

综述

母乳低聚糖的检测方法研究进展

朱婧¹, 王鑫¹, 向雪松², Stahl Bernd³, 王红伟⁴, 杨月欣²

(1. 北京市营养源研究所, 北京 100069; 2. 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050; 3. 纽迪希亚研究中心, 荷兰 乌特勒支 3544 PA; 4. 达能纽迪希亚生命早期营养, 上海 201204)

摘要:母乳低聚糖(HMOS)在母乳中的含量仅次于乳糖和脂肪,其生理功能受到越来越多的重视。在对母乳低聚糖的研究中,关键问题之一是灵敏和可定量的检测方法。由于母乳低聚糖属于复杂的混合物,结构多样,且没有内在的发色团,使得对其进行结构分辨和定量检测都存在不小的难度。本文拟对母乳低聚糖检测方法的研究进展进行综述。

关键词:母乳低聚糖; 检测; 定量; 综述; 营养

中图分类号:R155.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456(2016)03-0396-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.03.027

Advance in analysis of human milk oligosaccharides

ZHU Jing, WANG Xin, XIANG Xue-song, Stahl Bernd, WANG Hong-wei, YANG Yue-xin
(Beijing Research Institute for Nutrition Resources, Beijing 100069, China)

Abstract: Human milk oligosaccharides (HMOS) is the third abundant solid component after lactose and fat in human milk with diverse benefits. The key issue of HMOS research is the sensitive and quantitative analysis methods. Since HMOS are complex mixture with various structures and isomer, and are without inner chromophores, HMOS are difficult to identify and quantify. This review is to summarize the new and emerging methods for oligosaccharide analysis.

Key words: Human milk oligosaccharides; analysis; quantitate; review; nutrition

根据世界卫生组织婴幼儿喂养全球策略,目前推荐的婴儿喂养标准是婴儿出生后的前6个月纯母乳喂养,并继续母乳喂养1~2年。母乳是婴儿最佳的天然食品,可提供婴儿正常生长发育所需的全部营养成分和大量生物活性物质。母乳中母乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOS)的含量可达到12~23 g/L,作为仅次于乳糖和脂类的第三大固体组分,受到了越来越多的重视。

研究表明, HMOS具有多种生理功能。在到达大肠的过程中, HMOS可以竞争性抑制病原微生物与肠道上皮粘膜细胞的表面糖蛋白或糖脂结合,或影响肠道上皮粘膜细胞的多糖表达,减少病原微生物与肠道上皮粘膜细胞间的亲合力,从而减少感染的发生^[1]。HMOS可有效促进肠道有益菌群(如双

歧杆菌、乳酸杆菌和拟杆菌)的增殖,间接抑制有害菌群生长,以维持肠道微生态平衡,从而保护婴儿肠道免受致病菌侵袭,而且还具有促进婴儿肠道局部和全身免疫系统成熟的作用^[2]。小部分HMOS可穿过小肠上皮细胞进入血液,发挥免疫调节因子的作用,从而减轻免疫应激反应和预防慢性炎症^[3]。另外,也有研究指出HMOS参与人脑组织中神经节苷脂和糖蛋白构成的唾液酸(N-乙酰神经氨酸, Neu5Ac),在母乳中主要是以低聚糖的形式存在,与神经突触和神经传导关系密切,能促进婴儿的认知发育、增强学习和记忆能力^[4]。另外, HMOS不能被婴幼儿小肠的内源性酶消化,几乎完整地到达大肠。

研究HMOS必须解决的关键问题是灵敏和可定量的检测方法。法国科学家 Michel Polonowski 和 Albert Lespagnol 开启了 HMOS 检测的研究。1930年,首次发现了乳寡糖(gynolactose),之后在1954年两人又首次发现了两种HMOS(2'-岩藻糖基乳糖和3-岩藻糖基乳糖)^[5]。1981年, Heinz Egge首次将快原子轰击质谱(fast atom bombardment-mass spectrometry, FAB-MS)用于HMOS的检测^[5]。但HMOS的检测直到现在还存在着诸多的挑战。本文

