

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20909> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Bruggink, Cornelis

Title: Characterization of oligosaccharides with capillary high performance anion exchange chromatography hyphenated to pulsed amperometric detection and ion trap mass spectrometry

Issue Date: 2013-05-29

&

ADDENDUM

SUMMARY

The research described in this thesis is structured in two parts which are both introduced in Chapter 1. The first part of the research focuses on method development with regard to the hyphenation of mass spectrometry (MS) with high performance anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) for carbohydrate analysis. For many decades HPAEC-PAD has been successfully applied for the analysis of oligosaccharides, and its combination with mass spectrometric detection allows the resolved analysis of complex mixtures and provides a plethora of structural information. This thesis has addressed the challenge of improving the sensitivity of HPAEC-PAD-MS by miniaturization in order to make the method applicable for the analysis of biological samples which may be available in only limited amounts.

The second part of the thesis describes the application of the developed capillary HPAEC-PAD-MS system for a specific biomedical research question. The aim was to characterize the oligosaccharides excreted in urine and other body fluids from patients suffering from lysosomal storage diseases. In these patients the catabolism of glycoproteins and glycolipids is disturbed by specific enzymatic defects, and the structural analysis of the excreted urinary glycans provided insights into the catabolisms of glycoconjugates under these disease conditions.

The results section of this thesis starts with the description of the hyphenation of a standard ion chromatograph with a quadrupole mass spectrometer (Chapter 2). This system was successfully tested for the analysis of native carbohydrates with the aid of a membrane desalter. This desalter is necessary to overcome the incompatibility of the eluent needed for HPAEC-PAD with electrospray-MS (ESI-MS). The desalter removes cations from the column eluate thereby making the eluate compatible with MS detection. After the desalter, a make-up liquid is added to the eluate which enhances the sensitivity of the mass spectrometric detection of glycans, while the composition of the make-up liquid also influences glycan adduct formation. The performance of this system was tested by comparing the chromatograms obtained with both detectors. When applying isocratic elution, slightly broader peaks were observed with MS than with PAD detection; however, this peak broadening was found to be still acceptable. Tests with gradient elution also showed satisfactory resolution, when tested for the separation of native chicory inulin. The sensitivity of this system was investigated with glucose, fructose and sucrose and the result was a minimum detection limit of <0.2 pmol for PAD and of <1.5 pmol for MS in single ion monitoring (SIM). The formed glycan lithium adducts were readily fragmented by in-source decay which allowed the search for carbohydrates in the chromatogram based on specific fragment ions.

While the system described in Chapter 2 was found to be suitable for analyzing rather complex oligosaccharide mixtures such as inulin, its sensitivity was judged to be limiting for various biomedical applications. Therefore, in order to increase the sensitivity, a capillary format ion chromatographic system hyphenated to an MS was developed. The details of this system are described in Chapter 3. The necessary prototype capillary anion exchange column and prototype desalter were made available by the research and development department of Dionex. The capillary ion chromatograph was hyphenated to an ion trap mass spectrometer and instead of lithium adducts, sodium adducts of carbohydrates were formed and detected by positive ion mode MS. The performance test of this capillary system was mainly focused on the obtained resolution and desalting capacity. As described in Chapter 2, the peak broadening was studied by comparing the chromatograms obtained from the MS and the PAD and was

expressed as resolution. The chromatogram obtained with MS detection showed very limited peak broadening compared with that of the PAD. The desalting capacity was determined by pumping a sodium hydroxide solution at 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ flow rate and monitoring the conductivity and pH of the eluate. The desalting capacity was found to be 225 mmol/l Na^+ -ions, which is equal to a capacity of 2.25 meq/min. In view of the biomedical character of the envisioned research the response of both detectors was examined with a complex type asialo diantennary glycan. The response of the detectors was investigated in the range of 0.16 – 100 pmol. The signal of the PAD was found to be linear up to 20 pmol and for the MS over the whole range. The minimum detection limit as compared to the earlier published ion chromatograph-mass spectrometer combination was found to be about two orders of magnitude better, namely 160 fmol for the MS and 50 fmol for PAD respectively.

