mg 多糖溶解于 25 mL pH6.0 的磷酸缓冲液中, 上柱, 先用 pH6.0 的磷酸缓冲液进行梯度洗脱, 再用 0~0.6 mol/L NaCl pH6.0 的磷酸缓冲液进行梯度洗脱, 平均体积流量 2.5 mL/min, 每 2 min 收集一管, 每间隔 3 管测 486 nm 吸光度值, 每管取 250 μL, 用硫酸-苯酚法跟踪检测, 以吸光度值对洗脱体积作图, 得出洗脱曲线, 收集吸收峰区域的洗脱液, 透析, 冻干。

3.3.2 纸上层析法^[71, 75]

取 TPS 10 mg, 用 2 mol/L 三氯乙酸封管, 100℃水解 2 h, 水解液浓缩至干, 用甲醛反复洗涤至中性, 风干。加少量水溶解, 离心, 取上清液作纸层析。

取新华滤纸 (25×12 cm), 用上行法, 展层剂为正丁醇:乙醇:水(4:1:5), 以 AgNO₃ 染色, 标准单糖对照分析成分组成。

3.3.3 高效液相色谱法^[71, 76]

将 B 水解液上高效液相色谱柱 (即阳离子钙型树脂柱), 以示差折光检测器检测, 据单糖标准样的保留时间定性, 峰面积定量, 可确定 TPS 组成及比例。

3.3.4 气相色谱法

将 20 mg TPS 溶于 20 mL 水中, 加 10 mg 果酸裂解酶, 40℃下保持 3 h, 然后加水透析,

乙醇沉淀，沉淀溶于 4.0 mL 三氟乙酸（2.0 mol/L）中密封，置 100℃ 离解 8 h。然后加一滴氨水，1.0 mL 肌醇及 30 mg NaBH_4 于 2.0 mL 溶液中，置一夜，用 Dowex50-W 过滤，最后，加 0.1 mL 三甲基硅醚，振荡，制成三甲基硅衍生物，气相色谱分析组成。

3.3.5 原子吸收光谱分析

用有焰及无焰原子吸收光谱仪测定多糖中的微量元素。如从茶叶废渣中纯化的 TPS-3 中即含锰、锌、硒等多种对人体有益的微量元素。

A 分子量的测定^[77]

利用 Sephadex G-200 柱（18×880 mm）测定标准葡聚糖的 V_e 和兰糊精（Blue Dextran）的 V_e ，洗涤液 0.1 mol/L NaCl。将 5 mg TPS 溶于 1.5 mL 水中，测定 V_e ，汪东风等采用此法测定纯品 TPS 分子量为 107000。

B 光谱分析^[71、78]

a 红外光谱分析

将纯化的茶叶多糖进行红外光谱扫描，分析其特定吸收峰。黄桂宪等将提取的 TPS-3 进行红外扫描，TPS-3 在 3415~3280 cm^{-1} 和 1665~1635 cm^{-1} 处具有一般多糖类物质的特征吸收峰。

b 紫外吸收光谱分析

将纯品 TPS 进行紫外扫描，TPS 在 270~280 nm 处有强吸收峰。

C 纯度鉴定

茶叶活性多糖的纯度标准不能用通常化合物的纯度标准来衡量，因为即便是活性多糖纯品，其微观也是不均一的。茶多糖的纯度只代表相似链长的茶多糖分子的平均配布。通常所谓的茶多糖纯品实际上是一定分子质量范围的茶叶活性多糖的均一组分^[79]。目前常用于活性多糖纯度鉴定的方法有凝胶层析法，高压电泳法，超离心法，炫光测定法和毛细管电泳法等。茶叶活性多糖纯度鉴定中应用最多的是凝胶层析法，原因是该方法准确度高。茶叶活性多糖经凝胶层析得到一对称洗脱峰，则证明该活性多糖是均一组分。凝胶层析又分为常压层析和高压液相层析。高压电泳法是利用不同的活性多糖与硼砂形成不同的复合物，这些复合物具有不同的电荷，所以在电场作用下其迁移率不同，电泳结果显色后，如呈单一色斑，则表示该茶叶活性多糖为均一组分。高压电泳鉴定活性多糖纯度早期用的比较多，现在大多不再利用。原因是该方法的灵敏度不高。超离心是将活性多糖溶液进行密度梯度离心，待转速达到 600000 r/min 以上后，间隔照相，如得到的结果是单一峰，则证明该茶叶活性多糖是均一组分。旋光鉴定法利用不同分子质量的活性多糖在不同浓度低级醇中溶解度差别进行的，如果在不同浓度低级醇中得到的活性多糖的比旋光度相同，则证明该茶叶活性多糖为均一组分。

四. 香菇多糖和山药多糖简介^[80~90]

香菇是一种珍贵的食用真菌，香菇子实体中除含有蛋白质、氨基酸、矿物质、维生素和对人体有益的微量元素外还含有一种重要的生物活性高分子——多糖。香菇多糖以 β -1, 3 葡聚

糖为主, 含有少量的木糖和甘露糖, 具有提高机体免疫力, 防止机体失调、解除体内毒素、保护正常细胞等特殊功能。

香菇多糖是从香菇中提取的有效活性成分, 易溶于水, 无臭无味, 可与任何食品添加, 改变其色、香、味, 制成可口的功能食品, 也可与其它有补益作用的天然食品或微量元素配伍, 制成香菇多糖系列功能食品, 制成胶囊、片剂、饮料或口服液。香菇多糖在提取过程中不加任何化学物质, 提取多糖剩余溶液富含氨基酸, 可做成口服液, 也可制成各种强化营养食品; 渣子磨成粉后是非常好的食用纤维, 可添加在面包、面条、馒头、点心、饼干中。

香菇多糖具有抗病毒、抗肿瘤、调节免疫功能和刺激干扰素形成等多项功能。它的作用已被世界医学生物界作了充分的研究, 尤其在日本, 它被广泛应用于药品和保健食品中, 以它制成的制剂——香菇多糖针剂及片剂, 配合放化疗, 用于肿瘤患者疗效显著, 由于香菇多糖可调节人体内有免疫功能的T细胞活性, 增强免疫功能, 可降低甲基胆蒽诱发肿瘤的能力。在全世界各地被广泛应用。临床主要用于胃癌、肺癌、肠癌及癌性胸腹水等恶性肿瘤的治疗, 另外对提高肝炎及艾滋病人的免疫功能等均有较好的作用, 也是迄今为止国内唯一一个可以供静脉注射的大分子多糖。

山药(拉丁名为 *Dioscoresopposita* Thunb) 的块根, 又名白苕、土薯、大薯、薯药, 具有补脾、益肺、固肾、益精的作用, 原名薯蓣, 是一种营养丰富的传统药食同源植物。首见于《神农本草经》, 列为上品。山药主产于河南, 广东、广西等省亦广泛栽培, 历代认为以焦作市(古怀庆府)所产者为最佳, 称“怀山药”。《本草纲目》记载其能“山药味甘性平、益肾气, 健脾胃, 止泻痢, 化痰涎, 润皮毛”, 现代医学研究表明, 山药具有多种生物活性, 并认为山药中的主要功效成分是山药多糖。现代药理研究表明, 山药水煎剂有抗衰老、降血糖、增强免疫调节、抗突变及抗肿瘤等功能, 因此, 研究高效, 经济的山药活性多糖的提取分离方法具有现实意义, 并为山药多糖的医疗保健功能的开发研究提供实验依据。

五. 离子色谱方法和应用^[1,91]

1. 离子色谱的定义和发展

离子色谱(IC)是高效液相色谱(HPLC)的一种, 是分析阴离子和阳离子的一种液相色谱方法, 现代IC的开始源于H.Small及其合作者的工作, 她们于1975年发表了第一篇IC论文, 同年商品仪器问世。

Small等将第二支柱子(后来成为抑制柱)连接于离子交换分离柱之后, 通过在抑制柱中发生的化学反应, 于测定所分离的离子前, 将淋洗液转变成低电导形式, 降低流动相的背景电导, 提高待测离子的电导响应值。1979年Fritz等提出另一种分离与检测离子的方式, 电导检测池直接连接于分离柱之后, 用低离子强度的溶液作流动相, 不用抑制柱, 叫做非抑制型离子色谱法(或称为单柱离子色谱法)。用低容量的离子交换树脂作柱填料, 低离子强度的溶液作流动相。两种方法所用填料和淋洗液各不相同, 各有其优缺点。从离子色谱问世到现在, 已经

发生了巨大的变化。在其初期, IC 主要用于常见阴离子的分析, 而今, IC 已在非常广的范围得到应用, 已经成为在无机和有机阴、阳离子分析中起重要作用的分析技术。虽然离子交换仍是 IC 的主要分离方式, 离子排斥和离子对色谱在离子型和水可溶有机离子的分析中也起着重要的补充作用。就其主要应用而言, 抑制型和非抑制型电导检测器是最通用的检测器, 紫外-可见 (UV-Vis)、安培、荧光以及原子吸收光谱和质谱 (MS) 等元素特征检测器也得到了广泛应用。IC 法早期发展的主要推动力是阴离子的分析, 如一次进样, 8 min 内可连续测定低 $\mu\text{g/L}$ ~ 数百 mg/L 数量级的 F^- 、 Cl^- 、 NO_2^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 HPO_4^{2-} 和 SO_4^{2-} 等多种无机阴离子, 因此 IC 问世之后很快成为分析阴离子的首选方法。IC 法分析无机阳离子的方法发展比较晚, 其主要原因是已广泛使用的原子吸收法的快速、灵敏和选择性等突出优点。然而近几年来, 无机离子的 IC 法分析已在分析化学中广泛被接受。例如新型的弱酸型阳离子交换分离柱, 一次进样 10 min 内就可完成碱金属 (一价)、碱土金属 (二价) 及铵的分离与检测。对过渡金属的分析在很多领域已成为常规分析方法, 特别是对元素不同价态和形态的分析以及 IC 在线浓缩富集和基体消除技术已充分显示出 IC 的优势。IC 在有机和生化分析方面的研究也很活跃, 并有广泛应用。如用离子排斥性, 稀盐酸作流动相, 可分析 30 余种常见的水溶性有机酸, 其中包括用气相色谱 (GC) 难以分析的羟基有机酸。又如糖和氨基酸的分析, IC 中无需柱前和柱后衍生反应, 在强碱介质中, 氨基酸、单糖和低聚糖以阴离子形势存在, 用强氧化钠作流动相, 阴离子交换分离、脉冲安培检测, 直接进样, 检测浓度可达 pmol/L ~ fmol/L 级。

IC 的关键部件之一是分离柱, 新型柱填料的研究一直是 IC 的热点和发展的推动力。随着新型离子交换柱填料的发展, IC 技术已成功的扩展到多种基体中有机和无机离子的测定。例如新型高交联树脂填充的阴离子交换分离柱, 除了在 $\text{pH}=0\sim 14$ 稳定外, 还可兼容与水互溶的有机溶剂 (如甲醇、乙醇等), 可在淋洗液中加入有机溶剂调节和改善分离的选择性, 缩短疏水性化合物的保留时间, 以及用有机溶剂清洗有机物对色谱柱的污染以延长柱子的使用寿命。具有离子交换、离子对和反向分离机理的多维分离柱, 可同时用多种分离机理来改善分离度和选择性, 一次进样可同时分离离子型和非离子型化合物。IC 固定相发展的另一个方向是高容量柱的研究, 例如阴离子交换分离柱 IonPac AS19 和阳离子交换分离柱 IonPac CS16 的柱容量分别高达 $359\ \mu\text{mol}$ 和 $8000\ \mu\text{mol}$, 可用于高离子浓度基体中痕量阴、阳离子的直接进样分析, 增加弱保留离子的保留, 改善弱保留离子的分离, 是 F 远离水负峰。对羟基 ($-\text{OH}$) 选择性的亲水性固定相的研制成功是对 IC 固定相的又一突破。可用氢氧化钠 (或氢氧化钾) 作流动相, 由于 OH^- 经抑制反应之后生成水, 因而降低流动相的背景电导, 不仅作梯度淋洗时基线稳定, 水负峰小, 可用大体积进样, 还可提高检测灵敏度。

整合树脂填料的引入可作在线浓缩、富集和基体消除, 降低 IC 法的检出限 1~2 个数量级, 并已成功地用于酸、碱和 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等基体中痕量金属杂质的测定。小孔径 (2 mm) IC 柱直接进样, 较相同条件下直径为 4 mm 标准孔径的灵敏度高 4 倍; 需用的样品量和化学试剂量少, 而且由于流速也降低, 相当于抑制器抑制容量的扩大, 因此可用较高浓度的

淋洗液分离高电荷以及强保留的阴、阳离子。

抑制器技术的最新发展是自身再生抑制器 (SRS)。将电解和离子交换膜技术结合, 在库仑力的作用下推动离子通过离子交换膜的移动速度, 因而增加了抑制器的抑制容量和减少平衡时间。该抑制器简化了抑制器的操作, 摒弃了外加再生液, 由电解水产生抑制反应所需的 H^+ 和 OH^- 。

离子色谱仪的一项突破是淋洗液在线发生器的商品化。前面已经述及, OH^- 是一种非常理想的淋洗离子, 但这种碱性溶液非常容易吸收空气中的 CO_2 , CO_2 在碱性溶液中转变成淋洗强度较 OH^- 强的 CO_3^{2-} , 导致高的噪声, 改变分离的保留时间和选择性。淋洗液在线发生器可得到纯的所需浓度的 OH^- 。对 OH^- 选择性的亲水性分离柱与淋洗液在线发生器的结合, 是离子色谱发展的又一新的里程碑。这项最新技术, 无需手工配制流动相, 只用在线产生所需浓度的淋洗液。

2. 离子交换色谱原理

离子交换色谱 (HPIC) 的分离机理主要是离子交换, 基于离子交换树脂上可离解的离子与流动相中具有相同电荷的溶质离子之间进行的可逆交换, 依据这些离子对交换剂有不同的亲和力而被分离。这种分离方式, 主要用于亲水性阴、阳离子是分离。

典型的离子交换模式是样品溶液中的离子与固定相上的离子交换位置上的反离子 (或称平衡离子) 之间直接的离子交换。如用 NaOH 作淋洗液分析水中的 F^- 、 Cl^- 和 SO_4^{2-} 。首先用淋洗液平衡阴离子交换分离柱, 再将进样阀切换到进样位置, 高压泵传递淋洗液, 将样品带入分离柱。待测离子从阴离子交换树脂上置换 OH^- , 并暂时而选择地保留在固定相上。同时, 被保留的样品离子又被淋洗液中的 OH^- 置换并从柱上被洗脱。对树脂亲和力较弱的阴离子 (如 Cl^-) 较对阴离子交换树脂亲和力强的离子 (如 SO_4^{2-}) 通过柱子快。这个过程决定了样品中阴离子之间的分离。经过分离柱之后, 洗脱液先后通过抑制器和电导池, 电导检测。非抑制型离子色谱中, 洗脱液直接进入电导池。

3. 离子色谱常用检测器

离子色谱的检测器分为两大类, 即电化学检测器和光学检测器。电化学检测器包括电导、直流安培、脉冲安培和积分安培; 光学检测器包括紫外-可见和荧光。电导检测器是 IC 的主要检测器, 分为抑制型和非抑制型两种。抑制器能够显著提高电导检测器的灵敏度和选择性, 可用高浓度的淋洗液和高离子交换容量的分离柱, 因此, 现代离子色谱中主要用抑制型电导检测器。安培检测器也有两种, 即单电位安培器 (或直流安培检测器) 和多电位安培检测器 (或称脉冲安培检测器)。多电位安培检测器除工作电位外, 另加一个较工作电位正的清洗电位和一个较工作电位负的清洗电位, 用于直流安培检测器不能测定的易使电极中毒的化合物, 如糖类、醇类和氨基酸等。光学检测器包括紫外-可见和荧光检测器。紫外-可见检测器与普通液相色谱

中所用无明显区别,用可见波长区时,常加进柱后衍生反应器,如薄膜反应器或三通。被测离子进入检测器之前在膜反应器中与显色剂反应,由于薄膜反应器具有特殊结构,使显色剂与待测组分充分地混合并加速显色反应。主要用于溴酸盐、碘酸盐、多价阴离子、硅、过渡金属、重金属和稀有元素等的测定。

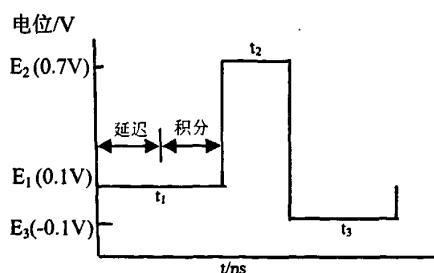
4. 脉冲安培检测器

安培检测器是一种用于测量电活性分子在工作电极表面氧化或还原反应时所产生的电流变化的检测器。它由恒电位器和三种电极组成。在外加电压的作用下,被测物质在电极表面发生氧化或还原反应,检测池内产生电解反应,当氧化反应时,电子由电活性被测物质向安培池的工作电极方向转移;在还原反应时,电子由工作电极向被测物质方向转移。

离子色谱中脉冲安培检测器的发展动力是源于对糖检测的需要。由于绝大多数糖在紫外波长处吸收较弱,紫外检测器仅可以在较低的波长处进行检测,而糖在 210 nm 处检测的灵敏度和选择性都较差,折光检测的灵敏度与选择性都不能满足糖检测的需要。从 20 世纪 80 年代中期开始,脉冲安培检测逐渐取代了这些测定糖的光度法,成为单糖、寡糖分析的一种最重要的手段,有大量的相关研究工作报道。除了糖的分析,脉冲安培检测器亦用于其他含有醇、乙醛、胺和含硫基团组分的测定。

虽然糖可以在金和铂电极上被氧化,但氧化反应的产物亦会毒化电极的表面,抑制了对被测物的进一步氧化过程。安培检测器测定电活性组分时要求其氧化或还原产物不在电极表面产生沉淀。因为受到沾污的电极将改变电极表面的特征,使基线漂移增强,背景噪声增高并使响应值变小。上述现象在糖的测定中表现极为明显。

为解决工作电极表面钝化的问题,脉冲安培检测器使用了快速、连续多重的三种不同工作电位即 E_1 、 E_2 和 E_3 , 见图。其中, E_1 为工作电位, E_2 为清洗正电位, E_3 为清洗负电位。对应的响应时间以 60 ms 为增量, 分别为 t_1 、 t_2 和 t_3 。当待测物在工作电极上发生氧化或还原反应后,其反应产物沉淀于电极表面。于工作电极上首先施加较高的正电位,继而再施加较高的负电位以除去电极表面可氧化或可还原的物质,整个过程在极短的时间内完成。清洗后,电极表面又恢复到未被沾污时的状态