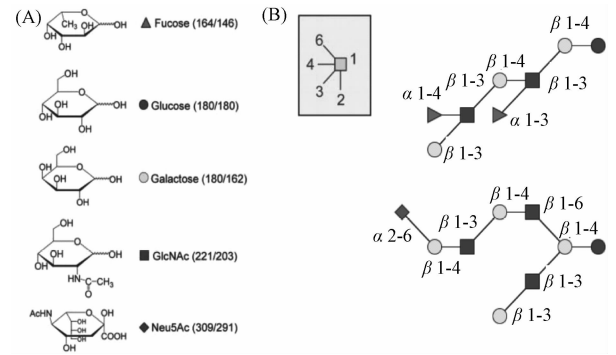
收稿日期:2015-10-20
基金项目:国家科技支撑计划(2012BAD33B05);北京市科学技术研究院青年骨干计划(201527)
作者简介:朱婧 女 助理研究员 研究方向为食物营养与功能评价
E-mail:juerl20@hotmail.com
通信作者:杨月欣 女 研究员 研究方向为食物营养
E-mail:xyyang@263.net

拟对 HMOS 的检测方法的研究进展进行综述。

1 HMOS 的结构及分类

HMOS 由 3 ~ 14 个单糖组成,为直链或支链结构,目前已发现超过 200 种结构,均在核心结构的基础上变换而来。如图 1 所示,核心结构有 5 种基本单体:*N*-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc),*L*-岩藻糖(Fuc),*D*-葡萄糖(Glc),*D*-半乳糖(Gal)和 *N*-乙酰神经氨酸(唾液酸,Neu5Ac)。核心结构通常还原端为乳糖基[Gal(β 1-4)Glc],在 Gal 非还原端通过 β 1-3 键与 GlcNAc 连接(I 型)或 β 1-4 与 GlcNAc 连接(II 型),核心结构进一步通过 α 1-2 或 α 1-3 或 α 1-4 键与 Fuc 残基连接和(或)通过 α 2-3 或 α 2-6 键与 Neu5Ac 残基连接^[6]。

HMOS 通常可分为 2 类:(1)中性 HMOS 的末端为 Fuc;(2)酸性 HMOS 的末端通常为 Neu5Ac,另外,研究还发现了 3 种酸性 HMOS 的末端为硫酸基^[7]。



注:A 为 5 种基本单体的结构及图例;B 为 HMOS 的糖苷键及示例

图 1 HMOS 结构示意图

Figure 1 Structures of HMOS

2 HMOS 的基因多态性

HMOS 是在乳腺内通过糖基转移酶的作用合成的,而糖基转移酶的种类由基因类型决定。HMOS 的基因多态性主要体现在连接岩藻糖基的化学键的多态性,与 2 个编码岩藻糖基转移酶的基因有关:*Lewis* 基因和 *Secretor* 基因。*Lewis* 基因编码岩藻糖基转移酶-3(fucosyltransferase 3,FUT3),该酶可将岩藻糖通过 α 1-3 和 α 1-4 键与核心结构连接;*Secretor* 基因编码岩藻糖基转移酶-2(fucosyltransferase 2,FUT2),该酶可将岩藻糖通过 α 1-2 键与核心结构连接。*Lewis* 基因和 *Secretor* 基因均有显性基因(*Le*,*Se*)和隐性基因(*le*,*se*),产生 4 种母乳类型,见表 1。*Thurl* 等^[8]研究发现,通过检测母乳中 14 种中性 HMOS(连接岩藻糖基的化学键包含了 α 1-2、 α 1-3 和 α 1-4 键 3 种类型)进行基因多态性的判断,与血清

凝集反应检测基因多态性的判断相比,结果一致。并且,Type 3 的母乳中性 HMOS 的含量明显高于 Type 4,Type 1 和 Type 3 的中性 HMOS 含量无明显差异,表明主要影响母乳中性 HMOS 含量的基因是 *Secretor* 基因。研究表明,*Secretor* 基因显性表达的母亲的婴儿能够抵御弯曲杆菌和环状病毒导致的腹泻。成人的 *Secretor* 基因显性表达与肠道微生物的多样性和组成有关,并且对于乳糜泻有一定的保护作用^[9]。

