

## Focusing Review

## 糖鎖，糖ペプチドの HILIC 分離分析

出口喜三郎\*

## HILIC separation of glycans and glycopeptides

Kisaburo Deguchi \*

*Analytical Systems Design Department, Hitachi High-Technologies, Co.**882Ichige, Hitachinaka, Ibaraki,312-8504,Japan**Received for review June 13, 2008. Accepted August 9, 2008.***Abstract**

Glycosylation is one of the most common post-translational modifications of proteins. It is related to numerous biological processes. N and O-glycans attached to proteins make up some of the most complex and challenging samples for chromatography because of the structural diversity of glycans (composition, sequence, anomeric character, linkage position, and branching pattern) and, as a result, the existence of many isomers. This review addresses the recent progress of the separation of glycans and glycopeptides, focusing on hydrophilic interaction chromatography (HILIC) and simply discusses the retention mechanism of neutral and sialylated glycans on a ZIC-HILIC column

*Keywords:* glycans, glycopeptides, HILIC separation, ZIC-HILIC column, mass spectrometry

**1. はじめに**

1906年、Twett がシンプルでかつパワーフルなクロロフィルの分離手段として考案したのは、今で言う順相クロマトグラフィーであった。しかし、1970年代に高性能シリカ ODS カラムが開発されて以来、逆相クロマトグラフィーは極性の有無に関わらず広範囲の化合物の分離分析に利用されるようになってきた。また、イオンペア剤を用いることにより、イオン性化合物の分離分析にも広く用いられている。最近、10-40%の水系順相クロマトグラフィーに対して名付けられた HILIC (hydrophilic interaction chromatography) [1, 2] が、生体由来の親水性化合物の分離分析において見直されている。その理由の一つは、選択的で高感度な質量分析計 (MS)

が HPLC の検出器として次第に普及してきたことによる。水系溶離液は酸化し難く、また、塩やイオンペア剤などは目的化合物のイオン生成を著しく阻害する。揮発性の有機溶媒比率が高く、高濃度の塩やイオンペア剤を必要としない HILIC は、ESI (electrospray ionization)-MS にとって相性が良いからである。

本来、逆相モードと順相/HILIC モードは相補的な (orthogonal) 関係にあり、生体由来の複雑な親水性化合物の分離分析では、HILIC モードが適している場合もある。例えば、酸性および塩基性代謝物、オリゴ核酸、オリゴ糖、糖ペプチド、リン酸化ペプチドなどはその典型的な化合物といえる。一方、HILIC 分離カラムにおいても、シリカ、アミン、アミ

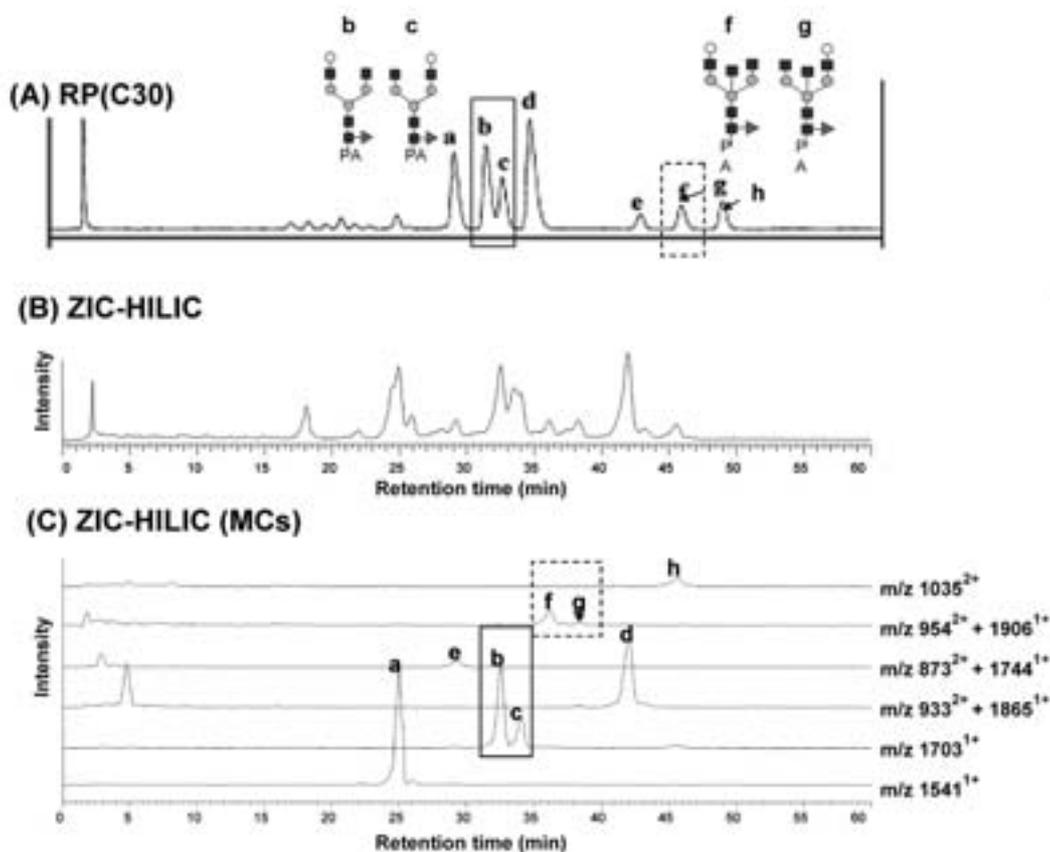
\*株式会社日立ハイテクノロジーズ那珂事業所分析システム設計部  
〒312-8504 茨城県ひたちなか市市毛882番地  
電話：029-354-6190  
FAX：029-272-2175  
E-mail: deguchi-kisaburp@naka.hitachi-hitec.com

ド系の従来カラムに加えて、ポリアミン、ポリアクリル酸、ポリビニル、シクロデキストリン、両イオン性カラムなどが市販され、その応用も次第に拡大しつつある。詳細は Hemström と Irgum の最近のレビュー論文 [3] に、応用例と共によく纏められている。本レビューでは、一部重複する部分もあるが、N (アスパラギン) および O (セリン/スレオニン) 結合型糖鎖と糖ペプチドの分離分析に焦点を当てながら、最近の研究を紹介したい。

## 2. 糖鎖の HILIC 分離

糖鎖の HILIC 分離は古く、アミノプロピル基で修飾されたシリカゲルによる分離が1975年に報告されている [4]。また、Alpert らは、遊離および誘導体化糖鎖を用いて、HILIC 分離のメカニズム (液-液分配) を議論した [2]。しかし、多くの立体および構造異性体を持つ糖鎖の系統的な分離には、逆相 (ODS) カラムと HILIC (アミド) カラムを組み合

わせた、いわゆる、2次元クロマトグラフィーが必要である [5-7]。Takahashi 等は保持インデックス (直鎖状オリゴ糖鎖との相対的保持時間) に基づく糖鎖分析法 (2D 糖鎖マッピング法と呼ばれている) を確立し、更に、弱イオン交換 (DEAE) カラムをも組み合わせた 3D マッピング法へと発展させた [8, 9]。3D 糖鎖マッピング法は、シアリル糖鎖を含めた 2-アミノピリジル誘導体化 (PA) N 結合型糖鎖の系統的分離分析法であり、500種ほどの糖鎖保持インデックスデータはインターネット上で公開されている (<http://www.glycoanalysis.info/ENG/index.html>) [10]。一方、Rudd 等は、2-アミノベンズアミド誘導体化 (AB) N および O 結合型糖鎖の 2次元 (弱イオン交換 (DEAE) と HILIC (アミド) カラム) クロマトグラフィー分離の保持インデックスと  $MS^n$  ( $n=1, 2$ ) スペクトル情報のデータベースを利用した方法を開発している [11, 12]。逆相 (ODS) カラムでの分離分析を  $MS^n$  スペクトル情報で代用することになるが、異性体



