

# Ionizacija negativnih iona nano-elektroaspršenjem uzrokovana umiješavanjem estera, aldehida i ketona u tok pokretne faze

---

Radić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:417712>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



MARTINA RADIĆ

IONIZACIJA NEGATIVNIH IONA NANO-  
ELEKTORASPRŠENJEM UZROKOVANA UMIJEŠAVANJEM  
ESTERA, ALDEHIDA I KETONA U TOK POKRETNE FAZE

**Diplomski rad**

Zagreb

2016.

MARTINA RADIĆ

IONIZACIJA NEGATIVNIH IONA NANO-  
ELEKTORASPRŠENJEM UZROKOVANA UMIJEŠAVANJEM  
ESTERA, ALDEHIDA I KETONA U TOK POKRETNE FAZE

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistre prirodnih znanosti (kemija)

Zagreb

2016.

Ovaj je diplomski rad izrađen u Laboratoriju za sistemsku biomedicinu na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Marija Cindrića i izv. prof. dr. sc. Ite Gruić-Sovulj, te neposrednim vodstvom dr. sc. Amele Hozić.

*Zahvaljujem se članovima Laboratorija za sistemsku biomedicinu na svim korisnim savjetima i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada.*

*Veliko hvala svim profesorima na prenesenom znanju i ljubavi prema znanosti.*

*Zahvaljujem se mami, tati i bratu na konstantnoj podršci i bodrenju tijekom školovanja i svoj pruženoj ljubavi tijekom života.*

*Hvala Zoranu što je uvijek uz mene, Kristini što brine o mojoj budućnosti i Korani što mi je uljepšala boravak u laboratoriju.*

# Sadržaj

<b>Sažetak.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Uvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturni pregled.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Spektrometrija masa.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Ionizacija .....	3
2.1.2. ESI ionizacija.....	4
2.1.2.1. Nastajanje nabijenih kapljica u procesu elektroraspršenja.....	5
2.1.2.2. Smanjenje nabijenih kapljica .....	6
2.1.2.3. Nastajanje iona u plinskoj fazi .....	8
2.1.3. Utjecaj kiselina, baza, aldehida i ketona na stvaranje negativnih iona elektroraspršenjem ..	8
2.1.4. Analizatori masa .....	11
2.1.4.1. Kvadrupolni analizator masa .....	11
2.1.4.2. TOF analizator .....	12
2.1.5. Hibridni analizatori masa .....	14
2.1.5.1. Q-TOF hibridni analizator masa .....	14
<b>2.2. Analiza proteina spektrometrijom masa .....</b>	<b>16</b>
2.2.1. Priprema proteina za analizu spektrometrijom masa.....	16
2.2.2. Spregnuti sustav tekućinski kromatograf-spektrometar masa (LC-MS) .....	18
2.2.3. Tekućinska kromatografija obrnutih faza .....	18
<b>2.3. Identifikacija proteina.....</b>	<b>20</b>
2.3.1. Tandemna spektrometrija masa.....	20
2.3.2. Fragmentacija peptida .....	21
2.3.3. Proteinske baze podataka .....	22
<b>3. Eksperimentalni dio .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Kemikalije .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Instrumenti.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Priprava otopina .....</b>	<b>25</b>
3.3.1. Priprava triptičkih peptida proteina BSA .....	25
3.3.2. Priprava otopina 2-fenil-2-oksoetanala, 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i formaldehida.....	25
<b>3.4. Analiza peptida vezanim sustavom nano-tekućinske kromatografije i spektrometrije masa visoke rezolucije.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Rezultati i rasprava .....</b>	<b>28</b>

<b>4.1. Utjecaj poboljšivača ionizacije na ionizaciju negativnih iona peptida.....</b>	<b>35</b>
4.1.1. <i>Selekcija poboljšivača ionizacije koji pokazuju veći ionizacijski potencijal peptida i proteina u negativnom načinu rada spektrometra masa od formaldehida .....</i>	<i>35</i>
4.1.2. <i>Formaldehid.....</i>	<i>37</i>
4.1.3. <i>2,2-dimetilpropanal .....</i>	<i>39</i>
4.1.4. <i>Etil-metanoat.....</i>	<i>41</i>
4.1.5. <i>2-fenil-2-oksoetanal .....</i>	<i>43</i>
<b>4.2. Usporedba utjecaja poboljšivača ionizacije po mjerenim masama.....</b>	<b>45</b>
4.2.1. <i>Peptidni ion m/z 787,4565 .....</i>	<i>45</i>
4.2.2. <i>Peptidni ion m/z 920,4729 .....</i>	<i>46</i>
4.2.3. <i>Peptidni ion m/z 1161,6156 .....</i>	<i>47</i>
4.2.4. <i>Peptidni ion m/z 782,3599 .....</i>	<i>48</i>
<b>4.3. Povezanost ionizabilnosti negativnih peptidnih iona s hidrofobnošću peptida .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4. Povezanost ionizabilnosti negativnih peptidnih iona s veličinom peptida i vremenom izlaska s kolone .....</b>	<b>52</b>
<b>4.5. Mehanizam reakcije prijenosa protona u kiselom mediju za korištene poboljšivače ionizacije negativnih iona .....</b>	<b>54</b>
4.5.1. <i>Mehanizam reakcije prijenosa protona kod formaldehida.....</i>	<i>54</i>
4.5.2. <i>Mehanizam reakcije prijenosa protona kod 2,2-dimetilpropanala.....</i>	<i>55</i>
4.5.3. <i>Mehanizam reakcije prijenosa protona kod etil-metanoata .....</i>	<i>56</i>
4.5.4. <i>Mehanizam reakcije prijenosa protona kod 2-fenil-2-oksoetanal.....</i>	<i>57</i>
<b>5. Zaključak.....</b>	<b>58</b>
<b>6. Popis korištenih kratica .....</b>	<b>60</b>
<b>7. Životopis.....</b>	<b>63</b>
<b>8. Literaturna vrela.....</b>	<b>64</b>

## Sažetak

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Diplomski rad

### IONIZACIJA NEGATIVNIH IONA NANO-ELEKTROASPRŠENJEM UZROKOVANA UMJEŠAVANJEM ESTERA, ALDEHIDA I KETONA U TOK POKRETNE FAZE

**Martina Radić**

Nastajanje negativnih iona elektroaspršenjem za cijelu klasu biomakromolekula (peptidi, proteini, DNA, RNA, ugljikohidrati) je energetski nepovoljnije od nastajanja pozitivnih iona u ionskom izvoru spektrometra masa. Jedan od razloga je vezan uz nemogućnost postizanja stabilnog elektroaspršenja u negativnom načinu rada spektrometra masa. Nastajanje i analiza negativnih iona peptida i proteina ima izraziti značaj u području proteomike, gdje bi se takvom primjenom pospjela uspješnost analize ukupnog aminokiselinskog slijeda proteina i njegovih posttranslacijskih modifikacija. Prijašnja istraživanja pokazala su pozitivan utjecaj formaldehida na formiranje negativnih iona selektivnih modulatora androgenih receptora. Smatra se da bi sličan utjecaj mogli imati i drugi aldehidi, ketoni i esteri jer podliježu sličnoj reakciji u kiselom mediju kao i formaldehid.