表 1 调控基因与母乳类型

Table 1 Gene and milk type

<i>Lewis</i> 基因	<i>Secretor</i> 基因	母乳类型	连接岩藻糖基的化学键
<i>Le</i> /-	<i>Se</i> /-	Type 1	通过 α 1-2、 α 1-3 和 α 1-4 键
<i>Le</i> /-	<i>se</i> / <i>se</i>	Type 2	通过 α 1-3 和 α 1-4 键
<i>le</i> / <i>le</i>	<i>Se</i> /-	Type 3	通过 α 1-2 和 α 1-3 键
<i>le</i> / <i>le</i>	<i>se</i> / <i>se</i>	Type 4	通过 α 1-3 键

注:-表示基因隐性表达

3 HMOS 的检测

由于母乳中含有大量的脂肪和蛋白质,HMOS 又是复杂的混合物,结构多样,包含多个同分异构体,且没有内在的发色团,使得 HMOS 的定性和定量检测都存在不小的难度。HMOS 的定性和定量检测均需先进行样品前处理和不同组分的分离,之后再分别进行定性分析(组成轮廓分析、结构分析)和定量分析。

3.1 HMOS 检测的样品前处理

对 HMOS 进行检测,通常首先需要去除母乳中的脂肪和蛋白质。目前研究中用到的去除脂肪和蛋白质的方法可分为以下几种原理和形式:①离心/沉淀:HMOS 具有亲水性,离心分离水油层可去除脂肪,再加入乙醇使蛋白质沉淀可去除蛋白质;②超滤:HMOS 的分子小且溶于水可通过超滤膜,而蛋白质和脂肪等大分子不能通过;③液/液萃取:采用氯仿-甲醇溶液萃取脂肪并使蛋白质变性沉淀,从而获得不含脂肪和蛋白质的上清液;④乙腈提取:在母乳中加入乙腈,HMOS 可溶于乙腈,脂肪不溶于乙腈,蛋白质被乙腈沉淀,从而得到不含脂肪和蛋白质的上清液。如 *Stahl* 等^[10]和 *BAO* 等^[11]采用第①种方式,*Sakaguchi* 等^[12]采用了第②种方式,*Ninonuevo* 等^[7]采用了第③种方式,*Galeotti* 等^[13]采用了第④种方式。

去除脂肪和蛋白质后,得到的 HMOS 溶解液还可以进一步的纯化,去除盐和化学试剂等影响检测的物质。如采用无孔石墨化碳进行纯化,可去除盐、单糖、洗涤剂、蛋白质(包括酶)、化学试剂等影响检测的物质^[14]。另外,对于微量的样品,现在还

发展出商品化 Spin Column、Prep Tip 和 Zip Tip 等纯化柱,大大提高了纯化的效率。

3.2 HMOS 的组成轮廓分析

HMOS 的组成轮廓分析均采用质谱 (MS) 进行。按分析器种类,目前常应用于 HMOS 组成轮廓分析的质谱有飞行时间质谱 (TOF-MS) 和傅里叶变换离子回旋共振质谱 (FTICR-MS), TOF-MS 的特点是质量范围宽,扫描速度快,分辨率较低 (可达 2 万), FTICR-MS 的分辨率可高达 100 万,但价格昂贵;按离子源不同,常用的有基质辅助激光解析电离 (MALDI) 和电喷雾电离 (ESI), MALDI 的质量检测精度和灵敏度较高,如在同一台 TOF-MS 上应用, MALDI 比 ESI 的分辨率可高出 1 倍多。