5. 离子色谱的应用

作为近 20 年来发展最快的分析技术之一,如今离子色谱的应用已经渗透到众多的领域。分析的对象已经从开始阶段仅仅分析水中常见阴、阳离子,发展到极性有机化合物以及生物样品中的糖(单糖、寡糖)、氨基酸、肽、蛋白质等的分析。离子色谱联用技术的发展,使得这项分析技术的应用范围和检测灵敏度有了很大的提高。已有大量离子色谱与原子吸收(发射)光谱、电感耦合等离子体、质谱联用的报道。

环境样品分析依然是离子色谱的重要应用领域。所涉及的样品有工业废水、饮用水、酸沉降物、大气颗粒物等样品中阴、阳离子以及其他对环境有害物质的分析,特别是价态和形态的分析,例如 As^{3+} 与 As^{5+} 、 Cr^{3+} 与 Cr^{5+} 、 Fe^{2+} 与 Fe^{3+} 等。利用这一手段,对于研究污染物在环境中迁移、转化的过程将有很大的帮助。

20 世纪 90 年代以来微电子工业发展很快,半导体制造过程中对所使用的水和试剂的纯度要求很高,因其对产品的质量有直接的影响。作为一种有效的痕量分析手段,离子色谱对该领域的发展所起的作用正在增加。此类样品中待测离子的浓度绝大多数是等于或小于 $\mu\text{g/L}$ 级,而 IC 的在线浓缩富集很好地满足了其检测要求。另外,核电厂和火力发电厂锅炉蒸汽冷凝水中痕量 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 SiO_3^{2-} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 以及短碳链的有机酸等离子 $\mu\text{g/L}$ 级的测定也已经广泛采用了离子色谱法代替冗长低效的湿化学法。

离子色谱在食品、卫生、石油化工、水文地质等领域也有广泛的应用。一些国际组织已将离子色谱法作为分析食品中阴离子六价铬和糖等的标准分析方法。

糖和氨基酸是生命科学研究中的热点之一。利用离子色谱法分离单糖、寡糖的工作已经进行了若干年,有不少研究工作报道。无需柱前或柱后衍生的高效阴离子交换分离以及积分脉冲安培检测技术,已广泛用于单糖、寡糖、多聚糖、氨基酸以及糖和氨基酸的同时分析。

六. 离子色谱的优点

溶液中离子型化合物的测定是经典分析化学的主要内容。对阳离子的分析已有一些快速而灵敏的分析方法,如原子吸收、高频电感耦合等离子体发射光谱和 X 射线荧光分析法等,而对阴离子的分析长期以来缺乏快速灵敏的方法,一直是沿用经典的容量法、重量法和光度法等。这些方法大都是操作步骤冗长费时,需用多种化学试剂,灵敏度低而且有干扰。离子色谱具有快速、灵敏、选择性好和同时测定多组分的优点,其中很多是目前难以用其他方法测定的离子,尤其是阴离子。离子色谱对阴离子的分析是分析化学中的一项新的突破。如果说高频电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)是目前同时测定多元素的快速、灵敏而准确的分析方法,则同时测定多种阴离子的快速、灵敏而准确的分析手段当首推离子色谱法。离子色谱对阳离子分析的突出贡献是对 NH_4^+ 和有机胺的分析,因为这些化合物很难用别的仪器分析方法完成。

高效液相色谱(HPLC)中的固定相主要是硅胶,硅胶稳定的 pH 值范围是 2~8。新型的有机高聚物基质离子交换剂在 $\text{pH}=0\sim 14$ 和与水互溶的有机溶剂中稳定,因此可用强的酸和碱以及有机溶剂作流动相。IC 的应用已从主要作无机阴、阳离子的分析扩展到有机化合物的分

析，特别是难以用 GC 和 HPLC 分析的极性较强的水溶性化合物分析。

1. 快速、方便

现在社会中完成一项分析任务所需的时间越来越重要。对 7 种常见阴离子 (F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-}) 和 6 种常见阳离子 (Li^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+}) 的平均分析时间已分别小于 8 min。用高效快速分离柱对上述 7 种重要的常见阴离子达基线分离只需 3 min。

使用方便是当代 IC 发展的标志之一。使用者感到麻烦的一些问题已得到较好解决。如 NaOH 是化学抑制型 IC 中分析阴离子的推荐淋洗液，因为它的抑制反应产物是低电导的水。但配制和使用时，空气中的 CO_2 总会溶入 NaOH 溶液中，并生成 CO_3^{2-} ，改变淋洗液的组成和浓度，基线漂移，影响分离。基于电解原理的在线淋洗液发生器，避免了淋洗液与空气接触，只用水及鼠标操作就可得到所需准确浓度的无污染的 KOH 淋洗液。又如电化学膜抑制器，无需再生，可连续工作。

2. 灵敏度高

离子色谱分析的浓度范围为低 $\mu g/L$ ($1 \sim 10 \mu g/L$) 至数百 $\mu g/L$ 。直接进样 ($25 \mu L$)，电导检测，对常见阴离子的检出限小于 $10 \mu g/L$ 。对电厂、核电厂以及半导体工业所用高纯水，通过增加进样量，采用微孔柱 (2 mm 直径) 或在线浓缩等方法，检出限可达 pg/L 或更低。脉冲安培检测器对电化学活性化合物的检测限低达 fmol。ICP-MS 法相比，柱后衍生反应是一个成本较低和简单的提高检测灵敏度的方法。例如基于 I^- 对次氯酸盐与双二甲胺二苯甲烷之间反应的催化效应，对 I^- 的检测限达 0.02 ng。

3. 选择性好

IC 法分析无机和有机阴、阳离子的选择性可以通过选择适当的分离方式、分离柱和检测方法来达到。与 HPLC 相比，IC 中固定相对选择性的影响较大，如 Ion-PacCS15 型阳离子分离柱，因其树脂的修饰基团增加了内径为 1.38 nm 的冠醚，对离子半径亦为 1.38 nm 的 K^+ 保留增强，将阳离子的洗脱顺序从原理的 $Li^+ \rightarrow Na^+ \rightarrow NH_4^+ \rightarrow K^+ \rightarrow Mg^{2+} \rightarrow Ca^{2+}$ 改变成 $Li^+ \rightarrow Na^+ \rightarrow NH_4^+ \rightarrow Mg^{2+} \rightarrow Ca^{2+} \rightarrow K^+$ 。虽然市场上已有数十种不同选择性的高效分离柱供选用，但对固定相的研究一直是 IC 的热点，每年匹兹堡会都有新的分离柱推出。在离子交换分离中，溶质离子对固定相的亲合力主要与溶质的电荷、离子半径和疏水性有关；在离子排斥色谱中，溶质离子对固定相的亲合力主要与其 pKa 有关。在选定分离柱和检测器后，可有选择淋洗液的种类和浓度以及梯度来改变选择性。用电导检测器时，抑制技术是很重要的，因为可能为干扰源的待测离子的反离子（如测 NaCl 中 Cl^- 时， Na^+ 为反离子，测 NH_4NO_3 中 NH_4^+ 时， NO_3^- 为反离子）在抑制反应中将分别与 H^+ 和 OH^- 交换，进入废液。选用溶质特性检测器以改善某些复杂样品

分析的选择性,如 Cl^- 无紫外吸收,而 NO_3^- 和 NO_2^- 有强的紫外吸收,选用紫外-可见检测器可方便地检测高浓度 Cl^- 中的 NO_3^- 和 NO_2^- 。柱后衍生方法的发展提高了对金属多价离子、六价铬、溴酸盐等的检测选择性。由于 IC 的选择性,对样品前处理的要求简单,一般只做稀释和过滤。

4. 可同时分析多种离子化合物

与光度法、原子吸收法相比,IC 的主要优点是可同时检测样品中的多种成分。只需很短的时间就可得到阴、阳离子以及样品组成的全部信息。例如用 KOH 作淋洗液,梯度淋洗,15 min 内就可检测 30 多种阴离子,包括常见无机阴离子,有机酸和卤氧化物等。

5. 分离柱的稳定性好、容量高

与 HPLC 中所用的硅胶填料不同,IC 柱填料的高 pH 值稳定性允许用强酸或强碱作淋洗液,有利于扩大应用范围。高交联度树脂在有机溶剂中稳定,可在淋洗液中加入有机溶剂改善分离的选择性,缩短分析时间和改善峰形,还可用有机溶剂清洗柱子以除去有机污染物。高的 pH 值稳定性和有机溶剂可匹配性以及高的柱容量,简化了样品前处理手续。溶解、稀释和过滤是 IC 中样品前处理的主要内容。

IC 中同时分析多种离子的能力受样品中不同成分之间的巨大浓度差的限制。如很难同时检测废水样品中的高浓度和低浓度成分,对这种样品的分析,常用不同灵敏度设置或不同稀释程度作两次或多次进样。20 世纪 90 年代高效高容量柱的研制成功较好地解决了上述部分问题。如用柱容量为 8 mmol 的 IonPacCS16 柱于饮用水中常见阳离子的分析,不需要样品前处理,一次进样可同时测定 Li^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 等离子,部分离子浓度差高达 10000 倍。

七. 分离方式和检测方式的选择

离子色谱有三种主要的分离方式和三种检测方式,数十种分离柱,在作一个未知样品或方法发展时,首先考虑的是选择适当的分离和检测方式。

分析者对待测样品应有一些一般信息,首先应了解待测化合物的分子结构和性质以及样品的基体情况,如是无机还是有机离子,离子的电荷数,是酸还是碱,亲水还是疏水,是否为表面活性化合物等。待测离子的 pK_a 值、疏水性和水合能是决定选用何种分离方式的主要因素。水合能高和疏水性弱的离子,如 Cl^- 或 K^+ ,最好用离子交换色谱 (HPIC) 分离。水合能低和疏水性强的离子,如高氯酸 (ClO_4^-) 或四丁基铵,最好用亲水性强的离子交换剂柱或离子对色谱 (MPIC) 分离。有一定疏水性也有明显水合能的 pK_a 值在 1~7 之间的离子,如乙酸盐或丙酸盐,最好用离子排斥色谱 (HPICE) 分离。

有些离子,既可用阴离子交换分离,也可用阳离子交换分离,如氨基酸、生物碱和过渡金属等。有的离子可用多种检测方式检测,例如测定过渡金属时,可于分离后直接用电导或脉冲

安培检测,也可用柱后衍生反应,使金属离子与 PAR 或其他显色剂作用,再用 UV/Vis 检测。一般的规律是:在水溶液中以离子形态存在的离子,其酸式离解常熟 pK_a 或碱式离解常熟 $pK_b < 5$, 应选用电导检测。具有对紫外或可见光有吸收基团或经柱后衍生反应后(IC 中较少用柱前衍生)生成有吸光基团的化合物,可选用直流安培或脉冲安培检测。对一些复杂样品,为了一次进样得到较多的信息,可将两种或三种检测器串联使用。若对所要解决的问题有几种方案可选,分析方案的确定主要由基体的类型、选择性、过程的复杂程度以及是否经济来决定。

前已述及,离子色谱柱填料的发展推动了离子色谱应用的快速发展,对多种离子分析方法的开发提供了多种可能性。特别应提出的是在 $pH=0\sim 14$ 的水溶液和 100%有机溶剂(反相高效液相色谱用有机溶剂)中稳定的亲水性高效高容量柱填料的商品化,使得离子交换分离的应用范围更加扩大。常见的在水溶液中以离子形态存在的离子,包括无机和有机离子,以弱酸的盐(Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 、 KOH 、 $NaOH$)或强酸(H_2SO_4 、甲基磺酸、 HNO_3 、 HCl)为流动相,阴离子交换或阳离子交换分离,电导检测,已是成熟的方法,有成熟的色谱条件可参照。对近中性的水可溶的有机“大”分子(相对常见的小分子而言),若待测化合物为弱酸,则由于弱酸在强碱性溶液中会以阴离子形态存在,因此选用较强的碱为流动相,阴离子交换分离;若待测化合物为弱碱,则由于在强酸性溶液中会以阳离子形态存在,选用较强的酸作流动相,阳离子交换分离;若待测离子的疏水性较强,由于与固定相之间的吸附作用而使保留时间较长或峰拖尾,则可在流动相中加入适当有机溶剂,减弱吸附,缩短保留时间、改善峰形和选择性。对该类化合物的分离也可选用离子对色谱分离,但流动相中一般含有较复杂的离子对试剂。此外,对弱保留离子可选用高容量柱和弱淋洗液以增强保留,对强保留离子则反之。对疏水性和多价离子的分离,可选用亲水性固定相减弱样品离子与固定相之间的疏水作用。

八. 离子色谱条件的优化

1. 稀释样品

1.1 对分离度的改善

组成复杂的样品,若待测离子对树脂亲和力相差颇大,就要作几次进样,并用不同浓度或强度的淋洗液或梯度洗脱。对固定相亲和力差异较大的离子的分离,增加分离度的最简单方法是稀释样品。例如盐水中 SO_4^{2-} 和 Cl^- 的分离,在常用的分析阴离子的色谱条件下,30 min 之后 Cl^- 的洗脱仍在继续。在这种情况下,在未恢复稳定基线之前不能再进样。若将样品稀释 10 倍之后再进样就可得到 Cl^- 与痕量 SO_4^{2-} 之间的较好分离。

1.2 改变分离和检测方式

若待测离子对固定相亲和力相近或相同,样品稀释的效果常不令人满意。对这种情况,除了选择适当的流动相之外,还应考虑选择适当的分离方式和检测方式。例如, NO_3^- 和 ClO_3^- , 由于它们的电荷数和离子半径相似,在用碳酸盐作淋洗液的阴离子交换分离柱上共淋洗。但

ClO_3^- 的疏水性大于 NO_3^- , 在用 OH^- 作淋洗液的亲水性柱上或离子对色谱柱上就很容易分开了。又如 NO_2^- 与 Cl^- 在阴离子交换分离柱上的保留时间相近, 常见样品中 Cl^- 的浓度又远大于 NO_2^- , 使分离更加困难, 但 NO_2^- 有强的 UV 吸收, 而 Cl^- 则很弱, 因此应改用紫外作检测器测定 NO_2^- , 用电导检测 Cl^- , 或将两种检测器串联, 于一次进样同时检测 Cl^- 和 NO_2^- 。对高浓度强酸中弱酸的分析, 若采用离子排斥, 由于强酸不被保留, 在死体积排除, 将不干扰弱酸在离子排斥柱上的分离。

1.3 选择适当的淋洗液

淋洗液种类、浓度和有机溶剂的适当选择, 可有效地改善分离度。离子色谱分离是基于淋洗离子和样品离子之间对树脂有效交换容量的竞争, 为了得到最佳的分离, 样品离子和淋洗离子应有相近的亲合力。离子色谱中由于固定相结构不同, 特别是离子交换功能基的选择性和亲水性不同, 所用淋洗液亦不同。离子交换功能基为烷基季铵的阴离子交换剂, 主要用碳酸盐作淋洗液; 离子交换功能基为烷醇季铵的离子交换剂是对 OH^- 选择性的固定相, 主要用 KOH 或 NaOH 为淋洗液。淋洗液浓度的改变对两价或多价待测离子保留时间的影响大于对一价待测离子。若多价待测离子的保留时间太长, 增加淋洗液浓度是较好的方法。用亲水性强的分离柱分离疏水性强的离子时, 淋洗液中无需加入有机溶剂。

用 CO_3^{2-} - HCO_3^- 作淋洗液时, 在 Cl^- 之前洗脱的离子是弱保留离子, 包括一价无机阴离子、短碳链一元羧酸和一些弱离解的组分, 如 F^- 、 Cl^- 等的分离应选用较弱的淋洗离子和高容量柱, 常用的淋洗离子有 HCO_3^- 、 OH^- 和 $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ 。由于 HCO_3^- 和 OH^- 易吸收空气中 CO_2 , CO_2 在碱性溶液中会转变成 CO_3^{2-} , CO_3^{2-} 的淋洗强度较 HCO_3^- 和 OH^- 大, 因而不利于上述弱保留离子的分离, 用 Dionex 公司的淋洗液在线发生器可得到很纯低浓度的 KOH 淋洗液。 $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ 亦为弱淋洗离子, 且溶液稳定, 是分离弱保留离子的推荐淋洗液。当用弱淋洗液 ($\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$) 分离样品中弱保留的离子时, 弱保留离子, 如奎尼酸根、 F^- 、乳酸根、乙酸根、丙酸根、甲酸根、丁酸根、甲基磺酸根、丙酮酸根、戊酸根、一氯乙酸根、 BrO_3^- 和 Cl^- 等得到较好分离。但一般样品中都含有对阴离子交换树脂亲和力强的离子, 如硫酸根、磷酸根、草酸盐等, 如果用等浓度淋洗, 它们将在 1 h 之后甚至更长时间才被洗脱。对这种情况, 应于 3~5 次进样之后, 用高浓度的强淋洗液作样品进一次样, 将强保留组分从柱中推出来, 或者用高浓度的淋洗液洗柱子 0.5 h。

对离子交换树脂亲和力强的离子有两种情况, 一种是离子的电荷数大, 如 PO_4^{3-} 、 AsO_4^{3-} 和柠檬酸等; 另一种是离子半径较大, 疏水性强, 如 I^- 、 SCN^- 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、苯甲酸和多聚磷酸盐等。对前者以增加淋洗液的浓度或选择强的淋洗离子为主。对后一种情况, 推荐的方法是在淋洗液中加入适量极性有机溶剂 (如甲醇、乙醇和对氰酚等) 或选用亲水性的分离柱。有机溶剂的作用主要是减少样品离子与离子交换树脂之间的非离子交换作用, 占据树脂的疏水性位置, 减少疏水性离子在树脂上的吸附, 从而缩短保留时间, 减少峰的拖尾, 并增加测定灵敏度。相邻两

种离子的分离度小于 0.8 或共洗脱时,若两种离子的疏水性不同,在淋洗液中加入适当种类和浓度的有机溶剂可有效的改善分离。

2. 减少保留时间的问题

缩短分析时间与提高分离度的要求有时是相矛盾的。在能得到较好的分离结果的前提下分析的时间自然的越短越好。为了缩短分析时间,可改变分离柱容量、淋洗液流速、淋洗液强度,在淋洗液中加入有机改进剂和用梯度淋洗技术。

