

学会創立20周年記念特集

複合糖質の LC/MS 分析のための特異的濃縮法の開発

吉年正宏, 生田朋子, 毛利幸恵, 小山武裕, 鈴木茂生

Development of Methods for the Specific Enrichment of Glycopeptides for the LC/MS Analysis

Masahiro Yodoshi, Tomoko Ikuta, Yukie Mohri, Takehiro Oyama, Shigeo Suzuki

*School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashi-osaka, 577-8502, Japan.***Abstract**

Glycosylation affects various biological functions of proteins, and it also recognized as an indicator of disease. Recent glycoproteomics studies require methods capable to enrich glycopeptides from protease digests, because MS sensitivity of glycopeptides is much lower than that of peptides. In addition salts or detergents added in the course of sample preparation impair ionization efficiency of glycoconjugates. Therefore, many researchers have been surveyed the methods to enrich glycoproteins and glycopeptides from crude samples such as urine, plasma and cells. Here we overview recent progresses of the enrichment methods of glycopeptides and glycans applied for the determination of glycosylation sites, structural analysis of carbohydrates, and their applications to glycomics or glycoproteomics studies. After that we introduced our recent studies on three novel methods for the enrichment of glycoconjugates; serotonin-immobilized silica SPE for trapping sialic acid-containing glycoconjugates, borate form anion exchanger to trap all of glycoconjugates, and various lectins and centrifugal ultrafiltration membrane for specific recovery of glycoconjugates based on the specificities of lectins to glycan structures.

Keywords: solid phase extraction, glycoproteomics, MS, enrichment, serotonin-bonded silica, borate form anion exchanger, lectin.

はじめに

糖鎖付加はタンパク質の主要な翻訳後修飾の1つであり、生体内タンパク質の60%以上は糖鎖が結合した「糖タンパク質」として存在している[1]。糖鎖は極めて種類が多く、アスパラギン結合型だけでも、その数は500種類を越える[2]。この糖鎖はタンパク質や脂質と結合した、いわゆる複合糖質という形で存在して初めてその機能を発現するが[3, 4]、微小不均一性 (microheterogeneity)、すなわち構造の類似した

糖鎖が多数共存する上、それぞれの糖鎖の構造ならびに量的な分布は結合部位ごとに異なる。この糖鎖の構造分布がその機能発現とも関係しており、数多くの疾患の発現や進行とともに糖鎖構造が変化することが知られている[5-7]。また、疾患によっては特異な構造を持つ糖鎖が発現することがあり、近年では診断マーカーとしても注目されてきている。しかし、糖鎖構造と生理機能との関連に関する分子機構は未だ謎が多い。もしこの複雑な糖鎖の構造変化を迅速かつ高感

〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1 近畿大学薬学部医療薬学科 薬品分析学研究室
School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashi-osaka, 577-8502, Japan.

Correspondence author : Shigeo Suzuki

Tel : 06-6721-2332

Fax : 06-6721-2353

E-mail : suzuki@phar.kindai.ac.jp

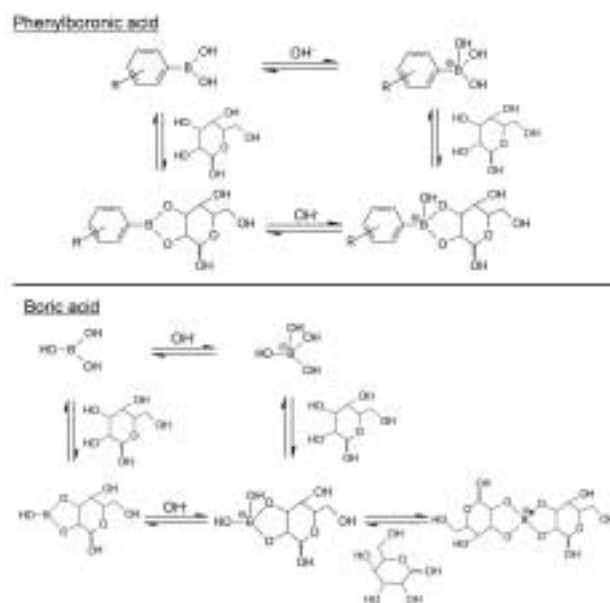
度・高精度に分析することができれば、糖鎖変化を伴う種々の疾病の発症機構の解明のみならず、診断薬や治療薬の開発にもつながることが期待される。すでに糖鎖研究はポストゲノムの重要な課題の一つであり、世界規模で多くの糖鎖関連プロジェクトが推進され、糖鎖の構造解析技術も着実に進歩している[7-11]。とりわけ、構造糖鎖生物学において分離分析は重要な地位を占めており、様々なモードを用いた高速液体クロマトグラフィー (LC) による分離分析法は、オフラインでのマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) 法をはじめ、LC とエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) を直接組み合わせたオンライン LC/ESI-MS 法として繁用されている。これらは糖鎖プロファイリングと構造解析を同時に可能とすることから、グライコプロテオミクス研究に欠かせない手法として定着しつつあり[12-15]、その一部は総説としてまとめられている[16-21]。これらはいずれも糖タンパク質をプロテアーゼなどで処理し、ペプチドおよび糖ペプチド混合物としたものを LC など分離し、MS あるいはタンデム質量分析 (MSⁿ) を行うことで、糖鎖構造とその結合部位のアミノ酸配列を決定するものである。ところが、無数のペプチドピークの中から糖鎖や糖ペプチドピークを特定することは難しい上、糖鎖の付加により疎水性が低下するので、質量分析において糖ペプチドはペプチドよりも大幅に感度が低くなる。しかも糖ペプチドは多量の遊離ペプチドと共存するとその検出感度が著しく低下する[22]。さらに糖鎖構造の微少不均一性によってスペクトルが複雑化することが多く、LC/MS によるグライコミクス解析が必ずしも成功しているとは言いがたい。したがって、グライコミクス解析を行う上では、微量試料中からいかに簡潔にそのピークを検出するかがカギとなる。現段階においては、生体試料から微量の糖鎖を高速・高収率かつ高精度に精製する戦略が欠落しており、まして血清等の臨床試料を診断等に応用することなど依然として現実のものとはなっていない。しかし生体内の糖鎖を高速・簡便に回収・濃縮 (エンリッチ) することができれば、糖鎖が関係する様々な疾患の分子診断や発症の分子メカニズムの解明に大きく貢献し、医薬品の開発にも寄与することが期待される。このような理由から、我々の研究室では糖鎖あるいは糖ペプチドのエンリッチ技術の開発に取り組んでいる。