The focus of the second part of this thesis was on the application of the developed ion chromatograph to biomedical research questions. To this end, oligosaccharides in urine samples from patients suffering from various lysosomal storage disorders were analyzed. The lysosome is a cellular organelle digesting all kinds of materials which are either produced by the cell itself or taken up by the cell. This digestion is enzymatically catalyzed in an acidic environment. When one or more enzymes are defect the degradation of a product will not be completed and storage of these undegraded fragments will be accumulated in the lysosome. The stored products will eventually be released in various body fluids. After excretion, increased concentrations of these partly degraded products can be detected in urine. In this study the excretion of free glycans derived from glycoproteins and glycolipids was analyzed for various lysosomal storage diseases.

First, the applicability of the developed capillary IC-PAD-MS was tested with a urine sample derived from a G_{M1} gangliosidosis patient and this is described in Chapter 3. The result illustrates the excellent selectivity of anion exchange chromatography in separating glycan isomers and the possibility to elucidate structures on the basis of tandem mass spectrometric data. While tandem mass spectrometric analysis routinely reveals structural features of the detected oligosaccharides, full structural elucidation is often not possible with mass spectrometry alone. Instead, by combining information obtained from mass spectrometry, from the known selectivity behavior of the chromatographic system with the knowledge from literature on glycan structures in specific biological sources it is often possible to assign structures to observed mass spectrometric signals.

Chapter 4 describes the research performed on urinary oligosaccharides of galactosialidosis patients with the mass spectrometer operated in negative ion mode. Urine from galactosialidosis patients contains sialylated glycans which could be detected with high selectivity by negative ion mode mass spectrometry. Unexpectedly, free glycan structures derived from glycolipids were detected in addition to glycoprotein-derived *N*-glycan degradation products that are known to be characteristic for galactosialidosis. These free, glycolipid-derived glycan structures were found in various urine samples as well as in ascitic fluid and amniotic fluid samples from galactosialidosis patients. The occurrence of glycolipid-derived free oligosaccharides in patients' body fluids cannot be explained by the known catabolic pathway for glycolipids. Therefore, to explain this observation, a possible endoglycosylceramidase activity is postulated in Chapter 4. Interestingly, oxidized versions of many of these glycans were likewise detected, exhibiting a carboxylic acid group at the C_1 position of the innermost hexose, thereby forming an aldohexonic acid. The

mechanism causing this oxidation is unknown, and one could speculate about an enzymatic as well as non-enzymatic process underlying the occurrence of these glycans.

A comparative study of urinary oligosaccharides from five different lysosomal storage disorders (fucosidosis, α -mannosidosis, G_{M1} gangliosidosis, G_{M2} gangliosidosis, and sialidosis) is reported in Chapter 5. For each disease a characteristic glycan pattern was observed that reflected the specific blockage of the glycan catabolic pathway, indicating that mass spectrometric detection of urinary oligosaccharide profiles may have diagnostic potential for lysosomal storage diseases.

The general discussion in Chapter 6 points out that the observation of glycolipid-derived oligosaccharides at high relative abundances is surprising, as one would expect that these glycans should have been noted and described in earlier reports on urinary oligosaccharides – which is not the case.

Likewise, the technological progress achieved in this thesis is evaluated in Chapter 6. It is concluded that, due to the successful miniaturization of HPAEC-PAD-MS, for glycan analysis the method presents a valuable addition to other LC-MS methods. The added value of HPAEC is based on its unique separation principle, making it orthogonal to other separation techniques such as hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and porous graphitized carbon chromatography (PGC). Also, HPAEC is particularly suitable for separating native oligosaccharides, as anomer separation is efficiently suppressed under the applied chromatographic conditions. In conclusion, capillary-scale HPAEC-PAD-MS as developed in this thesis was found to be suitable for analyzing the glycosylation of biological samples available in only limited amounts. In order to make the system available to a broader group of analytical scientists, it should be brought from a prototype to commercially available instrumentation which will hopefully take place in the near future.