**Figure 1.** Comparison of RP (C30) and ZIC-HILIC separations of PA N-glycans of human serum IgG.

(A) Develosil C30-UG column (150 x 2.0 mm, 3  $\mu$ m) was used at the flow rate 200  $\mu$ L/min and the linear gradient elution: A/B = 87/13 (0 min)  $\rightarrow$  64/36 (60 min) where eluents A and B were 1mM ammonium acetate buffer pH 4.3 and 10% acetonitrile in 1mM ammonium acetate buffer pH 4.3, respectively. The indicated peaks are (a : 200.4, b : 210.2, c : 210.3, d : 210.4, e : 201.4, f : 211.2, g : 211.3, h : 211.4) (the nomenclatures of Takahashi [10]). (B) ZIC-HILIC column (2.1 x 150 mm, 5  $\mu$ m) was used at the flow rate 0.2 mL/min and the linear gradient elution was A/B = 33/67 (0 min)  $\rightarrow$  50/50 (60 min) where eluents A and B were 50% acetonitrile containing 20 mM ammonium acetate and 90% acetonitrile containing 20mM ammonium acetate, respectively. Fluorescence (FL) wavelengths used in (A) and (B) were Ex : 320nm and Em : 400nm. (C) Mass chromatograms (MCs) of molecular ions  $[M+zH]^{z+}$  ( $z=1, 2 ; m/z \pm 1$ ) of the major eight peaks (a-h) in the ZIC-HILIC separation (B). It is noted that the isomeric PA N-glycans f and g are well separated.

の識別に MS<sup>2</sup> スペクトル情報だけでは十分でない場合もある [13, 14]。もちろん、その逆、即ち、ODS とアミドカラムで全ての糖鎖異性体を分離できる訳でもない。より効率的に糖鎖異性体を分離する新しいカラム (例えば、ポーラスグラファイトカーボン (PGC) [15–18] やシクロデキストリンカラム [19], 種々の HILIC モノリスカラム [20]) の開発はこれからも続いていくだろう。

最近、我々は、陰および陽イオン同時分析に用いられてきた両イオン性 (ZIC: zwitterionic interaction chromatography) カラム [21–23] が、HILIC モードで糖鎖異性体に対して高い構造認識能を持っていることを見出した [24]。Fig. 1 は、ヒト IgG (免疫グロブリン G) タンパク質由来の中性 PA-N 結合型糖鎖を逆相 (C30, 野村化学社製) および ZIC-HILIC (SeQuant 社製) カラムで分離したクロマトグラムを示している。使用した装置は日立 M-8000 3DQ LC-MS (SSI (sonic spray ionization) 付きイオントラップ型 MS) システムである。逆相 (C30) カラム (Fig. 1 A) では、異性体 b, c は分離されているが、バイセクティング GlcNAc (N-アセチルグルコサミン) が付加した異性体 f, g は分離されない。一方、ZIC-HILIC カラム (Fig. 1 B) では、マスクロマトグラム (Fig. 1 C) から分かるように、異性体 b, c および異性体 f, g とともにそれぞれよく分離されている。Fig. 1には示していないが、従来の HILIC (アミド) カラムでも異性体 f, g は分離し難いものである。

ヒト IgG タンパク質の中性 PA-N 結合型糖鎖は16種類 (最近、我々はもう一種類あることを報告した [25]) と少ないが、ヒト血清由来の中性、酸性 (シアリル) N 結合型糖鎖は30種以上報告されている [26, 27]。これら全てを一種類のカラムで分離することはできない。上で述べたように、3次元クロマトグラフィーが必要になる。即ち、弱イオン交換 (DEAE) カラムで中性および種々のシアリル糖鎖を分離、分取し凍結乾燥した後、再度溶解して次の分離モード (通常、逆相) に移行する (第1ステップ)。同様に、逆相から HILIC 分離へと移行する (第2ステップ)。特に、第2ステップでは、逆相と HILIC 溶離液の非互換性 (アセトニトリルの濃度の大きな違い) により、オフライン処理 (凍結乾燥と再溶解) が必須となる [8, 9]。一方、複雑なプロテアーゼ消化物を対象とするプロテオミクスの分野では、陽イオン交換 (SCX) カラムと逆相 (ODS) カラムを直列に組み合わせたオンライン2次元クロマトグラフィー (MudPIT 法) が良く用いられている [28, 29]。同様に、DEAE と HILIC カラムによるオンライン2次元クロマトグラフィーも可能である (2D HILIC と呼ぶ) [30]。ヒト血清 PA-N 結合型糖鎖の分離分析に適用した結果を Fig. 2 A に示す。高い塩 (500mM 酢酸アンモニウム) 濃度の溶離液の定期的なスパイクとその後の HILIC 溶出を繰り返すことにより、中性、モノ、ジ、トリ、テトラシアリル糖鎖が順次 DEAE カラムから溶出し、ZIC-HILIC カラムで分離されている。Fig. 2 B はシアリル糖