1994 年, Stahl 等^[10] 首先采用基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 法检测了中性和酸性 HMOS 的组成轮廓。在正离子模式下,以 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 及 2-羟基-5-甲氧基苯甲酸为基质,检测到 40 种中性 HMOS 碎片,还分别采用正离子和负离子模式,以 DHB 或 3-氨基喹啉为基质检测了酸性 HMOS 碎片。Blank 等^[15] 以 2-硫代-6-氮胸腺嘧啶 (ATT) 为基质,采用 MALDI-TOF-MS 对不同 Lewis 型的 HMOS 进行高通量指纹图谱分析,中性 HMOS 的钠盐和钾盐可在正离子模式下检测到,酸性 HMOS 以脱质子离子在负离子模式下可检测到,在此方法下,93.8% 的观察样本可被正确分入对应的 Lewis 型。

WU 等^[16-17] 采用纳米液相色谱-多孔石墨化碳-芯片系统-飞行时间质谱 (nano LC-PGC-chip-TOF-MS) 以 ESI 为离子源检测到 200 个 HMOS 结构。

Ninonuevo 等^[7] 和 Locascio 等^[18] 采用基质辅助激光解析/电离傅里叶变换离子回旋共振质谱 (MALDI-FTICR-MS), 以 DHB 为基质,可快速检测和比较不同样品中的 HMOS 的组成数量和响应的相对强度。中性 HMOS 以盐形式在正离子模式下检测。这种高分辨率的方法可以对中性及酸性的 HMOS 进行快速辨识,并且还可以应用氘作为内标从而进一步地定量。

3.3 HMOS 的结构分析

核磁共振最常被用于 HMOS 结构的分析,但需要较大数量 (通常 mmol 级) 的纯化合物。Van Leeuwen 等^[19] 即采用核磁共振分析不同基因型 (Lewis 和 Secretor) 母乳样本中 HMOS 的岩藻糖的连接结构,如 α 1-2、 α 1-3、 α 1-4 键。另外,通过 ^{13}C 和 ^1H 核磁共振 (NMR) 和电喷雾质谱分析 (ESMS) 还发现了 3 种硫酸化低聚糖,其中 2 种为硫酸化八糖,1 种为硫酸化九糖,均具有 *p*-乳糖-*N*-六糖的核心结构和

不同数量和位置的岩藻糖^[7]。

MS 不能进行完全的结构分析,但可在 pmol 数量级得到 HMOS 的结构信息。传统上, HMOS 的碎片通过碰撞诱导电离 (CID) 产生,糖苷键断裂最常见,而对于确定连接信息的交叉-环型键断裂很少见,即使有,也很难确定立体构型。同时,还必须注意 CID 可能导致重新排列从而影响对结构的判断^[20]。另外,离子捕获/转移方法也可以用于 HMOS 的结构分析,电子转移电离 (ETD) 通常发生交叉-环型键断裂,从而可确定连接信息。但这种方法通常适用于较简单的化合物,在 HMOS 应用中的可靠性还不能确定^[21]。将串联 MS 和糖苷酶反应结合是一种有效地分析 HMOS 结构的方法,可得到连接和残基的信息。WU 等^[16-17] 采用该方法,阐明了 70 种中性和酸性 HMOS 的结构。

3.4 HMOS 的定量分析

HMOS 定量分析首先要求不同组分的分离。HMOS 通常是亲水的,亲水的程度与组成的单糖有关,相对而言,含有唾液酸的酸性 HMOS 的离子化程度较中性 HMOS 略高。常用的分离方法包括毛细管电泳 (CE)、液相色谱 (LC)、多孔石墨化碳 (PCG) 等。

CE 通过不同组分的荷/质比差异所导致的迁移速度不同实现分离,可应用于 HMOS 的分离,酸性 HMOS 由于唾液酸所带的负电荷,可直接实现分离;中性 HMOS 可通过加入荧光标记物的方式引入负电荷和荧光基团从而有效分离。最常用的荧光标记物为 8-氨基吡-1,3,6-三磺酸 (APTS)^[14]。