本稿では、固相抽出 (SPE) 技術を利用したグライコミクス・グライコプロテオミクスを指向したエンリッチ技術について、これまで報告されているものに加え、我々が現在行っている研究成果の一部を紹介する。

1. 研究の背景 (代表的な糖鎖精製技術)

1. ボロン酸

ボロン酸は Scheme 1 に示すようにフルクトースなどの糖残基のシス-ジオール基と可逆的に五~六員環複合体を形成し、強く結合することが知られている[23]。しかも、塩基性



Scheme 1. Compexation between boric acid or phenylboronic acid and saccharides.

条件下ではホウ素原子にさらに OH⁻ イオンが配位してアニオン型となり安定性が增大する。この糖とボロン酸の親和性の高さを利用して、フェニルボロン酸をリガンドとするアフィニティー担体が古くから知られている[24-27]。最近では、ジボロン酸を磁性ビーズに固定化したマトリックス[28]や、アガロース系担体にフェニルボロン酸を結合させたゲル[29]のほか、糖ペプチドを特異的にエンリッチすることを目的として、フェニルボロン酸を多孔質シリカゲルに固定した担体[30]も登場した。さらには、後に述べる糖鎖認識タンパク質であるレクチンとともに結合させたハイブリットタイプの固相抽出法も報告されている[31]。しかしながら、フェニルボロン酸はカテコールアミンやポリアルコール、環状糖ではフラノース類と親和性を示すものの、糖鎖を構成するピラノース類とは親和性が極めて低いと言われており、改善の余地がある。いずれにせよ、固相抽出 (SPE) 用としてグライコプロテオミクスにおける前処理に利用するためには、後述する我々の開発した遊離ホウ酸イオンを陰イオン交換樹脂に固定化したもので行う方法も有効であると思われる。

2. カーボン SPE

活性炭は化学安定性が非常に高く、特有の吸着性能を有することから様々な物質の回収に利用されてきた。糖関係では“活性炭-セライトカラム”として、多糖類の部分加水分解で得られたオリゴ糖混合物の分離カラムとして利用されてきた。これは糖の環の内側が相対的に高い疎水性を示すことから、カーボンとの疎水相互作用により保持されることを利用している。その後、グラファイトカーボンを充填したカラム (Hypercarb[®]) の登場により、オリゴ糖の新たな分離モードとして利用されるようになった。このカラムでは、TFA を

含むアセトニトリル／水などの揮発性溶媒を溶離液に用いるので、MSにおいても相性の良いモードとして注目され、多くの糖分析に利用されている[32-38]。

一方、Packerらは糖鎖混合物からペプチドや塩を除去する方法として、グラファイトカーボンを固相とするSPE法の利用を提案した[39]。糖鎖のようなオリゴ糖も捕捉されることから、遊離糖鎖の精製やエンリッチに利用できる画期的な方法である。また、ペプチド鎖の短いものであれば、糖ペプチドの分離にも利用できる。すでに、市販のカーボンカートリッジを用いて糖鎖の精製を試みた例[40]や、糖ペプチドの多段階精製を目的としてその一段階目の逆相系カラムで共存ペプチドを除去し、その後カーボンを充填したマイクロカラムで捕捉・脱塩するという2ステップシステムを用い、試料中の微量糖ペプチドのエンリッチとMALDI-MSにおける感度向上を達成している[41]。しかしながら、トリプシン消化により得られる比較的長いペプチド鎖を有する糖ペプチドに対しては選択的な分離が難しく、その適用範囲に制限がある。