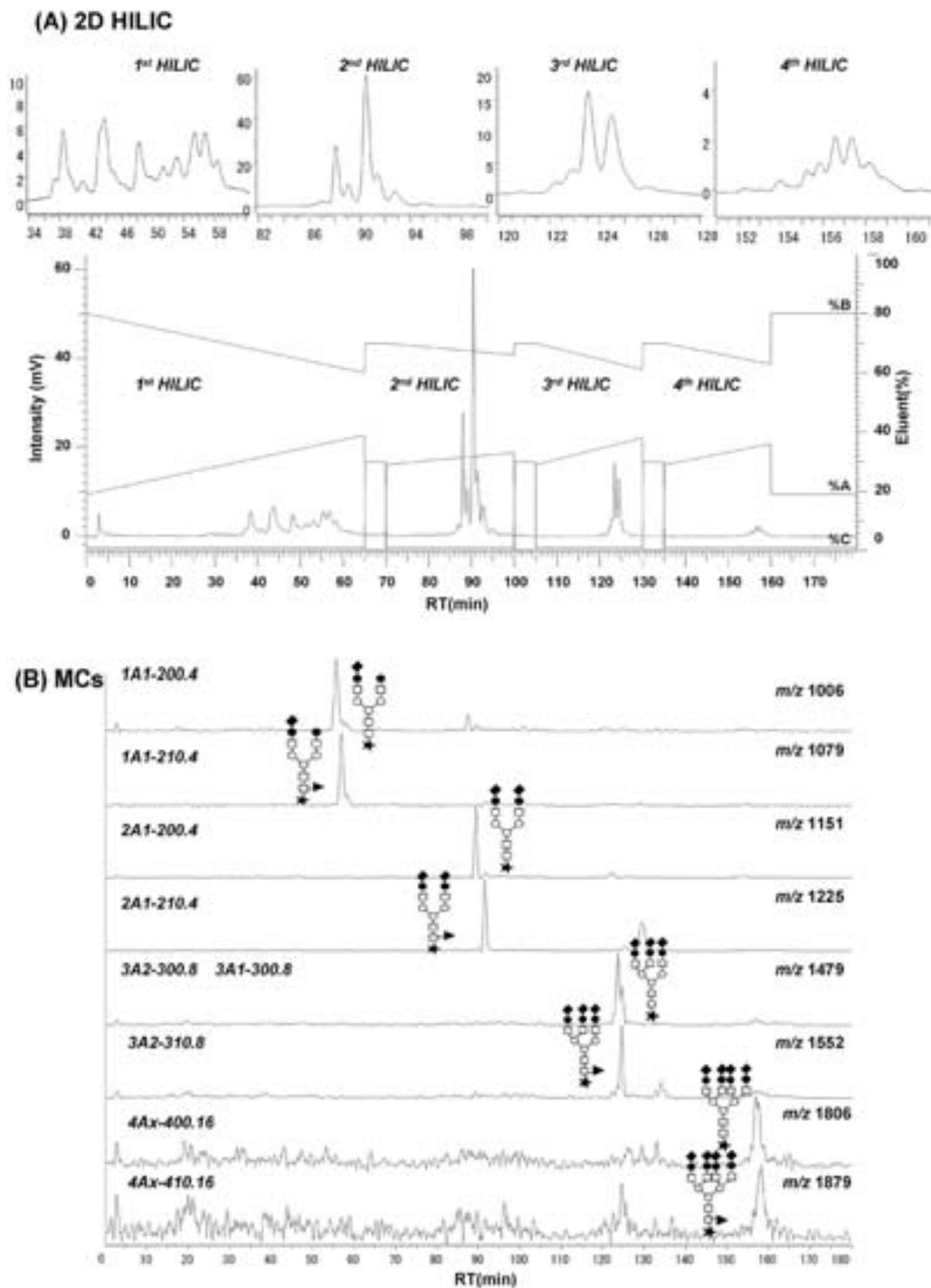
鎖をマスクロマトグラムで確認したものである。

Kondo 等は、アミノカラムのみを用いて中性、酸性 (シアリル) PA-N 結合型糖鎖を順次分離できることを示した [31]。アミノカラムが持つ HILIC とイオン交換モードを巧みに利用したものである。通常、水系のイオン交換クロマトグラフィーで使用される DEAE や ZIC-HILIC カラムを HILIC モードで用いた上記の 2D HILIC も同じ考えに基づいている。このように静電相互作用によるイオン交換、イオン排除効果を巧みに利用できるのも HILIC の特徴といえる。最近、Alpert は、イオン排除効果を利用した HILIC を ERLIC (electrostatic repulsion hydrophilic chromatography) と呼ぶことを提案している [32]

### 3. 糖ペプチドの HILIC 分離

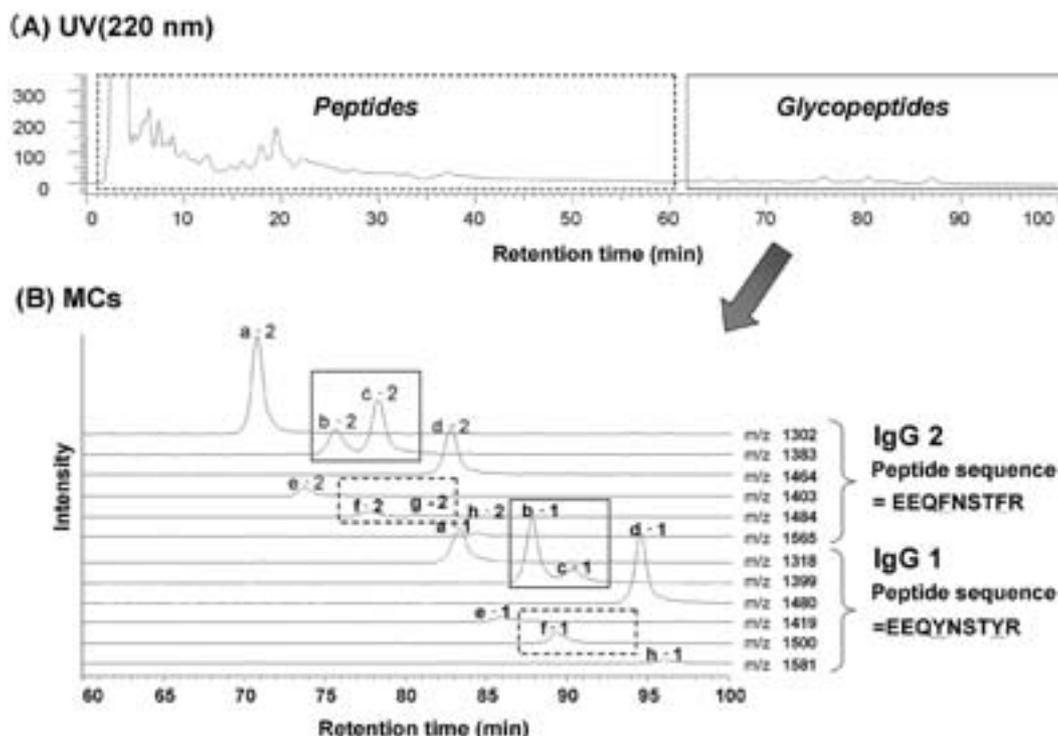
MS<sup>n</sup> (n = 1, 2) スペクトル情報とタンパク質やゲノムデータベース検索に基づくプロテオミクスは方法論的には、ほぼ確立された感がある。しかし、ダイナミックレンジで 10<sup>6</sup>~<sup>8</sup>も異なる何十万とも知れぬタンパク質やその酵素消化物をそのまま MS<sup>n</sup> 解析することは不可能であり、何らかの選択的な分離、精製、濃縮手段との組み合わせが必要となる。例えば、リン酸化や糖鎖修飾タンパク質の分離には金属やレクチン固定化アフィニティクロマトグラフィーが利用されている [33–35]。タンパク質の60%以上は糖鎖修飾されていると言われており、結合している糖鎖も一様ではない。即ち、1種類の糖タンパク質を酵素消化した場合、糖鎖部が異なる多種類の糖ペプチドが得られる。また、各糖ペプチド量は元の糖タンパク質より、さらに微量となる。従って、より高い選択的捕集や分離精製、より高感度な NanoLC-MS や CE-MS が必要となる [36–38]。

糖ペプチド解析の分野においても、ODS カラムによる逆相クロマトグラフィーが一般的に使用されている。しかし、糖タンパク質の酵素消化物を ODS カラムで分離する場合、親水性の大きな N 結合型糖ペプチドは保持が弱く分離が難しい。また、保持されても、糖鎖修飾されていないペプチド (以下、ペプチドと呼ぶ) と一緒に溶出してくる。もし、これらペプチドが多量に存在するならば、糖ペプチドのイオン化は阻害され、MS 検出が一層難しくなる。これらの問題を解決するために、Ohta らは、ODS カラムにおいて、塩の濃度が小さい溶離液では糖ペプチドが早く溶出し、ペプチドは遅く溶出することに着目して、糖ペプチドを分離分析する方法を提案した [39, 40]。一方、Wada らは、セファローズビーズを用いて糖ペプチドを選択的に捕集、回収した後、ODS カラムで分離分析を行っている [41, 42]。この HILIC モードでのセファローズビーズによる捕集回収率は40%程度であるが、Kaji らは、レクチンアフィニティカラム精製と組み合わせることにより糖タンパク質の同定率が向上することを報告している [35]。もう一つの方法は、HILIC カラムの応用である。HILIC カラムでのペプチド分離の報告は多いが



**Figure 2.** Chromatograms of PA N-glycans from human serum proteins obtained by 2D HILIC method coupling DEAE and ZIC-HILIC columns.

