N結合型糖鎖の負イオン化とフラグメンテーション

Ionization and Fragmentation of N-Linked Glycans in Negative-Ion Mode

西風隆司

Takashi NISHIKAZE

株式会社島津製作所 田中耕一記念質量分析研究所 Koichi Tanaka Mass Spectrometry Research Laboratory,
Shimadzu Corporation

(Received August 22, 2017; Accepted September 22, 2017)

1. はじめに

第三の生命鎖と呼ばれる糖鎖は生体内にさまざまな形で存在する。なかでも、タンパク質への翻訳後修飾としての糖鎖付加はタンパク質そのものの性質や働きを左右する重要な因子である。

糖鎖修飾の解析には得たい情報に応じてさまざまなアプローチ（単糖解析、遊離糖鎖解析、糖ペプチド解析、糖タンパク質解析など）が存在する¹⁾。なかでも、最も詳細に糖鎖の構造情報が得られるのは、タンパク質から切り離れた遊離糖鎖として解析する手法である。近年、質量分析（Mass spectrometry; MS）は糖鎖解析において中心的な役割を果たしていると言ってよい。しかし、MSを用いた糖鎖の構造解析は、質量では区別できない異性体が多いことや、糖鎖の多くが分岐構造を持つことなどから本質的に難しい分野である。

本概論では、ユニークな構造情報が得られる負イオンモード衝突誘起解離（collision-induced dissociation; CID）による糖鎖構造解析技術を紹介する。実際の分析手順とは逆となるが、ここではまず糖鎖、特にN結合型糖鎖の負イオンフラグメンテーションの特徴を述べ、次に糖鎖の負イオン種を与えるためのイオン化について述べる。これらの分析の可否を支配する因子を熱化学的な観点から考察したい。

2. 糖鎖の構造解析の難しさ

糖鎖は単糖残基がグリコシル結合でつながったもので、グリコシル結合は酸や塩基で容易に加水分解される。糖鎖をイオン化し、質量分析計の中で気相イオンに対してCIDを行った場合でも、各残基間のグリコシル結合開裂を中心とした分解過程を経る。しかし、糖鎖は分岐構造を持つものが多く、加えて単糖残基間の結合にも①位置異性体と

②アノメリック位の立体配置による α と β の異性体が存在するため、グリコシル結合のみの開裂では構造の推定に不十分である。

グリコシル結合中心の開裂は正イオンモードで誘起されやすい。もちろん、正イオンモードCIDで糖鎖構造が推定できないわけではなく、構成単糖の情報が得られやすい正イオンモードは現在の糖鎖構造解析の主流と言ってよい。また、質量も構成単糖も同じ異性体であってもCIDのスペクトルパターンが異なる場合があり、事前に当該装置で構造既知標品についての多段階CIDスペクトルパターンを把握していれば標品とのMSⁿスペクトルパターンマッチングで糖鎖の構造異性体を判別していくことも可能である^{2), 3)}。

しかし、データベースにない新しい構造の糖鎖や、データベースを保有していない場合など、いわゆる *de novo* で構造解析を行いたい場面はある。また、異性体に関する情報を得たい、分岐構造を解析したいなど、異なる視点からの構造情報を得たい場面もある。そのようなときの選択肢の一つとして負イオンモードの活用が挙げられる。

先に挙げた異性体の解析がすべて負イオンCIDで行えるわけではないが、分岐構造の解析やフコースの位置特定などには負イオンCIDが有用である。

3. 糖鎖の負イオン構造解析の特徴

負イオンモードでの糖鎖のフラグメンテーションは、メカニズムも得られるイオン種も全く異なる。正イオンの場合はナトリウムイオンやプロトンなどの正電荷が乗りやすい部分のイオンがプロダクトイオンとして観測される傾向にあるが、これから論じるような糖鎖負イオンの場合は、CID条件下での電子移動によって糖鎖の還元末端側がニュートラルロスしやすく、非還元末端側のプロダクトイオンを生じやすい。また、結合位置解析に有用な環開裂により生じるプロダクトイオンが多いのも特徴である。

