

## 寡糖分离纯化和鉴定方法的研究进展

徐畅<sup>1</sup>, 李洁<sup>1</sup>, 孙萌<sup>1</sup>, 姜艳艳<sup>1,2</sup>, 刘斌<sup>1,2\*</sup>

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 国家中医药管理局“中药经典名方有效物质发现”重点研究室, 北京 102488

**摘要:** 寡糖作为近年来备受关注的中药活性成分之一, 具有广泛的药理活性和开发应用前景。寡糖种类多样、组成复杂, 存在多种异构体, 分离纯化和结构鉴定存在较大难度。采用文献分析法, 系统梳理了近 20 年有关寡糖研究的相关文献, 归纳了寡糖分离纯化的主要方法, 包括色谱法(凝胶色谱法、离子交换色谱法、反相高效液相色谱法、活性炭色谱法、石墨化碳色谱法、亲水作用色谱法)、毛细管电泳法、膜分离技术等, 以及寡糖结构鉴定的主要方法, 包括紫外光谱法、红外光谱法、核磁共振波谱法、质谱法、色谱-质谱联用技术等, 并分析了这些方法的适用范围和发展趋势。

**关键词:** 寡糖; 分离; 纯化; 结构鉴定; 色谱法; 毛细管电泳法; 膜分离技术; 紫外光谱法; 红外光谱法; 核磁共振波谱法; 色谱-质谱联用技术

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)19-6531-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.033

## Research progress on methods for isolation, purification and identification of oligosaccharides

XU Chang<sup>1</sup>, LI Jie<sup>1</sup>, SUN Meng<sup>1</sup>, JIANG Yan-yan<sup>1,2</sup>, LIU Bin<sup>1,2</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Key Laboratory of Discovery of Effective Substances in Classical Prescriptions of Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102488, China

**Abstract:** Oligosaccharides, as one of the active ingredients of traditional Chinese medicine that has attracted much attention in recent years, have a wide range of pharmacological activities and development and application prospects. Oligosaccharides are diverse and complex in composition, with many isomers, which are difficult to isolate, purify and identify. This review used literature analysis to systematically sort out the relevant literature on oligosaccharides in the past 20 years. This paper summarized the main methods for the isolation and purification of oligosaccharides, including chromatographies (gel chromatography, ion exchange chromatography, reversed-phase liquid chromatography, activated carbon chromatography, graphitized carbon chromatography, hydrophilic interaction chromatography), capillary electrophoresis and membrane separation technology, and the main methods for the identification of oligosaccharides, including ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry, chromatography and chromatography-mass spectrometry technology. The application range and development trend of these methods were analyzed.

**Key words:** oligosaccharide; isolation; purification; structural identification; chromatography; capillary electrophoresis; membrane separation technology; ultraviolet spectroscopy; infrared spectroscopy; nuclear magnetic resonance spectroscopy; chromatography-mass spectrometry

寡糖又称低聚糖, 是 2~10 个单糖分子通过糖苷键结合而成的直链或支链聚合物。寡糖具有多种药理活性, 如抗肿瘤<sup>[1]</sup>、抗病毒<sup>[2]</sup>、抗菌<sup>[3]</sup>、抗抑郁<sup>[4]</sup>、调节免疫<sup>[5]</sup>、增强造血功能<sup>[6]</sup>等。目前

寡糖的主要获取方式有直接提取、多糖降解、化学合成等<sup>[7]</sup>。前 2 种寡糖获取方法较为常用, 得到的产物为寡糖混合物。寡糖混合物组成复杂、结构不明, 不利于后续研究, 需对其进行分离纯化,

收稿日期: 2023-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074283)

作者简介: 徐畅(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: xc717399@163.com

\*通信作者: 刘斌, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药(复方)有效成分(组分)发现与药物创新研究。E-mail: liubinyn67@163.com

获得组分单一的寡糖纯品并对其进行结构鉴定,最终获得结构明确、组分单一的寡糖样品,为寡糖的深入研究与开发利用打下良好基础。常用的寡糖分离纯化包括色谱法、毛细管电泳法、膜分离技术等,其中色谱法较为常用,并在填料上不断推陈出新,实现更加高效的寡糖分离纯化。寡糖结构鉴定的主要方法包括紫外光谱法、红外光谱法、核磁共振波谱法(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)、质谱法、色谱法、色谱-质谱联用技术等,其中核磁共振波谱法、质谱法较为常用,敞开式离子化质谱(ambient ionization mass spectrometry, AIMS)作为新型质谱技术,可实现常压下对寡糖样品快速检测分析,色谱-质谱联用技术实现了寡糖分离纯化鉴定的连续操作,为寡糖的结构解析提供更多的可靠信息。

随着大数据时代的来临,基于大数据统计的引文分析方法可利用数学和逻辑方法,对科学期刊、论文、著作等各种分析对象的引证与被引证现象进行分析,揭示其中的数量特征和内在规律,降低文献检索的难度,扩大检索范围,提高文献分析的速度和科学性,可更加普适简便、客观严谨、全面直观地反映某一研究领域的进展,弥补了人工文献检索的不足。在众多引文分析软件中,由科学引文索引创始人Grafeld开发的HistCite软件因操作简单、结果直观受到众多研究者的重视。基于HistCite的引文分析可以按年份生成引证关系图,有助于研究者发现文献间的相关性和重要文献,了解研究的发展轨迹,具有较高的应用价值。该方法有利于总结分析寡糖分离纯化鉴定的研究进展,挖掘相关研究的知识关联和发展趋势。

因此,本文简要分析了20年间寡糖分离纯化的文献发表趋势,并依托文献索引分析软件Histcite对寡糖的分离纯化鉴定方法进行分析,梳理寡糖分离纯化与结构鉴定相关的重要节点文献,基于高被引、高价值文献研究总结寡糖分离纯化鉴定的经典方法和创新之处,追踪寡糖提取分离纯化鉴定的难点和热点问题,归纳总结了寡糖分离纯化鉴定相关方法,为含寡糖类成分中药的研究开发提供科学参考。

## 1 文献分析

### 1.1 数据来源和分析方法

基于Web of Science数据库、Elsevier SD数据库和PubMed数据库,分别以“oligosaccharide”

“extraction”“isolation”和“oligosaccharide”“characterization”为2组主题词,系统检索了2002—2022年的文献,整理出2002—2022年寡糖分离、鉴定相关的文献,分析文献发表量的年份发展趋势。随后采用Histcite软件进行文献索引分析,选择50个结点数量自动筛选文献,并按时间顺序排列,绘制引证关系图,分析寡糖分离纯化鉴定的方法、发展趋势及文献间的引证关系等信息。

### 1.2 分析结果

2002—2022年文献发表量的发展趋势如图1所示,2002—2003年属于寡糖分离纯化鉴定的起步阶段,相关研究文献数量较少;2003—2004年发文量大幅度上升,证明寡糖分离纯化和鉴定的研究取得一定突破;2004—2021年寡糖分离纯化和鉴定方面的发文量稳步上升,并分别在2012、2015年达到小高峰,证明在这一时间内寡糖的相关研究稳步发展;2020年达到发文量的最高峰后,相关研究的发文量逐渐回落,表明寡糖分离纯化和鉴定的相关研究再次趋于稳定。