(A) Fluorescence (Ex : 320 nm and Em : 400 nm) chromatogram .(B) Extracted mass chromatograms (MCs) of sialylated PA N-glycans. The corresponding integer  $m/z$  values of doubly protonated ion  $[M+2H]^{2+}$  are indicated on the right side and their nomenclatures of Takahashi [10]are indicated on the left side. The two columns (TSKgel DEAE-5PW (75 x 2 mm, 5  $\mu$ m) and ZIC-HILIC (150 x 2.1 mm, 5  $\mu$ m)) were connected in series. The linear gradient and spiked-salt (bold type) elutions used were : A/B/C : 19/80/1-39/60/1 (0-65 min), **0/70/30 (65-70min)**, 29/70/1-33/66/1 (70-100 min), **0/70/30 (100-105 min)**, 29/70/1 -38/61/1 (105-130 min), **0/70/30 (130-135 min)**, and 29/70/1-39/60/1 (135-160min), where eluents A, B, and C were water, acetonitrile, and 0.5 M ammonium acetate, respectively. The flow rate was 0.2 mL/min.



**Figure 3.** ZIC-HILIC separation of tryptic peptides of human serum IgG.

(A) UV (220 nm) chromatogram. (B) Mass chromatograms (MCs) of molecular ions  $[M+zH]^{z+}$  ( $z=2$ ;  $m/z\pm 1$ ) of major N-glycopeptides of IgG1 (a-1-h-1) and IgG2 (a-2-h-2) over 60-100 min. The amino acid sequences of peptides IgG1 and IgG2 are shown on the right side and a-h mean the same N-glycans as those in Figure 1. The ZIC-HILIC separation was performed by using a flow rate of 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  and the linear gradient elution: A/B/C=36/59/5 (0min) $\rightarrow$ 64/31/5 (120 min) where eluents A, B and C were 50% acetonitrile, acetonitrile, and 100 mM ammonium acetate, respectively.

[1-3, 43, 44], 糖ペプチドを分離分析した報告はあまり多くはない [45, 46]。

Fig. 3 はヒト IgG タンパク質のトリプシン消化物を ZIC-HILIC カラムで分離したものである [24]。UV (Fig. 3 A) およびマスクロマトグラム (Fig. 3 B) から分かるように、ペプチドは早く溶出し、親水性の大きい糖ペプチドは強く保持されて溶出している。つまり、糖ペプチドを選択的に分離し分析することが可能である。マスクロマトグラム (Fig. 3 B) は、異なるペプチド配列の IgG 1 (EEQYNSTYR) および IgG 2 (EEQFNSTFR) に糖鎖 (a-h) (Fig. 1 参照) が結合した糖ペプチドのグラジエント溶出パターンを比較している。ここで注目すべき点は、糖ペプチド異性体 (b-1/c-1&b-2/c-2 および e-1/f-1&e-2/f-2) が、Fig. 1 C と同じように分離していることである。言い換えると、糖鎖の還元末端に結合している PA やペプチドは保持時間には影響を与えるが、分離パターン (選択係数) にはあまり影響を及ぼさないようである。

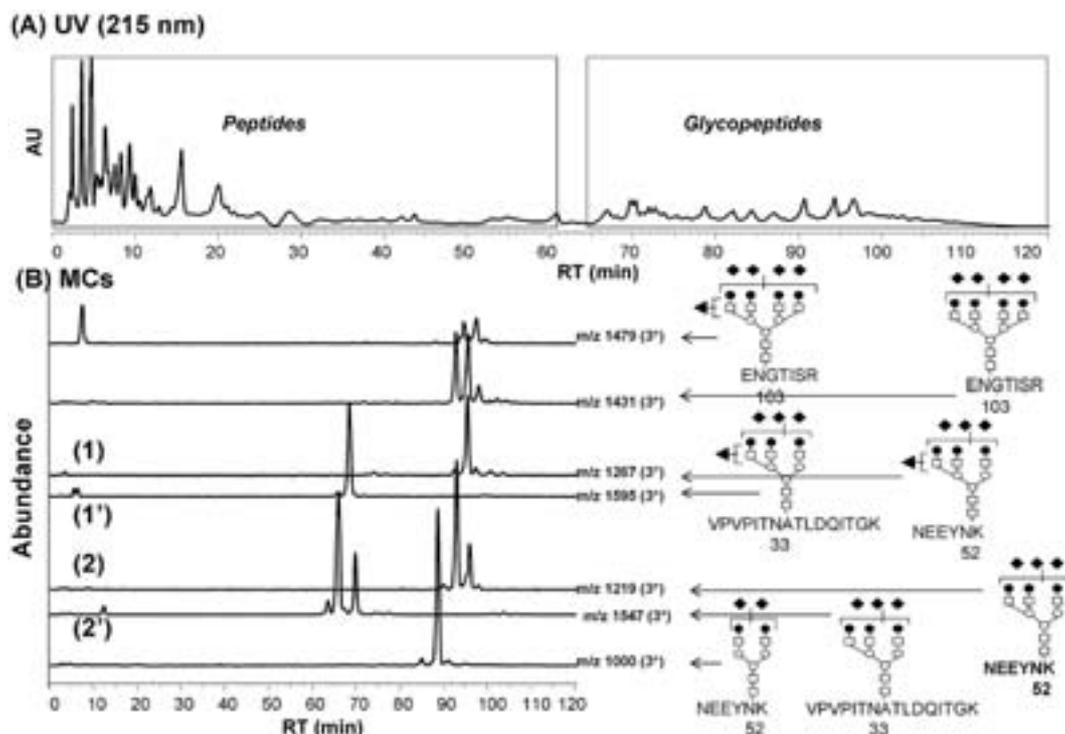
Fig. 4 は、 $\alpha$ -1 酸性糖タンパク質のトリプシン消化物を ZIC-HILIC カラムで分離したものである [47]。全ての糖鎖は 2~4 個のシアル酸を含んでおり、典型的な N 結合型酸性糖ペプチドの混合物である。また、シアル酸の結合様式 ( $\alpha$  2-3 と  $\alpha$  2-6 結合) やその結合位置から多くの異性体が存在

する。Fig. 4 A (UV クロマトグラム) は、N 結合型酸性糖ペプチドに対しても、多量に存在するペプチドからの選択的分離に、ZIC-HILIC カラムが有効であることを示している。また、Fig. 4 B のマスクロマトグラムに見られる複数のピークは、完全な同定は出来ていないが分離されたシリアル糖鎖異性体の存在を示している。

O 結合型糖鎖は N 結合型糖鎖に比べて、一般に分子量が小さいので HILIC カラムへの保持も弱い。Fig. 5 は増血ホルモンであるリコンビナントエリスロポエチン (rhEPO, 150 ng) のエンドプロテナーゼ Glc-C 酵素消化物をキャピラリー ZIC-HILIC カラム (SeQuant 社製) で分離した例である。マスクロマトグラム (Fig. 5B) から分かるように、親水性の小さい O 結合型糖ペプチド (a) は N 結合型糖ペプチド (b) より早く溶出してくるので、一部親水性のペプチドピークと重なり、上記のような完全な選択的分離は難しい。しかし、各糖ペプチド溶出部 (a, b) の MS スペクトル解析とマスクロマトグラムから、8 種の O 結合型糖ペプチドと 105 種の N 結合型糖ペプチドのプロファイリングが行えた [48]。