Proučavana je ionizacija negativnih iona peptida i proteina nano-elektroaspršenjem na hibridnom spektrometru masa koji se sastoji od T-vala, kvadrupola i analizatora vremena leta u neprekinutom slijedu (T-val Q-TOF MS). Tijekom predselekcije poboljšivača ionizacije (aldehida, ketona i estera) pokazalo se da su najveći utjecaj na nastajanje negativnih iona imali 2,2-dimetilpropanal, etil-metanoat i 2-fenil-2-oksoetanal. Da bi se pospjela ionizacija, odabrani poboljšivači ionizacije negativnih iona su umiješani u tok pokretne faze pri protoku od  $0,4 \mu\text{L min}^{-1}$  uz pomoć poslijekolonskog injekcijskog sustava. Rezultati su pokazali da se umiješavanjem mikromolarnih količina navedenih spojeva u matičnicu pokretne faze postigne ionizacija negativnih iona peptida i proteina u ESI-MS-u.

(65 + VIII stranica, 22 slike, 11 tablica, 34 literaturna navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb.

Ključne riječi: formaldehid, ionizacija elektroaspršenjem, negativni način rada, poboljšivači ionizacije negativnih iona, spektrometrija masa

Mentori: Dr. sc. Mario Cindrić, zn. sur., Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.

Ocjenjivači: Dr. sc. Mario Cindrić, zn. sur.

Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.

Dr. sc. Nives Galić, izv. prof.

Dr. sc. Vesna Petrović Peroković, izv. prof.

Rad prihvaćen: dana 22. veljače 2016., u Zagrebu



## Abstract

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Diploma Thesis

### NANO-ELECTROSPRAY IONIZATION OF THE NEGATIVE IONS CAUSED BY ADDING ESTERS, ALDEHYDES AND KETONES IN A MOBILE PHASE FLOW

**Martina Radić**

For a wide variety of biological compounds (peptides, proteins, DNA, RNA, carbohydrates), negative ion formation by electrospray ionization is energetically less favorable than positive ion formation in mass spectrometer ion source. One of the reasons is inability to maintain stable electrospray in negative ion mode. Formation and analysis of negative ions of peptides and proteins is of great importance in proteomics research, as they would significantly improve amino acid sequence analysis of proteins and analysis of their posttranslational modifications. Previous research showed favorable effects of formaldehyde on the negative-ion formation of selective androgen receptor modulators. It is assumed that other aldehydes, ketones and esters would have similar effect because their reaction mechanism in acidic medium is similar to the reaction mechanism of formaldehyde.

Hybrid T-wave quadrupole time-of-flight mass spectrometer (T-wave Q-TOF MS) was used for the study of nano-electrospray formation of negative ions of peptides and proteins. Pre-selection of the negative-ion enhancers (aldehydes, ketones and esters) showed that the greatest effect on negative-ion formation had 2,2-dimethylpropanal, ethyl methanoate and 2-oxo-2-phenylethanal. The selected negative-ion enhancers were added postcolumn at a flow rate of 0,4  $\mu\text{L min}^{-1}$  to a mobile phase flow to enhance ionization. Results showed that formation of negative ions of peptides and proteins in ESI-MS was achieved by addition of micromolar quantities of the mentioned negative-ion enhancers to the mobile phase flow.

(65 + VIII pages, 22 figures, 11 tables, 34 references, original in Croatian)

Thesis is deposited in the Central Chemical Library, Horvatovac 102a, Zagreb.

Keywords: electrospray ionisation, formaldehyde, mass spectrometry, negative-ion enhancers, negative mode

Supervisor: Dr. Mario Cindrić, Asst. Prof.  
Dr. Ita Gruić Sovulj, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Mario Cindrić, Asst. Prof.  
Dr. Ita Gruić Sovulj, Assoc. Prof.  
Dr. Nives Galić, Assoc. Prof.  
Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

Thesis accepted: on February 22<sup>nd</sup> 2016., in Zagreb

# 1. Uvod

Spektrometrija masa je instrumentalna analitička tehnika u kojoj se molekule analita ioniziraju, a potom se nastali ioni u plinskoj fazi razdvajaju i detektiraju prema njihovom omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). U širokoj primjeni je od ranih četrdesetih godina prošlog stoljeća, kada je najčešće korištena u petrokemijskoj industriji za kvalitativno i kvantitativno određivanje smjese ugljikovodika. Otkrićem ionizacije elektroraspršenjem (ESI)<sup>1</sup> i matricom pomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI)<sup>2</sup> analiza je proširena i na spojeve s molekulskom masom od nekoliko stotina tisuća daltona, čime spektrometrija masa postaje nezaobilazna tehnika u analizi biopolimera, kao što su na primjer proteini. Osim navedenih područja, područje primjene spektrometrije masa je izuzetno široko te učestalo obuhvaća: farmaceutiku, biomedicinu, ekologiju i biotehnologiju. Osim analize kompleksnih bioloških smjesa (npr. smjesa biopolimera), koristi se i u elementnoj i izotopnoj analizi (ICP-MS, engl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*),<sup>3</sup> za karakterizaciju i separaciju anorganskih, organskih i bioloških spojeva, te općenito kvalitativnu i kvantitativnu analizu istih. Jedan od preduvjeta identifikacije proteina, određivanja aminokiselinskog slijeda ili određivanja položaja posttranslacijskih modifikacija (glikozilacija, fosforilacija, disulfidni mostovi itd.) je točno mjerenje masa (tzv. HRMS, engl. *High Resolution Mass Spectrometry*).<sup>4</sup> Nadalje, spektrometrija masa se može primijeniti i u istraživanju protein-protein interakcija ili interakcija proteina i malih organskih molekula.

