

文章编号: 1004-0374(2011)07-0703-11

· 技术与应用 ·

## 寡糖色谱分离研究进展

傅青, 张秀莉\*, 郭志谋, 梁鑫淼\*

(中国科学院大连化学物理研究所分离分析重点实验室, 大连 116023)

**摘要:** 糖类化合物一直被认为是生物结构的重要组成部分和能量来源。近年来的研究发现, 糖类化合物特别是寡糖具有细胞识别等多种生物功能, 因此引起了人们日益广泛的关注。寡糖的色谱分离是糖生物学中重要的研究领域之一, 小型化和高通量制备可能会成为寡糖色谱分离的发展方向。对寡糖色谱分离方面的最新进展进行综述。

**关键词:** 寡糖; 分离; 高效阴离子交换色谱; 石墨化碳液相色谱; 亲水作用色谱

**中图分类号:** Q533; O657.7 **文献标志码:** A

## Recent progress in oligosaccharide separation by high-performance liquid chromatography

FU Qing, ZHANG Xiu-Li\*, GUO Zhi-Mou, LIANG Xin-Miao\*

(Key Lab of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Carbohydrates play important roles as structural materials in plants and as energy sources in organism. Recently, carbohydrates, especially oligosaccharides attracted more and more attentions due to its biological function in the cellular interaction and recognition. Separation of oligosaccharides by high performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most important and challenging research fields in glycobiology. In the present review, we would like to discuss the recent advances on oligosaccharides separation by HPLC. Miniaturization and high-throughput preparation are potential research directions in oligosaccharides separation.

**Key words:** oligosaccharides; separation; HPAEC; graphitized carbon liquid chromatography; HILIC

糖类化合物被认为是能量的来源, 生物结构的重要组成部分, 同时具有多种生物功能。根据聚合度不同, 糖类物质可分为单糖、寡糖和多糖。寡糖因分布于细胞表面, 往往与细胞间的相互作用、识别和防御等生物功能相关<sup>[1-2]</sup>。因此, 寡糖的化学表征是理解上述生物过程的关键步骤之一。此外, 各种植物多糖, 如纤维素、淀粉、菊粉以及细菌多糖等通常也通过酶解或化学降解至寡糖水平进行分析。质谱和核磁共振技术常被用来对寡糖结构进行详细的表征。由于寡糖样品的复杂性, 在进行结构表征前, 通常需要对样品进行分离。寡糖的分离是糖生物学研究中的难点之一, 因为寡糖为典型的极性分子, 具有相似的化学组成, 存在多种可能的异构

体、多种连接方式和分支结构。

目前, 可用于寡糖分离的色谱技术包括反相色谱<sup>[3-4]</sup>、石墨化碳液相色谱、阴离子交换色谱、亲水作用色谱、毛细管电泳<sup>[5-6]</sup>以及凝集素亲和色谱<sup>[7-8]</sup>等。反相色谱的分离对象通常为衍生化的寡糖样品,

收稿日期: 2011-01-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30801513, 20805046); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-R-214); 国家重大新药创制专项(2009ZX09301-012, 2009ZX09501-011)

\*通信作者: E-mail: 张秀莉, zhangxiuli@dicp.ac.cn; 梁鑫淼, liangxm@dicp.ac.cn

因为寡糖分子中含有大量的羟基,非衍生的寡糖很难在传统的反相固定相上有好的保留;高效毛细管电泳已被证明可用于分离各种寡糖及其异构体,各种电泳技术具体包括毛细管胶束电动色谱、毛细管电色谱、毛细管凝胶电泳和毛细管区带电泳;凝集素亲和色谱是利用凝集素与特异性糖基专一结合的特性而实现寡糖的分离。石墨化碳液相色谱、阴离子交换色谱和亲水作用色谱是寡糖分离中最常用的色谱技术,本文综述了这三种色谱技术在寡糖分离方面的最新进展,同时关注流动相组成、保留机理、异构体分离和检测器选择等影响寡糖分离的重要因素。

## 1 高效阴离子交换色谱(high performance anion exchange chromatography, HPAEC)

### 1.1 简介与应用

糖类化合物是一种多羟基醛或酮,在高 pH 值的流动相中,会部分或全部以阴离子形式存在,从而在阴离子交换柱上被保留并得到分离。HPAEC 的固定相是具有高强度和高稳定性的高效阴离子交

换树脂,常用的 HPAEC 色谱柱包括 CarboPac PA1、CarboPac PA10 和 CarboPac PA100(Dionex)。HPAEC 与脉冲安培检测器(pulsed amperometric detection, PAD)联用,是寡糖色谱分析的有效手段之一。HPAEC-PAD 可分析非衍生化的寡糖,具有高分辨率、高选择性和低检测限的特点,该方法已被广泛用于定性和定量分析不同样品中的寡糖成分,包括食品、糖蛋白、植物、动物和合成样品中的各种中性、酸性寡糖,线性、支链寡糖以及 N-连接的寡糖等(表 1)。

### 1.2 溶剂对寡糖色谱保留的影响

HPAEC 的流动相通常为非挥发性的高浓度钠盐,在 NaOH 溶液中加入 NaOAc,可有效增加流动相的洗脱能力;而 NaNO<sub>3</sub> 的洗脱能力更强,通过在分析的后半段加入 NaNO<sub>3</sub> 的方式,可以达到快速分析寡糖,特别是高聚合度寡糖的目的<sup>[29]</sup>。Corradini 等<sup>[10]</sup>研究发现,流动相中添加固定的、高浓度的 NaOH 溶液,可避免流动相 pH 值波动,防止检测器背景信号的提高。Grey 等<sup>[12]</sup>系统研究了流动相组成对分离中性和酸性寡糖的影响。流动

表1 HPAEC在寡糖分离中的应用

| 样品         | 寡糖种类  | 检测                     | 文献   |
|------------|---|------------------------|------|
| 甜菜         | 支链阿拉伯寡糖   | PAD, MALDI-TOF-MS (离线) | [9]  |
| 发酵牛奶       | 菊粉类寡糖, 果寡糖  | PAD                    | [10] |
| 大豆糖类       | 葡萄糖, 果糖, 蔗糖, 棉籽糖, 水苏糖                                       | PAD                    | [11] |
| 糖蛋白        | 18种中性和唾液酸化寡糖  | PAD                    | [12] |
| 小麦粉        | 果聚糖   | PAD                    | [13] |
| 蜂蜜, 玉米糖浆   | 麦芽寡糖  | PAD                    | [14] |
| 蜂蜜         | 单糖, 寡糖  | PAD                    | [15] |
| 大麦β-葡聚糖    | 3-O-β-cellobiosyl-D-glucose,<br>3-O-β-celotriosyl-D-glucose | PAD                    | [16] |
| 益生元半乳寡糖混合物 | 半乳寡糖  | PAD, ESI-MS            | [17] |
| 洋菊粉酶解物     | 菊粉类寡糖(IOS)  | PAD                    | [18] |
| 根瘤菌荚膜多糖    | 酸性寡糖  | PAD, ESI-MS            | [19] |
| 黑麦木聚糖      | 短链阿拉伯木寡糖  | PAD, MALDI-TOF-MS (离线) | [20] |
| 亚麻籽黏质物     | 阿拉伯木寡糖  | PAD                    | [21] |
| 米糠         | 木寡糖   | PAD                    | [22] |
| 小麦木聚糖      | 单取代/双取代阿拉伯木寡糖   | PAD, MALDI-TOF-MS (离线) | [23] |
| 龙舌兰        | 果寡糖   | PAD, ESI-MS (离线)       | [24] |
| 尖吻蝥        | 降纤酶(N-连接寡糖)   | PAD                    | [25] |
| 酸奶         | 半乳寡糖  | PAD                    | [26] |
| 合成         | 6'-galactosyl-lactulose                                     | PAD                    | [27] |
| 肝素         | 6种硫酸化寡糖   | PAD, MALDI-TOF-MS (离线) | [28] |
| 发酵牛奶       | 果寡糖 (FOS, DP 6-7),<br>菊粉类寡糖 (IOS, DP 4-7)                   | PAD                    | [29] |