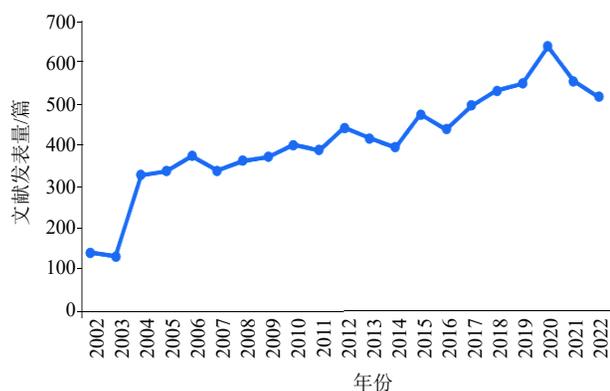


图1 基于3个数据库的2002—2022年寡糖分离纯化鉴定相关文献发表量的发展趋势

Fig. 1 Development trend of literature publication on isolation, purification and identification of oligosaccharides from 2002 to 2020 based on three databases

利用Histcite软件对数据库的文献检索结果进行分析,相关文献发表量及总被引情况见图2,引证关系如图3所示。引证关系图可以直观展示重要文献之间的引用网络关系,图3中箭头指向被引文献,结点大小与其总被引频次(total local citation score, TLCS)相对应,TLCS越高,结点越大,说明该文献被同主题其他文献引用的次数越高。

这些高被引文献中,图3中2004年发表的引证文献101<sup>[8]</sup>和140<sup>[9]</sup>为寡糖相关研究的经典之作,

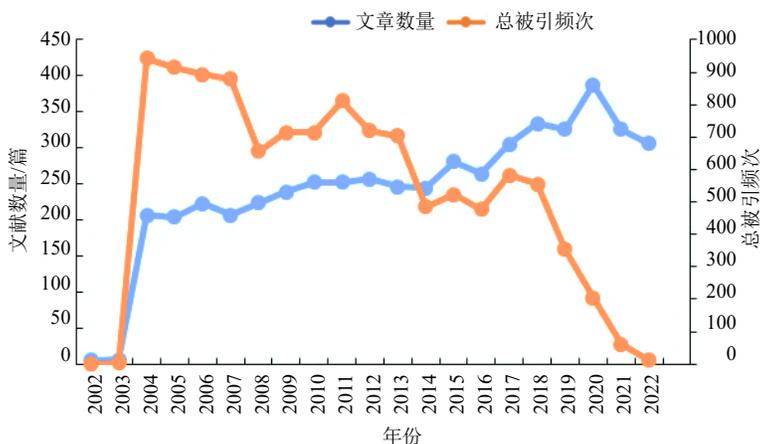


图2 基于 Web of Science 数据库的 2002—2022 年寡糖分离纯化鉴定相关文献数量及总被引频次

Fig. 2 Number of related literatures and total local citation score of isolation, purification and identification of oligosaccharide from 2002 to 2020 based on Web of Science

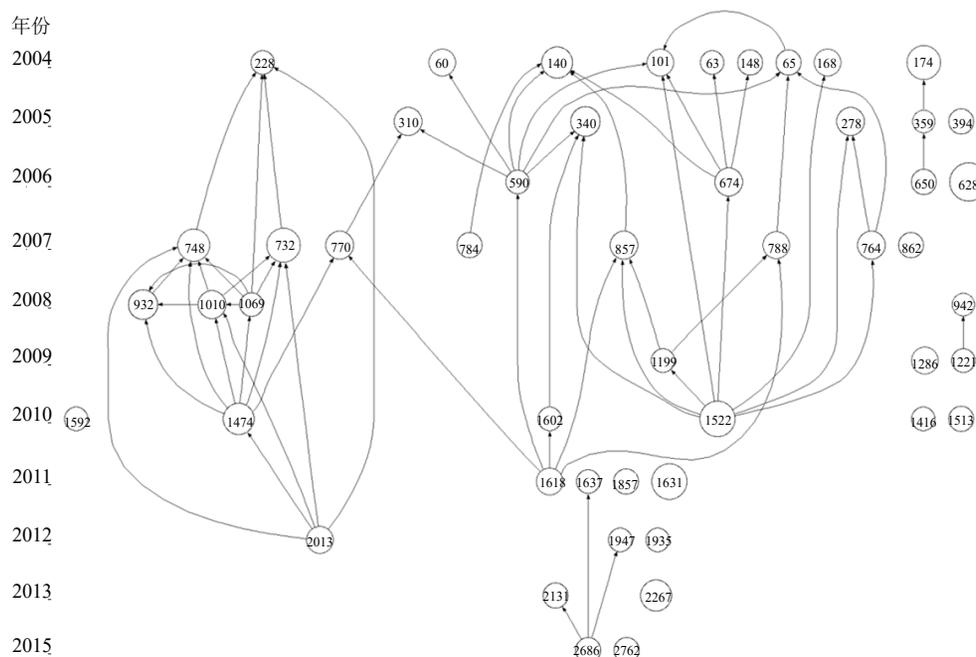


图3 引证关系图

Fig. 3 Citation diagram

分别研究了正相纳米液相色谱-质谱对寡糖混合物的分离鉴定和基质辅助激光解吸飞行时间串联质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-TOF MS) 在 N-连接聚糖片段鉴定中的应用, 液质串联质谱及 MALDI 串联质谱凭借其高灵敏度、重现性好等特点在寡糖成分的结构鉴定中取得了突破进展, 为后续研究提供了良好基础, 因此被反复引用。2007—2008 年寡糖相关研究蓬勃发展,

针对寡糖的质谱裂解规律进行研究总结, 起到承上启下的作用, 与前后文献联系紧密。2010 年发表的综述论文 1522<sup>[10]</sup>对前人研究进行了较为系统地归纳总结, 探讨了寡糖标记策略及其在鉴定和定量中的应用, 被后续研究广泛引用。在该文献中, 研究者将寡糖的标记策略分为 2 种: ①通过衍生化反应引入发色团或荧光团, 便于寡糖的色谱或电泳分离检测; ②在寡糖还原端连接带电或疏水基团, 以增强其分离和质谱检测效果。综合文献分析, 在寡糖分

离和结构鉴定中,多孔石墨化碳色谱法、反相色谱法、离子交换色谱法和亲水相互作用色谱法等多种色谱方法与质谱串联分析已成为寡糖分离纯化和鉴定的常用手段和发展趋势。

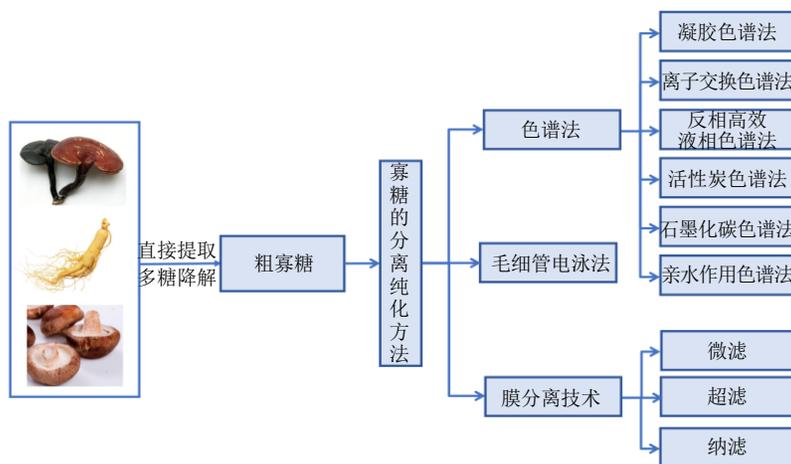


图4 寡糖分离纯化的主要方法

Fig. 4 Summary diagram of main methods for isolation and purification of oligosaccharides