Nastajanje iona u plinskoj fazi je početni korak u analizi spektrometrijom masa. Dva najučestalije korištena načina ionizacije biopolimera u spektrometriji masa su ESI i MALDI. Ionizacijom elektroraspršenjem nastaju višestruko nabijeni ioni što omogućuje detekciju izrazito velikih biopolimera u području od svega nekoliko tisuća  $m/z$  (npr. uz upotrebu analizatora kvadrupol, Q ili ionska stupica, IT). Ionizacijskom tehnikom MALDI predominantno nastaju jednostruko nabijeni ioni, što neizbježno proširuje  $m/z$  mjerne područje (npr. uz upotrebu analizatora koji mjeri vrijeme leta, TOF ili analizatora ionsko ciklotronske rezonancije, ICR), u odnosu na ESI ionizaciju. Budući da je MALDI pulsna

tehnika, najčešće se povezuje s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta (TOF, engl. *Time Of Flight*), ali je moguće povezivanje i s analizatorom ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju (FT-ICR, engl. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*). Navedeni analizatori se mogu sinkronizirati sa pulsним radom lasera i zato se najčešće primjenjuju u analizama intaktnih biopolimera.

Razvojem i usavršavanjem tehnika spektrometrije masa postupak identifikacije proteina znatno je olakšan. Sekvencioniranje genoma i primjena točnijih i robusnijih tehnika pridonijelo je razvoju interdisciplinarnе znanosti, proteomike, koja ima za cilj karakterizaciju svih proteina koje organizam proizvede tijekom života.<sup>5</sup> Dva su osnovna pristupa u proteomskim istraživanjima: pristup odozdol nagore (engl. *Bottom-Up*) i pristup odozgor nadolje (engl. *Top-Down*). Učestaliji pristup odozdol nagore sastoji se u analizi peptida nastalih cijepanjem proteina specifičnim proteazama, a rjeđe korišteni pristup odozgor nadolje temelji se na analizi intaktnih proteina.

Analiza proteina tehnikom ESI-MS može se provoditi u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa. U pozitivnom načinu rada nastaju  $[M+H]^+$  ioni, dok u negativnom načinu rada nastaju  $[M-H]^-$  ioni. Strukturalne informacije dobivene pozitivnim i negativnim načinom snimanja su komplementarne i pomažu pri karakterizaciji nepoznatih analita.<sup>6</sup>

Cilj diplomskog rada je proučiti način na koji se ionizacija u negativnom načinu rada ESI-MS-a može poboljšati. Ranija istraživanja pokazala su da u formiranju negativnih ESI iona sudjeluje formaldehid koji prelazi u svoju hidroksiliranu formu, metandiol te se time apsorbira većina protona koji ometaju proces ionizacije negativnih iona. O konstanti ravnoteže ovisi uspješnost ionizacije peptida i proteina u negativnom načinu rada spektrometra masa. Potrebno je proučiti doprinos estera, aldehida i ketona umiješanih u tok pokretne faze ionizaciji peptida i proteina u negativnom načinu rada spektrometra masa budući da ti spojevi podliježu sličnoj reakciji kao i formaldehid u kiselom mediju. Stoga je neophodno načiniti klasifikaciju estera, ketona i aldehida pogodnih za umiješavanje u pokretnu fazu tijekom separacije peptida i proteina, koji bi potaknuli dodatnu ionizaciju istih u negativnom načinu rada spektrometra masa.

## 2. Literaturni pregled

### 2.1. Spektrometrija masa

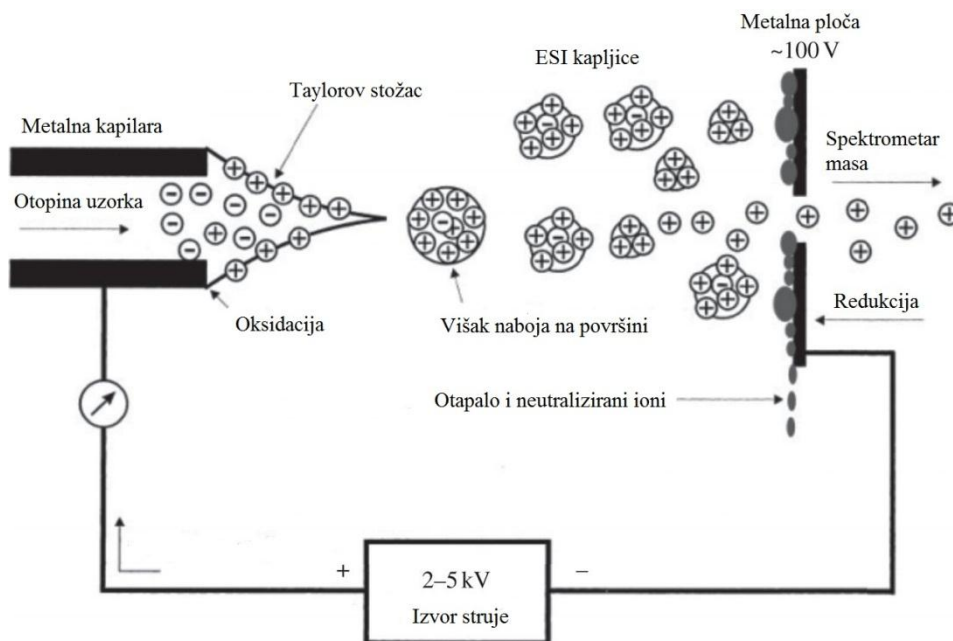
Analiza uzorka tehnikom spektrometrije masa započinje uvođenjem analita u ionski izvor gdje se događa ionizacija, nakon čega nastali ioni putuju u analizator masa gdje se odvajaju prema omjeru mase i naboja ( $m/z$ ), te u konačnici dolaze do detektora koji registrira broj iona pri svakoj vrijednosti omjera  $m/z$ , što rezultira stvaranjem spektra masa. Mogućnosti izvedbe tehnike spektrometrije masa, s obzirom na izbor ionizatora, analizatora masa i detektora, su mnogobrojne.<sup>7</sup>

#### 2.1.1. Ionizacija

Prevođenje analita u plinovito stanje i njegova ionizacija neophodno je za analizu uzoraka tehnikama spektrometrije masa. Postoji više različitih načina ionizacije, a dijele se u dvije glavne kategorije: plinske i desorpcijske ionske izvore. Kod plinskih ionskih izvora, uzorak se najprije prevodi u plinovito stanje, a potom ionizira. Toj skupini pripadaju npr. ionizacija elektronima (EI, engl. *Electron Ionization*), kemijska ionizacija (CI, engl. *Chemical Ionization*), te ionizacija poljem (FI, engl. *Field Ionization*). Desorpcijskom metodom ionizacije uzorak se direktno iz čvrstog ili tekućeg stanja prevodi u ionizirani plin, što je pogodno za analizu slabo hlapljivih i termički nestabilnih uzoraka. Neke od desorpcijskih metoda ionizacije su ionizacija brzim atomima (FAB, engl. *Fast Atom Bombardment*), desorpcija laserom (LD, engl. *Laser Desorption*), matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (MALDI, engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), te elektroraspršenje (ESI, engl. *Electrospray Ionization*).