SAMENVATTING

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift omvat twee hoofdlijnen, zoals geïntroduceerd in Hoofdstuk 1. De eerste lijn betreft het koppelen van massaspectrometrie (MS) aan “high performance” anionenchromatografie en “pulsed amperometric” detectie (HPAEC-PAD). HPAEC-PAD wordt al vele decennia met succes gebruikt voor de analyse van oligosaccharides. Door het combineren van deze analysetechniek met massaspectrometrie wordt het mogelijk om monsters te analyseren die complexe oligosaccharides bevatten en levert naast selectiviteit structuurinformatie van de eluerende oligosaccharides op. Om de analyse van biologische monsters die slechts in kleine hoeveelheden voorhanden zijn mogelijk te maken, was het echter noodzakelijk de gevoeligheid te verbeteren van HPAEC-PAD-MS. Deze gevoeligheidsverbetering is bereikt door het miniaturiseren van de HPAEC-PAD, zoals in dit proefschrift beschreven.

De tweede hoofdlijn van het onderzoek betreft het inzetten van de ontwikkelde capillaire HPAEC-PAD-MS bij biomedisch onderzoek. Hierbij is gekozen voor de analyse van oligosaccharides in urine en andere lichaamsvloeistoffen van patiënten die lijden aan een lysosomale stapelingsziekte. Bij deze patiënten is de afbraak van glycoproteïnen en glycolipiden verstoord door een defect in specifieke enzymen. Structuuranalyse van de uitgescheiden glycanen in urine geeft inzicht in het katabolisme van glycoconjugaten bij deze patiënten.

Dit deel van het proefschrift begint met het beschrijven van de koppeling van een standaard ionenchromatograaf aan een quadropole massa spectrometer in Hoofdstuk 2. Dit systeem is getest met ongederivatiseerde koolhydraten en de koppeling tussen de ionenchromatograaf en de MS gaat middels een membraanontzouter. De ontzouter is nodig omdat de voor HPAEC-PAD gebruikelijke eluent samenstellingen niet verenigbaar zijn met elektropray-MS (ESI-MS). De ontzouter verwijdert kationen uit het kolom eluaat wat de matrix voor MS-detectie geschikt maakt. Na de ontzouter wordt aan het eluaat een make-up vloeistof toegevoegd, waardoor de gevoeligheid van de MS-detectie verbetert. Door de samenstelling van de make-up vloeistof kan tevens de adductvorming van de koolhydraten worden beïnvloed. Dit systeem is getest op zijn prestaties door de signalen van beide detectoren te evalueren. Uit de vergelijking van de MS en PAD signalen bleek de piekverbreding onder isocratische eluent condities minimaal te zijn. Ook de test met gradiënt-elutie waarbij polyfructanen werden gescheiden gaf een uitstekend resultaat, zoals aangetoond met een monster natieve chicorei inuline. Het signaalgedrag van glucose, fructose en sucrose is onderzocht in een range van 2.5 – 1000 pmol en de aantoonbaarheidsgrens bleek met PAD < 0.2 pmol en met MS in “single ion monitoring” (SIM) < 1.5 pmol te zijn. De lithium glycaan adducten werden gefragmenteerd met behulp van in-source fragmentatie wat het zoeken naar koolhydraten in het chromatogram op basis van specifieke fragmentionen mogelijk maakte.