図1. 典型的なN結合型糖鎖の負イオンCIDスペクトルとその解釈. (a) Domon & Costelloのフラグメント命名法, (b, c) NA2型糖鎖のNO₃⁻付加体から取得した負イオンCIDスペクトルとその解釈, (d) bisecting GlcNAcの有無によるDイオンの検出のされ方の違い, (e) フコースの位置に応じた各種プロダクトイオンm/zのシフト. 負イオンCIDスペクトルはNO₃⁻付加体をプリカーサーとして得たものであるが, 脱プロトン体から生じているプロダクトイオンと一致する.

ここからはN結合型糖鎖の負イオンフラグメンテーションに焦点を当てる. N結合型糖鎖の負イオンCIDの研究はHarveyらによって精力的に進められ, その特徴も明らかとなっている⁴⁾⁻¹⁰⁾.

負イオン構造解析でのプリカーサーである脱プロトン分子は後述のように不安定で, そのCIDは単純な一次開裂を中心とする機構によってプロダクトイオンが生じやすく, 元の構造を直接的に反映したスペクトルになりやすい. それゆえに“診断的 (diagnostic)”な解析が行え, あいまいさの少ない構造解析が可能となる. また, 正イオンモードCIDで問題になる単糖の転移反応も負イオンモードでは起こりにくい¹¹⁾.

図1に典型的なN結合型糖鎖の負イオンCIDスペクトルとその解釈を示した. プロダクトイオンの命名はDomon & Costelloのものに準ずる¹²⁾ (図1a). N結合型糖鎖の負イオンCIDでは, 主として非還元末端を含むプロダクトイオンが生じる. 環開裂に由来するAイオンやグリコシル結合の開裂に由来するCイオンが生成しやすいが, 最も特徴的なのはN結合型糖鎖を構成する二つのアンテナ構造を反映するDイオンやEイオンの生成である (図1b赤枠参照). Dイオンはトリマンノシル構造の中央のマノースから6-アンテナ側の残基をすべて含むイオンであり, 負イオンCIDのマススペクトル解析ではこのDイオンを見つけることがスペクトル解釈の第一歩といってもよい. これに加えて, 3-アンテナ側のEイオンも検出できればより正確であるが, 実際はプリカーサー質量とDイオンの質量

からEイオンの質量が計算可能である. 各アンテナ構造が同じでもDイオンとEイオンの構造は異なるので, 区別に迷うことはない.

トリマンノシル構造の中央のマノースに対して付加的にN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が結合する bisecting GlcNAcの有無は, Dイオンの出方によって判別できる. 通常は, Dイオンに加えてそこからの脱水イオンであるD-18イオンが両方検出されるが, Dイオンが検出されずにD-18イオンのみが検出されれば, bisecting GlcNAcが付加していると判断できる (図1d). 本来は, Dイオンにbisecting GlcNAcも含まれるべきなのだが, Dイオンからはbisecting GlcNAcがH₂Oを伴って速やかに脱離するのでD-18のみが生じる. 文献によっては, このD-18をD-221 (221=GlcNAc 203+H₂O 18) と表記しているものもある.

フコース位置の特定は負イオンCIDの得意とするところで, Dイオンに含まれれば6-アンテナ側, Eイオンに含まれれば3-アンテナ側と判別でき, コアフコースの場合はプリカーサーまたは0,2A_Rに対する2,4A_Rイオンとの質量差により判別できる (図1e).

4. 質の高い負イオンCIDスペクトル取得のために

このような診断的構造解析を可能にする質の高い負イオンCIDスペクトルを取得するには, 試料側にいくつか条件がある.

① N結合型糖鎖にシアル酸がない, またはシアル酸のカルボキシル基が修飾により中性化されていること.