#### 4. HILIC 分離のメカニズム

HILIC 分離のメカニズムは、基本的には (液-液) 分配で説明されている。つまり、極性の大きいカラム表面に水の多



**Figure 4.** ZIC-HILIC separation of tryptic peptides of alpha-1-acid glycoprotein.

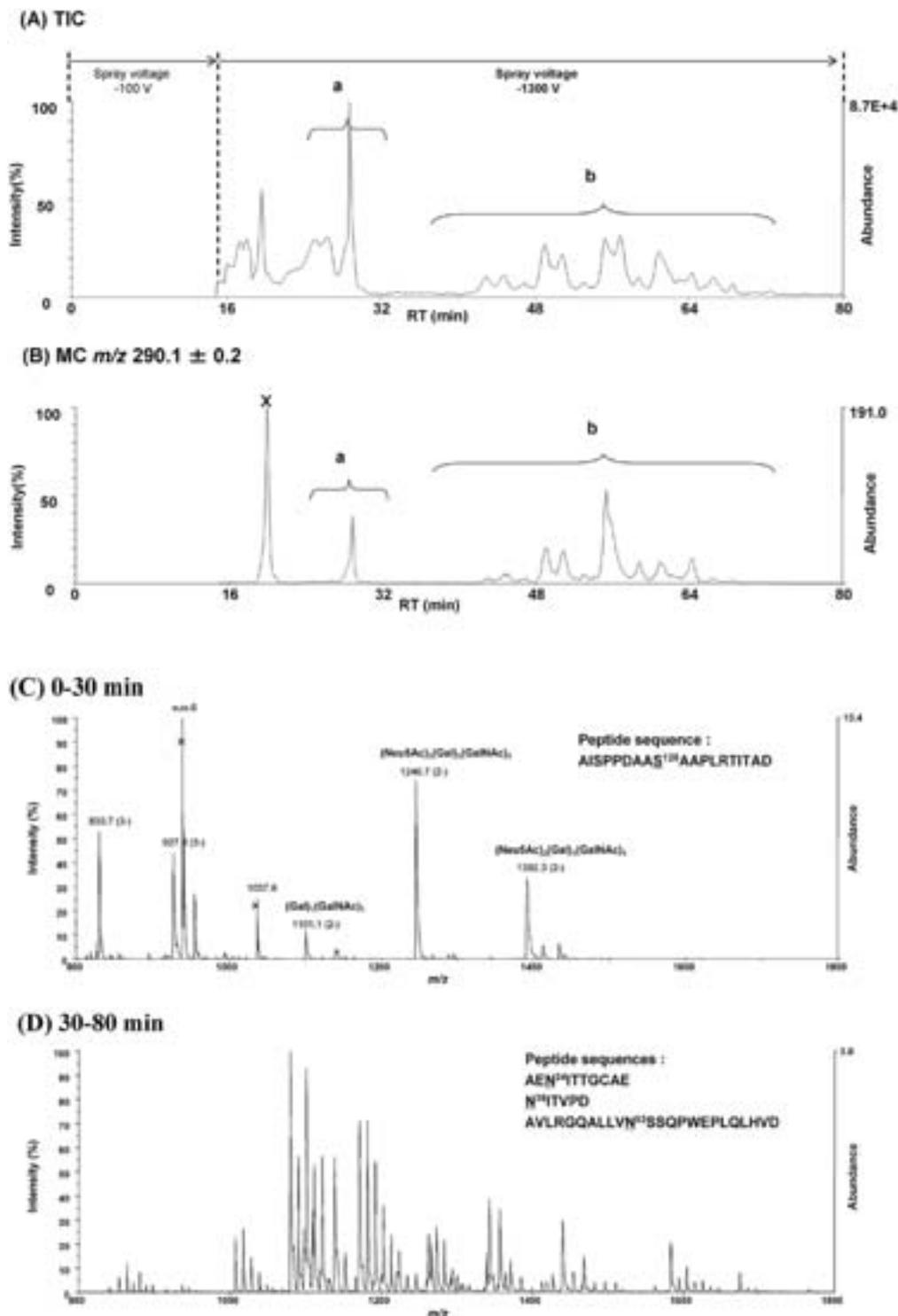
(A) UV (215 nm) chromatogram. (B) Mass chromatograms (MCs) of molecular ions  $[M-zH]^{z-}$  ( $z=3$ ;  $m/z \pm 1$ ) of major sialylated N-glycopeptides. The ZIC-HILIC separation was performed by using a flow rate of 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  and the linear gradient elution: A/B/C=36/54/10 (0min)  $\rightarrow$  54/36/10 (120 min) where eluents A, B, and C were 50% acetonitrile, acetonitrile, and 100 mM ammonium acetate (pH 6.8), respectively.

い固定相が形成され、極性の弱い移動相との間で溶質の分配平衡が成立しているとの理解である。かつて、Alpertらは、二糖 (Gal-GlcNAc と GlcNAc-Gal) のアノマーピークの溶出 (保持) 挙動の違いから、固定相への糖鎖の配向の違いも重要であると指摘した [2]。

Fig. 6 A は、ZIC-HILIC カラムでは、PA-ジおよびトリシリアル糖鎖 (b, c) の保持時間が塩 (酢酸アンモニウム) 濃度の減少 (20mM  $\rightarrow$  5 mM) に伴い早まることを示している。一方、中性糖鎖 (a) はあまり変化しない。Fig. 6 B は、酢酸アンモニウム 5mM における中性 (3 アンテナ) 糖鎖と ( $\alpha$  1-6) と ( $\alpha$  1-3) 結合シアル酸が混在するシリアル (3 アンテナ) 糖鎖の保持時間の違いを示している。Fig. 7 はこの保持挙動を説明するために提案したモデルである [47]。即ち、(液-液) 分配の他に、電解質 (塩) イオン ( $E^-$ ,  $E^+$ ) によってシールドされた静電 (特に、スルフォアルキルペタイン-シアル酸間の反発) 相互作用が保持に重要な役割を果たしていることを示している。また、トリシリアル (3 アンテナ) 糖鎖異性体において、( $\alpha$  1-6) 結合のシアル酸数が増えるに従い保持時間が遅れる (Fig. 6 B)。この挙動は、回転自由度が大きい ( $\alpha$  1-6) 結合のシアル酸は、静電反発力を弱めるようにコンフォーメーションを変えていることを示唆している。このように、HILIC の分離メカニズムは、(液-液) 分配のみならず、静電引力 (イオン交換) や静電反発 (イ