### 2.1.2. ESI ionizacija

Elektroaspršenje je nedestruktivan način ionizacije uzorka direktno iz otopine te omogućuje izravno povezivanje spektrometrije masa i tekućinske kromatografije. Smanjenjem brzine protoka analizirane otopine (npr. mikro- ili nano-elektroaspršenje) povećava se osjetljivost tehnike te su granice detekcije reda veličine atomola ( $10^{-18}$  mol). Mehanizam elektroaspršenja se sastoji od više uzastopnih elektrokemijskih reakcija koje prevode ione analita iz tekućeg u plinsko stanje. Otopina koja sadrži analit prolazi kroz metalnu ili silikatnu kapilaru protokom od 0,1 do 50  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Na vrh kapilare se pri atmosferskom tlaku primjenjuje jako električno polje električnog potencijala 2-5 kV. Primijenjeni napon može biti pozitivan ili negativan, u ovisnosti o naboju iona analita ili pokretne faze, te uzrokuje gradijent električnog polja potreban da bi došlo do razdvajanja naboja na površini tekućine. Kao rezultat toga, pri kritičnoj jakosti polja nastaje tzv. Taylorov stožac (Slika 2.1.).<sup>8</sup> Kada otopina koja tvori Taylorov stožac dosegne Rayleighov limit (točku pri kojoj su odbojne Coulombove sile naboja na površini jednake napetosti površine tekućine), kapljice koje sadrže višak pozitivnog ili negativnog naboja se odvajaju s vrha stošca. Postoje dva modela kojima se objašnjava nastajanje molekulskih iona. Model ostatka naboja pretpostavlja da povećana gustoća naboja i isparavanje otapala uzrokuje da se velike kapljice dijele u sve manje i manje, dok naposljetku ne ostane iznimno mala kapljica koja sadrži samo jedan ion. Isparavanjem molekula otapala nastaje ion u plinskoj fazi. Drugi model, poznat kao isparavanje iona, pretpostavlja da povećana gustoća naboja koja rezultira isparavanjem otapala uzrokuje Coulombovo odbijanje ne bi li se prevladala površinska napetost, što rezultira isparavanjem iona s površine kapljica prije nego li kapljica dostigne Rayleighov limit i započne dijeljenje. Ioni analita putuju do ulaza u spektrometar masa. Inertni plin, poput dušika i ugljikova dioksida, pomaže evaporizaciju kapljica i tvorbu iona analita.<sup>9</sup>



Slika 2.1. Shematski prikaz elektroraspršenja.<sup>9</sup>

Proces elektroraspršenja prikladno je podijeliti u tri faze: nastajanje kapljica, smanjenje kapljica i nastajanje iona u plinskoj fazi.

#### 2.1.2.1. Nastajanje nabijenih kapljica u procesu elektroraspršenja

Nastajanje nabijenih kapljica na vrhu kapilare početna je faza u procesu elektroraspršenja. Jakost električnog polja  $E_c$  u prostoru oko vrha kapilare može se iskazati izrazom:

$$E_c = \frac{2 V_c}{r_c \ln\left(\frac{4d}{r_c}\right)}$$

gdje je  $V_c$  primijenjeni potencijal,  $r_c$  vanjski radijus kapilare i  $d$  udaljenost od vrha kapilare do susjedne elektrode. Pod utjecajem električnog polja dolazi do separacije naboja u tekućini. Pri određenoj jakosti polja deformira se meniskus, odnosno stvara Taylorov stožac. Pri dovoljno jakom polju Taylorov stožac postaje nestabilan i na njegovu se vrhu stvara tanka nit tekućine čija je površina obogaćena pozitivnim ili negativnim ionima. Kada nit na određenoj udaljenosti postane nestabilna, iz nje nastaju kapljice s viškom aniona ili kationa. Potrebna jakost električnog polja za nastajanje nabijenih kapljica dana je izrazom:

$$E = \left( \frac{2 \gamma \cos 49^\circ}{\varepsilon_0 r_c} \right)^{1/2}$$

gdje je  $\gamma$  napetost površine tekućine,  $49^\circ$  polovina kuta Taylorovog stošca,  $\varepsilon_0$  permitivnost vakuumu i  $r_c$  radijus kapilare.<sup>10,11</sup>

Elektroraspršenje se može promatrati kao specijalna vrsta elektrolitske ćelije, u kojoj se transport dijela naboja ne odvija kroz otopinu, već kroz plinsku fazu, najprije preko nabijenih kapljica, a onda preko iona u plinskoj fazi. U pozitivnom načinu rada ESI-MS-a, negativno nabijeni ioni putuju u smjeru metalne kapilare, dok pozitivno nabijeni ioni putuju prema susjednoj elektrodi i time dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini. Primijenjeno jako električno polje u suprotnosti je s napetosti površine tekućine i kao rezultat toga nastaje Taylorov stožac. Zbog velike razlike u potencijalu između kapilare i suprotne elektrode, na granici faza metal-otopina dolazi do oksidacije, a na suprotnoj elektrodi odvija se redukcija. Pri negativnom načinu rada ESI-MS tehnike, smjer kretanja aniona i kationa, kao i elektrokemijske reakcije koje se odvijaju na elektrodama, suprotne su od gore opisanih u pozitivnom načinu rada. Na granici faza metal-otopina dolazi do redukcije, a na suprotnoj elektrodi odvija se oksidacija.<sup>12</sup>

#### 2.1.2.2. Smanjenje nabijenih kapljica

Početna veličina nabijenih kapljica nastalih elektroraspršenjem ovisi o nekoliko parametara, kao što su brzina protoka otopine i svojstva otapala. Radijus  $R$  i naboj  $q$  kapljica nastalih na izlazu iz kapilare mogu se procijeniti na temelju sljedećih izraza:

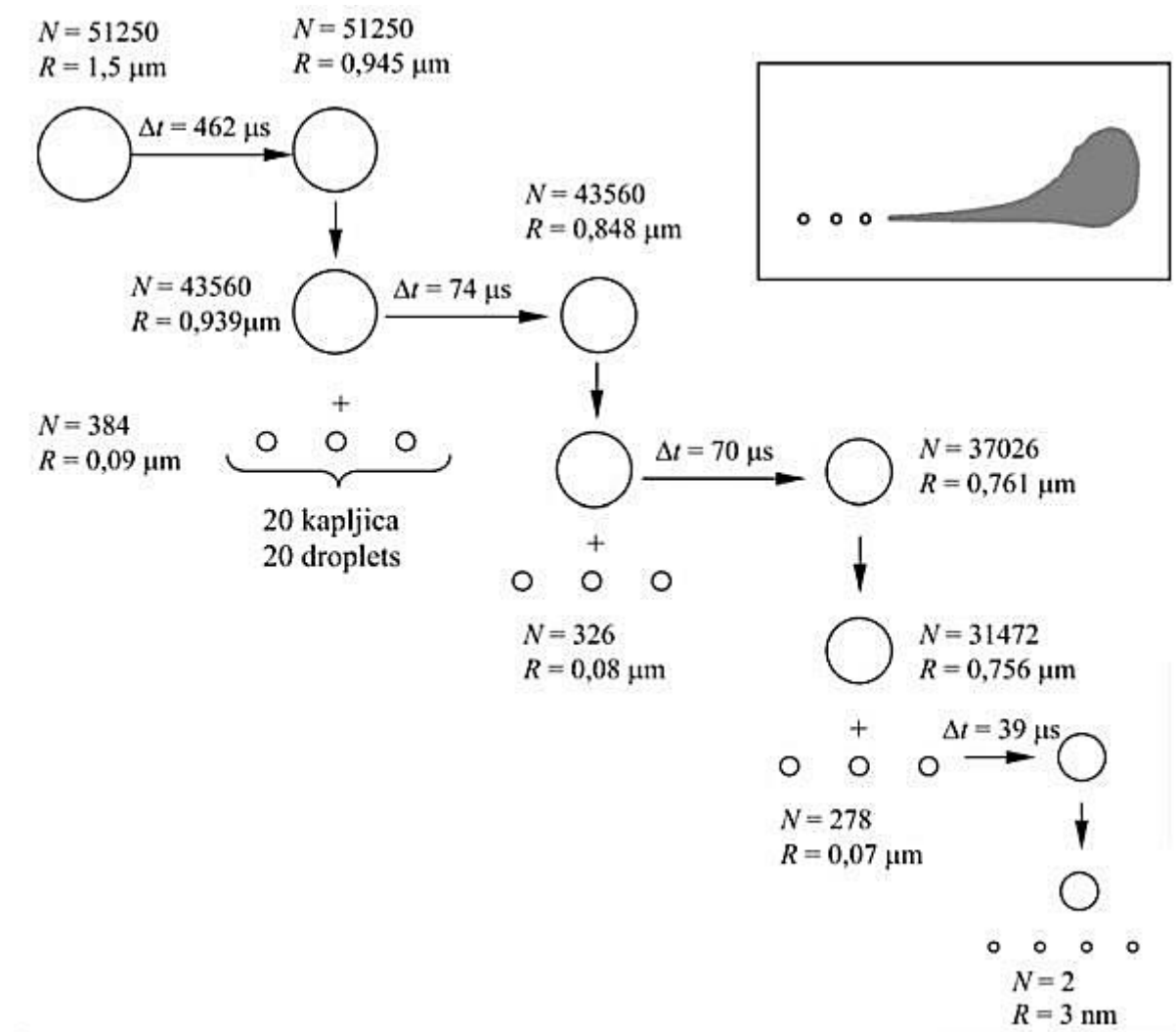
$$R \approx \left( \frac{V_i \varepsilon}{\kappa} \right)^{1/3}$$

$$q \approx 0,7 [8\pi(\varepsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}]$$

gdje je  $V_i$  brzina protoka otopine,  $\kappa$  provodnost otopine i  $\varepsilon$  permitivnost otopine. Kako otapalo potpomognuto grijanjem isparava, smanjuje se veličina kapljica, ali naboj ostaje konstantan. Kada se sila elektrostatskog odbijanja izjednači s površinskom napetosti, postiže se Rayleigheva granica stabilnosti:

$$q = 8\pi(\varepsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}$$

Unutar približno 100  $\mu\text{s}$  radijus ishodne kapljice dovoljno je blizu Rayleighevoj granici, dolazi do Coulombova dijeljenja i nastajanja manjih kapljica produkata koje nose oko 2 % mase i 15 % naboja ishodne kapljice (Slika 2.2.). Daljnjim smanjivanjem kapljica produkata, zbog isparavanja otapala, proces dijeljenja se nastavlja dva do tri puta uz konstantno povećanje omjera pozitivnog ili negativnog naboja na površini kapljice i sparenih iona elektrolita u unutrašnjosti. Ustanovljeno je da dolazi do nesimetričnog dijeljenja kapljica, nazvanog raspadom mlaza (engl. *Jet Fission*), u kojemu nastaju dvije vrste kapljica, velike, koje u sebi nose neželjene sparene ione elektrolita, i male, iz kojih nastaju ioni u plinskoj fazi.



**Slika 2.2.** Shematski prikaz nastajanja kapljica produkata iz ishodnih kapljica.  $R$  = radijus kapljice,  $N$  = broj elementarnih naboja na površini kapljice,  $\Delta t$  = vrijeme potrebno za smanjivanje kapljice do veličine kad započinje proces Coulombova dijeljenja. U gornjem desnom uglu prikazano je nesimetrično dijeljenje jedne kapljice.<sup>12</sup>



### 2.1.2.3. Nastajanje iona u plinskoj fazi

Kao što je ranije spomenuto, dva su modela kojima se objašnjava nastajanje iona u plinskoj fazi: model ostatka naboja<sup>13</sup> i model isparavanja iona.<sup>14</sup> Model ostatka naboja pretpostavlja da povećana gustoća naboja i isparavanje otapala uzrokuju da se velike kapljice dijele u sve manje i manje, dok naposljetku ne ostanu iznimno male kapljice, radijusa približno 1 nm, koje sadrže samo jedan ion. Isparavanjem molekula otapala nastaje ion u plinskoj fazi. Smatra se da velike molekule, mase barem preko 3300 Da, nastaju tim procesom. Drugi model, model isparavanja iona, pretpostavlja da iz kapljica radijusa približno 8 nm, sa suviškom od približno 70 elementarnih naboja, dolazi do isparavanja iona prije nego li kapljica dostigne Rayleighovu granicu i započne dijeljenje. Smatra se da ioni manji od navedenih 3300 Da u plinskoj fazi pretežno nastaju tim mehanizmom.