3. 親水性相互作用アフィニティー SPE

最近、親水性相互作用クロマトグラフィー (hydrophilic interaction chromatography; HILIC) [42-44]が、生体成分のような親水性化合物の分離に利用されており、すでに各社から様々なタイプのHILICカラムが発売され、糖鎖の適用例も増えている[18, 45-47]。HILICは順相クロマトグラフィーの一種として扱われ、水とアセトニトリルなどの有機溶媒の混合溶液を移動相に用い、それよりも高極性の固定相を組み合わせる。糖ペプチドの場合、その保持は主に糖鎖の親水性と分子サイズで決まり、糖ペプチド画分はペプチドよりも遅れて溶出される。アセトニトリルなど揮発性有機溶媒を多量に含む溶離液を用いるので、LC/ESI-MSとの相性が高く、糖ペプチドのイオン化効率も高い[48-50]。また、TakegawaやDeguchiのグループらは両性イオン性 (zwitterionic) HILICカラム (ZIC®-HILIC) が糖鎖異性体に対する高い構造認識能を示すことを見出し、糖鎖や糖ペプチドへ適用している[51-54]。

HILICの性質を利用した糖鎖精製法も報告されている。Shimizuらがセルロースカラムクロマトグラフィーで、N型糖鎖やN-結合型糖ペプチドの精製法を確立し[55]、結晶セルロースやセファロースSPEを用いて調製した糖試料をMALDI-MSや多段階質量分析 (MSⁿ) に応用し、良好な結果を得た[56, 57]。これは糖鎖と担体間での水素結合を利用したもので、いずれもブタノール／エタノール／水 (4 : 1 : 1 v/v) などを吸着溶媒に用い、エタノール／水 (1 : 1 v/v) などで溶出させる。糖鎖への選択性が高く、しかも操作が簡便なことからハイスループット分析に適している。また、Yuらは未標識の遊離糖鎖に対してアミノプロピルシリカゲル担体を充填した96穴SPEプレートをを用いたマイクロ

スケールでの精製を試み、MALDI-MSにおいて高感度を与えることを報告した[58]。しかしながら、糖鎖が結合していないペプチドでも親水性の高いものは同様に保持されるので注意を要する。いずれにせよ、これらの方法は生体試料中の糖鎖分析にも応用されており[47, 57]、今後も糖鎖や糖ペプチドのエンリッチ法として利用されると思われる。

4. レクチンアフィニティークロマトグラフィー

レクチンは糖と特異的に結合するタンパク質の総称であり、古くから糖鎖解析のツールとして利用されてきた[59]。レクチンは単糖ばかりではなく、糖鎖構造の微妙な違いを区別できることが知られている[60]。例えば、タチナタマメレクチン (Con A) とレンズマメレクチン (LCA) はともにグルコースやマンノース認識レクチンであるが、Con Aは高マンノース型や、分岐マンノース側鎖をもつ混成型糖鎖に強い親和性を示し、複合型では二鎖糖鎖に対してのみに弱いながらも結合性を示す。一方、LCAは高マンノース型糖鎖を認識せず、還元末端側がフコースで修飾された複合型糖鎖を選択的に認識する。このようなレクチンの持つ特性を組み合わせることで、グライコームに代表される糖鎖の網羅的解析が急速に進められている。このレクチンアフィニティークラムは、既に糖タンパク質などの複合糖質の分離や遊離糖鎖の精製にも利用されている。レクチンカラムに捕捉された糖タンパク質はハプテン糖を含む緩衝液で溶出することができる。レクチンカラムも、最初はセファロース系[61-63]担体が用いられたが、その後アガロース[64]やシリカゲル[65]も利用されるようになった。さらに、近年ではMALDI-MSやLC/ESI-MS解析の前処理への応用が検討され、操作性を高めるために磁性ビーズに固定化したもの[28]や、シリカゲルベースのマイクロカラム[66, 67]が現れ、微量糖鎖のエンリッチのみならず、質量分析における感度向上にも寄与している。また、種々のレクチンカラムを組み合わせた「マルチレクチンカラム」[68, 69]や、Hirabayashiらが考案した「グライコキャッチ」と呼ばれる糖鎖の特異的回収法[70-72]は独自の糖鎖解析法として発展している。さらに細胞中の糖タンパク質の特異的抽出・精製に利用した例もあり[73]、糖鎖構造解析にとってもレクチンは欠かせないツールであることは間違いない。レクチンを用いたエンリッチ法に関しては最近の総説を参照されたい[74]。