Hoewel het systeem dat is beschreven in Hoofdstuk 2 geschikt bleek voor het analyseren van complexe monsters, zoals inuline, is een betere gevoeligheid nodig voor biomedische toepassingen. Hiertoe is een ionenchromatograaf in capillair formaat ontwikkeld, die gekoppeld is aan een MS, hetgeen in Hoofdstuk 3 is beschreven. Prototypes van een capillaire scheidingskolom en een ontzouter werden beschikbaar gesteld door de afdeling onderzoek en ontwikkeling van de firma Dionex. De capillaire ionenchromatograaf was gekoppeld aan een “ion-trap” massaspectrometer en bij de experimenten met dit systeem worden in plaats van lithiumadducten, natriumadducten van de koolhydraten gevormd terwijl de

massaspectrometer in de positieve “ion mode” is gebruikt. Het testen van de prestaties van deze capillaire ionenchromatograaf was vooral gericht op het bepalen van de ontzoutingscapaciteit en de piekverbreding die de capillaire ontzouter veroorzaakt. Net als in Hoofdstuk 2 werd de piekverbreding bestudeerd door het MS-sigitaal te vergelijken met het sigitaal van de PAD en het effect van de piekverbreding op de scheiding werd uitgedrukt in resolutie. In het MS-sigitaal werd in vergelijking tot het PAD-sigitaal een zeer geringe piekverbreding waargenomen, waardoor de scheiding ruim voldoende bleef voor het met MS verkregen chromatogram. De ontzoutingscapaciteit werd bepaald door het verpompen van een natriumhydroxide oplossing met een debiet van 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ terwijl na de ontzouter de geleidbaarheid en de pH werden gemonitord. Een oplossing van 225 mmol/l Na^+ ionen kon worden ontzout wat overeenkomt met een capaciteit van 2.25 $\mu\text{eq}/\text{min}$. Gelet op het biomedische kader van het vervolgonderzoek is de respons van beide detectoren onderzocht met een complex type asialo diantenne glycaan over een bereik van 0.16 – 100 pmol. Het sigitaal voor de PAD bleek lineair tot 20 pmol en voor de MS over het gehele onderzochte gebied. De aantoonbaarheidsgrens was ongeveer twee grootte orders beter dan dat van eerder beschreven ionenchromatograaf-massaspectrometer combinaties voor koolhydratenonderzoek, namelijk 160 fmol voor MS en 50 fmol voor PAD.

De tweede onderzoekslijn in dit proefschrift beschrijft het toepassen van de ontwikkelde ionenchromatograaf voor biomedisch onderzoek. Voor dit biomedisch onderzoek waren urinemonsters afkomstig van patiënten met diverse lysosomale stapelingsziektes beschikbaar. Het lysosoom is een organel in de cel waarin afbraak plaatsvindt van allerlei componenten afkomstig van of opgenomen door de cel. Deze degradatie vindt plaats met behulp van enzymen. Als een of meerdere enzymen defect zijn vindt geen volledige afbraak plaats en stapelen deze producten zich op in het lysosoom. De gestapelde producten komen uiteindelijk vrij in diverse lichaamsvloeistoffen. Na uitscheiding in urine worden verhoogde concentraties van deze producten teruggevonden. In dit onderzoek werden de gestapelde vrije glycanen die afkomstig zijn van glycoproteïnen en glycolipiden bepaald bij diverse lysosomale stapelingsziekten.

In Hoofdstuk 3 is de praktische toepasbaarheid van de ontwikkelde capillaire IC-PAD-MS onderzocht met een urine monster van een G_{M1} gangliosidose patiënt. De resultaten tonen de speciale selectiviteit voor het scheiden van glycaan isomeren met behulp van anionenchromatografie en de mogelijkheden voor structuuropheldering met behulp van tandem massaspectrometrie aan. Massaspectrometrie alleen leidt vaak niet tot volledige structuuropheldering, maar door het combineren van gepubliceerde glycaanstructuren, de beschreven selectiviteit van het scheidingssysteem en de tandem massaspectrometrie resultaten is het vaak mogelijk om een structuur toe te wijzen aan een glycaan.