## 2.1 色谱法

### 2.1.1 凝胶色谱法 (gel chromatography)

凝胶色谱是寡糖分离最常用的方法。常用的色谱填料有葡聚糖凝胶 G (Sephadex G)、羟丙基葡聚糖凝胶 LH-20 (Sephadex LH-20) 和聚丙烯酰胺凝胶 (Bio gel P)。马铭等<sup>[11]</sup>采用 Sephadex G-25 纯化党参低聚糖,以蒸馏水为洗脱液,得到组分单一的党参低聚糖(得率 81.9%~92.7%)。Wang 等<sup>[12]</sup>采用 Sephadex G-15 和 Bio-gel P2 柱分离纯化人参提取物,得到了聚合度 2~7 麦芽寡糖部位,可以有效缓解东莨菪碱引起大鼠的记忆障碍的作用。于冰莉等<sup>[13]</sup>依次采用大孔吸附树脂柱、纤维素柱和 Sephadex LH-20 凝胶柱富集纯化了甘草地上部分寡糖,得到了相对分子质量为 180~1800 的寡糖部位。Zong 等<sup>[14]</sup>将 Bio gel P2 柱和快速蛋白液相色谱-示差折光检测器 (fast protein liquid chromatography-refractive index detector, FPLC-RID) 结合,对地黄中提取得到的棉子糖系列总寡糖进行分离纯化,得到了聚合度 3~5 的棉子糖、水苏糖和毛蕊花糖,得率分别为 1.72%、7.52% 和 0.51%。

### 2.1.2 离子交换色谱法 (ion-exchange chromatography)

在采用离子交换色谱法分离纯化寡糖时,阴离子交换色谱法较为常用。在高 pH 值的流动相中,糖类化合物部分或全部以阴离子形式存在,容易在阴离

## 2 寡糖的分离纯化方法

寡糖的分离方法如图 4 所示,主要包括色谱法、毛细管区带电泳法和膜分离法等,其中色谱法包含多种类型,是寡糖分离纯化的常用方法。

子交换柱上被保留并得到分离。在实际应用中,为提高该方法的定性能力,常将高效阴离子色谱柱 (high performance anion exchange chromatography, HPAEC) 与脉冲安培检测器 (pulsed amperometric detection, PAD) 联用,李仁勇等<sup>[15]</sup>采用 CarboPac PA10 高效阴离子交换柱结合 PAD 检测器,在 30 min 内充分分离了 3 种寡糖类成分。Morales 等<sup>[16]</sup>采用 HPEAC-PAD 法分析了糖浆和蜂蜜中的高相对分子质量低聚糖。马务迢等<sup>[17]</sup>采用 HPAEC-PAD 法分离检测了不同生长期的巴戟天中聚合度 3~5 的低聚果糖。Kazlowski 等<sup>[18]</sup>采用 CarboPac (TM) PA100 高效阴离子交换色谱柱分离纯化了新琼寡糖和琼胶寡糖,并与 CarboPac (TM) PA1 色谱柱串联确定了寡糖的聚合度范围。

### 2.1.3 反相高效液相色谱法 (reversed-phase liquid chromatography, RPLC)

RPLC 一般适用于衍生化寡糖的分离。Sun 等<sup>[19]</sup>采用 RPLC 法分离了 κ-卡拉胶寡糖,采用 3-氨基-9-乙基咪唑 (3-amino-9-ethylcarbazole, AEC) 对寡糖进行柱前衍生化,降低了寡糖样品的极性,扩大了寡糖样品适用的固定相及流动相范围,最终分离得到了 8 种卡拉胶偶数寡糖。Rajendiran 等<sup>[20]</sup>探究了寡糖在 RPLC 模式下的分离效果,采用 1-萘胺 (1-naphthylamine, 1-NA) 和 2-氨基蒽 (2-aminoanthracene, 2-AA) 作为柱前

衍生化试剂,有效分离出聚合度 2~7 的一系列麦芽寡糖,其中麦芽七糖优先出峰。除衍生化方法外,RPLC 也可以串联蒸发光散射检测器 (evaporative light-scattering detector, ELSD),实现非衍生化寡糖的直接分离。朱露林等<sup>[21]</sup>采用 RPLC-ELSD 法分离检测了巴戟天中聚合度 3~7 的低聚果糖,寡糖样品无需衍生化处理。

**2.1.4 活性炭色谱法 (activated carbon chromatography)** 活性炭色谱法常用于寡糖的初步分离和大量制备。Mei 等<sup>[22]</sup>采用活性炭柱初步分离了酶解法得到的琼脂低聚糖,并结合凝胶色谱分离纯化,得到新琼四糖和新琼六糖。Chen 等<sup>[23]</sup>采用活性炭色谱柱对琼脂低聚糖进行制备性分离,先以水为洗脱液除去盐和单糖化合物,再以不同浓度的乙醇为洗脱液分离出不同聚合度的低聚糖。洗脱液为 10%乙醇溶液时,洗脱流分中琼脂四糖和琼脂六糖的质量分数可达 59.87%。

**2.1.5 石墨化碳色谱法 (graphitized carbon chromatography)** 石墨化碳色谱法适用于寡糖的大量制备和异构体分离。多孔石墨化碳材料容量大、稳定性高、分离效果好,适用于寡糖的制备。石墨化碳色谱法的分离机制与化合物分子空间结构和分子极性密切相关,化合物分子与石墨化碳结合越紧密,在色谱柱上的保留越强。Westphal 等<sup>[24]</sup>研究表明,在石墨化碳色谱中,酸性寡糖的保留主要取决于其所带的净电荷,中性寡糖的保留取决于与石墨化碳表面的作用位点。因此石墨化碳色谱法可以有效分离寡糖异构体。Miller 等<sup>[25]</sup>采用多孔石墨化碳柱 (porous graphitic carbon, PGC) 洗脱不同聚合度的硫酸乙酰肝素低聚糖,从聚合度为 4 的寡糖中分离得到 2 个寡糖异构体,从聚合度为 6 的寡糖中分离得到 4 个寡糖异构体。Robinson 等<sup>[26]</sup>采用在线 PGC-LC-MS 方法在 30 min 内分离出小麦茎中不同聚合度的天然寡糖,以乙腈、水和 2-丙醇为洗脱液对天然寡糖混合物进行梯度洗脱,先以乙腈-水为洗脱液,分离出聚合度 < 5 的寡糖,再逐渐增加洗脱液中 2-丙醇的浓度,分离出聚合度较大的寡糖。上述实验结果表明,石墨化碳色谱柱与质谱联用时,可以实现不同聚合度寡糖的快速分离鉴定。

**2.1.6 亲水作用色谱法 (hydrophilic interaction chromatography, HILIC)** HILIC 适用于寡糖等极性较大或亲水性较强的化合物的分离纯化。虽然 HILIC 的保留机制目前尚未完全明确,但固定相上

的键合基团明确影响着亲水作用色谱的保留机制,也限制着 HILIC 分离寡糖的分辨率和载样量<sup>[27]</sup>。一般而言,高选择性、高亲水性、高渗透性、低传质阻力的亲水作用固定相可以更好地应用于寡糖的分离纯化。氨基键合相是 HILIC 模式下使用的第 1 个键合固定相,至今仍用于糖类的分离纯化。但氨基稳定性较差,容易导致分析物改变或键合相变性、流失。酰胺键合相在与氨基键合相选择性相近的情况下,可解决氨基键合相存在的问题,成为寡糖的 HILIC 模式分离中最常用的键合固定相。Ghfar 等<sup>[28]</sup>采用 BEH amide 柱同时分离了枣中的蔗糖、蔗果三糖和蔗果四糖,并对枣中糖的含量进行了测定。