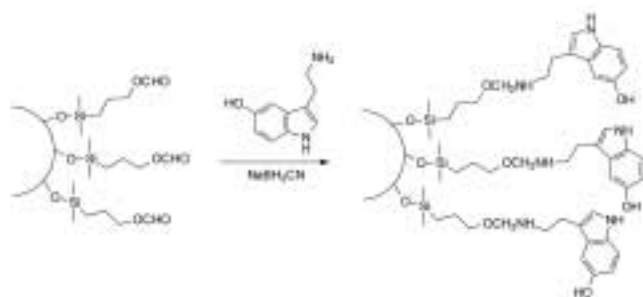
2. LC/MSを指向した糖鎖固相抽出法

1. セロトニン固定化シリカゲルを用いたシアル酸含有複合糖質の特異的回収

生体内の糖鎖の非還元末端には一般にシアル酸が結合し、赤血球や活性タンパク質の代謝調節や細胞接着、分解酵素に対する抵抗性の賦与など、複合糖質の構成成分として重要な生物学的機能を担っている。シアル酸と特異的に結合するレクチンとしてはイヌエンジュレクチン (MAM) やニホンニ

ワトコレクチン (SSA) が知られているが、これらのレクチンはシアル酸単独では親和性を示さず、結合特異性も異なる。ところで、神経伝達物質の1つでもあるセロトニン (5-ヒドロキシトリプタミン; 5HT) は、分子量がわずか176と極めて小さな分子でありながら、シアル酸 (特に N-アセチルノイラミン酸; NeuAc) に対して強く結合することが知られている。Sturgeon らはこの点に着目し、シアル酸含有糖鎖のアフィニティークロマトグラフィーにセロトニン固定化カラムを利用した[75]。そこで筆者らは生体試料のような複雑な試料成分からシアル酸含有糖タンパク質を特異的に回収することを目的とし、セロトニンによる固相抽出法を利用したシアル酸含有複合糖質の簡易抽出法の開発を試みた。

市販のシリカゲル (30~50 μm 、10 nm) を γ -グリシドキシプロピルトリメトキシシランで処理してエポキシ基を導入した後、数ステップの反応を経てアルデヒド基に変換した。これと 5HT のアミノエチル基を還元的アミノ化反応を利用して結合させることで、目的の 5HT 固定化シリカゲルを得た (Scheme 2) [65]。合成した SPE 担体は Fig. 1 で示した操作に従ってシアル酸含糖鎖を特異的に捕捉し、試料溶液中に含まれる夾雑物は水で溶出させることができた。試料に NeuAc を用いて溶出条件を検討した結果、加温した 0.1% 酢酸含有 0.5M 酢酸アンモニウム水溶液で溶出すれば、ほぼ定量的に回収することが可能であった。AP 標識化直後のシアル酸含有糖鎖の精製に適用したところ、Fig. 2 に示すように



Scheme 2. Synthesis of the serotonin-immobilized silica.

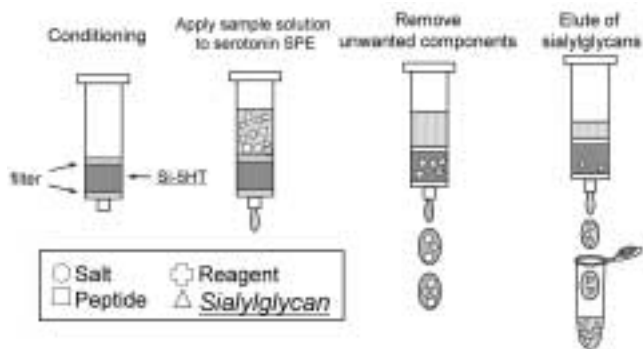


Fig. 1. Procedure for purification of sialylated glycan derivatives and/or peptides using Si-5HT SPE.

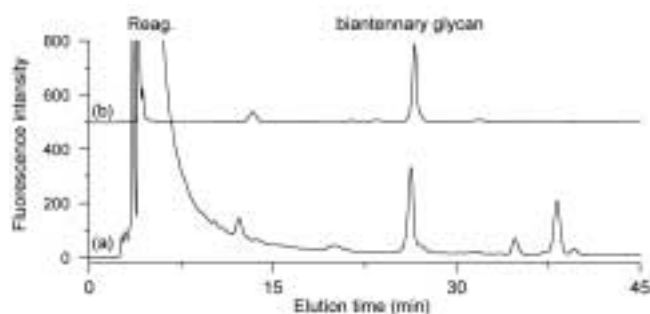


Fig. 2. Reversed phase HPLC analysis of AP-labeled glycans derived from human transferrin before (a) and after (b) specific extraction with Si-5HT SPE cartridge. Analytical conditions: column, ODS-silica column (6.0 $\times$ 150 mm, Nacalai Tesque); buffer, (A) 10 mM NaH₂PO₄ (pH 3.8), (B) buffer A containing 0.5% 1-BuOH; eluent, 70% to 5% of buffer A for 100 min; flow rate, 1.0 ml/min; detection, fluorescence at 310 (ex)/390 (em) nm.