LC 根据不同组分在固定相及流动相中的吸附能力、分配系数、离子交换作用或分子大小等差异进行分离,可应用于 HMOS 的分离。常用的 LC 包括反相高效液相色谱 (RP-HPLC), 正相亲水作用液相色谱 (HILIC) 和高 pH 值阴离子交换色谱法 (HPAEC)。HMOS 需衍生后才能通过 HPLC 分离,常用的衍生方法包括甲基化、发色活性标记物标记、硼氢化钠还原等。甲基化的优势是有利于 HMOS 的稳定和分散,并可促进离子化从而增加灵敏性,缺点是增加了检测步骤,未完全甲基化的物质也会影响检出,而且对同分异构体无法区分^[22]。采用发色活性标记物可帮助 HMOS 在 HPLC 的识别,常用的发色活性标记物有 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP)、2-氨基吡啶 (PA) 和 2-氨基苯甲酸 (2-AA)、2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 等^[23]。HMOS 还可使用 HILIC 分离^[24]。HMOS 的洗脱顺序通常与单糖残基的数量有关。一些酸性 HMOS 的同分异构体可实现分离,但大量的同分异构体的分离仍然存在

问题。HPAEC 也可用于 HMOS 的分离^[25],但是不能与质谱联用,应用上存在局限性。PCG 在 HMOS 的分离中的作用被逐渐被重视,多孔石墨化碳是一种独特的固定相结构,其中碳原子以平面六边形结构紧密结合,形成大分子的多环芳香族化合物,分离机理主要取决于分离目标物的极性和形状。多孔石墨化碳色谱柱具有更好的重现性,并且可以在任何 pH 条件和流动相下使用,中性和酸性 HMOS 都可以有效分离。WU 等^[16-17]采用多孔石墨化碳分离和检测到 200 个 HMOS 结构,灵敏度较其他色谱柱提高。

质谱技术的发展促进了 HMOS 的定量分析技术的发展,但基质的影响和电离抑制使 HMOS 的定量分析也存在不少困难。混合的 HMOS 中各组分在检测中存在相互抑制,从而导致不同电离效率。如在正离子模式下中性 HMOS 会抑制酸性 HMOS,在负离子模式下酸性 HMOS 则会抑制中性 HMOS。但一般情况下,采用总离子计数的 LC-MS 可满足大多数的定量分析要求^[26]。Totten 等^[27]采用纳米液相色谱-多孔石墨化碳-芯片系统-飞行时间质谱(nano LC-PGC-chip-TOF-MS)对母乳中的总的 HMOS、岩藻糖基 HMOS、唾液酸 HMOS、非岩藻糖基中性 HMOS 等 HMOS 的绝对丰度、相对丰度进行了定量,但该方法无法得到 HMOS 的绝对含量。

要获得 HMOS 的绝对含量,仍然需要标准品和标准曲线的方法。Sakaguchi 等^[12]采用 LC-MS/MS 对 6 种酸性 HMOS 进行了定量检测,采用 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-十七氟十一胺(HFUA)对 HMOS 进行氟衍生化,根据标准曲线进行定量。BAO 等^[11]亦采用多孔石墨化碳-液相色谱-质谱/质谱(PCG-LC-MS/MS)对 11 种中性 HMOS 进行定量检测,采用硼氢化钠还原 HMOS,根据标准曲线进行定量。

对于准确度要求更高的定量分析,可采用同位素标记^[28]。HMOS 经硼氢化钠还原为醛醇并加入氘原子。在样品中加入含氘的标准品,通过质谱检测,比较氢化物和氘化物的峰值可进行定量^[29]。ZHONG 等^[30]采用氨氧基串联质谱标记物(aminoxyl TMT)对 HMOS 进行定量检测。与其他的同位素标记物相比,aminoxyl TMT 的操作更简单,标记效率更高,且增加分析的灵敏度。在标记 aminoxyl TMT 的情况下,采用在线的毛细管电泳-电喷雾电离-质谱/质谱(CE-ESI-MS/MS)对 HMOS 进行分析,可分离 HMOS 的同分异构体,并实现定量分析。