PAD, 脉冲安培检测器; ESI-MS, 电喷雾电离质谱; MALDI-TOF-MS, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; DP, 聚合度。

相中 NaOH 的浓度由 125 mmol/L 降低至 75 mmol/L 时, 中性寡糖的保留时间增加近一倍; NaOAc 溶液浓度由 2.5 mmol/L 增加至 10 mmol/L, 中性寡糖的保留时间迅速降低, 即使 NaOH 溶液保持较低的浓度 (<71 mmol/L); 中性寡糖的最优分离条件是 NaOH 浓度为 55~71 mmol/L, NaOAc 溶液的浓度为 2.5 或 0 mmol/L。酸性寡糖在 HPAEC 中的保留强于中性寡糖, 可在最后一个中性寡糖洗脱后, 梯度增加流动相中的 NaOAc 溶液浓度 (2.9 mmol/L 增至 123 mmol/L), 使得酸性寡糖洗脱, 达到同时分离中性和酸性寡糖的目的 (图 1)。

## 2 石墨化碳液相色谱(graphitized carbon liquid chromatography)

### 2.1 简介与应用

石墨化碳液相色谱的固定相为多孔石墨化碳填料, 其由六方形排列、共价结合的碳原子层构成, 层间由范德华力联系, 具有均匀的表面结构, 稳定性高, 适用的 pH 范围为 1~14。石墨化碳固定相分离寡糖时, 使用的流动相主要包括水、乙腈或甲醇, 同时添加挥发性酸 (甲酸、乙酸和三氟乙酸) 和挥发性缓冲盐 (甲酸铵、乙酸铵和碳酸氢铵)。自 1991 年 Koizumi 等<sup>[30-31]</sup>首次使用石墨化碳色谱柱 (Hypercarb) 分离单糖和二糖以来, 石墨化碳固定相已被广泛用于分离分析各种样品 (植物、组织、真菌、饮料等) 中的寡糖, 包括果寡糖、卡拉胶寡糖、甘露寡糖和 N-/O- 连接寡糖等 (表 2)。

### 2.2 保留机理与保留行为

寡糖在石墨化碳固定相上的保留机理包括了疏

水作用、极性作用以及离子相互作用。Gruppen 等<sup>[41]</sup>系统研究了各种中性、酸性寡糖在石墨化碳固定相上的保留行为。实验结果表明, 中性寡糖  $\beta$ -(1,4)-葡寡糖和  $\beta$ -(1,4)-木寡糖的保留时间长于  $\beta$ -(1,4)-半乳寡糖、 $\beta$ -(1,4)-甘露寡糖和  $\alpha$ -(1,4)-葡寡糖。 $\beta$ -(1,4)-葡寡糖和  $\beta$ -(1,4)-木寡糖中的羟基都处于平伏键的方向,  $\beta$ -(1,4)-半乳寡糖和  $\beta$ -(1,4)-甘露寡糖中各有一个羟基处于轴向方向, 而  $\alpha$ -(1,4) 连接的方式导致寡糖的分子结构为螺旋式。由此可以看出, 中性寡糖的保留取决于单糖的连接方式和空间结构, 寡糖的结构越接近平面, 与石墨化碳表面的作用位点也越多, 保留也就越强。酸性寡糖  $\alpha$ -(1,4)-半乳糖醛酸寡糖 (DP 2-10) 随着梯度增加的三氟乙酸 (0.002%/min) 依次洗脱, 如果将其进行甲基酯化, 带电的羧基被有效屏蔽,  $\alpha$ -(1,4)-半乳糖醛酸寡糖的保留时间明显降低。该结果证明了酸性寡糖在石墨化碳固定相上的保留行为主要取决于其所带的净电荷。

### 2.3 异构体分离与溶剂影响

石墨化碳固定相最大的优点在于对异构体能够进行有效分离。Lebrilla 等<sup>[44]</sup>使用石墨化碳液相色谱-质谱联用分离人乳寡糖 (HMOs), 提取荷质比 (m/z) 为 1221.5 的色谱图, 可以得到至少 6 个色谱峰, 保留时间从 15.90 到 21.49 min, 实验结果证明了寡糖结构的复杂性和多变性, 同时也说明了石墨化碳固定相分离异构体的能力。Tanimoto 等<sup>[40]</sup>分别使用氨基柱和石墨化碳柱分离酿酒酵母中的甘露寡糖, 甘露三糖 ( $M_3$ ) 在氨基柱上为 1 个峰, 而在石墨化碳柱上被分成 2 个峰, 分别为异构体  $M_3-1$  和