In Hoofdstuk 4 wordt onderzoek beschreven verricht aan urines van galactosialidose patiënten. In deze urines werden sialylglycanen gevonden waarbij de massaspectrometer in de negatieve “ion mode” gebruikt werd om deze sialylglycanen met hoge selectiviteit te detecteren. Naast de verwachte *N*-glycanen, die relevant zijn voor galactosialidose, werden onverwacht ook vrije glycaanstructuren gevonden van glycolipiden, die niet verklaard konden worden met hetgeen er bekend is over het mechanisme van de afbraak van glycolipiden. Na het beschikbaar komen van additionele monsters urine, buikvocht en vruchtwater, konden deze resultaten worden bevestigd. In dit hoofdstuk is naast de mogelijkheid voor het onderzoeken van glycaanstructuren, een mogelijke endoglycosylceramidase-activiteit gepostuleerd om de gevonden glycaanstructuren van glycolipiden te verklaren. Van deze gevonden

glycaanstructuren werden tevens de geoxideerde vormen gedetecteerd. Het opvallende aan deze glycanen is dat ze een carboxylgroep op de C₁ plaats hebben en daardoor tot de groep aldohexonzuren behoren. Het achterliggend oxidatie mechanisme is onbekend en kan zowel enzymatisch als niet-enzymatisch van aard zijn.

In Hoofdstuk 5 worden de resultaten beschreven van een vergelijkend onderzoek van glycanen in urine van vijf lysosomale stapelingsziekten, fucosidose, α -mannosidose, G_{M1} gangliosidose, G_{M2} gangliosidose en sialidose. Voor elke ziekte is een histogram gemaakt van de gevonden relatieve hoeveelheid van elk glycaan en het patroon dat zo ontstond toont een goed beeld van de blokkade die optreedt in het katabolisme van de glycanen. De uitbreiding met tandem MS-detectie voor de karakterisering van glycanen in urine is mogelijk een aanvullende methode voor de diagnostiek van lysosomale stapelingsziekten.

Het is verrassend dat de relatief grote hoeveelheid oligosaccharides afkomstig van glycolipiden niet is gevonden in eerdere onderzoeken. Hierover wordt gediscussieerd in Hoofdstuk 6. In hetzelfde hoofdstuk wordt de in dit promotieonderzoek bereikte technologische vooruitgang besproken. De conclusie is dat door het miniaturiseren van HPAEC-PAD-MS met succes een waardevolle methode kon worden toegevoegd aan reeds bestaande LC-MS methoden voor het analyseren van glycanen. De toegevoegde waarde van HPAEC ligt vooral in het unieke scheidingsprincipe die orthogonaal is met andere scheidingstechnieken, zoals "hydrophilic interaction liquid chromatography" (HILIC) en "porous graphitized carbon chromatography" (PGC). HPAEC is in het bijzonder geschikt voor de scheiding van ongederiviseerde oligosacchariden, omdat anomere scheiding niet plaats vindt onder de gebruikte chromatografische condities. Samenvattend kan gesteld worden dat capillaire HPAEC-PAD-MS zoals ontwikkeld tijdens dit promotieonderzoek, geschikt is gebleken voor het analyseren van glycanen in biologische monsters, waarbij de hoeveelheid monster beperkt mag zijn. Om dit capillaire systeem meer algemeen beschikbaar te hebben voor onderzoek, moet het wel van prototype tot een commercieel beschikbaar instrument worden ontwikkeld, wat hopelijk spoedig zal gebeuren.