### 2.1.3. Utjecaj kiselina, baza, aldehida i ketona na stvaranje negativnih iona elektroraspršenjem

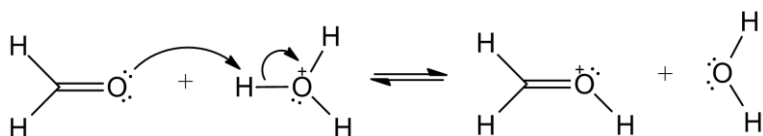
Analogno formiranju protoniranih iona, negativni ioni mogu biti formirani deprotoniranjem. Pri procesu elektroraspršenja nastale kapljice nose negativan ili pozitivan naboj ovisno o primjenjenom potencijalu.<sup>15</sup> Česti problem kod negativnog načina rada ESI-MS-a je električni izboj (engl. *Corona Discharge*), koji uzrokuju elektroni izbijeni iz ESI kapilare. Kod vodenih i drugih otopina velike ionske jakosti postaje izrazito teško održati stabilno elektroraspršenje pri negativnom ESI-MS-u, budući da odbijanje većinom negativnih iona pokretne faze, koji služe za kromatografsku separaciju peptida (npr. mravlja kiselina) ometa uspostavu stabilnog redoks potencijala. Jedan od načina suzbijanja nasumičnih električnih izboja je umiješavanje izopropanola u tok pokretne faze, budući da on pomaže magličanju, desolvataciji i prijenosu iona u otopini do plinovite faze.<sup>16</sup>

Slabe organske kiseline, poput očetene ili mravlje često se dodaju pri pozitivnom načinu rada ESI-MS-a zato što omogućavaju poboljšanu kromatografsku separaciju, a pri tome dodatno olakšavaju protoniranje analita sa bazičnim funkcionalnim skupinama. Stoga je razumljivo pretpostaviti kako će dodatak baza pogodovati deprotoniranju analita u negativnom načinu rada ESI-MS. No, istraživanja su pokazala da to nije slučaj. Dodatak

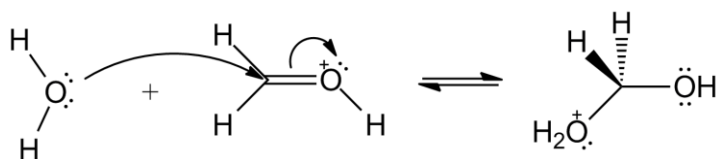
baza, poput amonijevog hidroksida nije poboljšao, već smanjio ionizaciju u negativnom načinu rada ESI-MS. Prema radu Z. Wu i sur., 2004.,<sup>6</sup> slabe kiseline, kao što su octena, propanska i butanska, pomažu stvaranje negativnih iona i time povećavaju odziv instrumenta u negativnom ESI načinu snimanja. Mravlja kiselina smanjuje ionizaciju, baš kao i baze, te neutralne soli. Opaženi fenomen može se objasniti afinitetom aniona navedenih kiselina prema protonima u plinovitom stanju, što se opisuje Gibbsovom slobodnom energijom stvaranja kiseline iz aniona i protona u plinovitom stanju. Od navedenih kiselina octena ima najveći afinitet prema protonima u plinovitom stanju, dok mravlja ima najmanji.  $pK_a$  vrijednost (negativan logaritam konstante disocijacije) za otopine tih kiselina ne razlikuje se od vrijednosti u plinovitom stanju. Protoni iz kiselina pružaju katione potrebne za elektrokemijsku redukciju, dok konjugirane baze nose višak negativnog naboja na površini kapljica što značajno doprinosi deprotoniranju analita koji ulaze u plinovitu fazu.<sup>6</sup>

Osim utjecaja kiselina, Z. Wu i sur. su pratili i utjecaj drugih poboljšivača ionizacije na formiranje negativnih iona elektroraspršenjem. Dva poboljšivača ionizacije (2,2,2-trifluoretanol i formaldehid) pokazali su se izrazito uspješni u ionizaciji negativnih iona. Anioni tih reagensa imaju visoki afinitet prema protonima u plinovitom stanju. Ipak, koncentracija tih poboljšivača ionizacije potrebna da se poveća ESI odziv bila je veća od koncentracija kiselina, što je najvjerojatnije povezano s njihovom niskom  $pK_a$  vrijednošću. Dodatkom formaldehida prisutni protoni, koji ometaju ionizaciju negativnih iona, ulaze u ravnotežnu reakciju nastajanja metandiola, te je time proces ionizacije negativnih iona dodatno pomognut. Mehanizam nastajanja metandiola iz formaldehida prikazan je u tri koraka:<sup>17</sup>

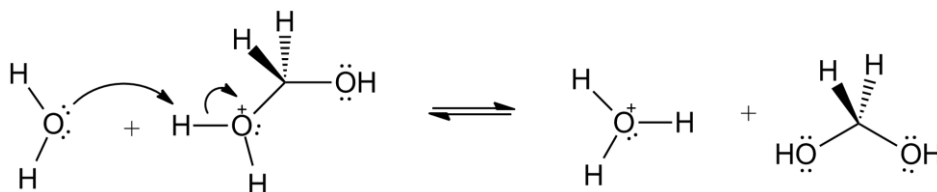
1) Protoniranje karbonilnog kisika:



2) Nukleofilna adicija na protonirani formaldehid:

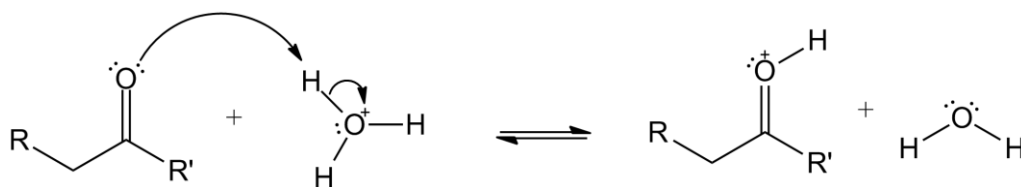


3) Prijenos protona s protonirane kiseline geminalnog diola na molekulu vode:

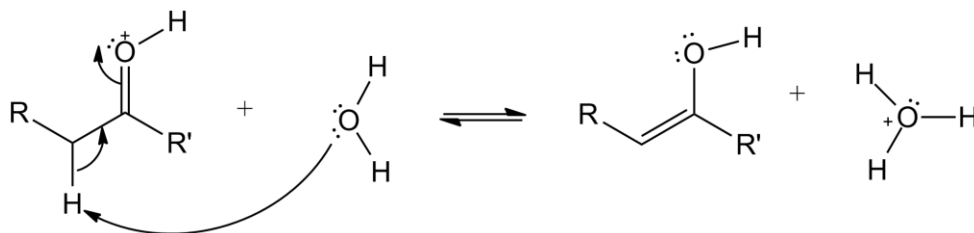


Umjesto formaldehida, deprotoniranje molekula analita može poboljšati dodatak ketona ili aldehida, koji u kiselom podliježu keto-enolnoj ravnoteži. Mehanizam keto-enolne ravnoteže uključuje dva koraka prijenosa protona:<sup>17</sup>

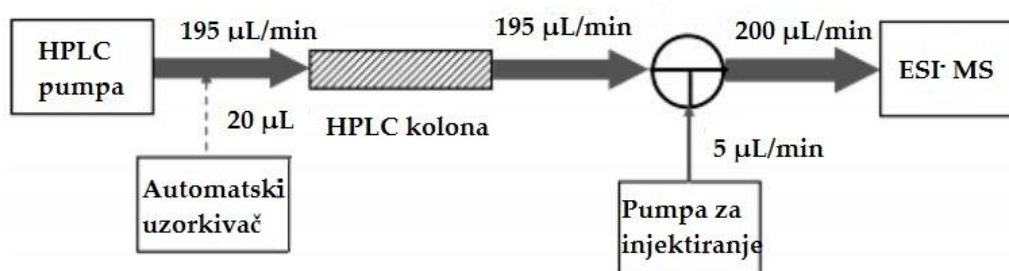
1) Prijenos protona na karbonilni kisikov atom:



2) Prijenos protona s  $\alpha$ -ugljikovog atoma na vodu:



Da bi se ispitalo utjecaj estera, aldehida i ketona potrebno je napraviti poslijekolonski injekcijski sustav (Slika 2.3.). Poboljšivači ionizacije negativnih iona se dodaju u tok pokretne faze nakon kromatografske separacije, a prije ulaska u ionski izvor spektrometra masa.