除上述传统的固定相之外,一些前沿技术也不断应用于 HILIC 固定相的制备,帮助 HILIC 得到更好的寡糖分离纯化效果。“点击化学”作为近年的研究热点,在制备复杂分离材料的过程中发挥了重要作用,目前已成功用于制备 HILIC 的固定相。Guo 等<sup>[29]</sup>采用铜催化叠氮化物-炔烃环加成 (CuAAC) 这一点击化学的标志性反应将炔基修饰的葡萄糖 (click glucose)、麦芽糖 (click maltose) 和  $\beta$ -环糊精 [click  $\beta$ -cyclodextrin (CD)] 键合至叠氮硅胶表面,形成新型的多醇羟基型 HILIC 固定相,研究结果显示 click glucose、click maltose 和 click  $\beta$ -CD 等新型固定相对糖类等极性化合物有良好的分离效果,具有成为 HILIC 分离材料的巨大潜力。其中 click maltose 柱凭借独特的键合相结构和优异的表面亲水性在寡糖的分离纯化领域脱颖而出。Fu 等<sup>[30]</sup>采用点击化学合成的自制麦芽糖柱 (click maltose) 开发了一种普适有效的 HILIC 方法,从酸性寡糖、中性寡糖和碱性寡糖 3 类低聚糖中分离得到 18 种聚合度 2~7 的高纯度寡糖。

## 2.2 毛细管电泳法

毛细管电泳法常用于糖类的分离与分析,根据分离模式不同,主要可分为 6 种模式。其中毛细管区带电泳法是毛细管电泳法中操作最简便、应用最广泛的分离模式,适用于分离具有荧光反应或带电荷的寡糖样品。对于不满足条件的中性寡糖,常需衍生化反应或依靠缓冲液使之带上荧光基团、发色基团或电荷。郭怀忠等<sup>[31]</sup>采用毛细管区带电泳法分离了板蓝根寡糖,衍生化试剂为 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP),寡糖的分离顺序与相对分子质量大小有关。除衍生化外,适宜的缓冲液也可提供碱性环境及络合离子,

使糖的羟基解离并发生络合或电离从而带电。Hiltunen 等<sup>[32]</sup>采用 NaOH 和 KOH 及其磷酸盐作为缓冲液,同时分离了聚合度 2~6 的低聚糖。缓冲液提供了高碱性条件,避免了衍生化过程,减少了样品处理操作程序。同时 Na<sup>+</sup>和 K<sup>+</sup>可以控制带电物质的迁移率,调节低聚糖的电动性能,提高基线分离的分辨率。毛细管电泳法快速高效,但只适用于带电或带发色(荧光)基团的寡糖样品,常需对寡糖样品进行衍生化处理,同时缓冲液也对实验结果有一定影响,在重复性、定性方面仍具有较大潜力。

### 2.3 膜分离技术

膜分离技术广泛应用于寡糖的分离和制备,根据高分子薄膜孔径的不同,膜分离技术可分为微滤、超滤和纳滤 3 种类型。

**2.3.1 微滤** 微滤又称微孔过滤,采用膜孔径 0.05~10 μm 的微滤膜,可截留蛋白质、颗粒物等杂质,多用于寡糖分离制备的前处理,能有效提高寡糖纯度。Chen 等<sup>[33]</sup>采用 0.45 μm 微滤膜分离纯化了杨树预水解液中的低聚糖,木质素的去除率达到 31%,为后续低聚糖的分离纯化奠定了基础。

**2.3.2 超滤** 超滤采用膜孔径 0.01~0.1 μm 的超滤膜,可截留相对分子质量 500~1×10<sup>6</sup> 的大分子物质,去除大分子杂质及多糖,提高寡糖的纯度和浓度,可用于寡糖的分离和浓缩。Jian 等<sup>[34]</sup>采用超滤膜对降解所得的魔芋寡糖进行分离纯化,得到了聚合度低于 5、相对分子质量小于 1000 的魔芋寡糖。Nabarlatz 等<sup>[35]</sup>采用不同截留相对分子质量的商用膜对低聚木糖溶液进行了超滤研究,结果表明超滤法可有效除去木质素等相关杂质,使低聚木糖的纯度大大增加。

**2.3.3 纳滤** 纳滤采用膜孔径 1 nm 左右的纳滤膜,能保持较高的渗透通量,是寡糖分离与制备中广泛应用的膜分离技术,可用于寡糖的精制。Santibáñez 等<sup>[36]</sup>采用纳滤法分离纯化半乳糖寡糖,有效去除单糖及乳糖,改善半乳糖寡糖的纯化效果。Rizki 等<sup>[37]</sup>将 3 个纳滤膜串联,用于分离纯化低聚果糖,得到纯度较高的单糖、聚合度=3 的低聚果糖和聚合度≥5 的低聚果糖。

膜分离法操作简单、环保安全、高效节能,尤其适合大量制备不同相对分子质量级别的寡糖样品。不同膜孔径的滤膜串联使用,可以实现寡糖样品的分离、纯化、浓缩与精制,得到相对分子质量更小、纯度更高的寡糖。但膜分离法对设备和滤膜

的要求较高,新型滤膜的制备是该领域未来发展的方向。

## 3 寡糖的鉴定方法

### 3.1 紫外光谱法

紫外光谱法可以判断样品中是否含有紫外吸收基团,用于寡糖的定性、定量鉴别。在采用紫外光谱法检测寡糖时,可以在强碱条件下直接检测寡糖,也可以对寡糖样品进行衍生化处理,在目前的紫外光谱检测中,后者较为常用。Lorenz 等<sup>[38]</sup>采用紫外-可见分光光度法(ultraviolet-visible spectroscopy, UV/VIS)方法检测和定量了被 2-氨基苯甲酸还原胺衍生化的木聚糖水解寡糖。Han 等<sup>[39]</sup>采用 PMP 对亚硝酸降解后的壳聚糖进行衍生化,经液相色谱-质谱(LC-MS)和 UV 检测后,可将低聚糖与特定紫外峰关联。

### 3.2 红外光谱法

红外光谱法可以无损地将振动光谱技术与化学计量分析相结合,确定寡糖的官能团、糖苷键构型和样品中寡糖的含量。

在红外光谱中,-OH 的伸缩振动在 3600~3200 cm<sup>-1</sup> 处出现 1 个吸收峰;-CH 的吸收峰较弱,出现在 3000~2800 cm<sup>-1</sup> 处,而在 1400~1200 cm<sup>-1</sup> 的吸收峰为-CH 的弯曲振动;糖醛酸的代表吸收峰一般存在于 1740 cm<sup>-1</sup> 处;C=O 的伸缩振动一般在 1640 cm<sup>-1</sup> 处出现吸收峰,C-O 的伸缩振动一般在 1140 cm<sup>-1</sup> 处出现吸收峰;1200~1000 cm<sup>-1</sup> 区域内的较大吸收峰由 C-OH 键和 C-O-C 糖苷键的的伸缩振动产生;α 型和 β 型糖苷键的呋喃糖环因其端基差异导致吸收峰不同,一般 α 型糖苷键的呋喃糖环吸收峰位于低波数,820、930 cm<sup>-1</sup> 和附近的典型吸收峰可证明 α 型和 β 型糖苷键的呋喃糖环的存在<sup>[40-41]</sup>。