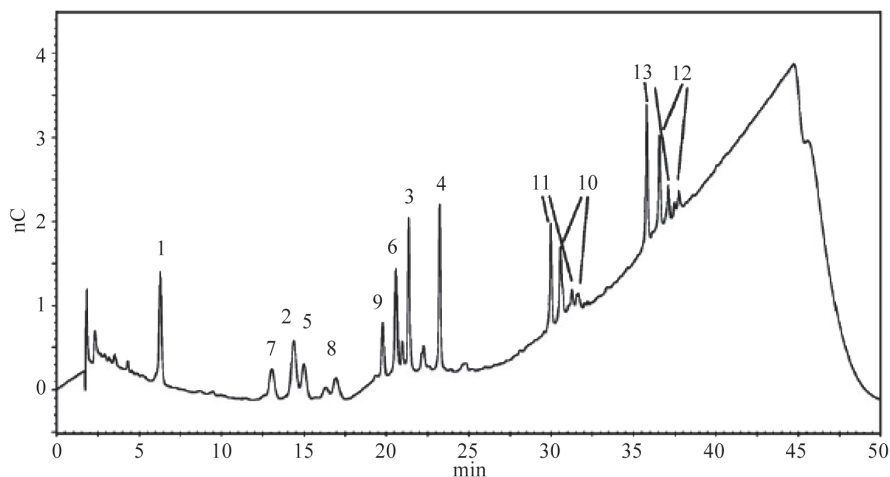


图1 梯度分离中性和酸性寡糖标准品

表2 石墨化碳液相色谱在寡糖分离中的应用

| 样品                                      | 寡糖种类                               | 检测                      | 文献   |
|---|------------------------------------|-------------------------|------|
| 黑麦草, 新西兰麻                               | 果寡糖 (DP 3-49)                      | ESI-MS                  | [32] |
| 人肺组织, 支气管肺泡灌洗液                          | 硫酸化二糖                              | ESI-MS                  | [33] |
| $\iota$ -卡拉胶                            | $\iota$ -卡拉胶寡糖                     | ELSD                    | [34] |
| $\kappa$ -卡拉胶                           | $\kappa$ -卡拉胶寡糖                    | ELSD                    | [35] |
| 血浆糖蛋白                                   | 聚糖                                 | MALDI-FT-ICR-MS         | [36] |
| 啤酒                                      | 麦芽寡糖 (MOSs)                        | ESI-MS, MALDI-FT-ICR-MS | [37] |
| 牛关节软骨可聚蛋白多糖                             | 硫酸软骨素寡糖                            | ESI-MS                  | [38] |
| 人乳寡糖                                    | LNF- I, LNF- II, MFLNH-III, LND- I | ESI-MS                  | [39] |
| 酿酒酵母                                    | 甘露寡糖                               | RI                      | [40] |
| 多种植物细胞壁多糖                               | 中性、酸性寡糖                            | ELSD                    | [41] |
| 甜菜                                      | 线性/支链阿拉伯寡糖                         | ELSD, ESI-MS            | [42] |
| 胎球蛋白, 核糖核酸酶B, 过氧化物酶, 人 $\alpha_1$ 酸性糖蛋白 | 糖肽中常见单糖                            | ESI-MS                  | [43] |
| 黏蛋白, 人乳                                 | O-连接寡糖, 人乳寡糖 (HMOs)                | ESI-MS                  | [44] |
| 鼠脑 Thy-1                                | N-连接寡糖                             | ESI-MS                  | [45] |
| 核糖核酸酶B                                  | N-连接寡糖                             | UV, ESI-MS              | [46] |
| 人血清                                     | 中性/酸性N-连接寡糖                        | MALDI-FT-MS             | [47] |
| 拟南芥                                     | 蔗糖, 麦芽糖, 海藻糖, 磷酸化糖                 | ESI-MS                  | [48] |
| 小麦杆                                     | 水溶性寡糖 (DP 2-20)                    | ESI-MS                  | [49] |

DP, 聚合度; ESI-MS, 电喷雾电离质谱; ELSD, 蒸发光散射检测器; MALDI-FT-MS, 基质辅助激光解吸电离-傅里叶变换离子回旋共振质谱; RI, 示差折光检测器; UV, 紫外检测器。

M<sub>3</sub>-2。Whitelock 等<sup>[38]</sup>的研究结果也证明了石墨化碳固定相可有效区分硫酸软骨素二糖异构体。流动相组成不同, 也会对石墨化碳分离异构体的能力产生影响。Lafosse 等<sup>[34]</sup>分离  $\iota$ -卡拉胶寡糖时, 用甲醇取代乙腈, 可实现异构体的分离。该小组在分离  $\kappa$ -卡拉胶寡糖时发现, 流动相中乙腈浓度降低, 可有效提高异构体分离的选择性; 甲酸盐的选择性高于乙酸盐, 但这种差异会随着流动相中乙腈浓度的增加而降低<sup>[35]</sup>。Altmann 和 Pabst<sup>[50]</sup>系统研究了离子强度、pH 值等因素对石墨化碳固定相分离酸性寡糖的影响。对于唾液酸化的 N-连接寡糖的分离, 作者提出了两个有效的溶剂系统: 10 mmol/L 碳酸氢铵 (pH 7.8~8.0), 具有最强的洗脱能力; 30~65 mmol/L 甲酸铵 (pH 2.6~3.0), 对异构体的分离具有最好的选择性。

### 3 亲水作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)

#### 3.1 简介

HILIC 的概念由 Alpert<sup>[51]</sup>于 1990 年提出, HILIC 可以看作是正相色谱 (normal-phase liquid chromatography, NPLC) 在水溶性流动相领域的延伸。HILIC 模式下, 流动相通常为水 (<40%) 和有

机溶剂 (一般为乙腈), 固定相为亲水的极性材料。HILIC 非常适用于分离极性化合物, 如代谢产物<sup>[52]</sup>、糖类<sup>[53]</sup>、药物<sup>[54]</sup>、天然产物<sup>[55]</sup>等, 近年来受到了持续而广泛的关注。与反相 C18 固定相不同, HILIC 的固定相具有多样性的特点, 除了传统的硅胶、氨丙基键合硅胶外, 还包括各种官能团修饰的硅胶, 如酰胺基、氰基、二醇基、两性离子、环糊精等, 以及聚合物固定相。

#### 3.2 硅胶和氨基修饰硅胶固定相

硅胶固定相是一种典型的正相色谱固定相, 在 HILIC 模式下也得到了广泛的应用, 通常被用来分离相对分子质量较小的极性化合物, 特别是药物, 在分离大分子如糖类、肽类和蛋白质方面的应用较少。氨基修饰硅胶固定相从 1975 年开始就被 Linden 等<sup>[56]</sup>用于单糖和寡糖的分离, 在 20 世纪 90 年代末, 其被广泛用来分离各种样品 (种子提取物、合成样品、细胞、黏液素和人乳) 中不同类型的寡糖<sup>[57]</sup>。由于氨基官能团和还原性糖可反应生成 Schiff 碱, 造成不可逆吸附, 导致样品丢失及固定相表面官能团的改变, 因此, 近年来关于使用氨基固定相分离寡糖的报道逐渐减少。Gilmore 等<sup>[58]</sup>使用氨基制备柱 (1×25 cm) 和分析柱 (0.46×25 cm) 分离得到脊椎动物组织和酵母中中长醇连接的寡糖。

Häusler 等<sup>[59]</sup> 使用氨基柱与蒸发光散射检测器联用, 定量分析样品中的乳糖含量。氨基柱还用于纯化分离乳果糖的衍生物<sup>[27]</sup>。

### 3.3 酰胺修饰硅胶固定相

酰胺修饰硅胶固定相是近年来应用最为广泛的亲水作用色谱固定相之一(表3), 常见的酰胺色谱柱包括 TSKgel Amide-80 色谱柱 (Tosoh, Tokyo, Japan) 和 GlycoSep N 色谱柱 (ProZyme, San Leandro, CA, USA)。酰胺固定相具有高的化学稳定性, 低活性, 不易与样品发生不可逆吸附。Tolstikov 和 Fiehn<sup>[55]</sup> 比较了三种色谱柱 (Polyhydroxyethyl A, TSKgel Amide-80, Silica) 分离强极性化合物的能力。实验结果证明使用酰胺色谱柱可以获得最佳的分离效果, 与质谱联用, 可定量分析笋瓜叶中各种强极