②還元末端がラベル化されていてもよいが、還元により開環していないこと。

以下に詳細を述べる。

①シアル酸を含む糖鎖は比較的安定な脱プロトン分子を生じるが、CIDではシアル酸の脱離を含むさまざまなフラグメントが混在することになり、診断的解析には向かない。そのため、シアル酸のカルボキシル基を修飾によって中性化した状態で負イオンCIDを行うのが好ましい。エステル化を採用した報告もあるが、エステル構造は負イオンCID条件下でアルコールの脱離を生じるため複雑なスペクトルになる⁸⁾。この点、アミド化で安定化したシアル酸からはアミン類の脱離は生じないためより適する^{13), 14)}。

②還元的アミノ化(図2)による糖鎖還元末端のラベル化は、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography; HPLC) での蛍光/UV検出やMSでの感度向上のために古くから行われている。本法では、MS糖鎖還元末端にアミンを反応させ可逆的に Schiff 塩基を生じさせるが、さらに還元を行うことで不可逆的なラベル化体を生じさせる。Schiff 塩基は開環構

図2. 還元的アミノ化による糖鎖ラベル化反応の概要。反応に直接関与する還元末端GlcNAcのみ示している。

造だがグリコシルアミン構造と平衡状態にあり、われわれのLC-NMRによる実験結果ではほぼすべてがグリコシルアミン構造、つまり閉環構造であることがわかった。この状態での負イオンCIDの特徴は非ラベルのものとは何ら変わらないが、還元により根元のGlcNAcが完全に開環すると、環内での電子移動が妨げられ、 $^{24}A_R$ といった環開裂イオンが生じにくくなる。さらに、脱プロトン分子の安定性が増大するためCIDを行うにはより強いエネルギーが必要となる。結果として、二次開裂を起こしやすくなるため、そのCIDスペクトルは複数箇所開裂を含む複雑なものになり、診断的解析には適さない。したがって、還元末端のラベル化は行ってもよいが、還元は行わないほうがよい^{10), 15)}。

先に述べたような糖鎖の構造を直接的に反映する診断的なプロダクトイオンの生成には『糖鎖の脱プロトン分子が不安定であること』が大きく貢献している。上に述べた条件を満たすタイプの糖鎖分子からのプロトン引き抜きは主にコア構造の二つのGlcNAcの3位の水酸基から起こると考えられており、そこからの電子移動によって環開裂や特殊なC, D, Eイオンなどが生じるモデルが提案されている⁵⁾。プロトン引き抜きで生じた反応性に富む負イオンはほぼ自壊するような形でプロダクトイオンを生じる。シアル酸があるとそこに負電荷が固定されてしまい、負イオンが安定化する。また、理論的な裏づけは乏しいが、実験的に還元末端GlcNAcの還元が脱プロトン分子を安定化することが示されている¹⁵⁾。

すなわち、N結合型糖鎖の負イオン構造解析には、脱プロトン分子からCIDを取得したいが脱プロトン分子を安定化してはいけない、というジレンマが存在する。プリカーサーが不安定というのは分析技術上不利となり、MS¹スペクトル中にインソース分解 (in-source decay; ISD) によるフラグメントイオンが混じる場合もあり、そもそもイオン化しない場合もある。

図3. 糖鎖のアニオン付加体をCIDしたときのフラグメンテーション経路の概略模式図。

5. アニオン付加体からのCID

このジレンマを解消するのが、アニオンを付加させた状態で安定に負イオン化し、CIDはそのアニオン付加体をプリカーサーとして取得する、という手法である。

一口にアニオンといっても種類は多い。アンモニウム塩などの試薬として容易に入手可能なものでも、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 HSO_4^- 、 $H_2PO_4^-$ 、 NO_3^- 、 SCN^- 、*etc.* などがある。もちろん、アニオンであれば何でもよいわけではなく、糖鎖の構造解析に使えるアニオンは試料となる糖鎖とアニオンの物理化学的性質によって決まる。