傅里叶变换红外光谱法(fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)在寡糖的检测中广泛使用。Wan 等<sup>[42]</sup>采用 FT-IR 对人参寡糖的结构进行鉴定,将不同条带与相应的官能团和糖苷键对应,确定了人参寡糖的特征带。Amanah 等<sup>[43]</sup>采用傅里叶变换近红外光谱法(fourier transform near infrared spectroscopy, FT-NIR)和 FT-IR 无损预测了完整大豆种子中的低聚糖,对寡糖的官能团和糖苷键产生的条带进行了归属,确定大豆寡糖中含有 36%~40% 的低聚半乳糖和微量的毛蕊糖及其他类型的低聚糖。

### 3.3 NMR 法

NMR 是解析糖类结构的重要方法之一,可用于判断糖类化合物的种类、糖与糖的连接位点和连接顺序、糖残基数目、糖苷键构型、氧环大小等精细结构,可使糖类化学结构的研究更加准确高效,以便于更好地揭示糖类物质的作用机制以及生物活性。

常用的 NMR 有 <sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR。在 <sup>1</sup>H-NMR 谱中,可对寡糖的氢信号进行归属,糖的端基质子信号一般出现在 δ4.3~5.9,可根据其确定糖分子数目;还可根据偶合常数 (*J*) 的大小确定糖苷键的类型。在 <sup>13</sup>C-NMR 谱中,可对寡糖的碳信号进行归属,糖的端基碳原子信号一般出现在 δ90~110,可根据其推定糖分子数目。同时,不同单糖(基)的糖信号存在明显差异,可根据不同的信号判断糖的种类。<sup>13</sup>C-NMR 谱也可确定糖与糖的连接顺序和连接位置,并根据糖端基碳原子的化学位移变化确定糖苷键构型。但利用 <sup>13</sup>C-NMR 谱确定糖与糖的连接位置时,只适用于糖数目 2~3 个小分子低聚糖,对于糖数目在 3 个以上的寡糖的糖链连接顺序可采用 2D-NMR 谱进行确定。Xiao 等<sup>[44]</sup>采用 NMR

鉴别木聚糖样品的结构,确定样品含有聚合度 3~6 的非取代的木聚糖和乙酰化的木聚糖。Wang 等<sup>[45]</sup>采用 2D-NMR 对棉子糖家族低聚糖异构体进行了结构鉴定,结果显示异头构型和糖苷键为 [α-Gal(1→6)]<sub>*n*</sub>-α-Glc-(1→2)-β-Fru (*n*=1~4)。Yang 等<sup>[46]</sup>采用 NMR 对巴戟天中分离得到的菊粉型寡糖进行结构鉴定,确定了低聚糖的聚合度、单糖残基的类型和异聚碳原子的构型。

### 3.4 质谱法

质谱法是寡糖结构解析的常用方法之一,可以确定寡糖的相对分子质量,区分寡糖序列。寡糖结构鉴定常用的质谱方法有电喷雾-质谱法(electron spray ionization-mass spectrometry, ESI-MS)和基质辅助激光解吸质谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry, MALDI-MS),新型质谱技术包括纸喷雾电离质谱(paper spray ionization-mass spectrometry, PSI-MS)、解吸电喷雾电离质谱(desorption electrospray ionization-mass spectrometry, DESI-MS)、实时直接分析质谱(direct analysis in real time-mass spectrometry, DART-MS)等(表 1)。

表 1 寡糖鉴定常用的质谱类型

Table 1 Summary of commonly used mass spectrum types for oligosaccharide identification

电离源	特点	文献
ESI	灵敏度随糖相对分子质量增加而降低,目前可测定聚合度 25 以内的寡糖	47
MALDI	对糖类化合物有更高的灵敏度,电离质量范围广(100~1×10 <sup>6</sup> ),可区分同分异构体的糖苷键	48-49
PSI	快速、实时、原位,无需复杂前处理	50-51
DESI	电喷雾同时解吸和电离	52
DART	可实现高通量分析	53-54

**3.4.1 ESI-MS** 该法广泛适用于各类寡糖样品的结构鉴定,可以直接检测非衍生化寡糖,还可以实现 *O* 和 *N* 连接的寡糖的直接鉴别。ESI-MS 可以确定寡糖的结构、聚合度及其组成,其产生的二级碎片可以进一步确定寡糖的连接顺序和糖苷键结构。Doco 等<sup>[47]</sup>采用 ESI-MS 表征了红酒中的中性低聚糖,结果表明中性低聚糖的聚合度大于 4,主要单糖组成为阿拉伯糖,含有片段 α-*L*-Rhap-(1→4)-α-*D*-GalpA。Wang 等<sup>[55]</sup>采用 UHPLC-ESI-MS/MS 对母乳中的低聚糖和 *N/O*-聚糖进行定性和定量分析,鉴定出 34 个低聚糖、23 个 *N*-聚糖和 6 个 *O*-聚糖。Pfenninger 等<sup>[56-57]</sup>采用电喷雾-四极杆-离子阱质谱

(electron spray ionization-Q-ion trap-mass spectrometry, ESI-Q-IT-MS)分析确定了人乳中的中性寡糖结构,通过 ESI-MS<sup>2</sup> 确定了不同人乳寡糖异构体中岩藻糖的位置,明确了结构未知的新人乳寡糖异构体的结构。

**3.4.2 MALDI-MS** 该法适用于寡糖的结构鉴定,尤其适用于电离后只产生 [M+Na]<sup>+</sup> 离子峰的中性寡糖。MALDI-MS 可以根据多级质谱中的碎片离子峰对寡糖的结构进行详细解析,区分同分异构体的糖苷键。MALDI-MS 为简化谱图,减少不稳定基团的干扰,常须对寡糖样品进行衍生化处理。Xiong 等<sup>[48]</sup>采用 MALDI-TOF-MS 探究了三桠苦中分离得到的

4种寡糖的相对分子质量分布,结果表明,4种寡糖的相对分子质量在500~1500内,聚合度在3~8,且存在异构体。Rohmer等<sup>[49]</sup>采用MALDI-TOF MS检测了人乳寡糖,以3-氨基喹啉为衍生化试剂,通过正、负离子模式检测,确定了寡糖的裂解规律,有助于确认寡糖的糖苷键和分支信息,并从人乳样品中鉴定出2种乳糖-N-六糖异构体。相比,该方法操作更简便,抗基质干扰能力更强,与其他质谱仪器联用更加方便,在高效灵敏的基础上进一步实现环保、原位、快速、高通量的实时分析。AIMS的质谱分析过程由样品原位解吸附、待测物实时离子化和离子传输至质量分析器3个核心步骤组成<sup>[58-59]</sup>。根据待测样品的离子化过程和机制,AIMS的离子源可分为直接电离离子源、直接解吸电离离子源和解吸后电离离子源3类,其代表技术分别为PSI、DESI和DART。

直接电离离子源基于电喷雾原理,是一种在高场中将样品直接电离的离子化技术,具有快速、实时、原位、无需复杂前处理的特点。PSI是直接电离离子源的主要离子源之一,PSI-MS常用于寡糖的结构鉴定。Chan等<sup>[50]</sup>报道了利用PSI-MS可以直接测定人参药材的寡糖类成分。在PSI-MS的基础上产生了脱盐纸喷雾质谱(desalting paper spray-mass spectrometry, DPS-MS),该方法采用1块三角形滤纸进行样品脱盐和电离,可以快速灵敏地检测具有复杂基质的生物样品中的低聚糖。Wang等<sup>[51]</sup>采用DPS-MS对寡糖进行了快速灵敏的定量分析与检