誘導体化後の過剰試薬の除去までも行うことが可能であり、回収率も80%以上であった。また、高マンノース型糖鎖などの中性糖は全く保持されず、シアル酸含糖鎖のみを選択的に回収することができた。糖ペプチド回収においては、一部のペプチドのわずかな非特異的吸着が見られるもののシアル酸含糖ペプチドに特異的であることが判明した。糖鎖の構造解析や機能解析を行う際に、このシアル酸含有複合糖質を選択的に捕捉できるので、疾病や病態に伴う糖鎖の変化を捕らえる際に簡便な前処理法となる。

2. ホウ酸結合型陰イオン交換樹脂を用いた複合糖質の特異的回収法

先にも述べたように、ポリアルコール構造を有する糖類はホウ酸イオンに配位することが知られ (Scheme 1 参照)、ホウ酸型陰イオン交換カラムは糖分析に広く利用されてきた。そこで、中性糖鎖あるいは糖ペプチドのエンリッチを目的として、ホウ酸結合型陰イオン交換樹脂を利用した固相抽出法 (ホウ酸 SPE) による糖試料のエンリッチについて検討を試みた。

糖試料を 1% アンモニア水に溶解したのち、ホウ酸結合型イオン交換樹脂に結合させ、アセトニトリル-水で夾雑物を洗浄・除去した後、糖鎖はホウ酸アンモニウム (pH 10.0) で溶出させた。トリプシン消化により調製したウシ脾臓リボヌクレアーゼ B (RNase B) 由来糖ペプチドに適用した結果を Fig. 3 に示す。なお解析は LC/MS で行った。本糖タンパク質は 5 種の高マンノース型糖鎖を含み、一カ所のアスパラギン残基に結合していることが知られている。トリプシン消化直後の TIC (Fig. 3(a)) では、10分付近に高マンノース型糖ペプチドが観察された。また、22.5分以降に夾雑物に由来するピークが観測されているが、ホウ酸 SPE を通すことにより、5~9 残基のマンノースを含む糖ペプチドのスペクト

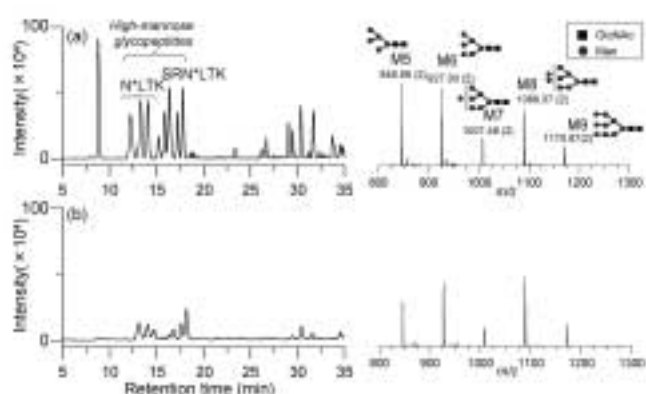


Fig. 3. Total ion current chromatograms of reversed-phase LC/ESI-MS of tryptic digests of ribonuclease B before (a) and after (b) specific extraction with borate form anion exchange resins. MS scan range: 1000–1700 m/z. GlcNAc; N-acetyl-glucosamine, Man; Mannose.

ルが明瞭に観察され、夾雑物由来のシグナルは消滅した (Fig. 3(b))。ここには示していないが、他の糖ペプチドに関しても同様にエンリッチすることができた。先述のセロトニン SPE とを組み合わせる使用することにより、従来の煩雑な操作を必要とする糖鎖分析の問題点を大幅に改善することができ、ハイスループット分析が可能になると考えている。しかしながら、まだ回収率が低いため、現在は溶出条件などの検討を行っている。

3. レクチンを用いる構造選択的糖鎖特異的回収法

先に述べたとおり、これまではレクチンをセルロースなどの担体に固定化したアフィニティーカラムを用いて、糖鎖の構造解析が行われてきた。しかしながら、タンパク質の固定化には煩雑な操作が必要な上に、その安定性にも問題がある。しかもディスプレイカラムとして用いるには、安定性だけでなくコスト面についても問題がある。これらの現状を踏まえ、我々は糖鎖の部分構造を認識するレクチンと限外ろ過膜を用いて糖鎖構造選択的な糖ペプチドの簡易精製・回収法の検討を行った。