以下、糖鎖のアニオン付加体について議論する。

中性糖鎖にアニオンが付加した複合体は、互いにプロトンを共有した proton-bound mixed dimer とみなせる¹⁶⁾。

糖鎖にアニオンが付加した状態をプリカーサーとしてCIDを行った際のフラグメンテーション経路としては、大きく次の二つが考えられる。

糖鎖アニオンのプロトンを引き抜く能力がアニオンより大きければ、アニオンが外れるのみで糖鎖のイオンは生じない（図3 経路I）。

一方で、アニオンのプロトンを引き抜く能力が糖鎖アニオンより大きければ、脱プロトン化糖鎖が生じる（図3 経路II）。

糖鎖の構造解析が可能なのは后者であり、CIDの結果生じた糖鎖アニオン $[Glycan-H]^-$ がそのままフラグメンテーションを起こし、糖鎖のプロダクトイオンが得られることとなる。

表1. 代表的なアニオンの気相塩基性度（GB）

Anion	GB (kJ/mol)
PF_6^-	1,157
BF_4^-	1,204
HSO_4^-	1,265
I^-	1,294
NO_3^-	1,330
Br^-	1,332
SCN^-	1,343
$H_2PO_4^-$	1,351
Cl^-	1,373
F^-	1,531

* 各数値の詳細は文献23を参照のこと。

表2. 糖鎖アニオンの気相塩基性度（GB）

Neutral glycan	GB _{[M-H]⁻} (kJ/mol)
D-Glucose	1,398
Sucrose	1,373
NA2 glycan	1,294~1,330

* 各数値の詳細は文献17および23を参照のこと。

プロトンを引き抜く能力とは、プロトンを得たときの自由エネルギー変化の負値、すなわち気相塩基性度（Gas-phase basicity; GB）に相当する。表1,2に代表的なアニオンと糖鎖アニオンのGBを示したが、**ここで議論するGBはすべて（プロトンが脱離した）アニオンの状態でのGB**である。アニオンがプロトンを得て中性化する能力であり、中性分子がプロトンを得てカチオン化する能力とは異なる。

グルコースやスクロースなど小さな糖鎖アニオンのGBは高く、プロトンを引き抜き糖鎖アニオンを生じさせるには、少なくとも Cl^- よりも高いGBのアニオンを使う必要があった。一方で、より巨大なN結合型糖鎖のGBは低く、 NO_3^- 程度でも糖鎖のプロダクトイオンが得られる⁴⁾。

N結合型糖鎖に対して Cl^- や F^- など高いGBを有するアニオンを付加させてもよいが、実用性は低い。 Cl^- の同位体分布により MS^1 スペクトルが複雑になるというのもあるが、主な理由は高いGBを有するアニオンを用いると良好なイオン生成量が得られないからである。以下、アニオンのGBとイオン生成量の関係について議論する。

6. アニオン付加体の生成

アニオン付加体はproton-bound mixed dimer modelによるとアニオンと糖鎖アニオンがプロトンを共有している複合体とみなせるため、GBの差が大きいと複合体を作りにくく安定な付加体とならない¹⁶⁾。図4はある条件でアニオンのみを変化させた際のNA2型中性糖鎖のアニオン付加体生成量の比較を示している。CIDにおいて、 I^- 付加体からは糖鎖のプロダクトイオンが取得できず、 NO_3^- 付加体からは取得できるので、NA2型糖鎖アニオンのGBは1,294~1,330 kJ/molと推定される。このことは、NA2型中性糖鎖が I^- 付加体や HSO_4^- 付加体で強いイオン生成量が得られていることから推定できる。 HSO_4^- 付加体のイオン生成量が高いのは水素結合などによって複合体がより安定化しているためと考えられる。

したがって、実用的には分析対象の糖鎖と似たようなGBのアニオンを用いるのが好ましいが、これまでに述べたCID時の“プロトン綱引き”との関係で、構造解析を行うには糖鎖アニオンより高いGBのアニオンを用いなければならない。