测。DPS在纸喷雾电离的基础上优化创新,排除了盐的干扰,便于分子离子的形成,推动了寡糖的鉴定技术向更加简便、快捷的方向发展。

直接解吸电离离子源是一种利用电喷雾同时解吸和电离样品的技术,样品解吸和离子化过程同时进行,在空间上没有明显的区分。DESI为其代表性离子源,常用于糖类化合物等极性物质的质谱检测。Hou等<sup>[52]</sup>采用解吸电喷雾电离-离子淌度-飞行时间质谱(desorption electrospray ionization combined with ion mobility and quadrupole time-of-flight mass spectrometry, DESI-IM-QTOF MS)从坚果中鉴别出4种寡糖,并探究了寡糖的空间分布。

解吸后电离离子源是一种先对被分析物进行解吸附,再将其电离的2步电离技术。实时直接分析作为该离子源的主要代表技术,在中药糖类成分分析中较为常用。Wang等<sup>[53]</sup>研究发现气体温度对DART-MS信号有显著影响,糖链延长,糖类电离所需的温度也随之提高。利用这一特点,该研究采用DART-Q-TOF-MS对人参寡糖提取物进行快速鉴定,得到聚合度3~6的人参寡糖质谱图,其流程如图5所示。Yang等<sup>[54]</sup>基于DART-Q-TOF-MS/MS,采用实时氦直接分析质谱(He-direct analysis in real time mass spectrometry, He-DART-MS)对糖类化合物进行分析,结合温度依赖性源内衰减(temperature-dependent in-source decay, TDISD)技术对脱水二聚体进行裂解,成功应用于双糖异构体的鉴定。



图5 新型敞开式质谱-实时直接分析样品示意图

Fig. 5 Schematic diagram of sample analysis by real time direct analysis in novel open mass spectrometry

### 3.5 色谱法

色谱法除可用于寡糖的分离纯化外,还可以利用对照品对待测样品进行定性鉴别。其中,平面色谱法以比移值作为定性鉴别的依据,柱色谱法以色谱峰的保留值作为定性依据。在对待测样品进行定性鉴别的同时,还可以借助于其他技术进行定量分析或确定寡糖的精细结构。

#### 3.5.1 薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)

该法依据显色后的斑点或条带对不同的寡糖进行定性鉴别。Chen等<sup>[60]</sup>根据TLC条带的颜色和位置,结合高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)图信息,确定分离得到的莲子低聚糖中含有蔗糖和棉子糖。高效薄层色谱法(high performance thin-layer chromatography,

HPTLC)则分辨率更高、重现性更好,可用于寡糖的含量测定。仰铁锤<sup>[61]</sup>采用 HPTLC 对巴戟天寡糖进行分析,准确鉴别了蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖。Singh 等<sup>[62]</sup>建立了 1 种简单、精确的高效薄层色谱法对菊粉水解物中的低聚果糖进行定性鉴别和定量测定,并成功用于不同样品中低聚果糖的分析。

**3.5.2 液相色谱法** 采用 HPLC 对寡糖进行分析检测,除应用紫外检测器时需对寡糖样品进行衍生化处理,示差折光检测器(refractive index detector, RID)、电雾式检测器(charged aerosol detector, CAD)和蒸发光散射检测器(evaporative light-scattering detector, ELSD)都可以实现直接检测。Pu 等<sup>[63]</sup>以 PMP 为柱前衍生化试剂,采用 RP-HPLC-UV 法对低聚木糖样品进行分析,对比样品色谱图与对照品色谱图,根据保留时间检测出聚合度 2~6 的木聚糖。邱建国等<sup>[64]</sup>采用 HPLC-RID 方法对地黄及含地黄中成药中的寡糖进行检测,样品色谱图与混合对照品色谱图进行对比,确定了寡糖的种类和含量。Hu 等<sup>[65]</sup>建立了 1 种简单快速且灵敏的 UPLC-CAD 方法,同时测定 7 种太子参中的低聚糖,包括聚合度为 3 的 2 种寡糖异构体、聚合度为 4 的 2 种寡糖异构体和 3 种聚合度分别为 5、6 和 7 的支链低聚糖。

**3.5.3 气相色谱法(gas chromatography, GC)** 在采用 GC 检测寡糖类成分时,样品常须进行衍生化处理。Shiomi 等<sup>[66]</sup>采用 GC-火焰离子化检测器(gas chromatography-flame ionization detector, GC-FID)检测甲基化的酮糖异构体,探究了 5 种酮糖异构体的糖苷键结构。卫冰等<sup>[67]</sup>将酸水解后的黄精低聚糖制成糖腈乙酸酯衍生物,采用 GC 法进行分析,经与对照品 GC 对比,确认黄精低聚糖为葡萄糖组成的均一糖。

### 3.6 色谱-质谱联用技术

Lopes 等<sup>[68]</sup>采用 GC-MS 对果聚糖样品的硅烷化衍生物进行分析,并通过对比数据库检索结果来表征化合物结构,最终确定低聚果糖聚合度为 4,其中含 45%的果糖和 11%的葡萄糖。Yan 等<sup>[69]</sup>采用 GC-MS 对金合欢蜂蜜中的痕量寡糖进行分析,对比对照品的保留时间和质谱信息,结合 NIST 数据库分析,鉴别出一系列痕量低聚糖。Ducasse 等<sup>[70]</sup>采用高效排阻色谱(high performance size exclusion chromatography, HPSEC)-ESI-MS 对葡萄酒中的低聚糖进行结构鉴定,表征了 2 种葡萄酒中所含的寡糖结构。Wang 等<sup>[71]</sup>采用在线 HPLC-ESI-MS 对麦麸

中的阿魏酰化低聚糖进行了结构表征,证实了分离得到的寡糖结构分别为阿魏基阿拉伯糖基木四糖和阿魏酰阿拉伯糖基木三糖。

### 4 结语

本文采用文献分析法,梳理了近 20 年来寡糖分离纯化和鉴定的相关文献,综述了该领域的常用方法,并总结了各种方法的适用范围及其优势和特色,分析了寡糖分离纯化和鉴定方法的现状和发展趋势,为寡糖的开发利用提供参考。

目前,寡糖分离纯化的常用方法为色谱法,其中凝胶色谱法、阴离子交换色谱法和亲水作用色谱法是寡糖分离纯化常用的 3 种色谱方法。凝胶色谱法操作简单,可以在分离纯化寡糖的同时,初步判断寡糖相对分子质量的范围。阴离子交换色谱法常与 PAD 检测器联用,实现寡糖分离、纯化与鉴别的连续操作。亲水作用色谱的固定相种类丰富,酰胺键合相在寡糖的分离纯化中应用广泛,而采用点击化学制备的新型麦芽糖柱可以有效分离纯化不同性质的寡糖。

在寡糖的鉴定方法中,紫外光谱法可用于识别寡糖样品中的紫外吸收基团,红外光谱法可以确定寡糖所含官能团及糖苷键构型。NMR 对确定寡糖的单糖组成、单糖间连接位点与顺序、糖苷键构型等结构信息具有重要作用,适用于结构未知的寡糖鉴定。质谱法可以确定寡糖的相对分子质量,区分寡糖序列,相较于 NMR,质谱法对寡糖样品的纯度和用量要求较低,可以通过在线数据库推测寡糖的结构,还可以与分离方法联合使用,是目前寡糖鉴定的常用方法。其中尤以 ESI-MS 和 MALDI-MS 应用最多,而 AIMS 法作为一种新方法,凭借其常压下离子化样品的独特优势,可实现高效快速、原位实时的高通量分析,快速解析寡糖结构,能够有效解决传统质谱在寡糖异构体区分上的不足。色谱法可以简单直观地对比待测寡糖样品与对照品,实现寡糖样品的定性鉴别。色谱-质谱联用技术作为寡糖鉴定的常用技术,实现了分离鉴别的连续化操作,并通过相应的色谱-质谱信息提高了鉴定结果的可靠性。