3.6 HMOS 的高通量检测

HMOS 的检测通常需要很长的时间,特别是样

品的前处理耗费很长的时间。Kottler 等^[31]采用多路复用的毛细管凝胶电泳(CGE)和激发诱导荧光(LIF),以 8-氨基吡-1,3,6-三磺酸(APTS)为荧光标记物,建立母乳中总的碳水化合物碎片(TCF)的数据库和指纹图谱,从而可以实现大量样品的定性和定量分析。Totten 等^[27]采用 96 孔板进行 HMOS 检测的前处理,包括脱脂、沉淀蛋白、醛还原、固相萃取,与传统的每个样品单独处理比较,96 孔板的处理方法可以同时处理多达 384 个样品,并且仅需要 2 天时间,而采用传统方法处理同样数量的样品需要 1 周^[7]。

4 讨论

人类母乳中所含 HMOS 的量比其他哺乳动物乳汁高 10 ~ 100 倍。牛乳中低聚糖含量很少(< 1 g/L),目前发现的惟一例外是,大象乳汁中低聚糖浓度是人类母乳的 3 倍,但其化学结构及中性或酸性成分的比例与人类母乳不同^[32]。在因为种种原因不能进行母乳喂养的孩子中,只能通过婴幼儿配方乳等进行人工喂养。但人工喂养与母乳喂养相比,存在很多不足。对母乳的研究,将有助于婴幼儿配方乳的开发。

目前,已经有超过 1 000 种的 HMOS 通过各种分析技术检测到^[31]。但是,检测的效率和定量的准确性还有待进一步地提高。目前,已有多种 HMOS 可购买到商业化的标准品,这些 HMOS 的定量检测较简单,可采用液相色谱或液相色谱质谱联用的方法进行。另一方面,检测大量样品及多种 HMOS 对检测方法提出更高要求,特别是高灵敏度、高分辨率、可重复、可信度高的高通量检测方法是发展的趋势。

另外,HMOS 的影响因素也是需要重视的。目前已有研究报道了 HMOS 的基因多态性以及不同泌乳时期对其的影响^[8],但对于不同人种、不同婴儿性别、不同膳食习惯对其的影响的研究还比较缺乏。特别对于中国人群,目前相关的研究还处于空白。

参考文献

[1] Georgi G, Bartke N, Wiens F, et al. Functional glycans and glycoconjugates in human milk [J]. Am J Clin Nutr, 2013, 98 (2) : 578S-585S.

[2] Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, et al. Breast milk : a source of *Bifidobacteria* for infant gut development and maturation [J]. Neonatology, 2007, 92 (1) : 64-66.

[3] Eiwegger T, Stahl B, Haidl P, et al. Prebiotic oligosaccharides ; in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties [J]. Pediatr Allergy Immunol,