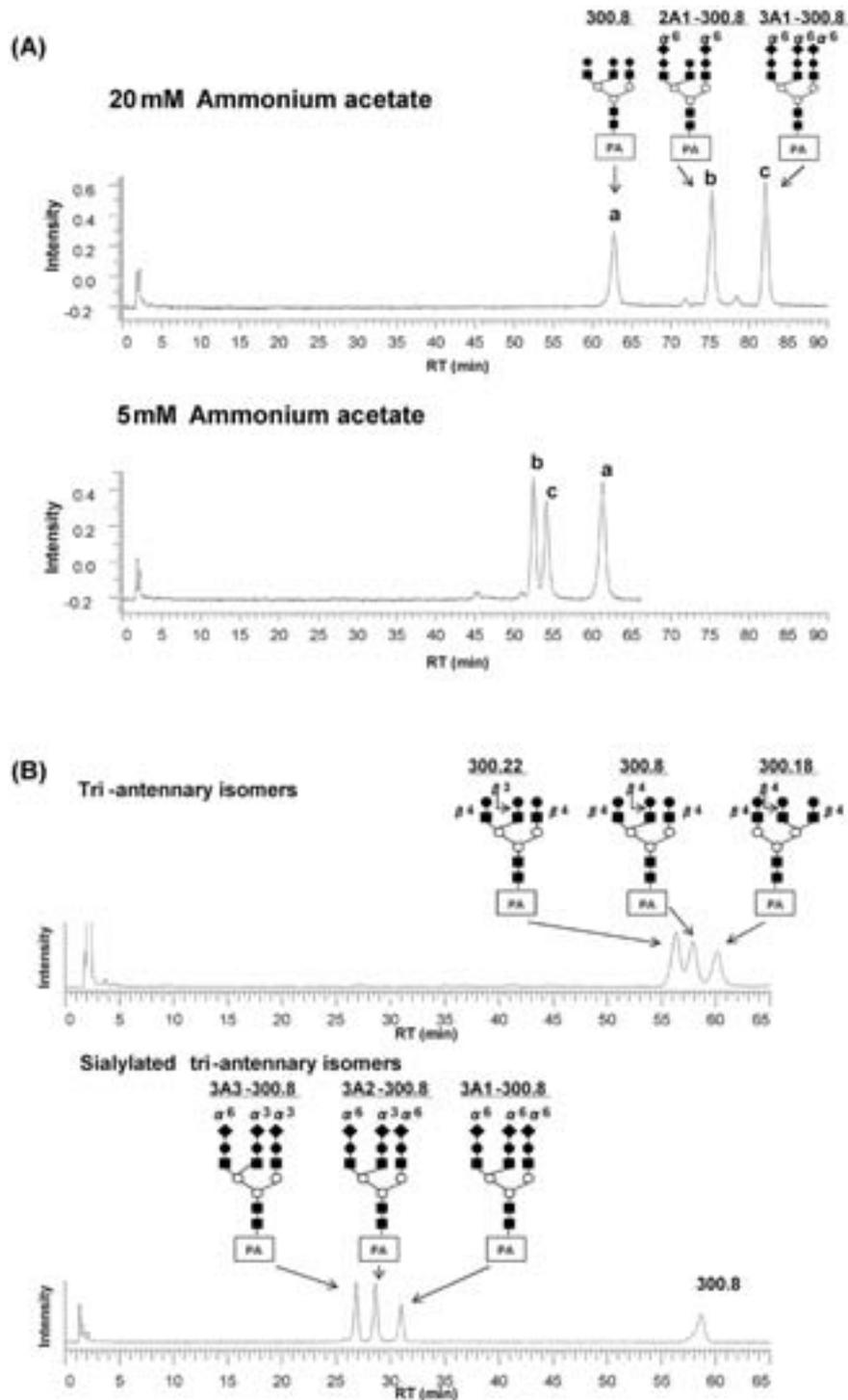
オン排除)、コンフォーメーション変化などが複雑に絡み合ったものである。従って、塩濃度、pH、温度の影響を受けやすい [31, 32, 49, 50]。しかし、このことはマイナス要因だけとは言えない。上述の異性体の構造認識能から分かるように、高い選択性や構造認識能が得られるといったプラスの効果もあるからである。

Fig. 8 は HILIC のもう一つの特徴を示している。ヒト IgG タンパク質の中性 N 結合型糖鎖を重水素置換された PA ( $d_4$ -PA) で誘導体化したものと通常の PA ( $d_0$ -PA) で誘導体化したものを (1 : 1) で混合したサンプルのクロマトグラム比較である [51]。逆相 (C30) カラムでは、 $d_4$ -PA と  $d_0$ -PA-糖鎖の保持時間に少し差があるため、2重ピークとなっている (Fig. 8 A)。この現象は比較定量プロテオミクスでは良く知られた現象で、“クロマトグラフィー重水素同位体効果”と呼ばれている [52] (そのメカニズムについては [53] を参照)。出来る限り同じイオン化条件で MS 信号強度を比較するには、2ピークは分離しないほうが望ましい。このために、保持時間差が小さいが高価な安定同位体  $O^{18}$  標識方法が勧められている [54]。一方、ZIC-HILIC カラムでの分離では、逆相 (C30) カラムより分離性能 (理論段数) が劣るとは言え、2重ピークは見られず、“クロマトグラフィー重水素同位体効果”は無視できるほどである (Fig. 8 B)。つまり、逆相 (C30) カラム (A) と異なり、ZIC-HILIC



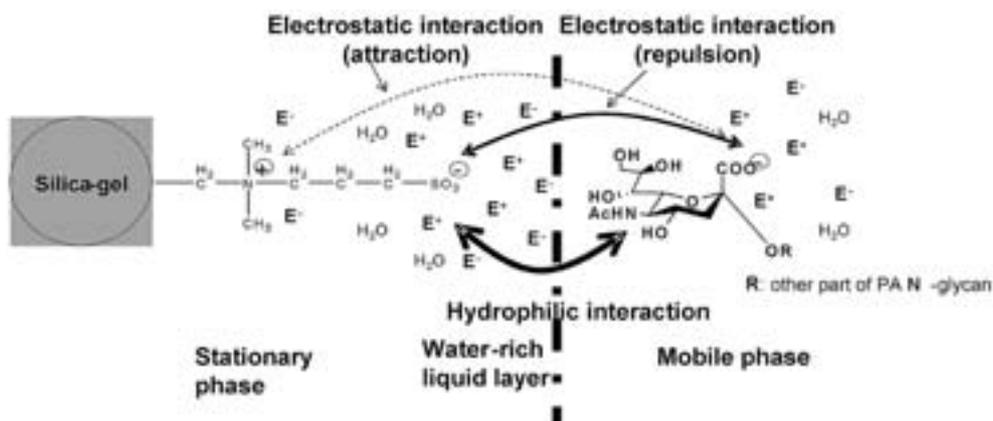
**Figure 5.** Capillary ZIC-HILIC separation of Glu-C digest of rhEPO.

(A) Total ion chromatogram (TIC). (B) Extracted mass chromatogram (MC) of  $m/z$   $290.1 \pm 0.2$  corresponding to in-source fragment ions of a sialic acid (Neu5Ac). (C) Accumulated mass spectrum in the time period a. (D) Accumulated mass spectrum in the time period b. It is seen from (C) and (D) that O- and N-glycopeptides were eluted in the time intervals indicated by a and b, respectively. The chromatograms were acquired by using a NanoFrontier L system (Hitachi High-Technologies) consisting of nanoHPLC and electrospray ionization linear ion trap time-of-flight mass spectrometer and a capillary ZIC-HILIC column (SeQuant, 150 x 0.075 mm, 5  $\mu$ m). Eluents A and B were 50% acetonitrile/10 mM ammonium acetate and 80% acetonitrile/10mM ammonium acetate, respectively. The linear gradient elution used was A/B = 30/70 (0 min) –68/32 (80 min) at the flow rate 250 nL/min. In the first 15 min, the ESI voltage was set at –100V to reduce strong ion current from nonglycosylated peptides.