性化合物。Deguchi 等<sup>[60]</sup> 将离子交换柱与酰胺柱联用, 构建在线二维系统, 用于同时分离分析人血清蛋白中的中性和唾液酸化的 N-连接寡糖。Zaia 等<sup>[61]</sup> 发展了芯片形式的亲水作用色谱-质谱联用技术 (HILIC/MS on chip), 其芯片整合了酰胺固定相捕集柱、分析柱和电喷雾喷嘴等装置, 可以达到低流速下稳定的电喷雾状态。该技术已成功用于分析动物组织中肝素寡糖。

### 3.4 两性离子固定相

两性离子 (zwitterion) 是指一个分子中同时存在正电荷中心和负电荷中心。Irgum 等<sup>[62-64]</sup> 发展两性离子作为离子交换色谱固定相时, 发现两性离子具有良好的亲水性。随着近年来亲水作用色谱的发展, 两性离子固定相被用作亲水作用色谱固定

表3 HILIC模式下酰胺和两性离子固定相在寡糖分离中的应用

| 固定相         | 色谱柱                           | 样品                          | 寡糖种类                       | 检测                      | 文献                      |            |      |
|-------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------|------|
| 酰胺          | TSKgel Amide-80               | 动物组织                        | 肝素寡糖, 硫酸乙酰<br>肝素寡糖         | ESI-MS                  | [61]                    |            |      |
|             |                               | 笋瓜叶                         | 寡糖, 糖苷, 氨基糖、<br>氨基酸, 核苷    | ESI-MS                  | [55]                    |            |      |
|             |                               | 肝素                          | 肝素己糖混合物, 肝素-<br>抗凝血酶复合物    | ESI-MS                  | [66]                    |            |      |
|             |                               | 蛋黄                          | 唾液酸寡糖, 唾液酸                 | CAD                     | [67]                    |            |      |
|             |                               | 糖蛋白 (mAb, rhEPO)            | 2-氨基苯甲酰胺标记的<br>N-连接寡糖      | FL                      | [68]                    |            |      |
|             |                               | 胎牛血清 (FBS)                  | N-连接寡糖                     | ESI-MS                  | [69]                    |            |      |
|             |                               | 血蓝蛋白 (KLH),<br>辣根过氧化酶 (HRP) | N-连接寡糖                     | ESI-MS                  | [70]                    |            |      |
|             |                               |                             | N-连接寡糖中常见单糖                | ELSD                    | [71]                    |            |      |
|             |                               | 食品                          | 单糖, 寡糖                     | FL                      | [72]                    |            |      |
|             |                               | 髯海豹, 冠海豹乳液<br>样品            | 多支链寡糖                      | MALDI-TOF-MS            | [73]                    |            |      |
|             |                               |                             | GlycoSep N                 | 卵清蛋白, 免疫球<br>蛋白, Fc融合蛋白 | 2-氨基吡啶酮标记葡<br>寡糖、N-连接寡糖 | FL, ESI-MS | [74] |
|             |                               |                             |                            | 鼠尿液                     | 2-氨基吡啶酮标记葡<br>寡糖, 唾液酸乳糖 | FL, ESI-MS | [75] |
|             |                               | 人、牛免疫球蛋白及<br>单克隆抗体          | 3-(乙酰氨基)-6-氨<br>基吡啶标记寡糖    | FL, MALDI-TOF-MS        | [76]                    |            |      |
| 两性离子        | ZIC-HILIC                     | 半乳寡糖混合物                     | 半乳寡糖(DP 2-10)              | ESI-MS                  | [77]                    |            |      |
|             |                               | 拟南芥                         | 糖类相关代谢物                    | ESI-MS                  | [78]                    |            |      |
|             |                               | 人血清免疫球蛋白<br>(IgG)           | 2-氨基吡啶标记的<br>N-连接寡糖        | FL, UV, ESI-MS          | [79]                    |            |      |
|             |                               | 糖蛋白 (AGP)                   | 2-氨基吡啶标记的<br>N-连接寡糖        | FL, UV, ESI-MS          | [65]                    |            |      |
| 酰胺、两性<br>离子 | TSKgel Amide-80,<br>ZIC-HILIC | 人血清蛋白                       | 2-氨基吡啶标记的中性,<br>唾液酸化N-连接寡糖 | FL, ESI-MS              | [60]                    |            |      |

ESI-MS, 电喷雾电离质谱; CAD, 电雾式检测器; FL, 荧光检测器; ELSD, 蒸发光散射检测器; MALDI-TOF-MS, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; UV, 紫外检测器; DP, 聚合度。

相,并以 ZIC-HILIC 的名字实现了商品化(表 3)。Deguchi 等<sup>[65]</sup>研究了中性和唾液酸化的寡糖在 ZIC-HILIC 色谱柱上的保留行为,当流动相中的  $\text{NH}_4\text{OAc}$  浓度由 5 mmol/L 增加至 20 mmol/L 时,中性寡糖的保留时间小幅度增加,唾液酸化的寡糖保留时间则显著增加。作者推测,中性寡糖的保留行为受亲水作用的影响, $\text{NH}_4\text{OAc}$  浓度增加,固定相上的富水层厚度增加,导致中性寡糖保留时间增加;酸性寡糖的保留除了受亲水作用的影响外,很大程度上受到静电作用的影响。这种静电作用来自唾液酸中的羧基与固定相的磺酸基之间的静电排斥力,会随着流动相中  $\text{NH}_4\text{OAc}$  浓度的增加而迅速降低,从而使酸性寡糖的保留时间大幅度增加。此外,作者在 ZIC-HILIC 色谱柱上实现了中性/酸性寡糖异构体的分离,证明了两性离子固定相具有良好的结构识别能力。两性离子固定相也可与离子交换色谱联用,构建二维分离系统,分离复杂样品中的中性和酸性寡糖<sup>[60]</sup>。

除了上述已经商品化的 ZIC-HILIC 色谱柱,Liang 等<sup>[80]</sup>发展了一种新型的两性离子固定相 Click CA,已成功的用于糖肽的选择性富集。Click CA 的合成步骤简单,具有高亲水性、高选择性的特点,是一种新型的、有潜力的 HILIC 两性离子固定相,其在寡糖分离方面的应用还需进一步的研究。

### 3.5 环糊精修饰硅胶固定相

根据葡萄糖单元的数量不同,环糊精(cyclodextrins, CD)可分为  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -CD。CD 修饰硅胶固定相被广泛用于手性分离<sup>[81-83]</sup>,也可作为亲水作用色谱固定相用于寡糖的分离。Berthod 等<sup>[84]</sup>研究了寡糖在  $\beta$ -CD 固定相上的保留行为,认为分配作用以及固定相与寡糖之间的氢键作用是分离的主要机理。与质谱检测器联用, $\beta$ -CD 色谱柱已成功用于分离分析不同类型的寡糖,如纤维寡糖、葡寡糖、甘露寡糖<sup>[85]</sup>和菊粉类寡糖<sup>[86]</sup>。