7. アニオン付加体の生成とMALDIマトリックス

オミクス系計測分野では複雑な試料をHPLCなどで分離しながらイオンサプレッションを低減しエレクトロスプレーイオン化（electrospray ionization; ESI）でイオン化する場合が多いが、糖鎖の分析ではマトリックス支援レーザー脱離イオン化（matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI）もよく用いられる。これには、ペプチドなどと比べて糖鎖は官能基のバリエーションが乏しいため、物理化学的な性質に差が生じにくくお互いにイオンサプレッションを受けにくい、常に一価イオンが生じるのでスペクトルの解釈が容易でスループットも高い、などの理由がある。

MALDIで糖鎖のアニオン付加体を生じさせるには、適

図4. NA2型糖鎖（右上）の負イオン生成量評価，G₃CA液体マトリックスを用い，各アニオンのアンモニウム塩を加えてアニオン付加体を生成させた．シアル酸を有するA1型の[A1-H]⁻を内部標準としてノーマライズし評価した．文献23より許可を得て使用，Copyright (2012) American Chemical Society.

切なマトリックスを用いることが肝要である．MALDIにおけるマトリックスは脱離イオン化の担い手であり，試料の量に対して大過剰利用するが，マトリックスがアニオンにプロトンを渡して中性化してしまうようでは，糖鎖に対する効率的な付加は望めない．つまり，下記の反応が起こらないよう，アニオンよりも高いGBを持つマトリックス（より正確には脱プロトン化したマトリックスアニオンの状態で高いGBを持つマトリックス）を選ばなければならない¹⁷⁾．

文献が存在する代表的なマトリックスアニオンのGBを表3に示した． β -Carboline alkaloidの一種である harmine や norharman は高いGBを有しており，糖鎖のCl⁻付加体の生成に用いられた¹⁸⁾．スクロースなどの短い糖鎖はGBが高いので，それからプロトンを引き抜こうとするとより高いGBのCl⁻を付加させなければならず，イオン化時にCl⁻を中性化させないためにはさらにGBの高いマトリックスを使う必要があった．

一方でN結合型糖鎖の場合はCl⁻よりも低いGBのアニオンを用いても負イオンCIDスペクトルが取得できるため，マトリックス選択の幅は広がる．

表3に挙げた中で最もGBの高いマトリックスは3-AQであるが，アミノ基を有するために糖鎖の還元末端と反応してシッフ塩基を与える．Rohmerらは3-AQをマトリックスとして用いるとともに，糖鎖のMALDIプレート上でのラベル化に用いたが，硝酸アンモニウムを添加しておきNO₃⁻付加体としてイオン化し構造解析を行った¹⁹⁾．著者らも3-AQが主体となる液体マトリックスを用いたオンターゲットラベル化法を開発したが，リン酸アンモニウムを添加しておきH₂PO₄⁻付加体としてイオン化した^{20), 21)}．

MALDIでの効率的なN結合型糖鎖のアニオン付加体生

表3. 代表的なMALDIマトリックスの気相塩基性度 (GB)

Matrix	GB _{[M-H]⁻} (kJ/mol)	GB _{[2M-H]⁻} (kJ/mol)
3-Aminoquinoline (3-AQ)	1,451	n/a
Harmine	1,373~1,407	n/a
Sinapinic acid (SA)	1,400	1,285
Ferulic acid (FA)	1,399	1,286
2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHBA)	1,329	n/a
2,4,6-Trihydroxyacetophenone (THAP)	1,324	n/a

* 各数値の詳細は文献29および24を参照のこと．

成に向け，Domannらは固体マトリックスとアニオン種²²⁾，筆者らは液体マトリックスとアニオン種との組み合わせを検討した²³⁾．硝酸アンモニウムを添加したTHAP固体マトリックスや，硝酸アンモニウムやテトラフルオロホウ酸アンモニウムを添加したG₃CA液体マトリックスが最適であった．