以上方法中最简便的是减小分离柱的容量,或用短柱。例如用 3 mm×500 mm 分离柱分离 NO_3^- 和 SO_4^{2-} ,需用 18 min;而改用 3 mm×250 mm 的分离柱,用相同浓度的淋洗液只用 9 min。但 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 的分离不好,若改用稍弱的淋洗液就可得到较好的分离。

大的进样体积有利于提高检测灵敏度,但导致大的系统死体积,即大的水负峰,因而推迟样品离子的出峰时间。如在 Dionex 的 AS11 柱上用 NaOH 为淋洗液,进样量分别为 25 μL 、250 μL 和 750 μL 时, F 的保留时间分别为 2.0 min、2.5 min 和 3.6 min。为了减小保留时间,最好用小的进样体积。

增加淋洗液的流速可缩短分析时间,但流速的增加受系统所能承受的最高压力的限制,流速的改变对分离机理不完全是离子交换的组分的分离度的影响较大。例如对 Br^- 和 NO_2^- 之间的分离,当流速增加时分离度降低很多,而分离机理主要是离子交换的 NO_3^- 和 SO_4^{2-} ,甚至在很高的流速时,它们之间的分离度仍很好。温度升高时,由于流动相的黏度降低,柱压亦降低,则可增加流速缩短分析时间。

分离机理主要是离子交换时,淋洗液浓度的增加会导致保留时间的缩短,但淋洗液浓度的增加对多价离子保留时间缩短的影响大于一价离子。因此会导致洗脱顺序(选择性)的改变。如在阳离子交换柱上,用 30 mmol/L 甲磺酸作淋洗液,阳离子洗脱顺序是: $\text{Li}^+ \rightarrow \text{Na}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{K}^+ \rightarrow \text{Mg}^{2+} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$; 而用 48 mmol/L 甲磺酸作淋洗液时,洗脱顺序则为: $\text{Li}^+ \rightarrow \text{Na}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{Mg}^{2+} \rightarrow \text{K}^+ \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ 。用较强的淋洗离子可加速离子的淋洗,但对弱保留和中等保留的离子,会降低分离度。在淋洗液中加入有机改进剂,可缩短疏水性离子的保留时间和减小峰的拖尾。

3. 改善检测灵敏度

第一种方法是降低基线噪声,将检测器的灵敏度设置在较高灵敏档是提高检测灵敏度的最简单方法。

第二种方法是增加进样量。直接进样,进样体积的上限取决于保留时间最短的色谱峰与死体积(IC中一般称水负峰)之间的时间和柱容量,例如用 IonPacCS12A 柱,用 12 mmol/L 硫酸作淋洗液。进样体积 1300 μL ,可直接用电导检测低 $\mu\text{g/L}$ 的碱金属和碱土金属,因为 Li^+ (保留时间最短的峰)的保留时间为 4.1 min,水负峰在 1.6 min, Li^+ 峰与水负峰之间相隔达 2.5 min,因此可直接用大体积进样。而在阴离子分析中,若用 $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ 作流动相,由于 F 峰(保留

时间最短的峰)靠近水负峰,若增加进样体积,水负峰增大,F的峰甚至与水负峰分不开;另一方面由于F的保留时间一般小于2 min,若进样量大于1 mL,流速为1~2 mL/min,F没有足够的时间参加色谱过程,因此峰拖尾定量困难。若用亲水性强的固定相,以NaOH为淋洗液,特别是梯度淋洗时,由于梯度淋洗开始时NaOH浓度低,又由于通过抑制器之后的背景溶液是低电导的水,几乎无水负峰,这种情况可适当增大进样量,若进样量为1000 μL 可直接测定低至 $\mu\text{g/L}$ 级的常见阴离子。

增加进样体积时,除了考虑水负峰的大小和弱保留溶质的保留时间之外,还必须考虑柱容量。离子色谱中不同型号分离柱的柱容量差别非常大,如常用的阴离子交换分离柱IonPacAS14的柱容量为65 $\mu\text{mol/柱}$ 。

第三种方法是用浓缩柱,但一般用于较清洁的样品中痕量成分测定的效果较好。用浓缩柱时要注意,柱子的动态离子交换容量小于理论值。不要使浓缩柱超负荷。用浓缩柱富集弱保留离子(如F)时,若样品中同时还含有保留较强的离子,如 SO_4^{2-} 或 PO_4^{3-} 等,弱保留离子的回收不好。其原因是样品中的 SO_4^{2-} 或 PO_4^{3-} 在浓缩时起淋洗作用,可将弱保留离子部分洗脱下来。对弱保留离子的分析,若浓缩柱的柱容量不是足够大,则用加大进样量方法所得到的结果较用浓缩柱好。除此之外,用浓缩柱时还应考虑样品的基体。例如,动力厂冷凝水中 Cl^- 和 SO_4^{2-} 的含量只有1~10 $\mu\text{g/L}$ 。用浓缩柱后, SO_4^{2-} 的测定结果很好,而 Cl^- 的结果则很不正常。其原因是工厂为了防止腐蚀,在水中加氨以降低水的pH值。氨与水作用生成的氢氧化铵中的 OH^- 对树脂的亲合力与 Cl^- 相近,因而起了淋洗离子的作用。而 SO_4^{2-} 对树脂的亲合力较大,受 OH^- 的影响小。

第四种方法是用微孔柱。离子色谱中常用的标准柱的直径为4 mm,小孔柱的直径为2 mm。因为小孔柱较标准柱的体积小4倍,在小孔柱中进同样(与标准柱)质量的样品,将在检测器产生4倍于标准柱的信号。而且淋洗液的用量只为标准柱的1/4,因而减少淋洗液的消耗。

第二部分 研究报告

一. 绿茶中茶多糖的提取与离子色谱检测方法研究

1. 引言

茶多糖是茶叶中具有特殊生物活性的一类与蛋白质结合在一起的酸性多糖或酸性糖蛋白。研究表明,茶多糖有降血压和减慢心率的作用,能起到抗血凝、抗血栓、降血脂、降血压、降血糖、改善造血功能、帮助肝脏再生、短期内增强机体非特异性免疫功能等功效,从而使茶多糖有望成为预防和治疗糖尿病及心血管疾病、增加免疫功能的一种非常有前景的天然药物。茶多糖含量的高低也是茶叶保健性功能理化指标之一。茶多糖为酸性多糖,不同制备原料和制备方法所得的多糖纯度及单糖组成等均有所不同,其生物活性也存在一定差异。近年来,随着科技的发展,茶叶的保健功能也越来越引起人们的普遍重视,大多数研究集中在茶叶中茶多糖的重要功能和作用,但在茶多糖的检测方面,高效、便捷、快速的分析检测方法还很欠缺。

对糖类的分析方法通常可以分为两类:一类是以色谱技术为基础的方法;另一类则是非色谱法-酶学方法。尽管酶学方法非常灵敏和具有很高的特异性,但受到样品中污染物引起的干扰的限制,且酶的来源和纯化也是一个至关重要的问题。因此相比较而言,色谱技术更为有利。糖类的检测常用高效液相色谱法(HPLC),气相色谱法(GC),薄层色谱法(TLC),高效毛细管电泳法(HPCE)等,离子色谱法研究相对较少。然而,综合比较以上各种分析检测方法,其中气相色谱法分析需要较烦琐的样品前处理过程;液相色谱法需先通过柱前衍生,然后再用紫外或荧光检测,这种方法虽然敏感,但是在定量检测时常出现异常现象干扰测定结果;毛细管电泳法快速、灵敏,但缺乏直接的UV检测信号等。离子色谱法则以其简单、快速、高选择性、高灵敏度等诸多优点,在各种糖类检测方法中异军突起,成为糖类分析的一个非常有利的工具,并且逐渐引起广大学者的重视。但由于离子色谱对进样样品要求严格,且多糖在加热处理后,量会变少,不耐热,不耐酸碱,在 $\text{pH}<5.0$ 或 $\text{pH}>7.0$ 时,会发生水解,因此样品前处理步骤则要求严格。

本文就是运用离子色谱法检测绿茶多糖中的葡萄糖和甘露糖。该方法具有简单、快速、灵敏度高、结果准确等突出优点,对多糖的分析具有一定的参考价值。文中通过运用三种不同温度的超纯水浸提绿茶茶叶,减压浓缩,乙醇沉淀,超声辅助乙酸水解粗多糖制样。并以NaOH溶液作为流动相,研究了用离子交换色谱分离-脉冲安培检测葡萄糖和甘露糖的最佳实验条件方法,得到了良好的分离效果和较高的检测灵敏度。将该法用于不同浸取条件下绿茶茶叶多糖的检测,结果令人满意,并且根据检测结果,确定了绿茶多糖的最佳提取条件。

2. 实验部分

2.1 仪器和试剂

仪器：瑞士万通公司（Metrohm）861 Advanced Compact IC，817 Bioscan 脉冲安培检测器，833 IC 蠕动泵，METROSEP CARB 1（150×4.0 mm）阴离子交换柱，色谱工作站为 Metrohm IC-Net 2.3，超声波清洗器（上海必能信超声波有限公司），隔膜真空泵（天津市腾达过滤器件厂），旋转蒸发器 RE-52A（郑州长城科工贸有限公司），78-1 型磁力加热搅拌器（江苏金坛市望华科教仪器厂），恒温箱，电炉，布氏漏斗，玻塞漏斗。

试剂：葡萄糖、甘露糖标样购于 Sigma 公司，NaOH（优级纯）（天津市瑞金特化学品有限公司），95%乙醇（分析纯），无水乙醇（分析纯），丙酮（分析纯）均为重庆川东化工（集团）有限公司化学试剂厂出品，乙醚（分析纯）（安徽金邦医药化工有限公司），冰乙酸（分析纯）（重庆博艺化学试剂有限公司），绿茶（西南农业大学特级绿茶），超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

分离柱：METROSEP CARB 1（150×4.0 mm）阴离子交换柱，淋洗液：6 mmol/L NaOH 溶液，流速：1.0 mL/min，进样量：20 μ L，柱温：32℃，再生液：200 mmol/L NaOH。

2.2.2 标准溶液和样品溶液的配制

（1）标准溶液的配制：

准确称取葡萄糖和甘露糖标准样品 0.10 g，分别溶于 100 mL 容量瓶中，配制成 1000 mg/L 标准储备液。用移液管分别依次准确移取以上葡萄糖、甘露糖标准储备液 0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 于 50 mL 容量瓶中，超纯水定容至刻度，得到葡萄糖和甘露糖浓度分别为 2.0、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0 mg/L 的标准混合溶液。

（2）样品溶液的配制：

A. 粗多糖的提取：

称取三份 20 g 绿茶茶叶，粉碎后分别置于 500 mL 烧杯中（分别编号为样品 1，样品 2，样品 3），均加入 250 mL 超纯水，分别依次在室温、温水浴、沸水条件下浸提 120 min。浸提时，可同时利用超声波辅助提取，利用超声波对细胞壁的破碎作用，促进胞内多糖的溶出。将浸提液用布氏漏斗减压抽滤后，滤液用旋转蒸发器减压浓缩（温度控制在 70℃，浓缩至 10 mL 左右）用 30 mL 95%乙醇溶液沉淀（边加边搅拌），放置冰箱冷藏，静置过夜后减压抽滤，沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚交替洗涤 2 次，放置于恒温箱中低温干燥至恒重（70℃）。三种不同浸提条件下得到的绿茶粗多糖质量分别为样品 1 为 0.3960 g、样品 2 为 0.4430 g、样品 3 为 3.2878 g。

B. 粗多糖的水解：

常用的水解方法有硫酸水解法，盐酸水解法和三氟乙酸水解法等。硫酸水解法使用硫酸，因具有一定的氧化性，会破坏一部分多糖，使分析结果准确度降低；盐酸水解法虽避免了氧化性，但耗时太长，不实用；三氟乙酸水解法使用的三氟乙酸毒性较大，也具有一定的局限性。

本实验利用乙酸水解,既保证高的水解效率,又由于乙酸是弱酸,不具有氧化性,因而不会破坏多糖组成,且无毒性,对环境无污染。同时利用超声辅助水解,提高水解反应速度,缩短水解时间,提高效率。

分别称取上述三种方法浸取的茶叶粗多糖 0.2 g,用 50 mL 1 mol/L 乙酸水解,超声波辅助作用时间为 120 min。

3. 结果与讨论

3.1 淋洗液的选择

离子色谱法分离检测多糖浓度为 0.01~0.2 mol/L 的氢氧化钠溶液是常用的淋洗液。调节淋洗液 NaOH 浓度分别为 1.0、2.0、5.0、6.0、7.5、10.0、15.0、20.0、50.0、100.0、200.0 mmol/L,分析含有葡萄糖和甘露糖 2 种单糖的标准溶液。由于葡萄糖和甘露糖属于差相异构体,因而流动相的浓度应小于 20.0 mmol/L,才可使这两种单糖达到分离。当淋洗液浓度大于 20.0 mmol/L 时,葡萄糖峰与甘露糖峰不能完全分离。当 NaOH 浓度为 15.0 mmol/L 时,甘露糖峰与葡萄糖峰可以分开,但峰形不佳。当淋洗液浓度进一步降低时,发现随着淋洗液浓度的不断降低,两峰的保留时间也相应延长。当淋洗液浓度为 6.0 mmol/L 时,2 种单糖峰分离效果最好且峰形最佳,保留时间适中。当淋洗液浓度低于 5.0 mmol/L 时,两峰的分离情况有所改善,但基线不稳定,向上漂移,不能选用。由于脉冲安培检测器是在碱性条件下 ($\text{pH} > 12$) 的电化学响应下实现的,因此若在低浓度的条件下持续检测,检测的灵敏度会降低,重现性变差,所以每次进样前色谱柱要用高浓度氢氧化钠 (200.0 mmol/L) 平衡柱子来进行再生处理。综合两种单糖的分离情况,本实验选用 6.0 mmol/L NaOH 溶液作为淋洗液。

3.2 温度控制

选择 6.0 mmol/L NaOH 溶液作为淋洗液,在不同温度情况下考察 2 种单糖混标溶液的分离情况。当色谱柱温度低于 25℃ 时,各色谱峰变宽,灵敏度降低。当色谱柱温度超过 40℃ 时,分离变差。当色谱柱温度在 25℃-35℃ 之间时,峰形较好,分离的效果也满足本实验要求,因此,对比之后选用 32℃ 作为色谱柱温度。

3.3 流速选择

调节流速分别为 1.0、0.8、0.5 mL/min,当流速降低时保留时间延长很多,但对峰的分离度影响不大,因此,为了提高实验的效率,选用 1.0 mL/min 作为淋洗液流速。

3.4 标准曲线的绘制与最低检测限的测定

在优化的色谱条件下,分析标准溶液,得到的色谱图见图 1。

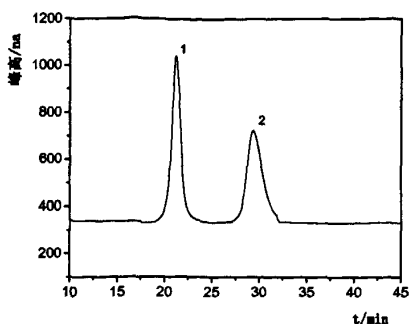


图 1: 2 种单糖标准样品的色谱图 (1. 葡萄糖、2.甘露糖)

Fig 1: Chromatogram of the two monosaccharides standard sample. (1. glucose、2. mannose)

以两种单糖的色谱峰高(Y)对其质量浓度(X, mg/L)进行线性回归, 标准曲线见图 2~3, 得到线性回归方程。葡萄糖为: $Y=41.56X+20.06$, $R=0.9996$; 甘露糖为: $Y=19.88X-69.59$, $R=0.9992$; 线性范围为 2.0-50.0 mg/L。进一步稀释质量浓度为 2 mg/L 的标准溶液测定其最低检测限, 得到葡萄糖和甘露糖的最低检测限分别为 0.125 mg/L 和 2.0 mg/L。

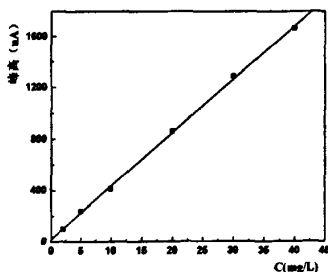


图 2: 葡萄糖的标准曲线

Fig 2: Standard curve of glucose

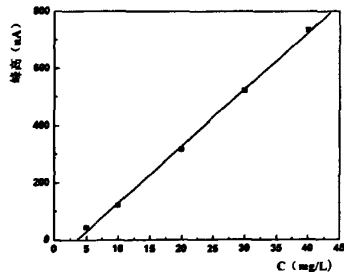


图 3: 甘露糖的标准曲线

Fig 3: Standard curve of mannose

3.5 重现性试验:

按照上述优化后的色谱条件, 用 20 mg/L 的葡萄糖和甘露糖混标液连续进样 7 次, 得到葡萄糖和甘露糖的峰高测定值的相对标准偏差 (RSD) 分别为 5.79%和 14.15%, 保留时间的相对标准偏差 RSD 分别为 2.08%和 2.19%。

3.6 加标回收率试验:

用移液管分别准确移取 2.5 mL1000 mg/L 葡萄糖和甘露糖标准储备液, 定容于 50 mL 容量瓶中, 得到浓度为 50.0 mg/L 的葡萄糖和甘露糖标准混合溶液。移取三种不同提取条件下制得的绿茶粗多糖水解液 5 mL 各三份, 依次向其中加入 50.0 mg/L 葡萄糖和甘露糖标准混合溶液 1 mL、2 mL、4 mL, 并用 1 mol/L 乙酸溶液定容至 10 mL, 混合均匀。按照优化后的色谱条件进行色谱分析 (进样前用玻塞漏斗抽滤), 计算加标回收率, 结果见表 1 示。如结果所示, 样品的加标回收率在 94.9%~97.5%之间, 均高于 94%, 保证了试验的准确度, 可很好的应用于

日常分析和检测。

表 1：回收率的试验结果

Table 1: The results of the recovery percentage

茶叶名称	单糖名称	本底值(mg)	加入值(mg)	检测值(mg)	回收率(%)
冷水绿茶样品	葡萄糖	0.0007750	0.05	0.04873	95.9
		0.0007750	0.10	0.09684	96.1
		0.0007750	0.20	0.1933	96.3
	甘露糖	0.04095	0.05	0.08880	95.7
		0.04095	0.10	0.1367	95.8
		0.04095	0.20	0.2333	96.2
	葡萄糖	0.01069	0.05	0.05849	95.6
		0.01069	0.10	0.1056	94.9
		0.01069	0.20	0.2011	95.2
温水绿茶样品	甘露糖	0.01298	0.05	0.06103	96.1
		0.01298	0.10	0.1088	95.8
		0.01298	0.20	0.2055	96.3
	葡萄糖	0.00276	0.05	0.0512	96.9
		0.00276	0.10	0.09986	97.1
		0.00276	0.20	0.1973	97.3
	甘露糖	0.02719	0.05	0.07594	97.5
		0.02719	0.10	0.1241	96.9
		0.02719	0.20	0.2215	97.2