### 3.6 糖基修饰(Click saccharides)硅胶固定相

单糖、二糖和寡糖是典型的强极性分子,含有大量的羟基官能团,具有独特的结构,是一种理想的硅胶表面修饰基团。固体表面的糖基固载可以通过 D-A(Diels-Alder)反应<sup>[87]</sup>和硫醇加成<sup>[88]</sup>反应实现,但上述反应存在反应效率低的缺点。2001 年,Sharpless 等<sup>[89]</sup>提出“点击化学”(Click Chemistry)的概念,该反应具有产率高、立体选择性强、反应条件简单、副产物无害、产物易分离等特点,其代表反应为铜催化的叠氮-炔基 Huisgen 环加成反应

(copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)。基于点击化学原理,Liang 等<sup>[90-94]</sup>实现了糖基官能团在硅胶表面的固载,合成了一系列糖基修饰的 HILIC 固定相,包括葡萄糖(Click Glucose)、麦芽糖(Click Maltose)、 $\beta$ -CD(Click  $\beta$ -CD)、壳寡糖(Click Chitooligosaccharide)等色谱柱。糖基修饰的硅胶固定相具有高柱效、高选择性和稳定性,适用于分离各种强极性化合物,如单糖、寡糖、糖醇、核苷、氨基酸等,是一类新型的 HILIC 固定相。

HILIC 模式下,流动相中乙腈的起始浓度较高,样品可能会因为溶解度的问题而析出。当进样量较大(制备级)时,此问题可能会更加突出。Liang 等<sup>[95]</sup>发展的 Click Maltose 色谱柱具有很好的亲水性,可有效降低流动相中乙腈的起始浓度,从而解决样品溶解度的问题;同时,Click Maltose 色谱柱也表现出良好的选择性和稳定性。作为一种新型的 HILIC 固定相,Click Maltose 色谱柱已成功的用于不同类型寡糖的分离(分析级)和纯化(制备级),包括中性(半乳糖寡糖)、碱性(壳寡糖)、酸性(半乳糖醛酸寡糖)和强酸性寡糖(卡拉胶寡糖),以及大分子寡糖(果寡糖,DP 5-50;壳寡糖,DP 5-25)(图 2)和天然产物地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)中的寡糖<sup>[95]</sup>。

### 3.7 整体柱

整体柱固定相近年来也受到较多的关注,整体柱材料具有高化学稳定性、低柱压、高传质速率等特点。Que 和 Novotny<sup>[96]</sup>合成氰基、氨基整体柱,它们与质谱联用,可用于单糖、糖醇和寡糖的分离分析。氰基整体柱分离了单糖、二糖的混合物以及三种单糖(fucose, N-acetylglucosamine, glucose)的异构体;氨基整体柱则有效分离了麦芽寡糖(DP 1-9),同时也表现出对异构体的分离能力。Ikeggami 等<sup>[53,97]</sup>发展了聚丙烯酰胺(polyacrylamide, PAAm)修饰的硅胶整体柱。动力学分析表明,在保证相同柱效下,整体柱的分析速度可以达到填充柱( $5\ \mu\text{m}$ )的 3 倍。与 ESI-MS 联用,PAAm-硅胶整体柱可用于分离分析非衍生的单糖和寡糖。

## 4 检测器

寡糖分析常用的检测器包括脉冲安培检测器(PAD)、紫外检测器(UV)、荧光检测器(FL)、蒸发光散射检测器(ELSD)、电雾式检测器(CAD)和质谱检测器(MS)等。

PAD 通常与 HPAEC 联用,具有高灵敏度、低

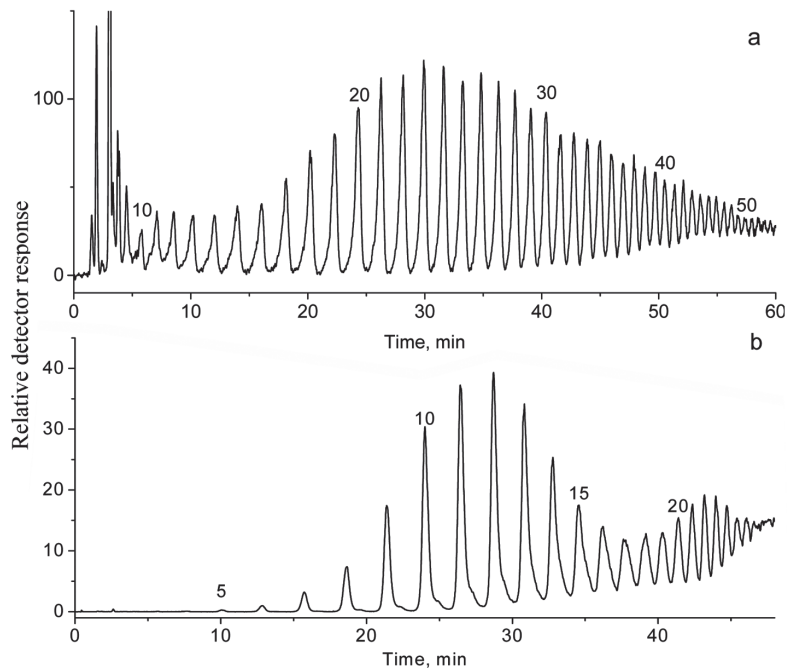


图2 大相对分子质量的果寡糖(a)和壳寡糖(b)在麦芽糖色谱柱上的分离色谱图

检测限的优点, 常用于寡糖的定性和定量分析。但该检测手段也有一定的局限性: (1) 无法得到寡糖聚合度、组成等详细的化学信息, 往往需要使用尺寸排阻色谱 (size exclusion chromatography, SEC) 对寡糖样品进行预处理后再分析; (2) 缺少寡糖标准品 (特别是聚合度大于 5 的寡糖标准品), 较难绘制标准曲线; (3) 检测信号易受寡糖结构和相对分子质量变化的影响。

蒸发光散射检测器 (evaporative light scattering detection, ELSD) 是寡糖分析中常用的检测器之一, 其工作原理包括喷雾、流动相蒸发和检测三个步骤。Beilmann 等<sup>[59]</sup> 系统考察了各种因素对 ELSD 的影响, 实验中需要优化的参数包括取样器位置、雾化气体流速、漂移管温度和样品溶液中的含水量。电雾式检测器 (charged aerosol detection, CAD) 可检测无紫外吸收的化合物, 因此也可作为寡糖分析的检测器。Inagaki 等<sup>[67]</sup> 报道使用 CAD 检测唾液酸化寡糖和唾液酸, 其检测灵敏度高于紫外吸收检测, 低于荧光检测。

质谱检测器 (mass spectrometry, MS) 是寡糖结构分析的重要工具, 可获取寡糖相对分子质量、单糖组成、连接方式等信息, 结果精确, 灵敏度高。HPAEC 与 MS 联用时, 必须使用离线<sup>[98]</sup> 或在线<sup>[17]</sup> 的方式除去流动相中高浓度的非挥发性钠盐; 石墨