寡糖具有良好的药理活性,人参、灵芝、地黄、巴戟天等临床常用中药含有多种寡糖类成分,但因寡糖混合物的分离纯化和鉴定具有一定难度,导致寡糖相关研究受限。随着新型分析技术的发展,寡糖的分离纯化、鉴定方法也在不断优化提高。AIMS

实现了分离分析一体化,减少样品前处理等繁琐操作,可以对寡糖类成分进行原位、快捷的实时检测,有望实现寡糖类成分的快速筛选。此外,多种方法联合使用可以综合多种技术优势、获取更多信息、降低分离鉴定的难度,得到纯度较高、结构明确的寡糖纯品,有利于明确中药中寡糖类成分的药效机制,规范中药质量控制体系,助力中医药事业稳步向前。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Zhang R X, Zhou J, Li M X, *et al.* Ameliorating effect and potential mechanism of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on the impaired glucose metabolism in chronic stress rats fed with high-fat diet [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(5): 607-614.
- [2] Bode L, Kuhn L, Kim H Y, *et al.* Human milk oligosaccharide concentration and risk of postnatal transmission of HIV through breastfeeding [J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 96(4): 831-839.
- [3] İspirli H, Colquhoun I J, Şahin E, *et al.* Preparation of gentiobiose-derived oligosaccharides by glucansucrase E81 and determination of prebiotic and immunomodulatory functions [J]. *Carbohydr Res*, 2019, 486: 107837.
- [4] 章主恒, 王静, 付宇, 等. 中药远志抗抑郁有效成分及其作用机制研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(12): 1797-1801.
- [5] Chung H K, Bae E K, Ji H J, *et al.* An oligosaccharide fraction from Korean mugwort herb suppresses death of the mouse thymocytes in culture by down-regulating the Fas death receptor gene [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(18): 1549-1553.
- [6] Falet H, Rivadeneyra L, Hoffmeister K M. Clinical impact of glycans in platelet and megakaryocyte biology [J]. *Blood*, 2022, 139(22): 3255-3263.
- [7] 崔连杰, 李科, 李震宇, 等. 寡糖提取分离与质谱结构解析研究进展 [J]. 药学学报, 2020, 55(5): 843-853.
- [8] Wührer M, Koeleman C A, Deelder A M, *et al.* Normal-phase nanoscale liquid chromatography-mass spectrometry of underivatized oligosaccharides at low-femtomole sensitivity [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(3): 833-838.
- [9] Stephens E, Maslen S L, Green L G, *et al.* Fragmentation characteristics of neutral N-linked glycans using a MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(8): 2343-2354.
- [10] Ruhaak L R, Zauner G, Huhn C, *et al.* Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(8): 3457-3481.
- [11] 马铭, 白瑞斌, 刘景龙, 等. 3种党参提取物体外抗氧化活性探究 [J]. 中成药, 2020, 42(9): 2514-2517.
- [12] Wang Y, Jiang R, Li G, *et al.* Structural and enhanced memory activity studies of extracts from *Panax ginseng* root [J]. *Food Chem*, 2010, 119(3): 969-973.
- [13] 于冰莉, 方永晟, 庞昕昕, 等. 甘草地上部分寡糖富集纯化及其抗衰老活性研究 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(11): 1889-1896.
- [14] Zong W R, Cheong K L, Wu D T, *et al.* Preparation and purification of raffinose family oligosaccharides from *Rehmannia glutinosa* Libosch. by fast protein liquid chromatography coupled with refractive index detection [J]. *Sep Purif Technol*, 2014, 138: 98-103.
- [15] 李仁勇, 梁立娜, 牟世芬, 等. 离子色谱-脉冲安培检测白醋和豆腐水中单糖和大豆低聚糖 [J]. 分析化学, 2009, 37(5): 725-728.
- [16] Morales V, Corzo N, Sanz M L. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups [J]. *Food Chem*, 2008, 107(2): 922-928.
- [17] 马务超, 刘伟贤, 孙恬, 等. 利用高效阴离子交换色谱-脉冲安培电化学检测法测定不同生长年限巴戟天中 6种寡糖类成分含量 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(21): 1912-1916.
- [18] Kazłowski B, Pan C L, Ko Y T. Monitoring and preparation of neoagaro- and agaro-oligosaccharide products by high performance anion exchange chromatography systems [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 122: 351-358.
- [19] Sun Y, Wang C, Geng T, *et al.* Analysis of  $\kappa$ -carrageenan oligosaccharides by LC-ESI-MS/MS<sup>n</sup> with 3-amino-9-ethylcarbazole derivatization [J]. *Acta Chim Sin*, 2011, 69(14): 1697-1704.
- [20] Rajendiran V, El Rassi Z. Retention behaviors of pre-column derivatized mono-, di- and oligosaccharides in various modes of high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1682: 463508.
- [21] 朱露林, 沈焱, 易晓薇, 等. 不同产地及种植年限巴戟天中 6种寡糖类成分的定量分析 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4348-4352.
- [22] Mei J F, Shao J T, Wang Q, *et al.* Separation and quantification of neoagaro-oligosaccharides [J]. *J Food Sci Technol*, 2013, 50(6): 1217-1221.
- [23] Chen H M, Zheng L. The preparation and bioactivity research of agaro-oligosaccharides [J]. *Food Technol Biotechnol*, 2005, 43(1): 29-36.
- [24] Westphal Y, Schols H A, Voragen A G, *et al.* Introducing