THAPがNO₃⁻付加体生成に適するのなら，それよりもGBの高いDHBAなどもアニオン付加体を生じてよいと思われるが，実際は非効率的である．推測の域を出ないが，DHBAがアニオン付加に適さないのは，マトリックスの二量体以上のクラスターがアニオン中性化の担い手になるからかもしれない．シナピン酸アニオンなどは二量体になるとGBが下がる（つまり，アニオンを中性化しやすい）ことが知られている²⁴⁾．

マトリックスによっては添加したアニオンを異物として排除しながら結晶化する場合もあり，添加したアニオンの量がそのままイオン分子反応の舞台となるブルーム内でのアニオン濃度に反映されるわけではない．液体マトリックスの場合は均一と期待されるが，3-AQ/CHCAや3-AQ/CAなどは溶媒が乾燥する過程で相分離が起こるのでアニオン濃度が均一でなくとも不思議ではない²⁵⁾．アニオンの種類によってはアニオンのクラスターイオンが顕著に検出される場合もある．

結局のところ，糖鎖の負イオン化のためのマトリックスとアニオンの組み合わせ，およびそのプレパレーションは試行錯誤による経験的な側面も強い．理論的な裏づけも乏しく『マトリックスとの相性が…』と言わざるをえない場面もある．これはマトリックスそのものの探索にも言えることであるが，イオン化現象を完全に理解するところまでわれわれの知見は至っていないので，脱離イオン化の各種素過程と得られるスペクトルを結びつけるような基礎研究は今後も必要である．

8. 糖鎖負イオンCID解析の最近の発展

前述のように，負イオンCIDを用いたN結合型糖鎖構造解析は，シアル酸の修飾と組み合わせることが好ましい．シアル酸の修飾には結合様式非特異的なものと特異的なものがあり，後者ではシアル酸の結合様式 (α 2,3-/ α 2,6-) に応じて質量の異なる修飾を行うことで結合異性体を区別することができる．特にアミド化を用いたものは負イオンCIDを行った際に修飾部分の分解が起こらないため適す

る。最近、著者らもアミド化ベースの結合様式特異的修飾法SALSATM (sialic acid linkage-specific alkylamidation) を開発した²⁶⁾。SALSATMと負イオンCIDを組み合わせることで、より詳細な構造解析が可能となる。

情報量を増やすという観点では、負イオンCIDとion mobilityを組み合わせたというアプローチも行われている^{10), 27)}。また、HPLCと組み合わせる手法として、移動相にF⁻を添加することで脱プロトン分子の生成を促す手法も開発されている²⁸⁾。

昨今のオミクス系計測分野では正イオンモードが通常用いられるが、糖鎖解析に関しては本概論で紹介したような負イオンの活用はいわば別軸の情報を与えるものなので、うまく併用することでより正確に糖鎖構造を把握できるようにもなる。

9. ま と め

本概論では、N結合型糖鎖負イオン構造解析のためのアニオン付加体の生成とフラグメンテーションについて、その現象を取り巻く物理化学的な性質の中から気相塩基性度(GB)に焦点を当てて述べた。プロトン引き抜き能力に相当する気相塩基性度は、一見負イオン解析には無関係な熱化学的物理量のようにも感じられるが、実際はアニオン付加体の生成やその先のフラグメンテーションにも関わる支配的な因子である。

負イオンモードは正イオンモードと比べると一般的とは言いがたく敬遠されることが多いが、分析対象によっては独特な構造情報を与える有用な分析モードになりうる。糖鎖の場合は特にユニークな構造情報を与え、MSが苦手とする構造異性体解析を補完する意味でも有用な分析モードと言える。