化碳液相色谱和亲水作用色谱使用的流动相与质谱有好的兼容性, 因此, 在使用这两种色谱技术时, 越来越多的报道开始使用质谱检测器对寡糖进行定性和定量分析。面对丰富的实验数据 (寡糖保留时间、相对分子质量、多级质谱碎片等), 需要使用化学计量学的方法将这些信息有效整合。因此, 寡糖质谱数据库的构建将成为重要的研究方向。Campbell 等<sup>[99]</sup> 成功构建了 HILIC 模式下 2-氨基苯甲酰胺衍生寡糖的数据库。考虑到寡糖样品的复杂性、液相色谱种类和质谱模式的多样性, 寡糖质谱数据库的构建必将是一个长期而复杂的工作。

## 5 展望

HPAEC-PAD 方法具有非常高的选择性和灵敏度, 是分析寡糖种类和含量的常规手段。由于 HPAEC 使用的是非挥发性、高浓度的钠盐, 对系统的要求较高, 并且不能直接和质谱联用, 限制了 HPAEC 的进一步发展。HILIC 和石墨化碳色谱都在经历着小型化的过程, 纳米级<sup>[100]</sup> 和芯片上<sup>[61]</sup> 的 HILIC(nano-HILIC and HILIC on chip) 以及 HILIC 整体柱<sup>[53]</sup> 的出现, 都极大地提高了分析灵敏度; 而纳米级<sup>[44,46-47]</sup> 石墨化碳液相色谱的出现, 也有望在寡糖异构体分离方面有更好的表现。

除了固定相的小型化, 发展高选择性、高稳定

性的制备级寡糖分离色谱柱也是寡糖研究的重要方向。制备级色谱柱的使用,可实现寡糖样品的高通量制备,获取高纯度的寡糖化合物,从而构建寡糖标准品库。在此基础上,可进一步与生物学表征相结合,从而实现糖类化合物的化学信息与生物信息的融合,为探索糖类化合物的生理活性发挥重要作用。

### [参 考 文 献]

- [1] Zhang Y, Luo SZ, Tang YJ, et al. Carbohydrate-protein interactions by “clicked” carbohydrate self-assembled monolayers. *Anal Chem*, 2006, 78(6): 2001-8
- [2] Wang CC, Huang YL, Ren CT, et al. Glycan microarray of Globo H and related structures for quantitative analysis of breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(33): 11661-6
- [3] Chen X, Flynn GC. Analysis of N-glycans from recombinant immunoglobulin G by on-line reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2007, 370(2): 147-61
- [4] Alley WR, Madera M, Mechref Y, et al. Chip-based reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of permethylated N-linked glycans: a potential methodology for cancer-biomarker discovery. *Anal Chem*, 2010, 82(12): 5095-106
- [5] Zhuang Z, Starkey JA, Mechref Y, et al. Electrophoretic analysis of N-glycans on microfluidic devices. *Anal Chem*, 2007, 79: 7170-5
- [6] Mechref Y, Novotny MV. Glycomic analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2009, 28(2): 207-22
- [7] Durham M, Regnier FE. Targeted glycoproteomics: Serial lectin affinity chromatography in the selection of O-glycosylation sites on proteins from the human blood proteome. *J Chromatogr A*, 2006, 1132(1-2): 165-73
- [8] Qiu RQ, Regnier FE. Use of multidimensional lectin affinity chromatography in differential glycoproteomics. *Anal Chem*, 2005, 77(9): 2802-9
- [9] Westphal Y, Kuhnel S, de Waard P, et al. Branched arabinoo-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan. *Carbohydr Res*, 2010, 345(9): 1180-9
- [10] Borromei C, Cavazza A, Merusi C, et al. Characterization and quantitation of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides in fermented milks by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J Sep Sci*, 2009, 32(21): 3635-42
- [11] Giannoccaro E, Wang YJ, Chen PY. Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars. *Food Chem*, 2008, 106: 324-30
- [12] Grey C, Edebrink P, Krook M, et al. Development of a high performance anion exchange chromatography analysis for mapping of oligosaccharides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(20-21): 1827-32
- [13] Haska L, Nyman M, Andersson R. Distribution and characterization of fructan in wheat milling fractions. *J Cereal Sci*, 2008, 48(3): 768-74
- [14] Morales V, Corzo N, Sanz ML. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chem*, 2008, 107(2): 922-8
- [15] Ouchemoukh S, Schweitzer P, Bey MB, et al. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chem*, 2010, 121(2): 561-8
- [16] Yoo DH, Lee BH, Chang PS, et al. Improved quantitative analysis of oligosaccharides from lichenase-hydrolyzed water-soluble barley  $\beta$ -glucans by high-performance anion-exchange chromatography. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(5): 1656-62
- [17] Coulier L, Timmermans J, Bas R, et al. In-depth characterization of prebiotic galacto-oligosaccharides by a combination of analytical techniques. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(18): 8488-95
- [18] Ronkart SN, Blecker CS, Fourmanoir H, et al. Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Anal Chim Acta*, 2007, 604(1): 81-7
- [19] Chataigne G, Couderc F, Poinot V. Polysaccharides analysis of sinorhizobial capsids by on-line anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection and mass spectrometry coupling. *J Chromatogr A*, 2008, 1185(2): 241-50
- [20] Rantanen H, Virkki L, Tuomainen P, et al. Preparation of arabinoxylobiose from rye xylan using family 10 *Aspergillus aculeatus* endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase. *Carbohydr Polym*, 2007, 68(2): 350-9
- [21] Guilloux K, Gaillard I, Courtois J, et al. Production of Arabinoxylan-oligosaccharides from Flaxseed (*Linum usitatissimum*). *J Agric Food Chem*, 2009, 57(23): 11308-13
- [22] Gullon P, Gonzalez-Munoz MJ, van Gool MP, et al. Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk xylooligosaccharides. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(6): 3632-41
- [23] Pastell H, Tuomainen P, Virkki L, et al. Step-wise enzymatic preparation and structural characterization of singly and doubly substituted arabinoxylo-oligosaccharides with non-reducing end terminal branches. *Carbohydr Res*, 2008, 343(18): 3049-57
- [24] Ravenscroft N, Cescutti P, Hearshaw MA, et al. Structural analysis of fructans from agave americana grown in south africa for spirit production. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(10): 3995-4003
- [25] Luo XQ, Yang HX, Liang CG, et al. Structural characterization of N-linked oligosaccharides of Defibrase from *Agikistrodon acutus* by sequential exoglycosidase digestion and MALDI-TOF mass spectrometry. *Toxicon*, 2010, 55(2-3): 421-9
- [26] Martinez-Villaluenga C, Cardelle-Cobas A, Corzo N, et al. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *J Food Compos Anal*, 2008, 21(7): 540-4
- [27] Cardelle-Cobas A, Martinez-Villaluenga C, Villamiel M, et al. Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and pectinex ultra SP-L. *J Agric Food Chem*, 2008,