- porous graphitized carbon liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometry detection into cell wall oligosaccharide analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(5): 689-695.
- [25] Miller R L, Guimond S E, Prescott M, *et al.* Versatile separation and analysis of heparan sulfate oligosaccharides using graphitized carbon liquid chromatography and electrospray mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(17): 8942-8950.
- [26] Robinson S, Bergström E, Seymour M, *et al.* Screening of underivatized oligosaccharides extracted from the stems of *Triticum aestivum* using porous graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(6): 2437-2445.
- [27] Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC): A powerful separation technique [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(1): 231-247.
- [28] Ghfar A A, Wabaidur S M, Ahmed A Y, *et al.* Simultaneous determination of monosaccharides and oligosaccharides in dates using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2015, 176: 487-492.
- [29] Guo Z M, Lei A W, Zhang Y P, *et al.* "Click saccharides": Novel separation materials for hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. *Chem Commun*, 2007(24): 2491-2493.
- [30] Fu Q, Liang T, Zhang X L, *et al.* Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column [J]. *Carbohydr Res*, 2010, 345(18): 2690-2697.
- [31] 郭怀忠, 姜文月, 杜智昊, 等. 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮衍生中药寡糖的毛细管区带电泳分离 [J]. 色谱, 2011, 29(3): 254-258.
- [32] Hiltunen S, Sirén H, Heiskanen I, *et al.* Capillary electrophoretic profiling of wood-based oligosaccharides [J]. *Cellulose*, 2016, 23(5): 3331-3340.
- [33] Chen X Q, Yang Q L, Si C L, *et al.* Recovery of oligosaccharides from prehydrolysis liquors of poplar by microfiltration/ultrafiltration membranes and anion exchange resin [J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2016, 4(3): 937-943.
- [34] Jian W J, Sun Y M, Huang H, *et al.* Study on preparation and separation of *Konjac* oligosaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(2): 1218-1224.
- [35] Nabarlatz D, Torras C, Garcíavalls R, *et al.* Purification of xylo-oligosaccharides from almond shells by ultrafiltration [J]. *Sep Purif Technol*, 2007, 53(3): 235-243.
- [36] Santibáñez L, Córdova A, Astudillo-Castro C, *et al.* Effect of the lactose hydrolysis on galacto-oligosaccharides mixtures subjected to nanofiltration: A detailed fractionation analysis [J]. *Sep Purif Technol*, 2019, 222: 342-351.
- [37] Rizki Z, Janssen A E M, Boom R M, *et al.* Oligosaccharides fractionation cascades with 3 outlet streams [J]. *Sep Purif Technol*, 2019, 221: 183-194.
- [38] Lorenz D, Erasmy N, Akil Y, *et al.* A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 140: 181-187.
- [39] Han Z R, Zeng Y Y, Lu H, *et al.* Determination of the degree of acetylation and the distribution of acetyl groups in chitosan by HPLC analysis of nitrous acid degraded and PMP labeled products [J]. *Carbohydr Res*, 2015, 413: 75-84.
- [40] He L L, Yan B X, Yao C Y, *et al.* Oligosaccharides from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua: Structural characterization and treatment of LPS-induced peritonitis in mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 255: 117392.
- [41] Sinyayev V A, Toxeitova G A, Batyrbayeva A A, *et al.* A comparative investigation of the IR spectra of a carbohydrate series [J]. *J Chem Technol Metall*, 2020, 55(4): 724-729.
- [42] Wan D B, Jiao L L, Yang H M, *et al.* Structural characterization and immunological activities of the water-soluble oligosaccharides isolated from the *Panax ginseng* roots [J]. *Planta*, 2012, 235(6): 1289-1297.
- [43] Amanah H Z, Tunny S S, Masithoh R E, *et al.* Nondestructive prediction of isoflavones and oligosaccharides in intact soybean seed using Fourier transform near-infrared (FT-NIR) and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic techniques [J]. *Foods*, 2022, 11(2): 232.
- [44] Xiao X, Wen J Y, Wang Y Y, *et al.* NMR and ESI-MS spectrometry characterization of autohydrolysis xylo-oligosaccharides separated by gel permeation chromatography [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 195: 303-310.
- [45] Wang Y D, Han W W, Song L L, *et al.* Compositional analysis and structural characterization of raffinose family oligosaccharides from *Eupatorium* [J]. *J Food Compos Anal*, 2019, 84: 103298.
- [46] Yang Z, Hu J, Zhao M. Isolation and quantitative determination of inulin-type oligosaccharides in roots of *Morinda officinalis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 83(4): 1997-2004.
- [47] Doco T, Williams P, Meudec E, *et al.* Complex carbohydrates of red wine: Characterization of the extreme diversity of neutral oligosaccharides by ESI-MS [J]. *J*

- Agric Food Chem*, 2015, 63(2): 671-682.
- [48] Xiong F, Liang H X, Zhang Z J, *et al.* Characterization, antioxidant and antitumor activities of oligosaccharides isolated from *Evodia lepta* (Spreng) Merr. by different extraction methods [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(11): 1842.
- [49] Rohmer M, Meyer B, Mank M, *et al.* 3-Aminoquinoline acting as matrix and derivatizing agent for MALDI-MS analysis of oligosaccharides [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(9): 3719-3726.
- [50] Chan S L, Wong M Y, Tang H W, *et al.* Tissue-spray ionization mass spectrometry for raw herb analysis [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(19): 2837-2843.
- [51] Wang Q, Bhattarai M, Zhao P Y, *et al.* Fast and sensitive detection of oligosaccharides using desalting paper spray mass spectrometry (DPS-MS) [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2020, 31(10): 2226-2235.
- [52] Hou J J, Zhang Z J, Zhang L L, *et al.* Spatial lipidomics of eight edible nuts by desorption electrospray ionization with ion mobility mass spectrometry imaging [J]. *Food Chem*, 2022, 371: 130893.
- [53] Wang Y, Liu L, Ma L, *et al.* Identification of saccharides by using direct analysis in real time (DART) mass spectrometry [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2014, 357: 51-57.
- [54] Yang H M, Shi L, Yao W B, *et al.* Differentiation of disaccharide isomers by temperature-dependent in-source decay (TDISD) and DART-Q-TOF MS/MS [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2015, 26(9): 1599-1605.
- [55] Wang H Y, Zhang X M, Kang P, *et al.* Variations in oligosaccharides and N/O-glycans in human milk through the eight-month lactation period [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(44): 14272-14283.
- [56] Pfenninger A, Karas M, Finke B, *et al.* Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MS<sup>n</sup> (Part 1: Methodology) [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002, 13(11): 1331-1340.
- [57] Pfenninger A, Karas M, Finke B, *et al.* Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MS<sup>n</sup> (Part 2: Application to isomeric mixtures) [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002, 13(11): 1341-1348.
- [58] 黄文静, 叶楚璇, 徐浩然, 等. 敞开式离子化质谱技术在中药材及中药饮片质量评价中的应用进展 [J]. *化学试剂*, 2022, 44(8): 1079-1087.
- [59] 黄鑫, 刘文龙, 张勇, 等. 敞开式离子化质谱技术在中药研究中的应用 [J]. *质谱学报*, 2017, 38(1): 1-10.
- [60] Chen L X, Hu D J, Liang X, *et al.* Preparation and identification of oligosaccharides in lotus seeds and determination of their distribution in different parts of lotus [J]. *Electrophoresis*, 2018, 39(15): 2020-2028.
- [61] 仰铁锤. 巴戟天寡糖指纹图谱研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [62] Singh R S, Singh T, Singh D, *et al.* HPTLC-densitometry quantification of fructooligosaccharides from inulin hydrolysate [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 177: 221-228.
- [63] Pu J H, Zhao X, Wang Q C, *et al.* Development and validation of a HPLC method for determination of degree of polymerization of xylo-oligosaccharides [J]. *Food Chem*, 2016, 213: 654-659.
- [64] 邱建国, 张汝学, 贾正平, 等. HPLC 法测定地黄及含地黄成药中寡糖 [J]. *中草药*, 2010, 41(12): 1997-2000.
- [65] Hu D J, Han B X, Chen C W, *et al.* Determination of seven oligosaccharides and sucrose in *Pseudostellaria heterophylla* by pressurized liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography with charged aerosol detector and tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1609: 460441.
- [66] Shiomi N, Abe T, Kikuchi H, *et al.* Structural analysis of novel kestose isomers isolated from sugar beet molasses [J]. *Carbohydr Res*, 2016, 424: 1-7.
- [67] 卫冰, 许闽, 于雷, 等. 黄精低聚糖的分离纯化及结构分析 [J]. *中成药*, 2012, 34(4): 694-697.
- [68] Lopes S M, Krausová G, Carneiro J W, *et al.* A new natural source for obtainment of inulin and fructo-oligosaccharides from industrial waste of *Stevia rebaudiana* Bertoni [J]. *Food Chem*, 2017, 225: 154-161.
- [69] Yan S, Wang W Q, Zhao W, *et al.* Identification of the maturity of acacia honey by an endogenous oligosaccharide: A preliminary study [J]. *Food Chem*, 2023, 399: 134005.
- [70] Ducasse M A, Williams P, Meudec E, *et al.* Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 79(3): 747-754.
- [71] Wang J, Yuan X, Sun B, *et al.* On-line isolation and structural characterisation of feruloylated oligosaccharides from wheat bran using HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> [J]. *Food Chem*, 2009, 115(4): 1529-1541.

[责任编辑 潘明佳]