本法の操作を次に示す。レクチン 250 μ g を 0.2 M NaCl、20 mM CaCl₂、2 mM MnCl₂、2 mM MgCl₂ を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝液に溶解後、100 μ g 相当の目的試料溶液とともに分画分子量 10,000 の限外濾過用遠心分離型チューブに充填する。その後緩衝液および精製水で洗浄し、不要成分を 4 $^{\circ}$ C で遠心しながら除去する。最終的に TFA を含む酢酸水溶液 2 mL を用いて、レクチンを酸性条件下で変性させ、保持された成分を回収した。各々のレクチンは糖ペプチドと予想通りの選択性で特異的に結合し、試料溶液中に含まれる非特異成分は緩衝液および水で溶出することができた。Fig. 4 に RNase B 由来の高マンノース型糖ペプチドの精製に Con A を用いた結果を示す。遊離ペプチドはほとんど保持される

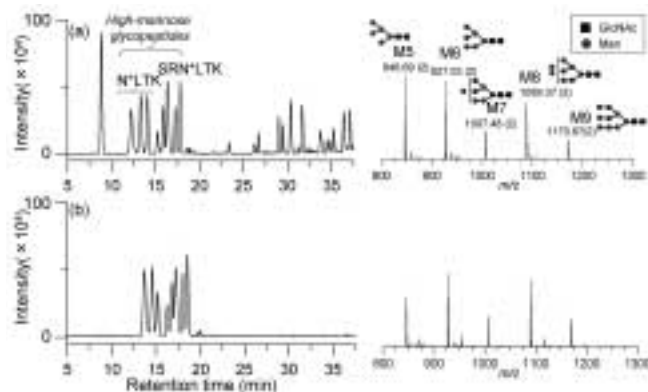


Fig. 4. Total ion current chromatograms of reversed-phase LC/ESI-MS of tryptic digests of ribonuclease B before (a) and after (b) specific extraction with Con A. MS scan range: 1000–1700 m/z. GlcNAc; N-acetyl-glucosamine, Man; Mannose.

ことなく目的糖ペプチドのみを特異的に回収することが出来た。また、シアル酸含有糖鎖をもつヒト血清トランスフェリンや α_1 -酸性糖タンパク質の糖ペプチドはシアル酸認識レクチンである SSA を用いることで、特異的に回収することができた。本法により、糖タンパク質糖鎖の部分構造情報と分子量を同時に決定できることから糖鎖のより詳細な解析が可能になる。

3. おわりに

質量分析法は、近年のめざましい感度の向上によりグライコミクスにおける高感度分析ツールとして定着しつつある。今後は、目的に応じた前処理法を上手く組み合わせた解析などの応用的手法の開発が求められてくる。糖鎖構造解析を行う前処理として、前半に述べた様々な手法が存在している。いずれも、オールマイティーな手法とは言えず、ユーザーは対象物に応じた選択を行うことになる。しかしながら、微量糖鎖を簡便、高速かつ特異的に分析するとなれば既存の方法だけでは不十分であると言えよう。

生体内の多くの微量試料から糖鎖複合体を特異的に回収する方法として、ここ紹介した我々の方法は、病態変化や感染などにもなる翻訳後修飾としての糖鎖複合体の解析を容易にするツールとして有用なものと思われ、グライコミクスの前処理法として更なる発展が期待できる。例えば、糖鎖複合体のみをホウ酸 SPE で回収し、その中でシアル酸結合糖鎖含有成分をセロトニン SPE を用いればそれぞれの成分を特異的にエンリッチすることが可能である。さらに、レクチンでその結合様式毎に分類し、同時に回収ことが可能となる。したがって単に試料のエンリッチだけではなく構造推定までも可能とする。