- 56(9): 3328-33.
- [28] Bultel L, Landoni M, Grand E, et al. UV-MALDI-TOF mass spectrometry analysis of heparin oligosaccharides obtained by nitrous acid controlled degradation and high performance anion exchange chromatography. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010, 21(1): 178-90
- [29] Borromei C, Cavazza A, Corradini C, et al. Validated HPAEC-PAD method for prebiotics determination in synbiotic fermented milks during shelf life. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(1): 127-35
- [30] Koizumi K, Okada Y, Fukuda M. High-Performance liquid-chromatography of monosaccharides and oligosaccharides on a graphitized carbon column. *Carbohydr Res*, 1991, 215(1): 67-80
- [31] Koizumi K. High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates on graphitized carbon columns. *J Chromatogr A*, 1996, 720(1-2): 119-26
- [32] Harrison SJ, Fraser K, Lane GA, et al. A reverse-phase liquid chromatography/mass spectrometry method for the analysis of high-molecular-weight fructooligosaccharides. *Anal Biochem*, 2009, 395(1): 113-5
- [33] Barroso B, Didraga M, Bischoff R. Analysis of proteoglycans derived sulphated disaccharides by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2005, 1080(1): 43-8
- [34] Antonopoulos A, Favetta P, Lafosse M, et al. Characterisation of iota-carrageenans oligosaccharides with high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A*, 2004, 1059(1-2): 83-7
- [35] Antonopoulos A, Herbreteau B, Lafosse M, et al. Comparative analysis of enzymatically digested  $\kappa$ -carrageenans, using liquid chromatography on ion-exchange and porous graphitic carbon columns coupled to an evaporative light scattering detector. *J Chromatogr A*, 2004, 1023(2): 231-8
- [36] Bereman MS, Williams TI, Muddiman DC. Development of a nanoLC LTQ orbitrap mass spectrometric method for profiling glycans derived from plasma from healthy, benign tumor control, and epithelial ovarian cancer patients. *Anal Chem*, 2009, 81(3): 1130-6
- [37] Clowers BH, Dodds ED, Seipert RR, et al. Dual polarity accurate mass calibration for electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using maltooligosaccharides. *Anal Biochem*, 2008, 381(2): 205-13
- [38] Estrella RP, Whitelock JM, Packer NH, et al. Graphitized carbon LC-MS characterization of the chondroitin sulfate oligosaccharides of aggrecan. *Anal Chem*, 2007, 79: 3597-606
- [39] Broberg A. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry for analysis of oligosaccharides derivatized by reductive amination and N,N-dimethylation. *Carbohydr Res*, 2007, 342(11): 1462-9
- [40] Tanimoto T, Ikuta A, Sugiyama M, et al. HPLC analysis of manno-oligosaccharides derived from *Saccharomyces cerevisiae* mannan using an amino column or a graphitized carbon column. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(2): 280-3
- [41] Westphal Y, Schols HA, Voragen AGJ, et al. Introducing porous graphitized carbon liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometry detection into cell wall oligosaccharide analysis. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(5): 689-95
- [42] Westphal Y, Kuhnel S, Schols HA, et al. LC/CE-MS tools for the analysis of complex arabin-oligosaccharides. *Carbohydr Res*, 2010, 345(15): 2239-51
- [43] Hammad LA, Saleh MM, Novotny MV, et al. Multiple-reaction monitoring liquid chromatography mass spectrometry for monosaccharide compositional analysis of glycoproteins. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20(6): 1224-34
- [44] Ninonuevo M, An HJ, Yin HF, et al. Nanoliquid chromatography-mass spectrometry of oligosaccharides employing graphitized carbon chromatography on microchip with a high-accuracy mass analyzer. *Electrophoresis*, 2005, 26(19): 3641-9
- [45] Itoh S, Kawasaki N, Hashii N, et al. N-linked oligosaccharide analysis of rat brain Thy-1 by liquid chromatography with graphitized carbon column/ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes. *J Chromatogr A*, 2006, 1103(2): 296-306
- [46] Lewandrowski U, Sickmann A. Online dual gradient reversed-phase/porous graphitized carbon nanohplc for proteomic applications. *Anal Chem*, 2010, 82(12): 5391-6
- [47] Chu CS, Ninonuevo MR, Clowers BH, et al. Profile of native N-linked glycan structures from human serum using high performance liquid chromatography on a microfluidic chip and time-of-flight mass spectrometry. *Proteomics*, 2009, 9(7): 1939-51
- [48] Antonio C, Larson T, Gilday A, et al. Quantification of sugars and sugar phosphates in *Arabidopsis thaliana* tissues using porous graphitic carbon liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2007, 1172(2): 170-8
- [49] Robinson S, Bergstrom E, Seymour M, et al. Screening of underivatized oligosaccharides extracted from the stems of *Triticum aestivum* using porous graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem*, 2007, 79(6): 2437-45
- [50] Pabst M, Altmann F. Influence of electrosorption, solvent, temperature, and ion polarity on the performance of LC-ESI-MS using graphitic carbon for acidic oligosaccharides. *Anal Chem*, 2008, 80(19): 7534-42
- [51] Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr*, 1990, 499: 177-96
- [52] Schiesel S, Laemmerhofer M, Lindner W. Multitarget quantitative metabolic profiling of hydrophilic metabolites in fermentation broths of  $\beta$ -lactam antibiotics production by HILIC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(5): 1655-79
- [53] Ikegami T, Horie K, Saad N, et al. Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-