ABBREVIATIONS

Asn	Asparagine
ASRS	Anion self regeneration suppressor
Cer	Ceramide
CMD	Carbohydrate membrane desalter
Da	Dalton (atomic mass unit)
DP	Degree of polymerization
DNA	Deoxyribonucleic acid
EIC	Extracted ion chromatogram
ESI	Electrospray ionization
F, Fuc	Fucose
FOS	Fructan oligosaccharide
FUCA1	Gene symbol for α -L-fucosidase
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalactosamine
GALNS	<i>N</i> -acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase
GD1b	Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)(Neu5Ac(α 2-8) Neu5Ac(α 2-3))Gal(β 1-4)Glc
GD3	Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglucosamine
GluconA	Gluconic acid
GM ₁	Monosialotetrahexosylganglioside; Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc
GM ₂	Monosialotrihexosylganglioside; GalNAc(β 1-4)(Neu5Ac(α 2-3))Gal(β 1-4)Glc
GM ₃	Monosialodihexosylganglioside
GPC	Gel permeation chromatography
GSL	Glycosphingolipid
H, Hex	Hexose
HexA	Hexonic Acid
HexNAc	<i>N</i> -acetylhexosamine
HexonA	Aldohexonic acid
HexSO ₃	O-Sulfated hexose
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography see NPLC
HPAEC	High performance anion exchange chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
I.D.	Internal diameter
IEC	Ion exchange chromatography
IPAD	Integrated amperometric detection, see also PAD
LC	Liquid chromatography
LSD	Lysosomal storage disorder
Man	Mannose
MDL	Minimum detection limit
MPS	Mucopolysaccharidosis

MS	Mass spectrometry
N	<i>N</i> -acetylhexosamine
Neu5Ac	<i>N</i> -acetylneuraminic acid
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
NPLC	Normal phase liquid chromatography see HILIC
PAD	Pulsed amperometric detection see also IPAD
PGC	Porous graphitized carbon
pH	Potential hydrogenii $-\log[\text{H}^+]$
pK_a	$-\log$ of the dissociation constant
RNA	Ribonucleic acid
PPCA	Cathepsin A, protective protein/carboxypeptidase C
RPLC	Reversed phase liquid chromatography
R_s	Resolution
S	Sialic acid or <i>N</i> -acetylneuraminic acid
Sap	Sapogenin
SEM	Scanning electron microscope
Ser	Serine
SIM	Selected ion monitoring
SO_3	Sulfate
TFA	Trifluoroacetic acid
Thr	Threonine
TLC	Thin layer chromatography
UV	Ultra violet
X	Aldohexonic acid
Xyl	Xylose

CURRICULUM VITAE

Cornelis Bruggink was born on June 29th 1951 in Amsterdam, the Netherlands. After passing his exam of the MULO B in 1969, he started his education in analytical chemistry at the evening classes of the Analisten School Amsterdam and passed the HBO-A in 1974 and HBO-B in 1976. During the time of the HBO education he was employed as junior analytical chemist at Ketjen (AKU, AKZO) in Amsterdam (1969–1971) and from 1971 until 1978 employed at the pharmaceutical company “De Watermolen”, later named Pharbita, where he got involved in analytical method development. In 1978 he started an application and demo facility for several brands of analytical equipment including Dionex represented by Pleuger in Amstelveen (later Lamers Pleuger in Den Bosch). Around that time he learned from Prof. Dr. J. Weiss the theoretical backgrounds of ion chromatography so that he could start with giving ion chromatography courses, which developed into an advanced course “method development for ion chromatography”. Likewise he started giving a course entitled “HPAEC-PAD for carbohydrate analysis” based on information provided by Dr. J.D. Olechno and Dr. J.S. Rohrer, as well as a course entitled “Electrochemical detection”, and he still teach on these subjects in his current function.

In 1988 Dionex started an own subsidiary for the sales of ion chromatography in the Netherlands and his main responsibility was to develop methods and applications in ion chromatography and for a few years also for capillary electrophoresis. He was responsible for setting up and managing the application laboratories in Breda and Mechelen, in which four application chemists were employed. He helped in setting up laboratory facilities for the agriculture company “Relab Den Haan BV” and did analytical method development for this laboratory. Dionex gave me several times the opportunity to do research together with the Leiden University and Wageningen University on the characterization of plant oligosaccharides using ion chromatography hyphenated to mass spectrometry resulting in several publications together with Prof. Dr. W.M.A. Niessen and Dr. H.A. Schols in the period from 1993 until 1998. He started his PhD study in 2004 under supervision of Prof. Dr. A.M. Deelder and Dr. M. Wuhler at the Department of Parasitology (LUMC) resulting in this thesis with the title “Characterization of oligosaccharides with capillary high performance anion exchange chromatography hyphenated to pulsed amperometric detection and ion trap mass spectrometry: Application to the analysis of human lysosomal disorders”. This PhD has been performed in part-time, while still employed for 4 days a week by Thermo Scientific for Dionex products. In his current function as “Support Specialist Dionex Products” he develops customer applications for ion chromatography, gives trainings to users, represent Dionex at scientific and commercial events, create marketing, training and support materials for the sales organization and customers, and keep close contact with the Dionex USA and Europe organizations.