さらに、種類と組み合わせを検討すれば、糖鎖や糖ペプチドの構造解析におけるハイスループット分析を可能にするも

のと考えており、現在はより詳細な検討を行っているところである。

謝辞

本研究は文部科学省ハイテク・リサーチ・センター事業による私学助成を得て行われた。

Reference

- [1] Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1473, 4–8.
- [2] Takahashi, N.; Kato, K., *Trends in Glycosci. Glycotech.*, **2003**, 15, 234–251.
- [3] Moloney, D. J.; Panin, V. M.; Johnston, S. H.; Chen, J.; Shao, L.; Wilson, R.; Wang, Y.; Stanley, P.; Irvine, K. D.; Haltiwanger, R. S.; Vogt, T. F., *Nature*, **2000**, 406, 369–375.
- [4] Lehle, L.; Strahl, S.; Tanner, W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 6802–6818.
- [5] Varki, A., *Glycobiology*, **1993**, 3, 97–130.
- [6] Dwek, R. A., *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 683–720.
- [7] Rudd, P. M.; Dwek, R. A., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **1997**, 32, 1–100.
- [8] Banks, R. E.; Dunn, M. J.; Hochstrasser, D. F.; Sanchez, J. C.; Blackstock, W.; Pappin, D. J.; Selby, P. J., *Lancet*, **2000**, 356, 1749–1756.
- [9] Harvey, D. J., *Proteomics*, **2001**, 1, 311–328.
- [10] Kuster, B.; Krogh, T. N.; Mortz, E.; Harvey, D. J., *Proteomics*, **2001**, 1, 350–361.
- [11] Spiro, R. G., *Glycobiology*, **2002**, 12, 43R–56R.
- [12] Kawasaki, N.; Ohta, M.; Itoh, S.; Hyuga, M.; Hyuga, S.; Hayakawa, T., *Biologicals*, **2002**, 30, 113–123.
- [13] Karlsson, N. G.; Schulz, B. L.; Packer, N. H., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, 15, 659–672.
- [14] Kremmer, T.; Szollosi, E.; Boldizsar, M.; Vincze, B.; Ludanyi, K.; Imre, T.; Schlosser, G.; Vekey, K., *Biomed. Chromatogr.*, **2004**, 18, 323–329.
- [15] Zamfir, A.; Seidler, D. G.; Schonherr, E.; Kresse, H.; Peter-Katalinic, J., *Electrophoresis*, **2004**, 25, 2010–2016.
- [16] Harvey, D. J., *Expert Rev. Proteomics*, **2005**, 2, 87–101.
- [17] Kawasaki, N.; Itoh, S.; Harazono, A.; Hashii, N.; Matsuishi, Y.; Hayakawa, T.; Kawanishi, T., *Trends in Glycosci. Glycotech.*, **2005**, 17, 193–203.
- [18] Wuhler, M.; Deelder, A. M.; Hokke, C. H., *J. Chromatogr. B*, **2005**, 825, 124–133.
- [19] Geyer, H.; Geyer, R., *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1764, 1853–1869.
- [20] Kaji, H.; Isobe, T., *Trends in Glycosci. Glycotech.*, **2006**, 18, 313–322.
- [21] Wuhler, M.; Catalina, M. I.; Deelder, A. M.; Hokke, C. H., *J. Chromatogr. B*, **2007**, 849, 115–128.
- [22] Annesley, T. M., *Clin. Chem.*, **2003**, 49, 1041–1044.
- [23] Hageman, J. H.; Kuehn, G. D., *Methods Mol. Biol.*, **1992**, 11, 45–71.
- [24] Gould, B. J.; Hall, P. M.; Cook, J. G., *Ann. Clin. Biochem.*, **1984**, 21 (Pt 1), 16–21.
- [25] Rendell, M.; Rasbold, K.; Nierenberg, J.; Krohn, R.; Hermanson, G.; Klenk, D.; Smith, P. K., *Clin. Biochem.*, **1986**, 19, 216–220.
- [26] Danze, P. M.; Tarjoman, A.; Rousseaux, J.; Fossati, P.; Dautrevaux, M., *Clin. Chim. Acta*, **1987**, 166, 143–153.
- [27] Gould, B. J.; Hall, P. M., *Clin. Chim. Acta*, **1987**, 163, 225–230.
- [28] Sparbier, K.; Koch, S.; Kessler, I.; Wenzel, T.; Kostrzewa, M., *J. Biomol. Tech.*, **2005**, 16, 407–413.
- [29] Zhang, Q.; Tang, N.; Brock, J. W.; Mottaz, H. M.; Ames, J. M.; Baynes, J. W.; Smith, R. D.; Metz, T. O., *J. Proteome Res.*, **2007**, 6, 2323–2330.
- [30] Xu, Y.; Wu, Z.; Zhang, L.; Lu, H.; Yang, P.; Webley, P. A.; Zhao, D., *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 503–508.
- [31] Monzo, A.; Bonn, G. K.; Guttman, A., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 389, 2097–2102.
- [32] Davies, M.; Smith, K. D.; Harbin, A. M.; Hounsell, E. F., *J. Chromatogr.*, **1992**, 609, 125–131.
- [33] Fan, J. Q.; Kondo, A.; Kato, I.; Lee, Y. C., *Anal. Biochem.*, **1994**, 219, 224–229.
- [34] Koizumi, K., *J. Chromatogr. A*, **1996**, 720, 119–126.
- [35] Kawasaki, N.; Ohta, M.; Hyuga, S.; Hashimoto, O.; Hayakawa, T., *Anal. Biochem.*, **1999**, 269, 297–303.
- [36] Itoh, S.; Kawasaki, N.; Ohta, M.; Hyuga, M.; Hyuga, S.; Hayakawa, T., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 968, 89–100.
- [37] Hashii, N.; Kawasaki, N.; Itoh, S.; Hyuga, M.; Kawanishi, T.; Hayakawa, T., *Proteomics*, **2005**, 5, 4665–4672.
- [38] Itoh, S.; Kawasaki, N.; Hashii, N.; Harazono, A.; Matsuishi, Y.; Hayakawa, T.; Kawanishi, T., *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1103, 296–306.
- [39] Packer, N. H.; Lawson, M. A.; Jardine, D. R.; Redmond, J. W., *Glycoconj. J.*, **1998**, 15, 737–747.
- [40] Nakano, M.; Kakehi, K.; Lee, Y. C., *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1005, 13–21.
- [41] Larsen, M. R.; Hojrup, P.; Roepstorff, P., *Mol. Cell. Proteomics*, **2005**, 4, 107–119.
- [42] Alpert, A. J., *J. Chromatogr.*, **1990**, 499, 177–196.
- [43] Alpert, A. J.; Shukla, M.; Shukla, A. K.; Zieske, L. R.; Yuen, S. W.; Ferguson, M. A.; Mehlert, A.; Pauly, M.; Orlando, R., *J. Chromatogr. A*, **1994**, 676, 191–122.
- [44] Boersema, P. J.; Mohammed, S.; Heck, A. J., *Anal. Bioanal. Chem.*