- based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391(7): 2533-42
- [54] van Nuijs ALN, Tarcomnicu I, Bervoets L, et al. Analysis of drugs of abuse in wastewater by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(3): 819-28
- [55] Tolstikov VV, Fiehn O. Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2002, 301(2): 298-307
- [56] Linden JC, Lawhead CL. Liquid chromatography of saccharides. *J Chromatogr A*, 1975, 105(1): 125-33
- [57] Churms SC. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. *J Chromatogr A*, 1996, 720(1-2): 75-91
- [58] Kelleher DJ, Karaoglu D, Gilmore R. Large-scale isolation of dolichol-linked oligosaccharides with homogeneous oligosaccharide structures: determination of steady-state dolichol-linked oligosaccharide compositions. *Glycobiology*, 2001, 11(4): 321-33
- [59] Beilmann B, Langguth P, Hausler H, et al. High-performance liquid chromatography of lactose with evaporative light scattering detection, applied to determine fine particle dose of carrier in dry powder inhalation products. *J Chromatogr A*, 2006, 1107(1-2): 204-7
- [60] Deguchi K, Keira T, Yamada K, et al. Two-dimensional hydrophilic interaction chromatography coupling anion-exchange and hydrophilic interaction columns for separation of 2-pyridylamino derivatives of neutral and sialylated N-glycans. *J Chromatogr A*, 2008, 1189(1-2): 169-74
- [61] Staples GO, Bowman MJ, Costello CE, et al. A chip-based amide-HILIC LC/MS platform for glycosaminoglycan glycomics profiling. *Proteomics*, 2009, 9(3): 686-95
- [62] Jiang W, Irgum K. Covalently bonded polymeric zwitterionic stationary phase for simultaneous separation of inorganic cations and anions. *Anal Chem*, 1998, 71(2): 333-44
- [63] Jiang W, Irgum K. Synthesis and evaluation of polymer-based zwitterionic stationary phases for separation of ionic species. *Anal Chem*, 2001, 73(9): 1993-2003
- [64] Viklund C, Sjögren A, Irgum K, et al. Chromatographic interactions between proteins and sulfoalkylbetaine-based zwitterionic copolymers in fully aqueous low-salt buffers. *Anal Chem*, 2000, 73(3): 444-52
- [65] Takegawa Y, Deguchi K, Ito H, et al. Simple separation of isomeric sialylated N-glycopeptides by a zwitterionic type of hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci*, 2006, 29(16): 2533-40
- [66] Naimy H, Leymarie N, Bowman MJ, et al. Characterization of heparin oligosaccharides binding specifically to antithrombin III using mass spectrometry. *Biochemistry*, 2008, 47(10): 3155-61
- [67] Inagaki S, Min JZ, Toyo'oka T. Direct detection method of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(4): 338-42
- [68] Melmer M, Stangler T, Schiefermeier M, et al. HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(2): 905-14.
- [69] Wang X, Emmett MR, Marshall AG. Liquid chromatography electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric characterization of N-linked glycans and glycopeptides. *Anal Chem*, 2010, 82(15): 6542-8
- [70] Wührer M, Koeleman CAM, Deelder AM, et al. Normal-phase nanoscale liquid chromatography - mass spectrometry of underivatized oligosaccharides at low-femtomole sensitivity. *Anal Chem*, 2004, 76(3): 833-8
- [71] Karlsson G, Winge S, Sandberg H. Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A*, 2005, 1092(2): 246-9
- [72] Kakita H, Kamishima H, Komiya K, et al. Simultaneous analysis of monosaccharides and oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization. *J Chromatogr A*, 2002, 961(1): 77-82
- [73] Kinoshita M, Ohta H, Higaki K, et al. Structural characterization of multibranched oligosaccharides from seal milk by a combination of off-line high-performance liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry and sequential exoglycosidase digestion. *Anal Biochem*, 2009, 388(2): 242-53
- [74] Charlwood J, Birrell H, Bouvier ESP, et al. Analysis of oligosaccharides by microbore high-performance liquid chromatography. *Anal Chem*, 2000, 72(7): 1469-74
- [75] Charlwood J, Birrell H, Tolson D, et al. Early indication of effects of puromycin aminonucleoside using a fluorimetric assay of 2-aminoacridone-derivatized carbohydrates in urine. *Anal Biochem*, 2000, 283(2): 250-7
- [76] Charlwood J, Skehel JM, Camilleri P. Immobilisation of antibodies in gels allows the improved release and identification of glycans. *Proteomics*, 2001, 1(2): 275-84
- [77] Sinclair HR, de Slegte J, Gibson GR, et al. Galactooligosaccharides (GOS) inhibit vibrio cholerae toxin binding to its GM1 receptor. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(8): 3113-9
- [78] Antonio C, Larson T, Gilday A, et al. Hydrophilic interaction chromatography/electrospray mass spectrometry analysis of carbohydrate-related metabolites from *Arabidopsis thaliana* leaf tissue. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(9): 1399-407
- [79] Takegawa Y, Deguchi K, Keira T, et al. Separation of isomeric 2-aminopyridine derivatized N-glycans and N-glycopeptides of human serum immunoglobulin G by using a zwitterionic type of hydrophilic-interaction chromatography. *J Chromatogr A*, 2006, 1113(1-2): 177-81
- [80] Yu L, Li X, Dong J, et al. Selective enrichment of N-linked glycopeptides by using a highly hydrophilic matrix synthesized via click chemistry. *Anal Methods*, 2010, 2(11): 1667-70
- [81] Hinze WL, Riehl TE, Armstrong DW, et al. Liquid chro-

- matographic separation of enantiomers using a chiral  $\beta$ -cyclodextrin-bonded stationary phase and conventional aqueous-organic mobile phases. *Anal Chem*, 1985, 57(1): 237-42
- [82] Li YJ, Song CH, Zhang LY, et al. Fabrication and evaluation of chiral monolithic column modified by  $\beta$ -cyclodextrin derivatives. *Talanta*, 2010, 80(3): 1378-84
- [83] Lv YQ, Mei DP, Pan XX, et al. Preparation of novel  $\beta$ -cyclodextrin functionalized monolith and its application in chiral separation. *J Chromatogr B Analy Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(26): 2461-4
- [84] Berthod A, Chang SSC, Kullman JPS, et al. Practice and mechanism of HPLC oligosaccharide separation with a cyclodextrin bonded phase. *Talanta*, 1998, 47(4): 1001-12
- [85] Liu Y, Uргаonkar S, Verkade JG, et al. Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2005, 1079(1-2): 146-52
- [86] Yang ZM, Yi YT, Gao CC, et al. Isolation of inulin-type oligosaccharides from Chinese traditional medicine: *Moringa officinalis* How and their characterization using ESI-MS/MS. *J Sep Sci*, 2010, 33(1): 120-5
- [87] Houseman BT, Mrksich M. Carbohydrate arrays for the evaluation of protein binding and enzymatic modification. *Chem Biol*, 2002, 9(4): 443-54
- [88] Houseman BT, Gawalt ES, Mrksich M. Maleimide-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate biochips. *Langmuir*, 2003, 19(5): 1522-31
- [89] Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem-Int Edit*, 2001, 40(11): 2004-21
- [90] Guo ZM, Lei AW, Liang XM, et al. Click chemistry: a new facile and efficient strategy for preparation of functionalized HPLC packings. *Chem Commun*, 2006(43): 4512-4
- [91] Guo ZM, Lei AW, Zhang YP, et al. "Click saccharides": novel separation materials for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Chem Commun*, 2007(24): 2491-3
- [92] Guo ZM, Jin Y, Liang T, et al. Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a "Click  $\beta$ -cyclodextrin" stationary phase. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(2): 257-63
- [93] Fu Q, Guo ZM, Liang T, et al. Chemically bonded maltose via click chemistry as stationary phase for HILIC. *Anal Methods*, 2010, 2(3): 217-24
- [94] Huang HX, Jin Y, Xue MY, et al. A novel click chitoooligosaccharide for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Chem Commun*, 2009(45): 6973-5
- [95] Fu Q, Liang T, Zhang X, et al. Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column. *Carbohydr Res*, 2010, 345(18): 2690-7
- [96] Que AH, Novotny MV. Separation of neutral saccharide mixtures with capillary electrochromatography using hydrophilic monolithic columns. *Anal Chem*, 2002, 74(20): 5184-91
- [97] Ikegami T, Fujita H, Horie K, et al. HILIC mode separation of polar compounds by monolithic silica capillary columns coated with polyacrylamide. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386(3): 578-85
- [98] Hilz H, de Jong LE, Kabel MA, et al. A comparison of liquid chromatography, capillary electrophoresis, and mass spectrometry methods to determine xyloglucan structures in black currants. *J Chromatogr A*, 2006, 1133(1-2): 275-86
- [99] Campbell MP, Royle L, Radcliffe CM, et al. GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics*, 2008, 24(9): 1214-6
- [100] Kirsch S, Muthing J, Peter-Katalinic J, et al. On-line nano-HPLC/ESI QTOF MS monitoring of  $\alpha$  2-3 and  $\alpha$  2-6 sialylation in granulocyte glycosphingolipidome. *Biol Chem*, 2009, 390(7): 657-72