文 献

- 1) K. Mariño, J. Bones, J. J. Kattla, and P. M. Rudd, *Nat. Chem. Biol.*, **6**(10), 713 (2010).
- 2) A. Kameyama, N. Kikuchi, S. Nakaya, H. Ito, T. Sato, T. Shikanai, Y. Takahashi, K. Takahashi, and H. Narimatsu, *Anal. Chem.*, **77**(15), 4719 (2005).
- 3) A. Kameyama, S. Nakaya, H. Ito, N. Kikuchi, T. Angata, M. Nakamura, H. Ishida, and H. Narimatsu, *J. Proteome Res.*, **5**, 808 (2006).
- 4) D. J. Harvey, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**(5), 622 (2005).
- 5) D. J. Harvey, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**(5), 631 (2005).
- 6) D. J. Harvey, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**(5), 647 (2005).
- 7) D. J. Harvey, J. Jaeken, M. Butler, A. J. Armitage, P. M. Rudd, and R. A. Dwek, *J. Mass Spectrom.*, **45**(5), 528 (2010).
- 8) D. J. Harvey and P. M. Rudd, *Int. J. Mass Spectrom.*, **305**(2-3), 120 (2011).
- 9) D. J. Harvey, M. Edgeworth, B. a. Krishna, C. Bonomelli, S. a. Allman, M. Crispin, and J. H. Scrivens, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **28**(18), 2008 (2014).
- 10) D. J. Harvey and J. L. Abrahams, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **30**(5), 627 (2016).
- 11) M. Wührer, C. A. M. Koeleman, and A. M. Deelder, *Anal. Chem.*, **81**(11), 4422 (2009).
- 12) B. Domon and C. E. Costello, *Glycoconjugate J.*, **5**(4), 397 (1988).
- 13) J. Amano, D. Sugahara, K. Osumi, and K. Tanaka, *Glycobiology*, **19**(6), 592 (2009).
- 14) T. Nishikaze, S. Kawabata, and K. Tanaka, *Anal. Chem.*, **86**(11), 5360 (2014).
- 15) T. Nishikaze, K. Kaneshiro, S. Kawabata, and K. Tanaka, *Anal. Chem.*, **84**(21), 9453 (2012).
- 16) Y. Cai and R. B. Cole, *Anal. Chem.*, **74**(5), 985 (2002).
- 17) Y. Cai, Y. Jiang, and R. B. Cole, *Anal. Chem.*, **75**(7), 1638 (2003).
- 18) T. Yamagaki, H. Suzuki, and K. Tachibana, *Anal. Chem.*, **77**(6), 1701 (2005).
- 19) M. Rohmer, B. Meyer, M. Mank, B. Stahl, U. Bahr, and M. Karas, *Anal. Chem.*, **82**(9), 3719 (2010).
- 20) K. Kaneshiro, Y. Fukuyama, S. Iwamoto, S. Sekiya, and K. Tanaka, *Anal. Chem.*, **83**(10), 3663 (2011).
- 21) Y. Fukuyama, N. Funakoshi, K. Takeyama, Y. Hioki, T. Nishikaze, K. Kaneshiro, S. Kawabata, S. Iwamoto, and K. Tanaka, *Anal. Chem.*, **86**, 1937 (2014).
- 22) P. Domann, D. I. R. Spencer, and D. J. Harvey, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **26**(4), 469 (2012).
- 23) T. Nishikaze, Y. Fukuyama, S. Kawabata, and K. Tanaka, *Anal. Chem.*, **84**(14), 6097 (2012).
- 24) K. Breuker, R. Knochenmuss, and R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **10**, 1111 (1999).
- 25) S. Sekiya, K. Taniguchi, and K. Tanaka, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **26**(6), 693 (2012).
- 26) T. Nishikaze, H. Tsumoto, S. Sekiya, S. Iwamoto, Y. Miura, and K. Tanaka, *Anal. Chem.*, **89**, 2353 (2017).
- 27) D. J. Harvey, C. A. Scarff, M. Crispin, C. N. Scanlan, C. Bonomelli, and J. H. Scrivens, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **23**(11), 1955 (2012).
- 28) W. Ni, J. Bones, and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, **85**(6), 3127 (2013).
- 29) K. Breuker, R. Knochenmuss, and R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom.*, **184**, 25 (1999).