- 2010,21(8):1179-1188.
- [4] WANG B, Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition [J]. Eur J Clin Nutr, 2003, 57(11):1351-1369.
- [5] Kunz C. Historical aspects of human milk oligosaccharides [J]. Adv Nutr, 2012, 3(3):430S-439S.
- [6] Kunz C, Rudloff S, Baier W, et al. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects [J]. Annu Rev Nutr, 2000, 20(1):699-722.
- [7] Ninonuevo M R, Park Y, YIN H, et al. A strategy for annotating the human milk glycome [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(20):7471-7480.
- [8] Thurl S, Munzert M, Henker J, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods [J]. Br J Nutr, 2010, 104(9):1261-1271.
- [9] Smilowitz J T, O'Sullivan A, Barile D, et al. The human milk metabolome reveals diverse oligosaccharide profiles [J]. J Nutr, 2013, 143(11):1709-1718.
- [10] Stahl B, Thurl S, ZENG J, et al. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. Anal Biochem, 1994, 223(2):218-226.
- [11] BAO Y, CHEN C, Newburg D S. Quantification of neutral human milk oligosaccharides by graphitic carbon high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Anal Biochem, 2013, 433(1):28-35.
- [12] Sakaguchi Y, Hayama T, Yoshida H, et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry with fluoruous derivatization method for selective analysis of sialyl oligosaccharides [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2014, 28(23):2481-2489.
- [13] Galeotti F, Coppa G V, Zampini L, et al. On-line high-performance liquid chromatography-fluorescence detection-electrospray ionization-mass spectrometry profiling of human milk oligosaccharides derivatized with 2-aminoacridone [J]. Anal Biochem, 2012, 430(1):97-104.
- [14] Simone A, Schols H A, Ellen G H M, et al. CE-LIF-MS n profiling of oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed babies [J]. Electrophoresis, 2010, 31(7):1264-1273.
- [15] Blank D, Gebhardt S, Maass K, et al. High-throughput mass finger printing and Lewis blood group assignment of human milk oligosaccharides [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 401(8):2495-2510.
- [16] WU S, Grimm R, German J B, et al. Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides [J]. J Proteome Res, 2011, 10(2):856-868.
- [17] WU S, TAO N, German J B, et al. Development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides [J]. J Proteome Res, 2010, 9(8):4138-4151.
- [18] Locascio R G, Ninonuevo M R, Kronewitter S R, et al. A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides [J]. Microb Biotechnol, 2009, 2(3):333-342.
- [19] Van Leeuwen S S, Schoemaker R J, Gerwig G J, et al. Rapid milk group classification by ¹H NMR analysis of Le and H epitopes in human milk oligosaccharide donor samples [J]. Glycobiology, 2014, 24(8):728-739.
- [20] Wuhler M, Deelder A M, Van der Burgt Y E. Mass spectrometric glycan rearrangements [J]. Mass Spectrom Rev, 2011, 30(4):664-680.
- [21] HAN L, Costello C E. Electron transfer dissociation of milk oligosaccharides [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2011, 22(6):997-1013.
- [22] Costello C E, Contado-Miller J M, Cipollo J F. A glycomics platform for the analysis of permethylated oligosaccharide alditols [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2007, 18(10):1799-1812.
- [23] Ruhaak L R, Lebrilla C B. Analysis and role of oligosaccharides in milk [J]. BMB Rep, 2012, 45(8):442-451.
- [24] Marino K, Lane J A, Abrahams J L, et al. Method for milk oligosaccharide profiling by 2-aminobenzamide labeling and hydrophilic interaction chromatography [J]. Glycobiology, 2011, 21(10):1317-1330.
- [25] Thurl S, Muller-Werner B, Sawatzki G. Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion-exchange chromatography [J]. Anal Biochem, 1996, 235(2):202-206.
- [26] Albrecht S, Lane J A, Marino K, et al. A comparative study of free oligosaccharides in the milk of domestic animals [J]. Br J Nutr, 2014, 111(7):1313-1328.
- [27] Totten S M, WU L D, Parker E A, et al. Rapid-throughput glycomics applied to human milk oligosaccharide profiling for large human studies [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(30):7925-7935.
- [28] ZHANG P, ZHANG Y, XUE X, et al. Relative quantitation of glycans using stable isotopic labels 1-(d0/d5) phenyl-3-methyl-5-pyrazolone by mass spectrometry [J]. Anal Biochem, 2011, 418(1):1-9.
- [29] Ninonuevo M R, Ward R E, LoCascio R G, et al. Methods for the quantitation of human milk oligosaccharides in bacterial fermentation by mass spectrometry [J]. Anal Biochem, 2007, 361(1):15-23.
- [30] ZHONG X, CHEN Z, Snovidia S I, et al. Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry for quantitative analysis of glycans labeled with multiplex carbonyl-reactive tandem mass tags [J]. Anal Chem, 2015, 87(13):6527-6534.
- [31] Kottler R, Mank M, Hennig R, et al. Development of a high-throughput glycoanalysis method for the characterization of oligosaccharides in human milk utilizing multiplexed capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. Electrophoresis, 2013, 34(16):2323-2336.
- [32] Osthoff G, Dickens L, Urashima T, et al. Structural characterization of oligosaccharides in the milk of an African elephant (*Loxodonta africana africana*) [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008, 150(1):74-84.