3.7 样品检测：

将三种不同温度条件下制得的绿茶水解液用玻塞漏斗减压抽滤,得到的滤液按照上述优化后的色谱条件进样进行色谱分析,色谱如图 4-6 所示。3 种样品在前 6 min 内均有系统峰出现。根据分析测定结果确定绿茶样品中含有葡萄糖和甘露糖这 2 种单糖,并定量检测出,在冷水浸提条件下 200 mg 绿茶粗多糖含有葡萄糖 0.007750 mg、甘露糖 0.4095 mg,在温水浸提条件下 200mg 绿茶粗多糖含有葡萄糖 0.1069 mg、甘露糖 0.1298 mg,在沸水浸提条件下 200mg 绿茶粗多糖含有葡萄糖 0.0276 mg、甘露糖 0.2719 mg。

检测结果表明,在冷水浸提条件下,多糖的提取含量低。在沸水浸提条件下,虽然得到粗多糖含量很高,但其中单糖成分由于温度过高多被破坏,导致单糖的含量降低。在温水浸提条件下所得的单糖含量最高,因此该条件最适合茶多糖的提取,可广泛应用于日常生产研究。

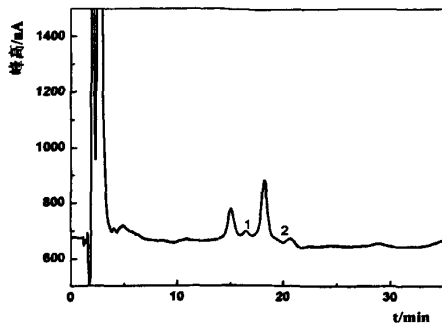


图 4: 冷水浸提绿茶样品色谱图 (1. 葡萄糖、2. 甘露糖)

Fig 4: Chromatogram of the green tea sample immersed in cold water (1.glucose 2. mannose)

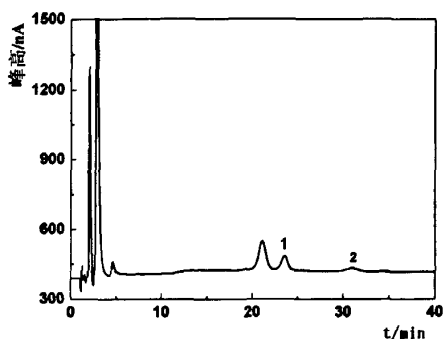


图 5: 温水浸提绿茶样品色谱图 (1. 葡萄糖、2. 甘露糖)

Fig 5: Chromatogram of the green tea sample immersed in warm water (1. glucose 2. mannose)

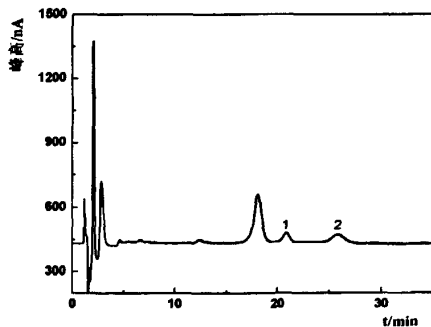


图 6: 沸水浸提绿茶样品色谱图 (1. 葡萄糖、2. 甘露糖)

Fig 6: Chromatogram of the green tea sample immersed in boiling water (1. glucose 2. mannose)

4. 小结

本文研究建立了高效离子交换分离-脉冲安培检测分析多糖中葡萄糖和甘露糖的方法。该方法操作简单, 准确性好, 灵敏度较高, 实用性强。但由于淋洗液浓度较低, 影响色谱柱的平衡体系, 导致试验时稳定性较差, 重现性不好, 可以进一步研究改善。

通过对三种条件下的实验结果的分析发现, 用温水浸取绿茶茶叶的方法得到的实验效果最好。可应作为日常多糖的提取方法。

二. 离子色谱法测定各种茶叶中的茶多糖研究

1. 引言

糖类是自然界中存在最多的有机化合物,也是重要的生物高分子化合物和信息物质。多糖及糖复合物分布广泛,功能多种多样。茶多糖是茶叶中具有特殊生物活性的一类与蛋白质结合在一起的酸性多糖或酸性糖蛋白。药理研究表明,茶多糖具有显著的降血糖效果和免疫活性,使茶多糖有望成为预防与治疗糖尿病和心血管疾病、提高免疫功能的天然药物。近年来,大多数研究表明茶叶中茶多糖的重要功能,但在茶多糖的检测方面,高效、便捷、快速的方法还很欠缺。

糖类的检测常用高效液相色谱法(HPLC),气相色谱法(GC),薄层色谱法(TLC),高效毛细管电泳法(HPCE)等,离子色谱法研究相对较少。近年来,离子色谱法测定糖类逐渐引起学者们的关注,鉴于糖类化合物分子具有电化学活性和在强碱溶液中呈离子化状态,常用浓度为0.01~0.2 mol/L NaOH与NaAc作梯度淋洗。通过改变流动相pH值到接近这些糖类化合物的pKa值的方法可增加分离的选择性。离子色谱法,操作简单,结果准确,是一种快速、便捷的检测方法。

本文运用温水浸提,乙醇沉淀,超声辅助乙酸水解法,方便、高效的提取了茶叶中的多糖,并以NaOH溶液作为流动相,研究了用离子交换色谱分离-脉冲安培检测半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖的方法。得到了良好的分离效果和较高的检测灵敏度。将该法用于不同种类茶叶多糖的检测,取得了满意的结果。

2. 实验部分

2.1 仪器和试剂

仪器:瑞士万通公司(Metrohm) 861 Advanced Compact IC, 817 Bioscan 脉冲安培检测器, 833 IC 蠕动泵, METROSEP CARB 1 (150×4.0 mm) 阴离子交换柱, 色谱工作站为 Metrohm IC-Net 2.3, 超声波清洗器(上海必能信超声波有限公司), 隔膜真空泵(天津市腾达过滤器件厂), 旋转蒸发器 RE-52A(郑州长城科工贸有限公司), 78-1 型磁力加热搅拌器(江苏金坛市望华科教仪器厂), 恒温箱, 布氏漏斗, 玻塞漏斗。

试剂:半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖标样购于Sigma公司, NaOH(优级纯)(天津市瑞金特化学品有限公司), 乙酸钠(分析纯)(重庆北碚化学试剂厂), 95%乙醇(分析纯), 无水乙醇(分析纯), 丙酮(分析纯)均为重庆川东化工(集团)有限公司化学试剂厂出品, 乙醚(分析纯)(安徽金邦医药化工有限公司), 冰乙酸(分析纯)(重庆博艺化学试剂有限公司), 绿茶(西南农业大学特级绿茶), 普洱茶(云南省西双版纳隆昌茶叶有限公司出品一级普洱茶), 乌龙茶(特级铁观音, 半发酵乌龙茶福建省安溪裕安茶厂), 红茶(安徽省芜湖市清福茶叶有限公司一级红茶), 超纯水。

2.2 色谱条件

分离柱: METROSEP CARB 1 (150×4.0 mm) 阴离子交换柱, 淋洗液: 6 mmol/L NaOH 溶液, 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 20 μ L, 柱温: 32℃, 再生液: 200 mmol/L NaOH。

2.3 标准溶液和样品溶液的配制

2.3.1 标准溶液的配制

称取半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖标样 0.10 g, 分别溶于 100 mL 容量瓶中, 配制成 1000 mg/L 标准储备液。用移液管分别移取半乳糖、葡萄糖、甘露糖标准储备液 0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 于 50 mL 容量瓶中, 移取果糖标准储备液 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 于上述 50 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 得到半乳糖、葡萄糖、甘露糖浓度为 2.0、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0 mg/L 和果糖浓度为 4.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 mg/L 的标准溶液。

2.3.2 样品溶液的配制

A. 粗多糖的提取

分别称取 20 g 绿茶、普洱茶、乌龙茶、红茶粉碎后, 水浴加热, 250 mL 温水浸提 120 min, 超声波辅助浸提。用布氏漏斗抽滤后, 滤液用旋转蒸发仪减压浓缩, 温度控制在 70℃, 浓缩至 10 mL 左右, 用三倍体积 95%乙醇沉淀, 放置冰箱冷藏, 静置过夜后抽滤, 沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚交替洗涤 2 次, 放置于恒温箱中低温干燥至恒重(70℃)。得到绿茶粗多糖 0.4430 g, 乌龙茶粗多糖 2.8001 g, 普洱茶粗多糖 5.1543 g, 红茶粗多糖 0.7421 g。

B. 粗多糖的水解

本实验分别利用了超声辅助乙酸水解和直接用水水解的方法。分别称取上述四种茶叶粗多糖 0.2 g 各两份, 用 50 mL 1 mol/L 乙酸和超纯水分别进行水解, 超声波作用时间为 120 min。实验发现, 用水水解不仅水解速度很慢且水解不完全, 后经色谱分析, 多糖含量也非常低, 因此该方法不适宜于该实验。而用乙酸水解, 水解效率高, 速度快, 水解较完全, 且无杂质引入, 无毒害, 不污染环境, 是较佳的水解方法, 故选用。

3. 结果与讨论

3.1 淋洗液的选择

离子色谱法分析检测多糖常用 NaOH-NaAc 体系作为流动相。本实验通过调节淋洗液 NaOH 浓度分别为 200.0、100.0、50.0、20.0、15.0、10.0、7.0、6.0、5.0、2.0、1.0 mmol/L, 分析含有半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖 4 种单糖的混合标准溶液发现, 由于半乳糖、葡萄糖和甘露糖属于差相异构体和位置异构体, 流动相的浓度应小于 20.0 mmol/L, 才可使这三种单糖达到分离。当 NaOH 浓度大于 20.0 mmol/L 时, 半乳糖、葡萄糖与甘露糖峰未能完全分离。在浓度大于 200 mmol/L 时, 甚至四种单糖不分离, 只出一个单峰。降低淋洗液 NaOH 浓度到

15.0 mmol/L 时, 甘露糖峰与半乳糖、葡萄糖峰分开, 但半乳糖峰和葡萄糖峰仍未完全分开, 继续降低 NaOH 浓度, 通过对比发现在 NaOH 浓度不断降低时, 保留时间也相应延长, 当 NaOH 浓度为 6.0 mmol/L 时, 4 种单糖峰分离效果最好, 且保留时间适中。当 NaOH 浓度继续降低时, 分离变的更好, 但引起基线向上漂移, 影响最终定量分析结果, 因而不选用。由于在低浓度的条件下, 脉冲安培检测器是的电化学响应无法实现 (通常为 $\text{pH} > 12$ 的碱性条件下), 所以检测的灵敏度降低, 重现性变差, 故每次进样前色谱柱需要再生处理, 用高浓度氢氧化钠 (200.0 mmol/L) 平衡柱子。在多糖的测定中常通过加入 NaAc 来增加淋洗液的极性, 从而增加分离的选择性, 但试验后对分离的改善效果并不明显, 反而增加了操作步骤, 影响了实验的简便程度, 因而不选用。综合各单糖的分离情况, 最终选用 6.0 mmol/L NaOH 溶液作为淋洗液。

3.2 温度控制

选择 6.0 mmol/L NaOH 溶液作为淋洗液, 在不同温度情况下考察 4 种单糖混标溶液的分离情况。当色谱柱温度超过 40°C 时, 半乳糖和葡萄糖的分离变差; 当色谱柱温度低于 25°C 时, 各色谱峰变宽, 灵敏度降低。当色谱柱温度在 25°C - 35°C 之间时, 峰形较好, 分离的效果也满足实验要求, 因此, 对比之后选用色谱柱温度为 32°C 。

3.3 流速选择

调节流速分别为 1.0、0.8、0.5 mL/min, 当流速降低时保留时间延长较多, 但对峰的分离情况影响不大, 因此, 为了提高实验的效率, 节省实验时间, 选用 1.0 mL/min 作为淋洗液流速。

3.4 标准曲线的绘制与最低检测限的测定

在优化的分离测定条件下, 分析标准溶液, 以峰高定量, 其分离情况见图 1。

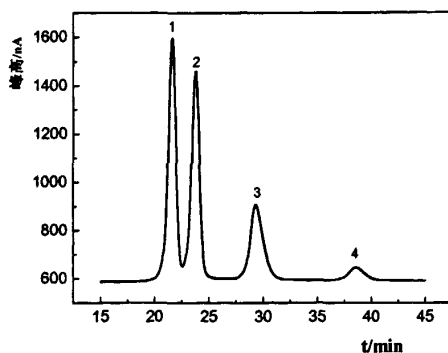


图 1: 4 种单糖标准样品的色谱图 (1. 半乳糖、2. 葡萄糖、3. 甘露糖、4. 果糖)

Fig 1: Chromatogram of the four monosaccharides standard sample. (1. galactose、2. glucose、3. mannose、4. fructose)

以单糖的色谱峰高 (Y) 对其质量浓度 (X, mg/L) 进行线性回归, 标准曲线见图 2~5,

得到线性回归方程。半乳糖为： $Y=46.07X+39.26$, $R=0.9991$ ；葡萄糖为： $Y=39.84X+31.67$, $R=0.9994$ ；甘露糖为： $Y=20.09X-73.50$, $R=0.9997$ ；果糖为： $Y=1.86X+3.47$, $R=0.9997$ 。线性范围为 2.0~50.0 mg/L。进一步稀释质量浓度为 2mg/L 的标准溶液测定其最低检测限，得到最低检测限为 0.125 mg/L~2.0 mg/L。

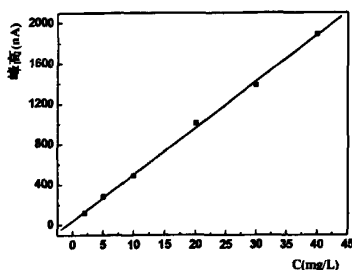


图 2：半乳糖的标准曲线
Fig 2: Standard curve of galactose

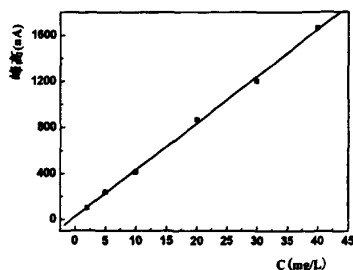


图 3：葡萄糖的标准曲线
Fig 3: Standard curve of glucose

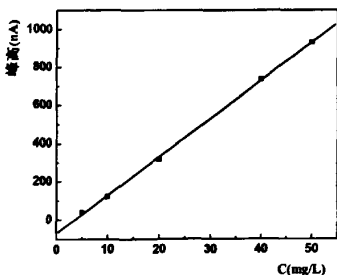


图 4：甘露糖的标准曲线
Fig 4: Standard curve of mannose

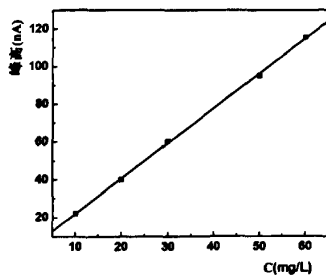


图 5：果糖的标准曲线
Fig 5: Standard curve of fructose

3.5 重现性试验

取 20 mg/L 的半乳糖、葡萄糖、甘露糖和 30 mg/L 的果糖混合液适量，按照上述优化后的色谱条件分别连续进样 7 次，得 4 种单糖峰高测定值的相对标准偏差 (RSD) 如下：半乳糖为：6.10%、葡萄糖为：5.82%、甘露糖为：14.19%、果糖为：9.88%。4 种单糖保留时间的 RSD 如下：半乳糖为：2.12%、葡萄糖为：2.03%、甘露糖为：2.25%、果糖为：2.26%。

3.6 加标回收率试验

准确称取绿茶粗多糖 20 mg、移取普洱茶、乌龙茶、红茶粗多糖水解液 5 mL 各三份，向其中分别依次加入浓度为 20 mg/L 半乳糖、葡萄糖、甘露糖和 30mg/L 果糖的混标溶液 2.5 mL；4 种单糖的标准储备液半乳糖、葡萄糖、甘露糖 0.1 mL，果糖 0.2 mL；40 mg/L 半乳糖、葡萄糖、甘露糖和 50mg/L 果糖的混标溶液 5 mL。并定容至 10 mL。按照优化后的色谱条件进行色谱分析，计算加标回收率，结果如表 1 示。

表 1：回收率的试验结果

Table 1: The results of the recovery percentage

茶叶名称	单糖名称	本底值(mg)	加入值(mg)	检测值(mg)	回收率(%)
绿茶样品	葡萄糖	0.01056	0.05	0.05826	95.4
		0.01056	0.10	0.1069	96.3
		0.01056	0.20	0.2021	95.8
	甘露糖	0.01324	0.05	0.0606	94.7
		0.01324	0.10	0.1084	95.2
		0.01324	0.20	0.2038	95.3
普洱茶样品	半乳糖	0.03890	0.05	0.0851	92.4
		0.03890	0.10	0.1323	93.4
		0.03890	0.20	0.2245	92.8
	葡萄糖	0.02110	0.05	0.0680	93.8
		0.02110	0.10	0.1167	95.6
		0.02110	0.20	0.2197	99.3
乌龙茶样品	半乳糖	0.0001080	0.05	0.04725	94.3
		0.0001080	0.10	0.09480	94.7
		0.0001080	0.20	0.1879	93.9
	葡萄糖	0.09040	0.05	0.1370	93.2
		0.09040	0.10	0.1831	92.7
		0.09040	0.20	0.2762	92.9
	甘露糖	0.1080	0.05	0.1556	95.2
		0.1080	0.10	0.2028	94.8
		0.1080	0.20	0.2970	94.5
红茶样品	半乳糖	0.03565	0.05	0.0833	95.3
		0.03565	0.10	0.1304	94.8
		0.03565	0.20	0.2268	95.6
	葡萄糖	0.0670	0.05	0.1132	92.4
		0.0670	0.10	0.1601	93.1
		0.0670	0.20	0.2506	91.8
	果糖	0.1461	0.075	0.2155	92.5
		0.1461	0.20	0.3303	92.1
		0.1461	0.25	0.3796	93.4