- Chem.*, **2008**, 391, 151–159.
- [45] Hagglund, P.; Bunkenborg, J.; Elortza, F.; Jensen, O. N.; Roepstorff, P., *J. Proteome. Res.*, **2004**, 3, 556–566.
- [46] Wuhler, M.; Koeleman, C. A.; Hokke, C. H.; Deelder, A. M., *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 886–894.
- [47] Ruhaak, L. R.; Huhn, C.; Waterreus, W. J.; de Boer, A. R.; Neususs, C.; Hokke, C. H.; Deelder, A. M.; Wuhler, M., *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 6119–6126.
- [48] Grumbach, E. S.; Wagrowski-Diehl, D. M.; Mazzeo, J. R.; Alden, B.; Iraneta, P. C., *LC GC North America* **2004**, 22, 1010–1023.
- [49] Shou, W. Z.; Naidong, W., *J. Chromatogr. B*, **2005**, 825, 186–192.
- [50] Hemstrom, P.; Irgum, K., *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 1784–1821.
- [51] Takegawa, Y.; Deguchi, K.; Ito, H.; Keira, T.; Nakagawa, H.; Nishimura, S., *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 2533–2540.
- [52] Takegawa, Y.; Deguchi, K.; Keira, T.; Ito, H.; Nakagawa, H.; Nishimura, S., *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1113, 177–181.
- [53] Deguchi, K., *Chromatography*, **2008**, 29, 17–27.
- [54] Deguchi, K.; Keira, T.; Yamada, K.; Ito, H.; Takegawa, Y.; Nakagawa, H.; Nishimura, S., *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1189, 169–174.
- [55] Shimizu, Y.; Nakata, M.; Kuroda, Y.; Tsutsumi, F.; Kojima, N.; Mizuochi, T., *Carbohydr. Res.*, **2001**, 332, 381–388.
- [56] Wada, Y.; Tajiri, M.; Yoshida, S., *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 6560–6565.
- [57] Tajiri, M.; Yoshida, S.; Wada, Y., *Glycobiology*, **2005**, 15, 1332–1340.
- [58] Yu, Y. Q.; Gilar, M.; Kaska, J.; Gebler, J. C., *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **2005**, 19, 2331–2336.
- [59] Boyd, W. C.; Reguera, R. M., *J. Immunol.*, **1949**, 62, 333–339.
- [60] Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N., *Nature*, **1980**, 285, 66.
- [61] Ogata, S.; Muramatsu, T.; Kobata, A., *J. Biochem*, **1975**, 78, 687–696.
- [62] Krusius, T.; Finne, J.; H., R., *FEBS Lett.*, **1976**, 71, 117–120.
- [63] Kornfeld, K.; Reitman, M. L.; Kornfeld, R., *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 6633–6640.
- [64] Cummings, R. D.; Kornfeld, S., *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 11235–11240.
- [65] Larsson, P. O., *Methods Enzymol.*, **1984**, 104, 212–223.
- [66] Madera, M.; Mechref, Y.; Novotny, M. V., *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 4081–4090.
- [67] Madera, M.; Mechref, Y.; Klouckova, I.; Novotny, M. V., *J. Chromatogr. B*, **2007**, 845, 121–137.
- [68] Yang, Z.; Hancock, W. S., *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1053, 79–88.
- [69] Yang, Z.; Hancock, W. S., *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1070, 57–64.
- [70] Hirabayashi, J.; Arata, Y.; Kasai, K., *Proteomics*, **2001**, 1, 295–303.
- [71] Hirabayashi, J.; Hayama, K.; Kaji, H.; Isobe, T.; Kasai, K., *J. Biochem.*, **2002**, 132, 103–114.
- [72] Hirabayashi, J.; Kasai, K., *J. Chromatogr. B*, **2002**, 771, 67–87.
- [73] Hirabayashi, J., *Glycoconj. J.*, **2004**, 21, 35–40.
- [74] Mechref, Y.; Madera, M.; Novotny, M. V., *Methods Mol. Biol.*, **2008**, 424, 373–396.
- [75] Sturgeon, R. J.; Sturgeon, C. M., *Carbohydr. Res.*, **1982**, 103, 213–219.