LIST OF PUBLICATIONS

1. Eghbali H, Bruggink C, Agroskin Y, Pohl CA, & Eeltink S (2012) Performance evaluation of ion-exchange chromatography in capillary format. *J Sep Sci*. doi: 10.1002/jssc.201200680.
2. Wouters B, Bruggink C, Desmet G, Agroskin Y, Pohl C, & Eeltink S (2012) Capillary ion chromatography at high pressure and temperature. *Anal Chem* **84**, 7212-7217.
3. Bruggink C. (2012) Oligosaccharide analysis by high-performance anion-exchange chromatography hyphenated to integrated pulsed amperometric detection and on-line ion-trap mass spectrometry. In Applications of ion chromatography for pharmaceutical and biological products (Bhattacharyya, L. & Rohrer, J.S., eds), pp. 379-391. John Wiley & Sons, Inc.
4. Bruggink C, Poorthuis BJ, Deelder AM, & Manfred Wuhrer M (2012) Analysis of urinary oligosaccharides in lysosomal storage disorders by capillary high-performance anion-exchange chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. **403**, 1671-1683.
5. Bruggink C, Poorthuis BJ, Piraud M, Froissart R, Deelder AM, & Wuhrer M (2010) Glycan profiling of urine, amniotic fluid and ascitic fluid from galactosialidosis patients reveals novel oligosaccharides with reducing end hexose and aldohexonic acid residues. *FEBS J* **277**, 2970-2986.
6. Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, & Wuhrer M (2010) Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem* **397**, 3457-3481.
7. Bruggink C, Wuhrer M, Koeleman CA, Barreto V, Liu Y, Pohl C, Ingendoh A, Hokke CH, & Deelder AM (2005) Oligosaccharide analysis by capillary-scale high-pH anion-exchange chromatography with on-line ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **829**, 136-143.
8. Bruggink C, Maurer R, Herrmann H, Cavalli S, & Hoefler F (2005) Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1085**, 104-109.
9. Bruggink, C. (2000) Backgrounds and possibilities for electrochemical detection in conjunction with anion exchange chromatography. Conference proceeding AVH Association - 7th Symposium - Reims, March 2000, 3-9.
10. van der Hoeven RAM, Tjaden UR, van der Greef J, van Casteren WHM, Schols HA, Voragen AGJ, & Bruggink C (1998) Recent progress in high-performance anion-exchange chromatography/ion-spray mass spectrometry for molecular mass determination and characterization of carbohydrates using static and scanning array detection. *J Mass Spectrom* **33**, 377-386.
11. Torto N, Hofte A, Tjaden UR, Gorton L, Marko-Varga G, Bruggink C, & van der Greef J (1998) Microdialysis-introduction high-performance anion-exchange chromatography/ion-spray mass spectrometry for monitoring of online-desalted carbohydrate hydrolysates. *J Mass Spectrom* **33**, 334-341.
12. van der Hoeven RAM, Hofte AJP, Tjaden UR, van der Greef J, Torto N, Gorton L, Marko-Varga G, & Bruggink C (1998) Sensitivity improvement in the analysis of oligosaccharides