3.7 样品检测

将配制好的绿茶、普洱茶、乌龙茶、红茶粗多糖水解液按照上述优化后的色谱条件进样进行色谱分析,进样前用玻塞漏斗过滤,色谱如图 6~9 所示。4 种样品在前 8 min 内均有系统峰出现。测定结果表明,绿茶样品中含有此 3 种单糖,可定量检测出 100 mg 绿茶粗多糖中含有葡萄糖 0.0528 mg、甘露糖 0.0662 mg,有微量果糖存在,由于在该条件下果糖的测定灵敏度较低,且低于最低检测限,因此只能定性。普洱茶样品中只含有半乳糖和葡萄糖两种单糖,且 100 mg 普洱茶粗多糖中含有半乳糖 0.0548 mg、葡萄糖 0.0244 mg。乌龙茶样品和红茶样品均

含有此 4 种单糖，100 mg 乌龙茶粗多糖样品中含有半乳糖 0.00051 mg、葡萄糖 0.452 mg、甘露糖 0.54 mg，以及微量果糖。200 mg 红茶粗多糖中含有 0.3665 mg 半乳糖、0.67 mg 葡萄糖、1.461 mg 果糖和微量甘露糖。

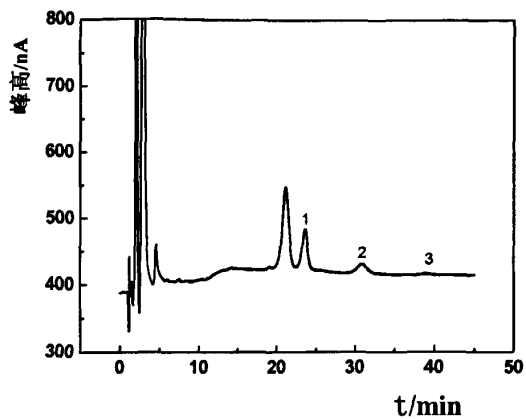


图 6：绿茶样品色谱图（1.葡萄糖、2.甘露糖、3.果糖）

Fig 6: Chromatogram of the green tea sample (1. glucose、2.mannose、3. fructose)

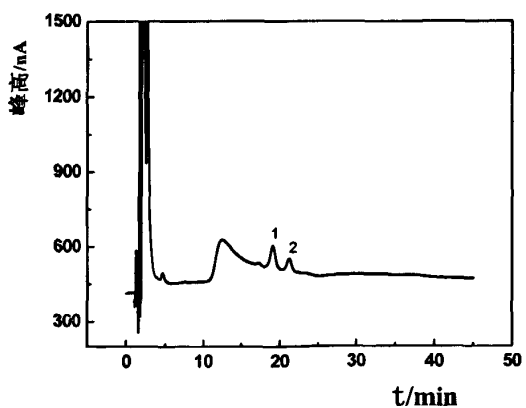


图 7：普洱茶样品色谱图（1.半乳糖、2.葡萄糖）

Fig 7: Chromatogram of the Pu'er tea sample (1. galactose 2. glucose)

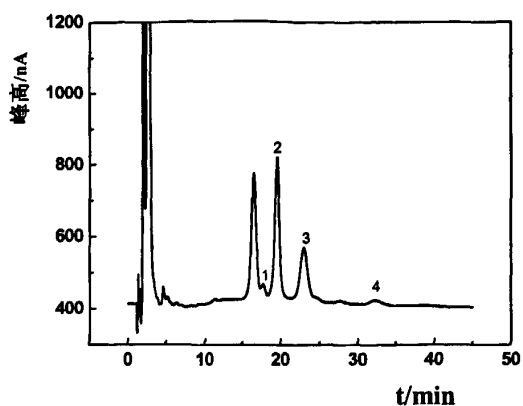


图 8: 乌龙茶样品色图 (1. 半乳糖、2. 葡萄糖、3. 甘露糖、4. 果糖)

Fig 8: Chromatogram of the oolong tea sample (1. galactose、2.glucose、3. mannose、4. fructose)

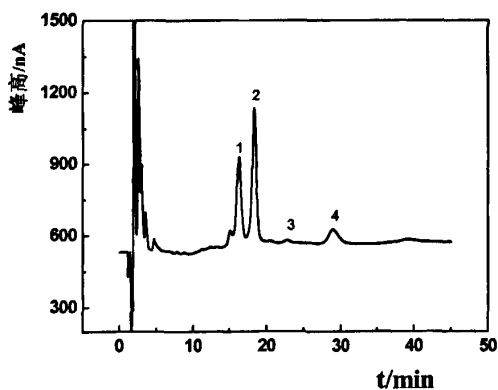


图 9: 红茶样品色谱图 (1. 半乳糖、2. 葡萄糖、3. 甘露糖、4. 果糖)

Fig 9: Chromatogram of the black tea sample (1. galactose、2.glucose、3. mannose、4. fructose)

4. 小结

本研究建立了高效离子交换分离-脉冲安培检测多糖中半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖的方法。方法灵敏度高, 准确性好, 操作简单。但在果糖的测定上还存在一定的欠缺, 且试验时稳定性差, 可以进一步研究改善。将该法用于实际样品的测定, 实用性强。

三. 香菇多糖和山药多糖的离子色谱检测方法研究

1. 引言

糖类是自然界中存在最多的有机化合物,也是重要的生物高分子化合物和信息物质。多糖分布广泛,在高等植物,细菌,真菌,藻类以及动物体内含量丰富。香菇是全球第二大人工种植最为普遍的食用菌。香菇多糖是真菌多糖中的一类,是目前最有开发前途的功能食品和药品资源之一,也是当今医药和食品工业共同关注的焦点。香菇多糖为白色纤维状疏松固体,易溶于热水,不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂。香菇多糖已经进入临床应用阶段,在中国和日本抗肿瘤的多糖制剂已经商品化。香菇多糖不仅是一种比较理想的药物,也是一类重要的保健食品功能因子,具有广阔的应用前景。现有的研究表明:香菇多糖具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节、抗突变、抗感染、降血脂、降胆固醇、抗衰老等多种生理功能。

山药又名薯蓣、怀山药、延章、玉延等,为薯蓣科薯蓣属植物,是一种营养丰富的传统药食同源植物。《本草纲目》记载:山药味甘性平、益肾气、健脾胃、止泻痢、化痰涎、润皮毛。现代药理研究表明,山药水煎剂有抗衰老、降血糖、增强免疫调节、抗突变及抗肿瘤等功能,其中山药多糖为其主要的活性成分。因此,研究高效,经济的香菇和山药活性多糖的提取分离方法具有现实意义,并为香菇多糖和山药多糖的医疗保健功能的开发研究提供实验依据。

香菇多糖和山药多糖的检测目前有高效液相色谱法(HPLC),气相色谱法(GC),薄层色谱法(TLC),高效毛细管电泳法(HPCE)等,离子色谱法研究相对较少。本文在对茶叶多糖的离子色谱检测研究方法的基础上,将研究范围拓展到真菌和中药领域。运用热水浸提,乙醇沉淀,超声辅助乙酸水解法,方便、高效的提取了香菇和山药中的多糖,并以NaOH溶液作为流动相,研究了用离子交换色谱分离-脉冲安培检测香菇多糖和山药多糖中的半乳糖、葡萄糖和甘露糖的方法,得到了良好的分离效果和较高的检测灵敏度,实现了离子色谱法检测应用范围的扩展。

2. 实验部分

2.1 仪器与试剂

仪器:瑞士万通公司(Metrohm) 861 Advanced Compact IC, 817 Bioscan脉冲安培检测器, 833 IC 蠕动泵, METROSEP CARB 1 (150 mm×4.0 mm) 阴离子交换柱, 色谱工作站为Metrohm IC-Net 2.3, 超声波清洗器(上海必能信超声波有限公司), 隔膜真空泵(天津市腾达过滤器件厂), 旋转蒸发器RE-52A(郑州长城科工贸有限公司), 78-1型磁力加热搅拌器(江苏金坛市望华科教仪器厂), 恒温箱, 布氏漏斗, 玻塞漏斗。

试剂:半乳糖、葡萄糖、和甘露糖标样购于Sigma公司, NaOH(优级纯)(天津市瑞金特化学品有限公司), 95%乙醇(分析纯), 无水乙醇(分析纯), 丙酮(分析纯)均为重庆川东化工(集团)有限公司化学试剂厂出品, 乙醚(分析纯)(安徽金邦医药化工有限公司), 冰

乙酸（分析纯）（重庆博艺化学试剂有限公司），干香菇（购于重庆百货公司），山药（购于心连心大药房）

2.2 色谱条件

分离柱：METROSEP CARB 1（150×4.0 mm）阴离子交换柱，淋洗液：7 mmol/L NaOH 溶液，流速：1.0 mL/min，进样量：20 μ L，柱温：32℃，再生液：200 mmol/L NaOH 溶液。

2.3 标准溶液的配制

用移液管分别移取浓度为 1000 mg/L 的半乳糖、葡萄糖、甘露糖的标准储备液 0.25、0.50、1.0、1.5、2.0、2.5 ml 于 50 ml 容量瓶中，用超纯水定容至刻度线，摇匀，可制得半乳糖、葡萄糖和甘露糖浓度分别为 5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 mg/L 的混合标准溶液。

2.4 样品处理

2.4.1 粗多糖的提取

多糖的提取常可以采用热水、稀酸、稀碱作为浸提剂。在提取过程中，不仅要考虑到粗多糖的得率，还要保证不破坏多糖的结构。由于酸对多糖的糖苷键有破坏作用，故一般采用热水或稀碱作为浸提剂。热水浸提的温度一般为 90℃~100℃，浸提时间 1 h~3 h。碱浸提通常采用 NaOH 作为浸提液，浓度为 0.1 mol/L~1 mol/L。考虑到本试验的检测条件是在低浓度的 NaOH 作淋洗液的流动相中进行的，为了防止有残留的 NaOH 混入提取样品中，影响淋洗液浓度，故本实验用热水作浸提液。

由于香菇的脂肪含量约为干重的 2%~4%，因此一般不考虑脂肪对香菇多糖提取的影响。一般用于多糖提取的香菇子实体通常是干品。称取 20 g 干香菇，剪碎，置于 250 ml 洁净烧杯中。取 250 ml 超纯水于烧杯中，加热浸提 120 min。保持浸提温度在 90℃~100℃。待浸提液冷却后，用布氏漏斗减压抽滤，收集滤液，约有 180 ml。加热浓缩至 20 ml，浓缩温度不超过 100℃以防止多糖分解。向浓缩液中加入 60 ml 无水乙醇沉淀多糖，沉淀放置 8 h。抽滤沉淀，分别用丙酮、乙醚、无水乙醇依次洗涤沉淀 3 次。将制得的沉淀即粗多糖放入烘箱中烘干（70℃），得到干燥的香菇粗多糖。由于香菇多糖具吸湿性^[33]，因此将制得的干燥粗多糖密封保存。

山药粗多糖的提取方法同上，提取流程为：山药→碾碎→沸水浸提→减压浓缩→抽滤→乙醇沉淀→抽滤→沉淀物乙醇、乙醚、丙酮循环洗 2 次→山药粗多糖→烘干→0.8432 g 粗多糖

2.4.2 粗多糖的水解

本实验利用超声辅助乙酸水解法制备样品溶液。分别香菇粗多糖和山药粗多糖称取 0.2 g，用 50 mL 1 mol/L 的乙酸溶液超声水解 2 h。用玻塞漏斗抽滤，收集滤液，待测。

3. 结果与讨论

3.1 淋洗液的选择

糖类化合物是弱酸, 其 $pK_a > 11$ 。以 NaOH 为淋洗液可使糖离子化, 此时糖类物质以阴离子形式存在。采用 METROSER CARB 1(150×4.0 mm)阴离子交换柱为分离柱, 用低浓度的 NaOH 淋洗液可实现单糖的快速分离。实验发现, 当 NaOH 淋洗液浓度大于 20.0 mmol/L 时, 半乳糖、葡萄糖与甘露糖峰不能完全分离。降低淋洗液 NaOH 浓度到 15.0 mmol/L 时, 甘露糖峰与半乳糖、葡萄糖峰分开, 但半乳糖峰和葡萄糖峰仍未完全分开, 继续降低 NaOH 浓度, 通过对比发现在 NaOH 浓度不断降低时, 保留时间也相应延长。试验中调节淋洗液 NaOH 浓度分别为 1.0、2.0、5.0、6.0、7.0、10.0、15.0、20.0、50.0、100.0 mmol/L, 当 NaOH 浓度为 7.0 mmol/L 时, 3 种单糖峰分离效果最好, 且保留时间适中。但是, 在低浓度的条件下, 由于脉冲安培检测器是在碱性条件下 ($pH > 12$) 的电化学响应下实现的, 所以检测的灵敏度降低, 重现性变差, 且每次进样前色谱柱需要再生处理, 用高浓度氢氧化钠 (200.0 mmol/L) 平衡柱子。综合各单糖的分离情况选用 7.0 mmol/L NaOH 作为淋洗液。单个样品的检测总分析时间为 35 min。

3.2 温度控制

不同温度情况下 3 种单糖混标溶液的分离情况差异很大。经实验验证: 选择 7.0 mmol/L NaOH 溶液作为淋洗液, 当色谱柱温度超过 40℃ 时, 半乳糖和葡萄糖的分离变差; 当色谱柱温度低于 25℃ 时, 各色谱峰变宽。当色谱柱温度在 25℃-35℃ 之间时, 峰形较好, 分离的效果也满足实验要求。因此, 最后确定选用色谱柱温度为 32℃。

3.3 流速选择

实验通过调节流速分别为 1.5、0.75、0.5 mL/min 发现, 当降低流速时保留时间延长较多, 但对峰的分离情况影响不大。当加快流速时, 保留时间相对减小, 但样品峰分离情况受到一定干扰。因此, 为了提高实验的效率, 选用 1.0 mL/min 作为淋洗液流速。

3.1 标准曲线的绘制

在优化的分离测定条件下, 分析标准溶液, 得到标准溶液色谱图 (图1)。

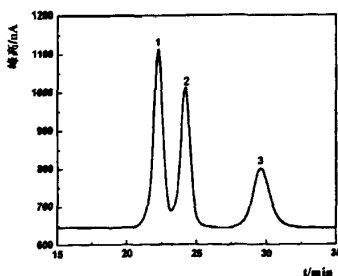


图1. 3种单糖标准样品色谱图 (1. 半乳糖、2. 葡萄糖、3. 甘露糖)

Fig 1. Chromatogram of the three monosaccharides standard sample(1.galactose、2.glucose、3.mannose)

以单糖的色谱峰高(Y, nA)对其质量浓度(X, mg/L)进行线性回归, 分别得到半乳糖、葡萄糖、甘露糖的标准曲线如下(图2~4), 它们的线性回归方程分别为: 半乳糖: $Y=49.25X-43.35$, $R=0.9999$; 葡萄糖: $Y=41.96X-82.69$, $R=0.9991$; 甘露糖: $Y=21.34X-57.59$, $R=0.9995$ 。线性范围为5.0 mg/L~50.0 mg/L。

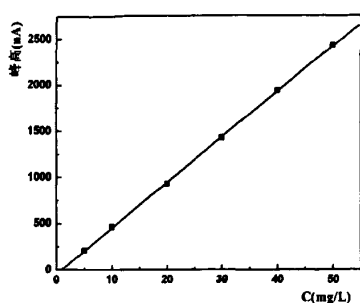


图 2: 半乳糖的标准曲线

Fig 2: Standard curve of galactose

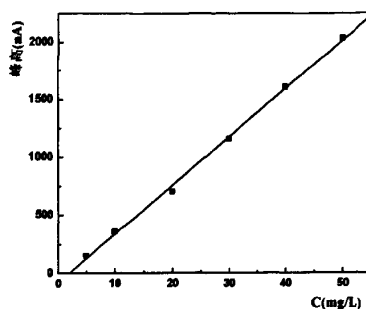


图 3: 葡萄糖的标准曲线

Fig 3: Standard curve of glucose

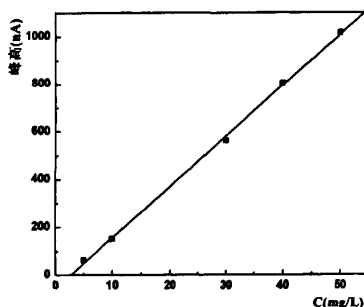


图 4: 甘露糖的标准曲线

Fig 4: Standard curve of mannose

3.2 最低检测限的测定

不断稀释浓度为5.0mg/L的标准样品混合溶液, 分别对上述稀释后的样品溶液进行色谱分析, 测定各单糖的最低检测限, 得到半乳糖的最低检测限为0.125 mg/L, 葡萄糖的最低检测限为0.5 mg/L, 甘露糖的最低检测为1.0 mg/L。

3.3 重现性试验

取 30 mg/L 的半乳糖、葡萄糖、甘露糖标准混合液, 按照上述优化后的色谱条件分别连续进样 6 次, 得 3 种单糖峰高测定值的相对标准偏差 (RSD) 如下: 半乳糖为: 1.79%、葡萄糖为: 1.90%、甘露糖为: 3.52%。3 种单糖保留时间的 RSD 如下: 半乳糖为: 3.21%、葡萄糖为: 3.07%、甘露糖为: 3.29%。

3.4 加标回收率的测定

分别称取 20 mg 香菇多糖和山药多糖各三份,用 5 mL1 mol/L 乙酸溶液超声水解 120 min,玻塞漏斗过滤,分别依次向上述溶液中移取 50 mg/L 标准混合溶液 1 mL、2 mL、4 mL 并定容至 10 mL。用优化后的色谱条件进样检测,分析结果见表 1。如分析结果所示,加标回收率在 96.3%~99.5%之间,均高于 96%,保证了试验的高准确度,可应用于日常分析检测。

表 1: 回收率的试验结果

Table 1: The results of the recovery ercentage

名称	单糖名称	本底值(mg)	加入值(mg)	检测值(mg)	回收率(%)
香菇样品	半乳糖	0.02210	0.05	0.07100	97.8
		0.02210	0.10	0.1202	98.1
		0.02210	0.20	0.2187	98.3
	葡萄糖	0.01570	0.05	0.06480	98.2
		0.01570	0.10	0.1148	99.1
		0.01570	0.20	0.2131	98.7
	甘露糖	0.01488	0.05	0.06303	96.3
		0.01488	0.10	0.1116	96.7
		0.01488	0.20	0.2091	97.1
山药多糖	半乳糖	0.01612	0.05	0.06537	98.5
		0.01612	0.10	0.1143	98.2
		0.01612	0.20	0.2119	97.9
	葡萄糖	0.01180	0.05	0.06155	99.5
		0.01180	0.10	0.1104	98.6
		0.01180	0.20	0.2094	98.8