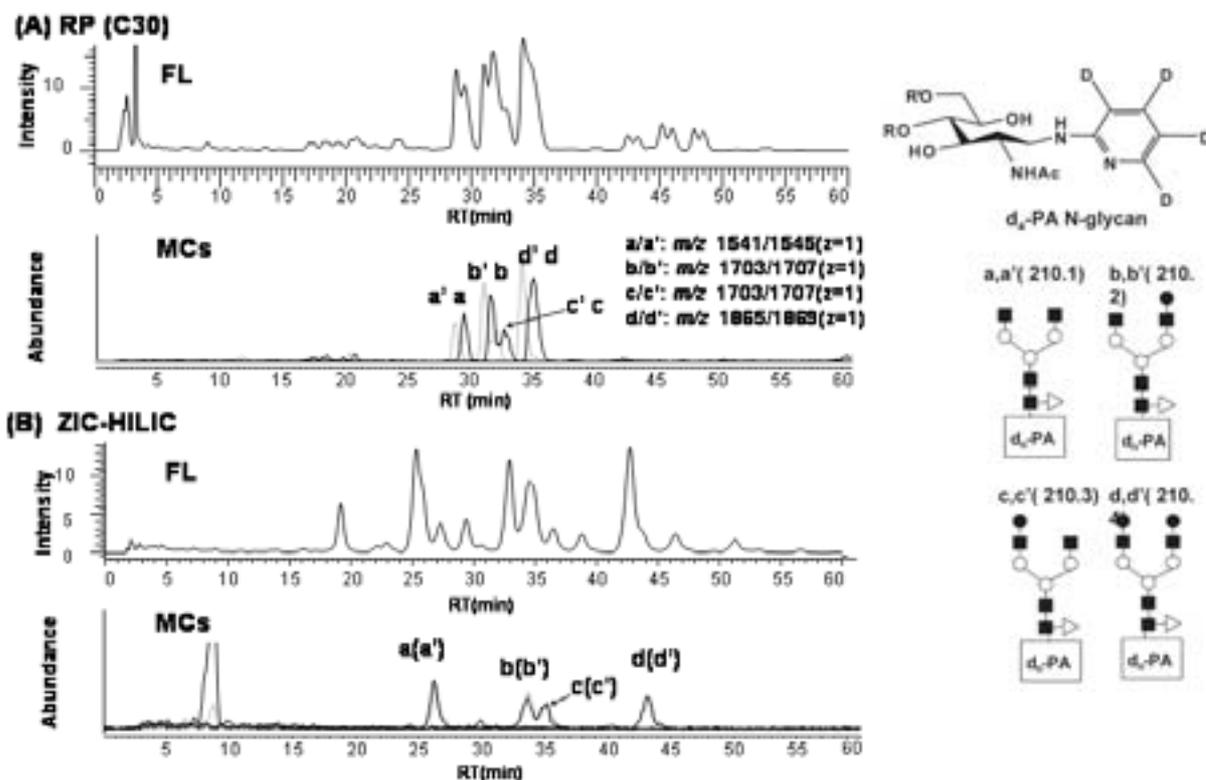
**Figure 6.** Effect of electrolyte concentration in ZIC-HILIC separations of neutral, di-sialylated, and tri-sialylated tri-antennary PA N-glycans (A) and structural recognition of tri-antennary PA N-glycan isomers (B).

(A) The linear gradient elutions were A/B/C=42/56/2 (0 min)→70/28/2 (120 min) (20 mM) and A/B/C=30/62/8 (0 min)→58/34/8 (120min) (5 mM), where eluents A, B, and C are 50% acetonitrile, 90% acetonitrile, and 250 mM ammonium acetate, respectively. The concentrations (5 mM, 20 mM) of ammonium acetate were kept constant during a run. (B) The linear gradient elution was A/B/C =36/59/5(0 min) →50/45/5 (60min) where eluents A, B, and C were 50% acetonitrile, acetonitrile, and 100 mM ammonium acetate, respectively, and the concentration of ammonium acetate as kept in the both chromatograms (Tri-antennary isomers and Sialylated tri-antennary isomers). The flow rate was 200  $\mu$ L/min. Fluorescence (FL) wavelengths were Ex : 320 nm and Em : 400 nm. The indications of N-glycans are the nomenclatures of Takahashi [10].



**Figure 7.** Schematic diagram of ZIC-HILIC interactions of sialylated PA N-glycan.

The stationary phase consists of the zwitterionic sulfoalkylbetaine and water rich liquid layer. Electrostatic (attraction and repulsion) and hydrophilic interactions between the sialic acid and the sulfoalkylbetaine group on the surface of the ZIC-HILIC column are schematically shown. E<sup>+</sup> and E<sup>-</sup> are positive- and negative-electrolyte ions (i.e., ammonium and acetate ions) in the eluent, respectively, which likely play an important role to shield the electrostatic interactions.



**Figure 8.** Chromatographic deuterium isotope effects in RP (C<sub>30</sub>) and ZIC-HILIC separations of d<sub>0</sub>-PA and d<sub>4</sub>-PA-N-glycans of human serum IgG.

(A) and (B) are FL chromatograms and superimposed MCs separated on the C<sub>30</sub> (RP) and ZIC-HILIC columns, respectively. The solid and dotted lines correspond to MCs of the d<sub>0</sub>-PA (a-d) and d<sub>4</sub>-PA (a'-d')-N-glycans, respectively. (A) : The linear gradient elution was A/B=87/13 (0 min) → 64/36 (60 min) where eluents A and B were 1mM ammonium acetate buffer pH 4.3 and 10% acetonitrile in 1mM ammonium acetate buffer pH 4.3, respectively. (B) : The gradient elution was A/B=33/67 (0 min) → 50/50 (60 min) where eluents A and B in this case were 50% acetonitrile containing 20 mM ammonium acetate and 90% acetonitrile containing 20 mM ammonium acetate, respectively. The flow rate was 200 μL /min. Fluorescence (FL) wavelengths were Ex : 320 nm and Em : 400nm. The indications of N-glycans are the nomenclatures of Takahashi [10].

(B)では疎水的なPA部は保持にあまり関わっていないといえる。重水素置換した無水コハク酸で誘導体化した糖ペプチドでも同様の挙動が見られる [51]。MS信号による定量分析において、安価な重水素置換試薬が利用できることは、HILICモードの大きなメリットといえる。

## 5. 今後の展望

表面多孔性の高耐圧充填剤の開発でスタートしたHPLCの歴史は、より微細で高性能なカラム開発と高耐圧装置の開発と共に歩んできたといえる。今また、モノリスカラム [55–57]、1.7 $\mu\text{m}$  ポーラスシリカゲル [58]、2.7 $\mu\text{m}$  表面多孔性溶融コアカラム [59] による超高速LCの時代を迎えている。プロテオーム（リン酸化や糖鎖も含む）やメタボローム解析に代表されるような複雑な生体サンプルの分離分析では、一種類の分離モードによるピークキャパシティにはおのずと限界があり、複数の分離モードを組み合わせた多次元LCとハイスループットな超高速LC-MSとの融合が必須という点では異論がないと思う。逆相モードと相補的なHILIC分離モードは、この観点からも、今後ますます重要になって行くだろう。

## 謝辞

本稿で紹介した研究は北海道大学大学院先端生命科学糖鎖精密化学研究室において行われたものである。西村紳一郎教授ならびに研究室のスタッフの皆様、(株)日立ハイテクノロジーズの技術者のご協力にたいして、心から感謝申し上げます。また、本研究は日本科学技術振興機構（JST）の先端機器技術研究開発プロジェクトの一環として行われたものである。