- by online high-performance anion-exchange chromatography/ion-spray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **12**, 69-74.
13. Schols HA, Mutter M, Voragen AG, Niessen WM, van der Hoeven RA, van der GJ, & Bruggink C (1994) The use of combined high-performance anion-exchange chromatography-thermospray mass spectrometry in the structural analysis of pectic oligosaccharides. *Carbohydr Res* **261**, 335-342.
 14. Niessen WM, van der Hoeven RA, van der Greef J, Schols HA, Voragen AG, & Bruggink C (1993) Recent progress in high-performance anion-exchange chromatography-thermospray mass-spectrometry of oligosaccharides. *J Chromatogr* **647**, 319-327.
 15. Niessen WMA, van der Hoeven RAM, van der Greef J, Schols HA, Lucaslokhorst G, Voragen AGJ, & Bruggink C (1992) High-performance anion-exchange chromatography-thermospray mass-spectrometry in the analysis of oligosaccharides. *Rapid Commun Mass Spectrom* **6**, 474-478.
 16. van der Hoeven RAM, Niessen WM, Schols HA, Bruggink C, Voragen AG, & van der Greef J (1992) Characterization of sugar oligomers by on-line high-performance anion-exchange chromatography-thermospray mass spectrometry. *J Chromatogr* **627**, 63-73.
 17. Schols HA, Voragen AG, & Bruggink C (1992) Analyse van koolhydraten met HPAEC/PAD: aanvulling of doorbraak? *Voedingsmiddelentechnologie* **7**, 30-33.
 18. Cook K, Dewsbury P, Burgess K, & Bruggink C (2010) Ion Chromatography Coupled to MS for Metabolomic Analysis. *Chromatography Today* 16-19.
 19. Bruggink C, van Rossum WJ, Spijkerman E, & van Beelen ES (2007) Iodide analysis by anion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection in surface water and adsorbable organic iodide. *J Chromatogr A* **1144**, 170-174.
 20. Bruggink C, van Rossum WJ, & Smeenk JGMM (1995) Ionchromatografische spooranalyse van bromaat in drink- en oppervlaktewater met behulp van een macro-injectiesysteem. *H₂O* **28**, 343-347.

DANKWOORD – ACKNOWLEDGEMENTS

De belangrijkste persoon waar mijn dank naar uitgaat, is mijn echtgenote Helen. Zij heeft mij altijd liefdevol de ruimte gegund om me te ontwikkelen en dat “schat”, zal niet altijd eenvoudig zijn geweest. Als je dit leest is de vraag: ‘is je promotieonderzoek nu af?’, beantwoord. Ongetwijfeld ben ik vergeten om personen te noemen die hebben geholpen bij het tot stand komen van dit proefschrift en ik bied u mijn welgemeende excuses aan. Ik hoop dat u toch kan genieten van wat bereikt is. Aan Franck van Veen en anderen heb ik te danken dat het mogelijk werd om dit promotieonderzoek te starten. Je zorgde voor de nodige toestemmingen en stimuleerde me om niet op te geven. Je verzuchtte een keer “you are a person that needs high maintenance” ... maar je hield het met mij vol. Chris Pohl I would like to thank you for providing all custom made materials required for my PhD research. The research described in Chapter 2 was performed in the laboratory of Dionex in Olten. Frank Höfler thank you for giving me this opportunity. Rob, mijn beste broer, je geduldig luisteren en het samen discussiëren over diverse zaken van technische aard heb ik enorm gewaardeerd. Ook hartelijk dank voor het bouwen en creëren van de onderdelen die nodig waren voor het promotieonderzoek. Manfred en André, jullie wil ik in het bijzonder bedanken voor het geduld en de discussies die mijn blik verbreedde. Zonder jullie zou dit proefschrift niet tot stand zijn gekomen. Collega’s van de afdeling Parasitologie en Biomoleculaire Massa Spectrometrie, jullie wil ik bedanken voor de gezelligheid, aanmoedigingen en discussies. Dat gaf en geeft me een thuis op het LUMC. Tanja, Henk, Ans, Rebecca, Yvonne en Angela bedankt voor jullie ondersteuning in het corrigeren van mijn teksten.