3.4 样品检测

在优化条件下,对香菇样品溶液和山药样品溶液分别进行色谱分析,得到色谱图如图5和图6。将检测结果与样品加标溶液得出的色谱图进行对比分析可得:图中峰1为半乳糖峰,峰2为葡萄糖峰,峰3为甘露糖峰。由于山药多糖中甘露糖含量很低,已低于其最低检测限,因此甘露糖无法定量,只能定性检测。

将样品溶液测得的峰高值代入线性回归方程,可计算出200 mg香菇多糖中含有半乳糖0.2206 mg、葡萄糖0.1573 mg和0.1488 mg甘露糖。200 mg山药多糖中含有半乳糖0.1612 mg、葡萄糖0.1180 mg和少量甘露糖。

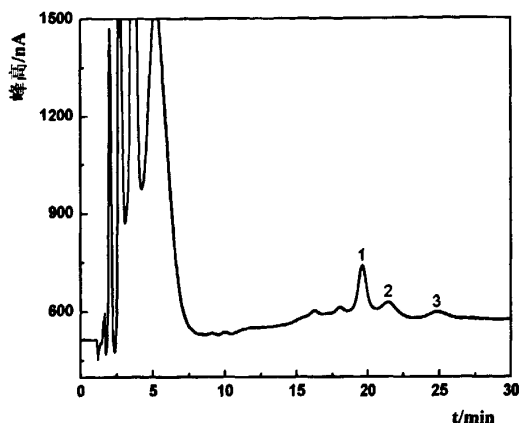


图 5: 香菇样品色谱图

Fig 5: Chromatogram of the lentinan sample

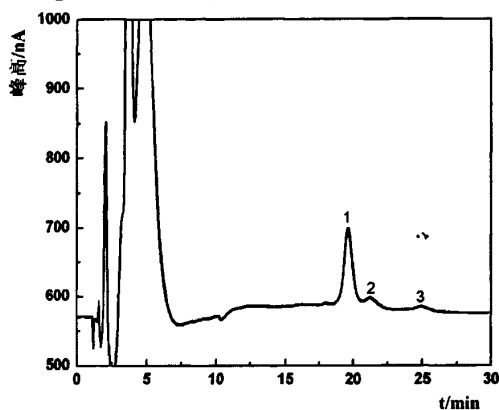


图 6: 山药样品色谱图

Fig 6: Chromatogram of the dioscorea opposita sample

4. 小结

本文研究了离子交换色谱分离-脉冲安培检测香菇多糖和山药多糖中的半乳糖、葡萄糖、甘露糖的方法。方法检测灵敏度高, 准确性好, 操作简单。香菇中得多糖种类比较多, 本文只研究了检测了香菇多糖中的半乳糖、葡萄糖、甘露糖, 研究不够全面, 有待以后改进提高研究方法。山药多糖中甘露糖含量较低, 无法定量, 也可进一步通过提高样品溶液浓度来实现定量检测。

四. 离子色谱技术检测多糖水解液中果糖的研究

1. 引言

果糖($C_6H_{12}O_6$)是一种简单的单糖,在许多食品中存在。果糖和葡萄糖、半乳糖一起构成了血糖的三种主要成份。蜂蜜,树上的水果,浆果,瓜类,以及一些根类蔬菜如:甜菜,甜土豆,欧洲萝卜,洋葱等常含有果糖。果糖是甜度最高的天然糖。现已被人们誉为21世纪健康新糖源,是糖尿病人、高血压、高脂肪、心血管病人的安全糖源,其甜度是蔗糖的1.4~1.8倍,具有低热量、抗疲劳、保护肝脏、易消化吸收等特点,在医药工业、食品工业、精细化工领域的应用前景十分广阔。

现存的研究果糖的方法有高效液相色谱法(HPLC),离子色谱法(IC),气相色谱法(GC),薄层色谱法(TLC),高效毛细管电泳法(HPCE)等,但在离子色谱测定多糖中的果糖方面的研究还存在着灵敏度低,检测时间长的缺点。为了进一步优化离子色谱法高速、快效的分离检测多糖中的果糖的分析技术,本文根据在原研究多糖检测的基础上,优化实验条件,实现了多糖中果糖的离子色谱快速分离定量检测方法,用NaOH溶液作为流动相,用离子交换色谱分离-脉冲安培检测果糖,并同时考察了峰高与峰面积定量两种不同定量分析方法的差异与准确度。实验得到了良好的分离效果和较高的检测灵敏度。将该法用于不同种类茶叶多糖水解液的检测,取得了满意的结果。

2. 实验部分

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器

瑞士万通公司(Metrohm) 861 Advanced Compact IC, 817 Bioscan 脉冲安培检测器, 833 IC 蠕动泵, METROSEP CARB 1 (150×4.0 mm) 阴离子交换柱, 色谱工作站为 Metrohm IC-Net 2.3, 超声波清洗器(上海必能信超声波有限公司), 隔膜真空泵(天津市腾达过滤器件厂), 玻塞漏斗。

2.1.2 试剂

果糖标样购于Sigma公司, NaOH(优级纯)(天津市瑞金特化学品有限公司), 冰乙酸(分析纯)(重庆博艺化学试剂有限公司), 绿茶(西南农业大学特级绿茶), 乌龙茶(特级铁观音, 半发酵乌龙茶福建省安溪裕安茶厂), 红茶(安徽省芜湖市清福茶叶有限公司一级红茶), 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液与样品溶液的配制

A. 标准溶液的配制

用移液管依次准确移取1000 mg/L果糖标准储备液0.1 mL、0.25 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2 mL于50 mL容量瓶中，配制成浓度分别为2.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、30.0 mg/L、40.0 mg/L的标准样品溶液，待测。

B. 样品溶液的配制

准确称取红茶粗多糖100 mg，绿茶粗多糖130 mg和乌龙茶粗多糖20 mg，用50 mL 1.0 mol/L乙酸溶液超声水解120 min后，玻塞漏斗过滤，保留滤液待用。

2.2.2 重现性试验方法

选用10.0 mg/L果糖标准溶液重复进样检测7次，计算试验的相对标准偏差。

2.2.3 回收率试验方法

用移液管准确移取2.5 mL 1000 mg/L果糖标准储备液，定容于50 mL容量瓶中，得到浓度为50.0 mg/L的果糖标准溶液。

分别取上述已配好的多糖水解液5 mL各三份，依次向其中加入50.0 mg/L果糖标准溶液1 mL、2 mL、4 mL，并定容至10 mL，待测。

2.3 条件选择

2.3.1 淋洗液的选择

根据对多种单糖的同时分析可知，淋洗液NaOH在低浓度的条件下(<50 mol/L)可达到多种单糖的同时分离与定量分析，但果糖的检测灵敏度偏低，检测限也偏高，检测时间也较长。由于实际样品中多数都含有果糖以及其它多种单糖，因此为了优化多种单糖中果糖的快速定量检测，在既要保证果糖与其它单糖分离检测的同时，又要保证高效，便捷的试验效果，故提高淋洗液浓度，增强系统对果糖的检测灵敏度，降低果糖的最低检测限。

实验发现，当淋洗液NaOH浓度高于200 mol/L时，果糖峰与其它单糖峰无法完全分离；当淋洗液浓度低于50 mol/L时，果糖峰与其它单糖峰可实现完全分离，但果糖峰的灵敏度低且检测时间长；当选用淋洗液浓度在70 mol/L~150 mol/L时，果糖峰可与其它单糖峰实现完全分离，且保留时间明显缩短。其中当淋洗液浓度为100 mol/L时，保留时间与灵敏度最佳，色谱分离情况见图1。（图1为果糖和其它多种单糖混合标准溶液分离在淋洗液为100 mol/L NaOH时的分离色谱图）因此，选用淋洗液浓度为100 mol/L NaOH溶液作为淋洗液。

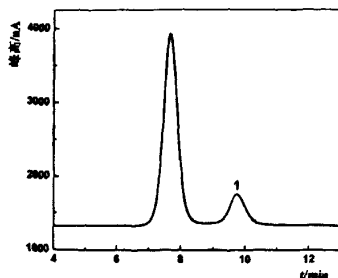


图1 果糖与其它多种单糖混合标准样品溶液分离色谱图

Fig 1 chromatogram of the fructose and other monosaccharides standard sample

2.3.2 流速的选择

实验发现，流速的快慢对样品的分离情况改善不大，但对保留时间的影响比较明显，因此考虑到方法的实用性，分别试验了流速在0.5 mL/min、1.0 mL/min、1.5 mL/min条件下的分离情况，当流速为1.0 mL/min时，保留时间适中，分离情况良好。故选用1.0 mL/min作为实验流速。

2.3.3 温度的选择

选择 100 mmol/L NaOH 溶液作为淋洗液，在不同温度情况下考察果糖和其它单糖标准样品混合溶液的分离以及峰形情况。当色谱柱温度超过 40℃时，对分离的影响不大，但实验时达到该条件下需要的时间很长，当实验在气温较低的情况下进行时，温度很不稳定，比较难控制；当色谱柱温度低于 25℃时，色谱峰变宽，灵敏度降低。当色谱柱温度在 25℃~35℃之间时，峰形较好，分离的效果也满足实验要求，因此对比之后选用色谱柱温度在 32℃条件下进行。

2.3.4 检测电压的选择

根据脉冲安培检测器工作原理可知，为解决工作电极表面钝化的问题，脉冲安培检测器使用了快速、连续多重的三种不同工作电位即 E_1 、 E_2 和 E_3 ，见图2。其中， E_1 为工作电位， E_2 为清洗正电位， E_3 为清洗负电位。

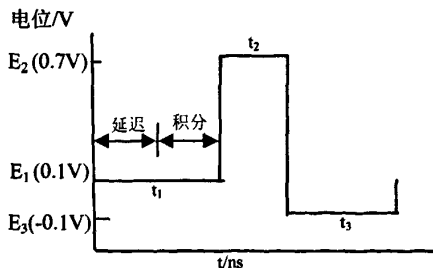


图2 工作电位示意图

Fig 2 Sketch map of the operating potential

实验发现,当增大电位时,可明显提高检测灵敏度,但与此同时,背景基线噪音也同时增大,对分离的影响很小,对灵敏度的影响较大。考虑到试验方法的实用性,以及最大程度的保护电极,延长电极的使用寿命,通过改变三种电位的大小,最终选择的最佳电极电位为:
 $E_1=+0.10\text{ V}$, $E_2=+1.75\text{ V}$, $E_3=-0.25\text{ V}$ 。

3. 结果分析

3.1 标准曲线与最低检测限

在优化的分离测定条件下,分析标准溶液,由于达到基线分离分别以峰高和峰面积定量,其分离情况见图3。

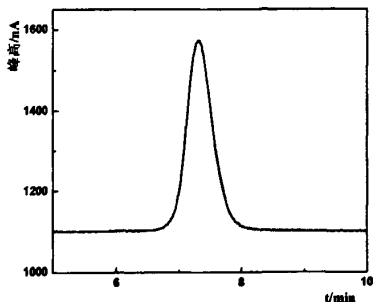


图3 果糖的标准样品色谱图

Fig 3 Chromatogram of the fructose standard sample

分别以单糖的色谱峰高 (Y_h) 对其质量浓度 (X_h , mg/L) 和色谱峰面积 (Y_A) 对其质量浓度 (X_A , mg/L) 进行线性回归, 标准曲线见图 4 和图 5, 得到线性回归方程。
 $Y_h=68.28X_h-117.46845$, $R_h=0.9991$; $Y_A=2124.52X_A-3517.07$, $R_A=0.9991$ 。线性范围为 2.0~40.0 mg/L。进一步稀释质量浓度为 2 mg/L 的标准溶液测定其最低检测限, 得到该条件下, 果糖的最低检测限为 0.4 mg/L。

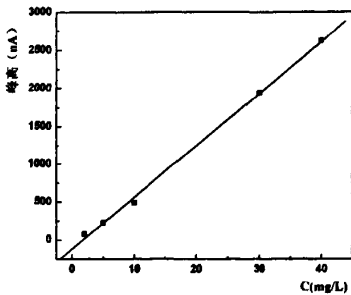


图4 果糖峰高标准曲线

Fig 4 Standard curve of fructose by height

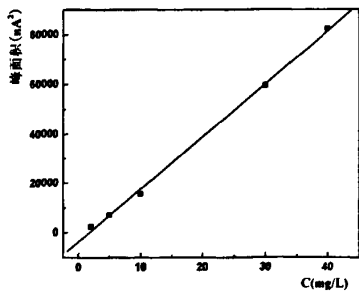


图5 果糖峰面积标准曲线

Fig5 Standard curve of fructose by area

3.2 重现性试验

按照上述优化后的色谱条件分别连续进样 7 次, 得果糖峰高测定值的相对标准偏差(RSD)为 1.64%, 果糖峰面积测定值的相对标准偏差为 3.43%, 果糖保留时间的相对标准偏差为

0.36%。对比峰高和峰面积测定的相对标准偏差可以看出，根据峰高定量检测的相对标准偏差远小于根据峰面积进行定量的相对标准偏差。因此，根据峰高进行定量分析的方法优于依据峰面积进行定量分析，可保证更高的重现性。

3.3 加标回收率试验

按照优化后的色谱条件进行色谱分析，计算加标回收率，结果如表 1 示。如分析结果所示，根据峰高进行定量的加标回收率在 94.6%~96.1%之间，根据峰面积进行定量的加标回收率在 93.2%~95.6%之间，对比两结果可以看出，根据峰高进行定量的加标回收率高，即准确度高，因此根据峰高定量分析结果更准确，更适合于日常生产分析检验。

表 1：回收率的试验结果

Table 1: The results of the recovery percentage					
茶叶名称	定量方法	本底值(mg)	加入值(mg)	检测值(mg)	回收率(%)
红茶样品	峰高	0.01323	0.05	0.06053	94.6
		0.01323	0.10	0.1084	95.2
		0.01323	0.20	0.2028	94.8
	峰面积	0.01360	0.05	0.0602	93.2
		0.01360	0.10	0.1085	94.9
		0.01360	0.20	0.2026	94.5
绿茶样品	峰高	0.01362	0.05	0.06130	95.4
		0.01362	0.10	0.1097	96.1
		0.01362	0.20	0.2052	95.8
	峰面积	0.01383	0.05	0.06140	95.1
		0.01383	0.10	0.1092	95.4
		0.01383	0.20	0.2024	94.3
乌龙茶样品	峰高	0.01372	0.05	0.06117	94.9
		0.01372	0.10	0.1090	95.3
		0.01372	0.20	0.2033	94.8
	峰面积	0.01975	0.05	0.06670	93.9
		0.01975	0.10	0.1139	94.2
		0.01975	0.20	0.2109	95.6

3.4 样品检测

将配制好的红茶、绿茶、乌龙茶粗多糖水解液按照上述优化后的色谱条件进样进行色谱分析，色谱如图6~8所示，图中1示为果糖峰。3种样品在前3 min内均有系统峰出现。测定结果表明，按照峰高定量分析，红茶样品中果糖含量为100 mg粗多糖中含有0.1323 mg果糖，绿茶样品中100 mg粗多糖含有0.1048 mg果糖，乌龙茶样品中100 mg粗多糖含有0.6860 mg果糖。

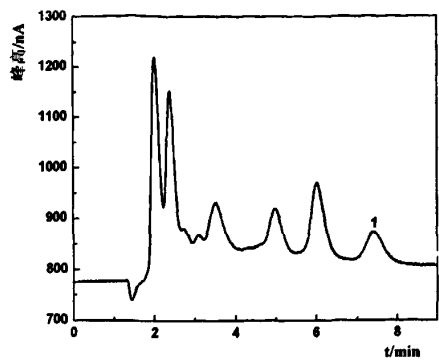


图6 红茶样品色谱图

Fig 6 Chromatogram of the black tea sample

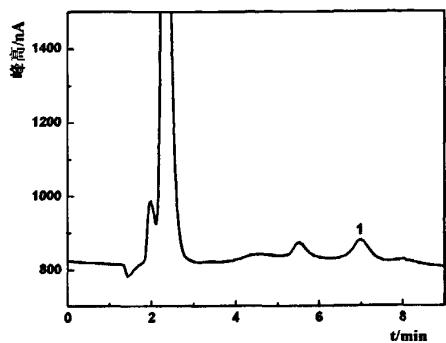


图7 绿茶样品色谱图

Fig 7 Chromatogram of the green tea sample

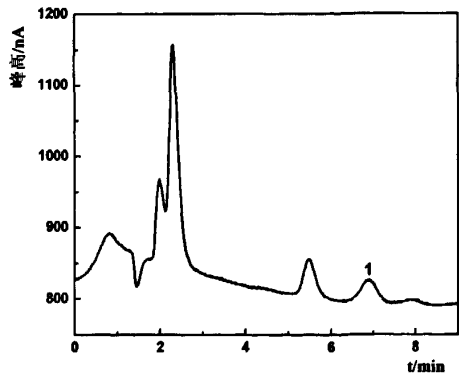


图8 乌龙茶样品色谱图

Fig 8 Chromatogram of the oolong tea sample

4. 小结

本文在原先研究多糖中各种单糖的离子色谱法分离检测的基础上, 优化了实现条件, 实现了对复杂样品中果糖的有效分离和准确定量分析, 方法快速、有效、准确, 可方便的应用于日常的生产检测。并且通过实验研究发现, 用峰高定量准确度更高, 重现性更好, 实验结果更可靠, 可普遍采用峰高进行定量分析研究。

结论

离子色谱法已经被证明是一种比较成熟的分析技术。经过多年的应用，目前已逐渐为国内外分析领域所接受。作为阴、阳离子检测的首选方法。离子色谱法已被一些国际上有影响的机构确定为标准分析方法或推荐的方法。

我国离子色谱分析方法标准化的工作也取得了一定的进展。离子色谱仪使用较多的领域已经制定了相应的国家标准，如环境监测，工业循环水分析，半导体高纯水分析等。

然而，离子色谱法在多糖类物质的检测方面的研究还相对较少。由于多糖中单糖种类繁多，多数检测方法均是在梯度淋洗的条件下进行的，因而建立一种固定浓度下分离检测多糖的离子色谱分析方法既可以节省实验时间，又可以降低检测成本，值得广大分析学者深入研究探讨，从而进一步完善离子色谱法分析检测糖类的技术，建立高速、快效、准确、操作简便的分析技术。