## References

- [1] Alpert, A. J. *J. Chromatogr.* **1990**, 499, 177–196.
- [2] Alpert, A. J.; Shukla, M.; Shukla, A. K.; Zieske, L. R.; Yuen, S. W.; Ferguson, M. A. J.; Mehlert, A.; Pauly, M.; Orlando, R. *J. Chromatogr. A* **1994**, 676, 191–202.
- [3] Hemström, P.; Irgum, K. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 1784–1821.
- [4] Linden, J. C.; Lowbead, C. L. *J. Chromatogr.* **1975**, 105, 125–133.
- [5] Hase, S.; Oku, H.; Ikenaka, T. *Anal. Biochem.* **1987**, 167, 321–263.
- [6] Hase, S. in E. F. Hounsell (Ed.), *Glycoprotein Analysis in Biomedicine*, Humana Press, Totowa, NJ, **1993**, 69–80.
- [7] Tomiya, N.; Awaya, J.; Kuroono, M.; Endo, S.; Arata, Y.; Takahashi, N. *Anal. Biochem.* **1988**, 171, 73–90.
- [8] Takahashi, N.; Nakagawa, H.; Fujikawa, K.; Kawamura, Y.; Tomiya, N. *Anal. Biochem.* **1995**, 226, 139–146.
- [9] Takahashi, N. *J. Chrom. Library: Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis* (Ed. El Rassi, Z.), Elsevier Science B. V., Amsterdam, Netherlands, **2002**, 66, 384–385.
- [10] Takahashi, N.; Kato, K. *Trends Glycosci. Glyc.* **2003**, 15, 235–251.
- [11] Guile, G. R.; Rudd, P. M.; Wing, D. R.; Prime, S. B.; Dwek, R. A. *Anal. Biochem.* **1996**, 240, 210–226.
- [12] Royle, L.; Mattu, T. S.; Hart, E.; Langridge, J. I.; Merry, A. H.; Murphy, N.; Harvey, D. J.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Anal. Biochem.* **2002**, 304, 70–90.
- [13] Kameyama, A. *Trends Glycosci. Glyc.* **2006**, 18, 323–341.
- [14] Deguchi, K. *Trends Glycosci. Glyc.* **2008**, 20, 81–95.
- [15] Koizumi, K. *J. Chromatogr. A* **1996**, 720, 119–126.
- [16] Kawasaki, N.; Ohta, M.; Hyuga, S.; Hashimoto, O.; Hayakawa, T. *Anal. Biochem.* **1999**, 269, 297–303.
- [17] Zhang, J.; Lindsay, L. L.; Hedrick, J. L.; Lebrilla, C. B. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5990–6001.
- [18] Karlsson, N. G.; Wilson, N. L.; Wirth, H.-J.; Dawes, P.; Joshi, H.; Packer, N. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 2282–2292.
- [19] Liu, Y.; Urganekar, S.; Verkade, J. G.; Armstrong, D. W. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1079, 146–152.
- [20] Horie, K.; Ikegami, T.; Hosoya, K.; Saad, N.; Fiehn, O.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1164, 198–205.
- [21] Nesterenko, P.; Haddad, P. R. *Anal. Sci.* **2000**, 16, 565–574.
- [22] Viklund, C.; Sjogren, A.; Irgum, K.; Nes, I. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 444–452.
- [23] Jiang, W.; Irgum, K. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1993–2003.
- [24] Takegawa, Y.; Deguchi, K.; Keira, T.; Ito, H.; Nakagawa, H.; Nishimura, S.-I. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1113, 177–181.
- [25] Takegawa, Y.; Deguchi, K.; Nakagawa, H.; Nishimura, S.-I. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 6062–6068.
- [26] Nakagawa, H.; Kawamura, Y.; Kato, K.; Shimada, I.; Arata, Y.; Takahashi, N. *Anal. Biochem.* **1995**, 226, 130–138.
- [27] Takegawa, Y.; Deguchi, K.; Ito, S.; Yoshioka, S.; Nakagawa, H.; Nishimura, S.-I. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2097–2106.
- [28] Link, A. J.; Eng, J.; Schieltz, D. M.; Carmack, E.; Mize, G. J.; Morris, D. R.; Garvik, B. M.; Yates, III, J. R. *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 676–682.
- [29] Motoyama, A.; Xu, T.; Ruse, C. I.; Wohlschlegel, J. A.; Yates, III, J. R. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 3623–3634.
- [30] Deguchi, K.; Keira, T.; Yamada, K.; Ito, H.; Takegawa, Y.; Nakagawa, H.; Nishimura, S.-I. *J. Chrom. A* **2008**, 1189, 169–174.
- [31] Kondo, A.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Kato, I. *Anal. Biochem.* **1994**, 219, 21–25.
- [32] Alpert, A. J. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 62–76.

- [33] Paradela, A.; Albar, J. P. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1809–1818.
- [34] Ishihama, Y. *Chromatography* **2008**, *29*, 25–31.
- [35] Kaji, H.; Isobe, T. *Trends Glycosci. Glyc.* **2006**, *18*, 313–322.
- [36] Mechref, Y.; Novotny, M. V. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 321–370.
- [37] An, H. J.; Peavy, T. R.; Hedrick, J. L.; Lebrilla, C. B. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5628–5637.
- [38] Hagglund, P.; Bunenborg, J.; Elortza, F.; Jensen, O. N.; Roepstorff, P. *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 556–566.
- [39] Ohta, M.; Kawasaki, N.; Hyuga, S.; Hyuga, M.; Hayakawa, T. *J. Chromatogr. A* **2001**, *910*, 1–11.
- [40] Ohta, M.; Kawasaki, N.; Itoh, S.; Hayakawa, T. *Biologicals.* **2002**, *30*, 235–244.
- [41] Wada, Y.; Tajiri, M.; Yoshida, S. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6560–6565.
- [42] Tajiri, M.; Yoshida, S.; Wada, Y. *Glycobiology* **2005**, *15*, 1332–1340.
- [43] Yoshida, T. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3038–3043.
- [44] Yoshida, T. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *60*, 265–280.
- [45] Zhang, J.; Wang, D. I. C. *J. Chromatogr. B* **1998**, *712*, 73–82.
- [46] Wuhler, M.; Koeleman, C. A. M.; Hokke, C. H.; Deelder, A. M. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 886–898.
- [47] Takegawa, Y.; Deguchi, K.; Ito, H.; Keira, T.; Nakagawa, H.; Nishimura, S.–I. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2533–2540.
- [48] Takegawa, Y.; Ito, H.; Keira, T.; Deguchi, K.; Nakagawa, H.; Nishimura, S.–I. *J. Sep. Sci.*, **2008**, *31*, 1585–1593.
- [49] Guo, Y.; Gaiki, S. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1074*, 71–80.
- [50] Jiang, W.; Fischer, G.; Girmay, Y.; Irgum, K. *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1127*, 82–91.
- [51] Takegawa, Y.; Hato, M.; Deguchi, K.; Nakagawa, H.; Nishimura, S.–I. *J. Sep. Sci.*, **2008**, *31*, 1594–1597.
- [52] Zhang, R.; Regnier, F. E. *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 139–147; Julka, S.; Regnier, F. E. *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 350–363.
- [53] Turowski, M.; Yamakawa, N.; Meller, J.; Kimata, K.; Ikegami, T.; Hosoya, K.; Tanaka, N.; Thornton, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13836–13849.
- [54] Yao, X.; Freas, A.; Ramirez, J.; Demirev, P. A.; Fenselau, C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2836–2842; Reynolds, K. J., Yao, X., Fenselau, C., *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 27–33.
- [55] Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Ishizuka, N. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 421A–429A.
- [56] Hara, T.; Kobayashi, H.; Ikegami, T.; Nakanishi, K.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7632–7542.
- [57] Hosoya, K.; Hira, N.; Yamamoto, K.; Nishimura, M.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5729–5735.
- [58] Mazzes, J. R.; Neue, U. D.; Kele, M.; Plumb, R. S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 460A–467A; Grumbach, E. S.; Diehl, D. M.; Neue, U. D. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1511–1518.
- [59] Kirkland, J. J.; Langlois, T. J. *USP* **2007**/0189944 A1; Kirkland, J. J.; Langlois, T. J.; DeStefano, J. J. *Am. Lab.* **2007**, *37*, 18–21.