参考文献

- [1] 牟世芬,刘克纳,丁晓静著. 离子色谱方法及[M]. 第二版. 北京: 化学工业出版社,2005
- [2] 陈昌福.植物多糖[J]. 病害防治. 2007(5): 50~51
- [3] 王慧铭,孙炜,项伟岚,潘宏明. 鳖甲多糖对小鼠免疫调节作用的研究[J]. 中国中药杂志. 2007,32(12): 1245~1247
- [4] 徐文清,高文远,王月英,李美佳. 银耳多糖硫酸酯的合成及抗肿瘤作用的研究[J]. 中国药学杂志. 2007,42(8): 630~632
- [5] TAN Feng, DENG Jun. Analysis of the Constituents and Antisenile Function of *Achyranthes bidentata* Polysaccharides[J]. *Acta Botanica Sinica*. 2002,44 (7) : 795~798
- [6] 谢少凡,柳欣,蒋明,刘长林,刘剑峰. 硫酸乙酰肝素多糖类似物的抗乳腺癌活性研究进展[J]. 中国新药杂志. 2007,16(1): 11~16
- [7] 张海容. 沙棘果皮多糖清楚氧自由基的活性研究[J]. 植物学通报. 2005,22(6): 703~707
- [8] 袁强,袁弘. 文蛤多糖对小鼠调节血糖和抗应激功能的影响[J]. 中国现代应用药理学杂志. 2007,24(2): 113~114
- [9] 张元琳,顾小红,李德远,汤坚. 当归多糖对亚急性辐射损伤小鼠的防护作用研究[J]. 食品科学. 2007,28(2): 305~308
- [10] 吴琼,郑成,宁正祥,刘本国,董华强. 碱性银耳粗多糖的提取及其清除自由基作用的研究[J]. 食品科学. 2007,28(6): 153~155
- [11] 黄森,查学强,罗建平,于龙. Box-Behnken 法优化提取霍山石斛活性多糖的研究[J]. 中药材. 2007,30(5): 591~594
- [12] 刘贝贝,李小定,谭正林,吴谋成. 菜籽饼粕中多糖的酸提取工艺优化[J]. 农业工程学报. 2006,22(11):213~216
- [13] 谢红旗,周春山,杜邵龙,周尽花. 酶法提取、超滤分离香菇多糖新工艺研究[J]. 食品科学. 2007, 28(4): 217~219
- [14] 李俊,黄锡山,张艳军,苏小建,何星存. 超声波法提取罗汉果多糖的工艺研究[J]. 中药材. 2007,30(4): 475~477
- [15] 邓永智,李文权,袁东星. 海水小球藻中多糖的提取及其单糖组成的气相色谱-质谱分析[J]. 分析化学. 2006,34(12): 1697~1701
- [16] 赵玉英. 蒙成药哈日阿布日-16 中多糖的组分和糖含量研究[J]. 光谱学与光谱分析. 2005,25(2): 314~316
- [17] 王黎明,夏文水. 蒽酮-硫酸法测定茶多糖含量的研究[J]. 食品科学. 2005,26(7): 185~188
- [18] 汪东风,谢晓风,蔡成永,杨敏,张阳春等. 粗老茶治糖尿病的药理成分分析[J]. 中草药. 1995,26(5): 255~257

- [19] 傅博强,谢明勇,袁少平. 茶叶中多糖含量的测定[J]. 食品科学. 2001, (11): 69~73
- [20] 赵阳楠,常继东. 苯酚硫酸法和间接碘量法测定灵芝多糖含量比较[J]. 食用菌. 2007,(3): 58~61
- [21] 王红英,钱斯日古楞,赵前程,藏妹. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定麦冬多糖含量[J]. 沈阳农业大学学报. 2005,36(5): 628~630
- [22] 杨兴斌,赵燕,周四元,刘莉,王海芳,梅其炳. 柱前衍生化高效液相色谱法分析当归多糖的单糖组成[J]. 分析化学. 2005,33(9): 1287~1290
- [23] 颜军,郭晓强,李晓光,郭晓勇,苟小军. TLC 快速分析多糖的单糖组成[J]. 食品科学. 2006, 27(12): 603~607
- [24] 耿越,王建波,刘靓雯,张明伟,刘书明. 高效毛细管电泳法测定玉米花粉多糖中单糖的组成[J]. 中草药. 2005,36(8): 1164~1166
- [25] 周蓉,齐莉,王雅芬,朱一川,于翠娟. 甘草多糖的分离纯化及高效毛细管电泳分析[J]. 分析化学. 1999,27(2): 245
- [26] 季宇彬,王帅帅,汲晨锋. 龙葵多糖含量测定及组分分析[J]. 分析化学. 2006,34(11): 1665
- [27] Rendleman J A. Ionization of Carbohydrates in the presence of Metal Hydroxides and Oxides, Carbohydrates in solution[J]. Advances in Chemistry Series. Washington D C: American Chemical Society. 1973,117: 51
- [28] 金利通,刘彤,周满水,方禹之. 高压液相色谱磷钼杂多酸修饰电极安培检测儿茶酚胺类神经递质的研究[J]. 高等学校化学学报. 1993,14(7): 914~917
- [29] 牟世芬,李宗利. 阴离子交换分离-脉冲安培检测分析糖类化合物的进展[J]. 色谱. 1995,13(5): 320~324
- [30] Louisette J, Basa, Michael W. Analysis of glycoprotein-deriver oligosaccharides by high-pH anion-exchange chromatography[J]. Journal of Chromatography A. 1990,499: 205~220
- [31] CarboPac PA10 and CarboPac MA1 product. Manual.Sunnyvale. CA[M]. Dionex Coporation. 2004,4,15
- [32] Peter Hermentin, Reinhild Witzel, Johannes F.G. vliegenthart, Johann P.Kamerling,Manfred Nimtz and Harald S.Conrad. A strategy for the mapping of N-glycans by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Analytical Biochemistry. 1992,203: 281~289
- [33] Koyko Koizumi, Yoko Kubota, Hisako Ozaki, Shigenobu Keiko,Masako Fukuda and Toshiko Tanimoto. Analyses of isomeric mono-O-methyl-D-glucoses, D-glucobioses and D-glucose monophosphates by highperformance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Journal of Chromatography A. 1992, 595: 340~345
- [34] Yaqi Cai,Jingshen Liu,Yali Shi, Lina Liang and Shifen Mou. Determination of several sugars in

- serum by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Journal of Chromatography A*. 2005,1085(1): 98~103
- [35] Tommaso R.I.Cataldi, Massimiliano Angelotti, Giuliana Bianco. Determination of mono-and disaccharides in milk and milk products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Analytica Chimica Acta*. 2003,485:43~49
- [36] 孙玉军. 木通多糖的分离纯化及部分理化性质测定[J]. *安徽技术师范学院学报*.2001,15(4): 60~61
- [37] 黄桂宪,李毅,谢荣仿,杜所昌. 广西绿茶多糖分离与分析[J]. *中国茶叶*. 1995,8(5): 18~19
- [38] 林晓之,唐渝,张渊明,岑颖洲. 海藻多糖的组成及结构光谱分析[J]. *化学通报*. 2005,(12): 911~917
- [39] 周林,郭祀远,蔡妙颜,李琳. 粘度法测定水溶液中裂褶多糖分子量[J]. *功能高分子学报*. 2005,18(4): 692~695
- [40] 张惟杰著. 复合多糖生化研究技术[M]. 第一版. 上海: 上海科学技术出版社. 1987: 77~120
- [41] J. Dean Pakulski, Ronald Benner. An improved method for the hydrolisis and MBTH analysis of dissolved and particulate carbohydrates in seawater[J]. *Marine Chemistry*. 1992,40: 143~160
- [42] Sverre M. Myklestad,Elin Skanoy,Solveig Hestmann. A sensitive and rapid method for analysis of dissolved mono-and polysaccharides in seawater[J]. *Marine Chemistry*. 1997(56): 279~286
- [43] De Ruiter G A, Schols H A. Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods[J]. *Analytical Biochemistry*. 1992. 207(1): 176~185
- [44] 陈宗道主编. 茶叶化学工程学[M]. 重庆:西南师范大学出版社. 1999
- [45] Masayuki Suzuki. Characteristic distribution of 2-O- (α -L-arabinopyranosyl)-Myo-Inositol in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Proceedings of the International Symposium on Tea Science*. Japan. 1991:135~139
- [46] 陈宗道. 微生物与普洱茶发酵[J]. *茶叶科技*. 1985(4):4~7
- [47] 汪东风,谢晓风,王银龙,等. 茶叶多糖及其药理作用研究进展[J]. *天然产物研究与开发*. 1996,13(1):63~67
- [48] Wang dongfeng. Study of pharmaceutical components in coarse tea on curing diabetes. *Proceedings of the 95 international Tea-Quality-Human Health Symposium*[论文集]. China. 1995:84~86
- [49] 汪东风,谢晓风,王泽农,杨敏,张阳春. 粗老茶中多糖含量及保健作用[J]. *茶叶科学*. 1994,14(1):73~74

- [50] 赵国华. 四种根茎类食物活性多糖的研究[博士学位论文]. 重庆: 西南农业大学. 2001
- [51] Ito En Co, Ltd, Rido ChemI Cal Co. Ltd. (Takeo C, kinugasa H Oosu H). JP04,124,139, ChemI Cal Abstracts. 1992, 117 (8): 76468
- [52] 方积年,叶淳渠,吴淑云,刘玉荣,桂金珠,殷文陶. 亮菌多糖的研究 I-ATM3 组分的分离纯化及其性质[J]. 生物化学与生物物理学报. 1984,16(3):222~227
- [53] 楼福庆. 茶叶与动脉粥样硬化[J]. 浙江医学. 1981,3(4)1~5
- [54] Reed ChemI Cal K K (Mori M, Morita N, Keoaya K). JP 63,308,001 , ChemI Cal Abstracts, 1989, 111:140472
- [55] 萧伟祥,萧惠. 茶多糖生物活性与结构的研究进展[J]. 中国茶叶. 2002,24(1):14~15
- [56] 汪东风,谢晓风,严峻,王泽农. 茶叶多糖等有效成分综合提取[J]. 中草药. 1998, 29 (11): 739~740
- [57] 王玉琦,孙景信,郭繁清,陈红民,许雷,曹国印. 分子活化法分析研究多功能铁芒萁叶中稀土结合多糖[J]. 中国科学 B 辑. 1997,27 (6):64~68
- [58] 叶盛,程玉祥,汪东风. 茶叶多糖及其生物活性[J]. 茶叶科学技术. 2000(1):8~11
- [59] 傅博强,谢明勇,周鹏. 茶叶多糖的提取纯化、组成及药理作用研究进展[J]. 南昌大学学报(理科版). 2001,25(4):358~363
- [60] 蔡鸿思. 中西医结合茶治疗糖尿病初步疗效报告[J]. 茶叶通报. 1979,11(2):58~59
- [61] Tsumura Morin Co. Extraction of hypolycemI Cs from tea. CA, 1991, 115: 142239
- [62] 安徽农业大学主编. 茶叶生物化学[M]. 第二版. 北京: 农业出版社. 1988
- [63] 王淑如,王丁刚. 茶叶多糖的抗凝血和抗血栓作用[J]. 中草药. 1992,23(5):254~256
- [64] 陈建国,王茵,梅松,来伟旗,付颖,胡欣. 茶多糖降血糖、改善糖尿病症状作用的研究[J]. 营养学报. 2003,25(3):253~255
- [65] 王丁刚,陈国华,王淑如. 茶叶多糖的降血糖、抗炎及碳廓清[J]. 茶叶科学. 1991,11(2):173~174
- [66] KenI Chi E, Tokuro T, Tadakazu T. Proceedings of the International Symposium on Tea Science, 1991, 8, 26~29, Shizuoka Japan/The Organizing Committee of ISTS,1992, 240~242
- [67] 王丁刚,王淑如. 茶叶多糖的分离、纯化、分析及降血脂作用[J]. 中国药科大学学报. 1991,22(4):225~228
- [68] 申建和,陈琼华. 木耳多糖、银耳多糖和银耳孢子多糖的降血糖作用[J]. 中国药科大学学报. 1989,20(16):344~347
- [69] Wang Y. A Progression of the polysaccharide on antitumor[J]. Chinese J EugenI Cs Heredity. 2003, 11(2): 139~142
- [70] 邓俊林,许平,王志勇. 茶叶多糖的分离、纯化及分析[J]. 重庆师范学院学报. 1998,15(2):37~38

- [71] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第一版. 杭州:浙江大学出版社. 1999
- [72] 张庆红,马梅芳. 硫酸-蒽酮法测定天冬中多糖含量[J]. 中国现代中药. 2008,10(8):18~22
- [73] Nelly Blumenkrantz and Gustav Asboe-hansen. New method for uronic acids[J]. Anal biochem. 1973, 54: 484
- [74] 王元凤, 金征宇. 茶叶中多糖的分离及降血糖活性的研究[J]. 中草药. 2005,10(36):1453~1457
- [75] 朱秋军. 香菇多糖的分离纯化及理化性质的研究[硕士学位论文]. 武汉. 华中农业大学硕士学位论文. 1998
- [76] 魏远安,方积年. 高效凝胶渗透色谱法测定多糖纯度及分子量[J]. 药学学报. 1989,24(7):532~536
- [77] 张龙翔编著. 生化实验方法和技术[M]. 第一版. 北京:人民教育出版社. 1981
- [78] 申明月,聂少平,谢明勇. 茶叶多糖的纯化及其光谱特性研究[J]. 食品科学. 2007,28(11):39~43
- [79] 屠幼英. 绿茶饮料中茶多糖的构成[J]. 茶叶. 2001,27(2):22~24
- [80] 林楠,钟耀广,王淑琴,刘长江. 香菇多糖的研究进展[J]. 食品研究与开发. 2007,128(5):174~176
- [81] 王健,龚兴国. 多糖的抗肿瘤及免疫调节研究进展[J]. 中国生化药物杂志. 2001,22(1):52~54
- [82] 方积年,王顺春. 香菇多糖的研究进展[J]. 中国药学杂志. 1997,32(6):332~334
- [83] 杨娟,吴谋成,张声华,梁光义. 香菇蛋白多糖抗疲劳作用研究[J]. 营养学报. 2001,23(4):350~353
- [84] 罗伟,李东. 香菇多糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业. 2000,26(4):63~67
- [85] 秦思昌,孙云汉. 香菇的保健作用[J]. 食品研究与开发. 2003,24(4):88~90
- [86] 李丹,尚红,姜拥军,王亚男. 香菇多糖体外抗 HIV 的免疫调节作用的实验研究[J]. 中国免疫学杂志. 2004,20 (4):252-255
- [87] 王一心,李梅君. 香菇多糖的药理作用[J]. 大理学院学报. 2002,1(4):58~61
- [88] 刘栋,钱建亚,卜敏. 香菇多糖抗肿瘤作用研究现状[J]. 食用菌. 2003,25(2):43~44
- [89] 蔡婀娜,王昭晶,罗巛辉. 水提山药多糖的分离纯化与DTA的性质分析[J]. 福建中医学院学报. 2006,16(3):40~43
- [90] 许本波,张世俊,江洪波. 辅助法提取山药多糖的研究[J]. 安徽农学通报. 2007,13(12):34~35
- [91] 丁明玉,田松柏. 离子色谱原理与应用[M]. 第一版. 北京:清华大学出版社. 2000,6
- [92] 李蒙蒙,张丽颖. 国内中药多糖的提取分离及分析研究概况[J]. 药物分析杂志. 2005,25(10):1285~1288
- [93] 王黎明,夏文水. 水法提取茶多糖工艺条件优化[J]. 食品科学. 2005, 5 (26) :1~3
- [94] 许旋,骆晓枫,陈兆星,李勤瑜,陈剑经,罗一帆. 正交试验优化绿茶中茶多糖醇析水提法

- 的实验研究[J]. 中药材. 2005,28(4):327~329
- [95] 陈荣义,张新申,申金山,谢君. 茶叶中有效成分综合提取的研究[J]. 食品科学. 2005,26(4):174~176
- [96] 龚加顺,周红杰,张新富,宋姗,安文杰. 云南晒青绿毛茶的微生物固态发酵及成分变化研究[J]. 茶叶科学. 2005,25(4):300~306
- [97] 梁立娜,张萍,蔡亚崎,牟世芬. 高效离子交换-脉冲安培检测同时分析单糖和糖醛酸[J]. 分析化学. 2006,34(10):1371~1374
- [98] 王盈峰,王登良,严玉琴. 茶多糖的研究进展[J]. 福建茶叶,2003(2):14~16
- [99] 清水岑夫. 探讨茶叶降血糖作用以及从茶叶中制取糖尿病的药物[J]. 国外农学-茶叶. 1990,3(38):38~40
- [100] 严明潮. 茶叶多糖的提取及应用[J]. 中国食品添加剂. 1999,4:50~51
- [101] 朱永兴,王岳飞. 茶医学研究[M]. 第一版. 杭州:浙江大学出版社. 2005:137~161
- [102] 倪德江,谭少波. 脱蛋白工艺对茶多糖提取率及蛋白质含量的影响[J]. 中国茶叶. 2002,24(4):6~7
- [103] 李布青,张慧玲,舒庆龄,张部昌,葛盛芳. 中低档绿茶中茶多糖的提取及降血糖作用[J]. 茶叶科学. 1996,16(1):67~72
- [104] 陈海霞,谢笔钧. 茶多糖不同提取工艺的比较研究[J]. 食品工业科技. 2001,22(2):18~19
- [105] 邓国栋,郁建平. 茶叶多糖提取分离研究[J]. 西南农业大学学报. 2002,24(6):546~548
- [106] 吴建芬,冯磊,张春飞,李印彩. 茶多糖降血糖机制研究[J]. 浙江预防医学. 2003,15(9):9~13
- [107] Paul R.Haddad,Pavel N.Nesterenko,Wolfgang Buchberger. Recent developments and emergung directions in ion chromatography[J]. Journal of Chromatography A. 2008,1184:456~473
- [108] 王元凤,金征宇. 茶多糖脱色的研究[J]. 食品与发酵工业. 2004,30(12):61~66
- [109] 周鹏,沈金灿,谢明勇,庄峙厦,王小如. GC-MS 法分析茶叶中提取物 TGP 的单糖组成及机理探讨[J]. 厦门大学学报(自然科学版). 2003,42(2):213~217
- [110] 王元凤,金征宇. 茶叶中酸性杂多糖的部分化学性质及降血糖活性的研究[J]. 天然产物研究与开发. 2005,17(S):424~427,456
- [111] 徐仲溪,王坤波. 茶多糖化学及生物活性的研究[J]. 茶叶科学. 2004,24(2):75~81
- [112] 倪德江,陈玉琼,谢笔钧,宋春和,袁芳婷. 绿茶、乌龙茶、红茶的茶多糖组成、抗氧化及降血糖作用研究[J]. 营养学报. 2004,26(1):57~60
- [113] 李雷,汪东风,周小玲,丁庆波. 茶叶多糖食品功能性研究[J]. 茶叶科学. 2006,26(2):102~107
- [114] 王莉英,俞茂华. 茶多糖的组分及其生物活性[J]. 中国临床医学,2004,11(5):924~925
- [115] 周裔彬,汪东风,周小玲,李雷,朱永兴. 茶叶多糖复合物的研究进展[J]. 食品与发酵工业,. 2005,31(2):88~92

- [116] Honnavally, Ramesh P, Rudrapatnam N Tharanathan. Water-extracted polysaccharides of selected cereals and influence of temperature on the extractability of polysaccharides in sorghum[J]. Food Chemistry. 1999,(64):345~350.
- [117] Yamaguchi F, Ota Y, Hatanaka C. Extraction and purification of pectic polysaccharides from soybean okara and enzymatic analysis of their structures[J]. Carbohydrate Polymers. 1996,30:265~273
- [118] Chen H X, Zhang M, Xie B J. Quantification of uronic acids in tea polysaccharide conjugates and their antioxidant properties[J]. J Agric Food Chem. 2004,52:3333~3336
- [119] Wang D F, Wang C H, Zhao G W. The characteristic and activity of polysaccharide binding rare earth elements in tea[J]. Biosci Biotech Biochem. 2001,65(9):1987~1992
- [120] Ronald A. Burke, Michael G. Hvizd, Ty R. Shockley. Direct determination of polyglucose metabolites in plasma using anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Journal of Chromatography B. 1997,693:353~357
- [121] Enzo Giannoccaro, Ya-Jane Wang, Pengyin Chen. Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars[J]. Food Chemistry. 2008,106:324~330
- [122] Yoshida O, Nakashima H, Yoshida T. Sulfation of the immunomodulating polysaccharide lentinan: A novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV) [J]. Biochem Pharma. 1988, 37 (15):2887~2891
- [123] 张海容, 韩伟珍. 微波法与传统热水法提取香菇多糖的比较研究[J]. 食品研究与开发. 2005,26 (5):68~71
- [124] K. Tirumalesh. Simultaneous determination of bromide and nitrate in contaminated waters by ion chromatography using amperometry and absorbance detectors[J]. Talanta. 2008,74:1428~1434
- [125] Zhiming Geng, Rong Jiang, Ming Chen. Determination of acrylamide in starch-based foods by ion-exclusion liquid chromatography[J]. Journal of Food Composition and Analysis. 2008, 21: 178~182
- [126] Muhammad Amin, Lee Wah Lim, Toyohide Takeuchi. Determination of common inorganic anions and cations by non-suppressed ion chromatography with column switching[J]. Journal of Chromatography A, 2008,1182:169~175
- [127] Velochka Kontozova-Deutsch, Agnieszka Krata, Felix Deutsch, Laszlo Bencs, Rene Van Grieken. Efficient separation of acetate and formate by ion chromatography: Application to air samples in cultural heritage environment[J]. Talanta, 2008,75:418~423
- [128] Maria Concetta Bruzzoniti, Rosa Maria De Carlo, Krisztian Horvath, Daniela Perrachon, Ambra Prella, Renata Tofalvi, Corrado Sarzanini, Peter Hajos. High performance ion

- p>chromatography of haloacetic acids on macrocyclic cryptand anion exchanger[J]. Journal of Chromatography A,2008,1187:188~196
- [129] Janez Cerar, Matevz Pompe, Marjan Gucek, Janez Cerkovnik, Joze Skerjanc. Analysis of sample of highly water-soluble T_h-symmetric fullerenehexamalononic acid C₆₆(COOH)₁₂ by ion-chromatography and capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A. 2007,1169:86~94
- [130] Andrea Morganti, Silvia Becagli, Emiliano Castellano, Mirko Severi, Rita Traversi, Roberto Udisti. An improved flow analysis-ion chromatography method for determination of cationic and anionic species at trace levels in Antarctic ice cores[J]. Analytica Chimica Acta 2007,603:190~198
- [131] Viktor Drgan, Marjana Novic, Boris Pihlar, Milko Novic. Hard modeling of ion chromatography separations on hydroxide-selective stationary phase[J]. Journal of Chromatography A, 2008,1185:109~116
- [132] Poonam Verma, Karanam L. Ramakumar. Determination of alkali and alkaline earth elements along with nitrogen in uranium based nuclear fuel materials by ion chromatography(IC)[J]. Analytica Chimica Acta. 2007,601:125~129
- [133] Paul R. Haddad, Pavel N. Nesterenko, Wolfgang Buchberger. Recent developments and emerging directions in ion chromatography[J]. Journal of Chromatography A. 2008,1184: 456~473
- [134] Tommaso R. I. Cataldi, Donatella Nardiello. A pulsed potential waveform displaying enhanced detection capabilities toward sulfur-containing compounds at a gold working electrode[J]. Journal of Chromatography A. 2005,1066:133~142
- [135] Domingo Blanco, Daysi Muro, Maria Dolores Gutierrez. A comparison of pulsed amperometric detection and spectrophotometric detection of carbohydrates in cider brandy by liquid chromatography[J]. Analytica Chimica Acta. 2004,517:65~70
- [136] Yvonne Genzel, Susanne Konig, Udo Reichl. Amino acid analysis in mammalian cell culture media containing serum and high glucose concentrations by anion exchange chromatography and integrated pulsed amperometric detection[J]. Analytical Biochemistry. 2004,335:119~125
- [137] Petr Jandik, Jun Cheng, Nebojsa Avdalovic. Analysis of amino acid-carbohydrate mixtures by anion exchange chromatography and integrated pulsed amperometric detection[J]. Journal of Biochemical and Biophysical methods. 2004,60:191~203
- [138] K. Mahabir-Jagessar Tewari, S. A. M. van Stroe-Bieze. Analysis of amine-containing phosphonates in detergent powders by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Journal of Chromatography A. 1997,771:155~161

- [139] Michael Murkovic, Karin Derler. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee[J]. Journal of Biochemical and Biophysical methods. 2006,69:25~32
- [140] Norihiro Kotani, Seiichi Takasaki. Analysis of O-linked Oligosaccharide Allditols by High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection[J]. Analytical Biochemistry. 1997,252:40~47
- [141] Christian Campargue, Claude Lafitte, Marie-Therese Esquerre-Tugaye, Dominique Mazau. Analysis of hydroxyproline and hydroxyproline-arabinsides of plant origin by high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection[J]. Analytical Biochemistry. 1998,257:20~25
- [142] K.Racaityte, S.Kiessig, F.Kalman. Application of capillary zone electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography in the biopharmaceutical industry for the quantitative analysis of the monosaccharides released from a highly glycosylated therapeutic protein[J]. Journal of Chromatography A. 2005,1079:354~365
- [143] Innocenzo G.Casella, Maria Gatta, Elio Desimoni. Applications of a copper-modified gold electrode for amperometric detection of polar aliphatic compounds by anion-exchange chromatography[J]. Journal of Chromatography A.1998,814:63~70
- [144] Corne J.M.Stroop, C.Allen Bush, Ronita L.Marple, William R.LaCourse. Carbohydrate analysis of bacterial polysaccharides by high-pH anion-exchange chromatography and online polarimetric determination of absolute configuration[J]. Analytical Biochemistry. 2002,303:176~185
- [145] Maddalena Generoso, Mario De Rosa, Roberto De Rose, Laura De Magistris, Mario Secondulfo, Raffaele Fiandra, Romano Carrate, Maria Certeni Cellobiose and lactulose coupled with mannitol and determined using ion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, are reliable probes for investigation of intestinal permeability[J]. Journal of Chromatography B. 2003,783:349~357
- [146] Peter L.Albertson, Christopher P.L.Grof. Application of high performance anion exchange-pulsed amperometric detection to measure the activity of key sucrose metabolising enzymes in sugarcane[J]. Journal of Chromatography B. 2007,845:151~156
- [147] Jeffrey S.Rohrer. Analyzing sialic acids using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Analytical Biochemistry. 2003,283:3~9
- [148] Hans Peter Smits, Arie Cohen, Torbjorn Buttler, Jens Nielsen, Lisbeth Olsson. Cleanup and analysis of sugar phosphates in biological extracts by using solid-phase extraction and anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Analytical

- Biochemistry. 1998,261:36~42
- [149] Ivan Simkovic, Juraj Alfoldi, Olga Auxtova, Desana Liskova, Patrice Lerouge. Chemical modification and fractionation of pea stem polysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers. 1996,29:51~56
- [150] Yoko Sekiguchi, Naoto Mitsuhashi, Yoshinori Inoue, Hitoshi Yagisawa, Tetsuro Mimura. Analysis of sugar phosphates in plants by ion chromatography on a titanium dioxide column with pulsed amperometric detection[J]. Journal of Chromatography A. 2004,1039:71~76
- [151] Simon Ballance, Synnove Holtan, Olav Andreas Aarstad, Pawel Sikorski, Gudmunal Skjak-Brad, Bjorn E. Christensen. Application of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and statistical analysis to study oligosaccharide distributions- a complementary method to investigate the structure and some properties[J]. Journal of Chromatography A. 2005,1093:59~68
- [152] Karen V. Swanson, J. McLeod Griffiss. Separation and identification of neisserial lipooligosaccharide oligosaccharides using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Carbohydrate Research. 2006,341:388~396
- [153] Ji-Seon Jeong, Ha-Jeong Kwon, Yong-Moon Lee, Hye-Ran Yoon, Seon-Pyo Hong. Determination of sugar phosphates by high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection[J]. Journal of Chromatography A. 2007,1164:167~173
- [154] Niels Henrik Borch, David L. Kirchman. Concentration and composition of dissolved combined neutral sugars (polysaccharides) in seawater determined by HPLC-PAD[J]. Marine Chemistry. 1997,57:85~95
- [155] Gunther Weber, Gunter Neumann, Charlotte Haake, Volker Romheld. Determination of phytosiderophores by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Journal of Chromatography A. 2001,928:171~175
- [156] Alexandre Caseiro, Iain L. Marr, Magda Claeys, Anne Kasper-Giebl, Hans Puxbaum, Casimiro A. Pio. Determination of saccharides in atmospheric aerosol using anion-exchange high-performance liquid chromatography and pulsed-amperometric detection[J]. Journal of Chromatography A. 2007,1171:37~45
- [157] Valoran P. Hanko, Jeffrey S. Rohrer. Determination of carbohydrates, sugar alcohols and glycols in cell cultures and fermentation broths using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Analytical Biochemistry. 2000,283:192~199
- [158] Christophe Cordella, Julio S. L. T. Militao, Marie-Claude Clement, Patrick Drajnudel, Daniel

- Cabrol-Bass. Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics[J]. *Analytica Chimica Acta*. 2005, 531: 239~248
- [159] Tommaso R.I. Cataldi, Giovanna Margiotta, Carlo G. Zambonin. Determination of sugars and alditols in food samples by HPAEC with integrated pulsed amperometric detection using alkaline eluents containing barium or strontium ions[J]. *Food Chemistry*. 1998, 62(1): 109~115
- [160] Stefano Ricci, Angela Bardotti, Sandro D'Ascenzi, Neil Ravenscroft. Development of new method for the quantitative analysis of the extracellular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection[J]. *Vaccine*. 2001, 19: 1989~1997
- [161] Yongsheng Ding, Hong Yu, Shifen Mou. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. *Journal of Chromatography A*. 2002, 982: 237~244
- [162] Philippe Talaga, Sandrine Vialle, Monique Moreau. Development of a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates[J]. *Vaccine*. 2002, 20: 2474~2484
- [163] Philippe Talaga, Laurent Bellamy, Monique Moreau. Quantitative determination of C-polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Vaccine*. 2001, 19: 2987~2994
- [164] Innocenzo G. Casella, Maria R. Guascito, Tommaso R.I. Cataldi. Electrocatalysis and amperometric detection of alditols and sugars at a gold-nickel composite electrode in anion-exchange chromatography[J]. *Analytica Chimica Acta*. 1999, 398: 153~160
- [165] Heather A. Currie, Carole C. Perry. Resolution of complex monosaccharide mixtures from plant cell wall isolated by high pH anion exchange chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1128: 90~96
- [166] C. Corradini, F. Bianchi, D. Matteuzzi, A. Amoretti, M. Ressi, S. Zanoni. High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection and capillary zone electrophoresis with indirect ultra violet detection as powerful tools to evaluate prebiotic properties of fructooligosaccharides and inulin[J]. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1054: 165~173
- [167] Antonio Martinez-Ferez, Silvia Rudloff, Antonio Guadix, Cordula A. Henkel, Gottfried Pohlentz, Julio J. Boza, Emilia M. Guadix, Clemens Kunz. Goats' milk as a natural source of

- lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology[J]. *International Dairy Journal*. 2006,16:173~181
- [168] James R.Thayer, Jeffrey S.Rohrer, Nebojsa Avdalovic,R..Patrick Gearing Improvemrnts to in-line desalting of oligosaccharides separated by high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Analytical Biochemistry*. 1998,256: 207~216
- [169] Tommaso R.I Cataldi, Cristiana Campa, Massimiliano Angelotti, Sabino A.Bufo. Isocratic separations of closely-related mono- and disaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection using dilute alkaline spiked with barium acetate[J]. *Journal of Chromatography A*. 1999,855: 539~550
- [170] Sebastien N.Ronkart, Christophe S.Blecker, Helene Fourmanoir,Christian Feugnies,Claude Deroanne,Jean-Claude Van Herck, Michel Paquet. Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis[J]. *Analytica Chimica Acta*. 2007,604:81~87
- [171] Q.Paula Lei, David H.Lamb, Ronald Heller, Patricia Pietrobon. Quantitation of low level unconjugated polysaccharide in tetanus toxoid-conjugate vaccine by HPAEC/PAD following rapid separation by deoxycholate/HCl[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000, 21: 1087~1091
- [172] 高林瑞,周斌星. 茶多糖的研究与开发[J]. *世界农业*. 2005,7(315):46~48
- [173] 王丽霞,杜德清. 食用菌多糖研究进展[J]. *浙江林业科技*. 2005,25(5):49~56
- [174] 吴伟,樊丽. 中药多糖分析方法的研究进展[J]. *时珍国医国药*. 2007,18(3):399~700
- [175] 刘锐. 多糖类物质的研究进展[J]. *安徽农业科学*. 2005,33(9):1722~1725
- [176] 牛广财,朱丹. 植物多糖的生物活性及其制备技术研究进展[J]. *食物研究与开发*. 2005,26(6):191~194
- [177] 王斌,连宾. 食药真菌多糖的研究与应用[J]. *食品与机械*. 2005,21(6):96~100
- [178] 王静,王晴,向文胜. 色谱法在糖类化合物分析中的应用[J]. *分析化学*. 2001,29(2):222~227
- [179] 刘婷,周光明. 多糖的提取和分析方法[J]. *化工时刊*. 2008.22(3):66~70
- [180] 刘婷,周光明,罗振亚,许蕊. 高效阴离子交换分离-脉冲安培检测茶叶多糖中的半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖[J]. *食品科学*. 2009.30(6):155~159

作者发表论文题录

1. 刘婷,周光明. 多糖的提取和分析方法. 化工时刊. 2008, 22(3): 66~70
2. 刘婷,周光明,罗振亚,许荃. 高效阴离子交换分析-脉冲安培检测茶叶多糖中的半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖. 食品科学. 2009, 30(6): 155~159

致 谢

斗转星移，时光荏苒，校园时光转瞬即逝，漫漫二十载的求学之路也要走向尾声。回首三年前的金秋，我有幸师从仰慕已久的周光明教授，攻读理学硕士学位。在周光明教授及其他老师们的谆谆教诲下，在同学、朋友们的鼓励与帮助下，经历了忙碌而充实的三年，期间埋头学习理论，刻苦钻研实验，自身素质水平得到了很大的提高。

首先要感谢我的恩师周光明教授及其夫人魏治平女士。吾师周光明教授，翩翩鸿儒，学富五车，渊渟岳峙，蜚声遐迩。在知识传授方面循循善诱，发蒙启蔽；在道德修为方面，行端表正，以身垂范；在学生的日常生活方面，更是关爱有加，无微不至。高山仰止，景行行止。吾师丰硕的学术成果、崇高的道德风范、一丝不苟的治学态度和诲人不倦的奉献精神，都给吾辈学子留下深刻而美好的印象。

几年来，吾师的言传身教对我的专业发展起到了极为重要的作用，从论文的选题到论文的形成，都凝结了导师的大量心血与过人的智慧。正是导师及夫人在学业和生活上的指导与关怀，才使我能取得今天些许的进步与成绩。在此谨向我的导师及其夫人表示由衷的感谢并致以崇高的敬礼！

上善若水，大爱无言。我的导师周光明和他的同事们所组成的强大的教育团队为我辈学子提供了良好的学习环境。能够在西南大学化学化工学院这片肥沃沃土中，沐浴着科学的阳光雨露茁壮成长，让我终身引以为荣。在我即将毕业离开之际，衷心感谢化学化工学院所有老师对我的熏陶和教诲，他们对我的亲切关怀和深情寄语将化为强大的精神动力，鞭策着我在人生的漫漫长途上勇往直前。

感谢我的父母，在我从牙牙学语到如今学有所成的所有日子里，是他们扶持我从无知走向智慧，是他们给了我最大限度的精神鼓励和物质支撑。父母为了我的成长，一直在背后辛勤的劳作和无私的奉献。我对于这般如山恩情、似海慈爱，常怀感激，唯有努力工作，建功立业，以优异的成绩来报答父母恩情之万一。

感谢师兄黄成，师姐邓永利，在论文的修改方面提出宝贵意见，让我的论文撰写得以顺利进行。感谢所有给予我真诚的帮助和支持的同门和朋友，他们的帮助是我完成学业和论文不可或缺的重要条件！当吾青春之时，得遇金兰之交，同窗之谊，幸甚至哉。

再次感谢我的导师和师母。我将在今后的工作和生活中“认真做人，踏实做事”，以此回报他们对我的支持与帮助。

最后，向在百忙中抽出时间对本文进行评审并提出宝贵意见的各位专家表示衷心的感谢！

刘婷

2009年4月 西南大学杏园