**Slika 2.3.** Shematski prikaz poslijekolonskog injekcijskog sustava. Nakon separacije na kromatografskoj koloni, efekt poboljšivača ionizacije testiran je uvođenjem istih pomoćnom pumpom za nadodani protok, a prije ulaska u ionski izvor spektrometra masa.<sup>6</sup>

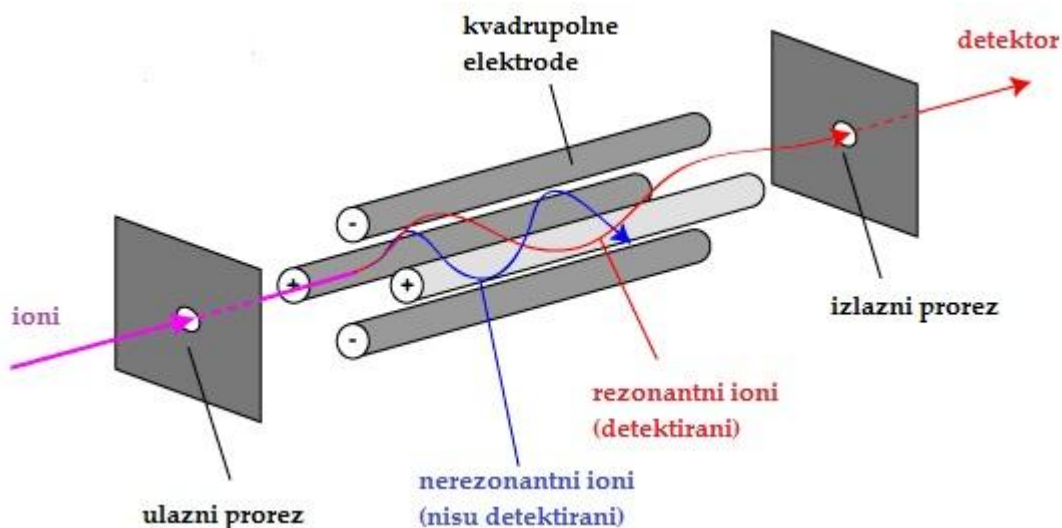
#### 2.1.4. Analizatori masa

Analizator je dio spektrometra masa u kojemu se razdvajaju ioni različitog omjera mase i naboja. U proteomici se najčešće upotrebljavaju kvadrupol i TOF analizator, te hibridni analizatori nastali kao kombinacija istih. Različiti analizatori masa zahtijevaju i različite ionizacijske izvore i detektore iona.

##### 2.1.4.1. Kvadrupolni analizator masa

Kvadrupolni analizator masa (Q) se sastoji od četiri usporedne elektrode dijagonalno električki povezane: jedan par ima pozitivni, a drugi negativni polaritet (Slika 2.4.). Dijagonalno suprotne elektrode dodatno su povezane radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje koji je za 180° izvan faze. Ioni koji ulaze u analizator imaju različit omjer mase i naboja i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju mogu zadržati stabilnu putanju i proći kroz analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule. Kvadrupolni analizator može razdvojiti ione čija je razlika u masi do 0,5 Da. Ako se kvadrupol koristi kao jedini analizator, gornja granica područja mjerenja mase je do 4000 Da. Selekcija iona različitih vrijednosti  $m/z$  postiže se proporcionalnim promjenama amplitude radiofrekvencije i struje. U ovisnosti o primijenjenim amplitudama, određeni ioni specifične  $m/z$  vrijednosti postižu rezonanciju, neometano prolaze kroz analizator ne sudarajući se ni sa jednim od

parova elektroda i dolaze do detektora. Istovremeno, nerezonantni ioni se sudaraju sa parom elektroda suprotnog polariteta te se na taj način neutraliziraju.



Slika 2.4. Shema kvadrupolnog analizatora masa.<sup>18</sup>

#### 2.1.4.2. TOF analizator

Anlizator vremena leta (TOF, engl. *Time Of Flight*), nakon ubrzavanja iona električnim poljem, razdvaja ione na temelju njihove brzine putovanja, odnosno vremena leta kroz cijev analizatora (Slika 2.5.). Svi ioni koji ulaze u analizator imaju različitu brzinu koja ovisi o njihovoj masi; manji ioni imaju veću brzinu, a veći ioni manju brzinu. Jednadžbe kojima se može opisati način mjerenja mase u TOF-u:

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV$$

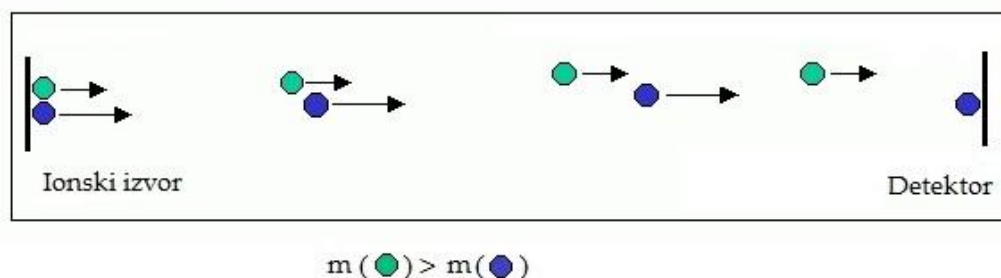
$$q = ze$$

$$t = \frac{d}{v}$$

$$\frac{m}{z} = t^2 \frac{(2Ve)}{d^2}$$

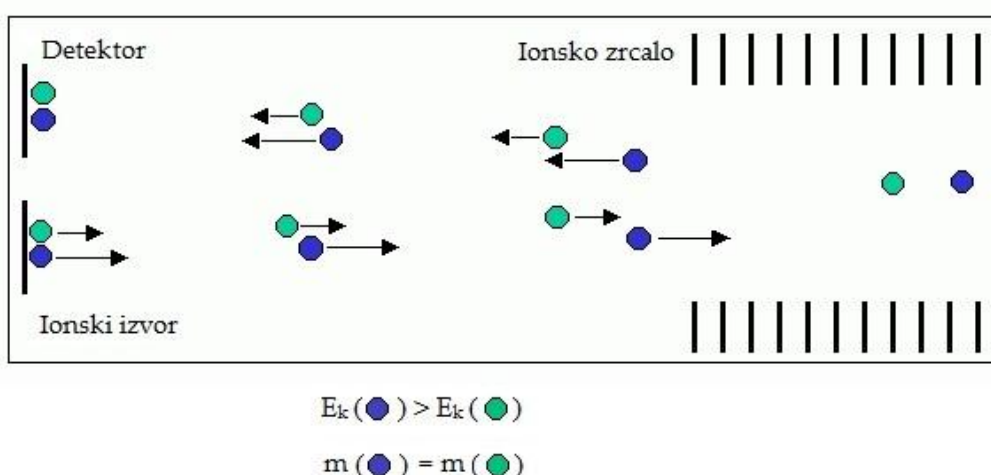
$$v \approx \sqrt{\frac{2Ve}{m/z}}$$

gdje je  $E_k$  kinetička energija iona,  $m$  masa iona,  $v$  brzina iona,  $V$  napon,  $q$  naboj iona,  $z$  ionski broj,  $e$  elementarni naboj,  $d$  duljina cijevi i  $t$  vrijeme leta. Ako pretpostavimo da su napon i duljina cijevi konstantni,  $m/z$  ovisi jedino o vremenu leta iona. Ioni veće vrijednosti  $m/z$  su sporiji i kasnije dolaze do detektora, dok su ioni manjih vrijednosti  $m/z$  brži i dolaze ranije do detektora.



Slika 2.5. Princip rada linearnog analizatora.

Poboljšanje razlučivosti TOF analizatora postiže se ugradnjom ionskog zrcala (reflektrona). Refleksijom na ionskom zrcalu produljava se put iona veće kinetičke energije te se omogućava da ioni istih masa, a različitih kinetičkih energija, dođu istovremeno do detektora (Slika 2.6.).



Slika 2.6. Princip rada analizatora s ionskim zrcalom.<sup>19</sup>

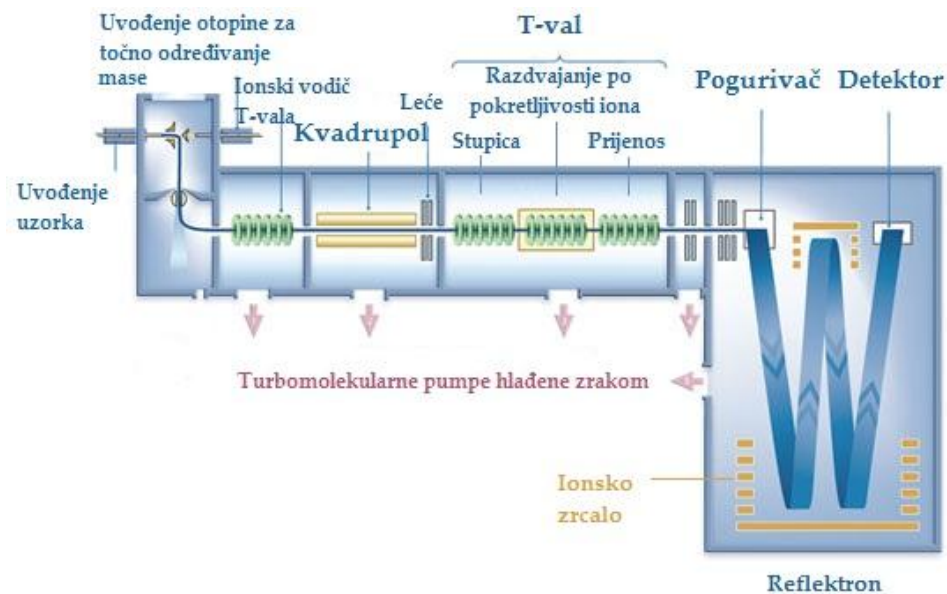
Ionsko zrcalo se sastoji od niza prstenastih elektroda. Primjenom potencijala stvara se polje koje zakreće i odbija ione prema detektoru. Ioni veće energije, a prema tome i veće brzine, prodiru dublje u ionsko zrcalo zbog čega se dulje zadržavaju, pa na detektor u isto vrijeme stižu ioni istih masa, a različitih kinetičkih energija.

#### 2.1.5. Hibridni analizatori masa

Hibridni analizatori masa sastoje se od dva ili više, istih ili različitih tipova analizatora masa, spregnutih u seriju. Takva konfiguracija omogućuje provedbu analize tehnikama tandemne spektrometrije masa. Tandemna spektrometrija masa predstavlja dodatnu mogućnost analize iona u vremenu ili prostoru, s ciljem izazivanja dodatne fragmentacije, s pomoću koje se kvalitetnije može odrediti struktura analiziranog iona. Spektrometre masa s mogućnosti tandemne analize možemo podijeliti u tri skupine: spektrometri masa s jednim analizatorom, kod kojih je teorijski moguća analiza do  $MS^n$  (npr. Fourier transformirana spektrometrija masa, FTMS ili ionska stupica, IT), spektrometri masa s više analizatora kod kojih je analiza moguća do  $MS^2$  (npr. trostruki kvadrupol, QQQ), te spektrometri masa s dva analizatora između kojih se nalazi kolizijska ćelija (tzv. hibridni spektrometri masa) kod kojih je, također, moguća analiza do  $MS^2$ . U proteomskim eksperimentima najčešće korišteni hibridni analizatori sastavljeni su od kvadrupola i TOF analizatora.

##### 2.1.5.1. Q-TOF hibridni analizator masa

Q-TOF hibridni analizator masa koristi kvadrupol i TOF analizator u analizi iona nastalih ESI tehnikom ionizacije. Ioni nastali ESI tehnikom ionizacije ulaze u kvadrupol kroz koji su propušteni s obzirom na njihovu vrijednost  $m/z$ . Propušteni ioni se skupljaju i u kvantiziranim vremenskim razmacima istovremeno propuštaju kroz TOF analizator u kojem se dodatno razdvajaju na temelju vremena leta (Slika 2.7.).



Slika 2.7. Shematski prikaz T-val Q-TOF hibridnog analizatora masa.<sup>20</sup>



Slika 2.8. Spregnuti sustav spektrometar masa visoke rezolucije SYNAPT G2-Si (Waters, Milford, MA, SAD) s kromatografskim sustavom nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, SAD).



## 2.2. Analiza proteina spektrometrijom masa

Proteini su biološke makromolekule koje obavljaju niz različitih funkcija u stanici. Sveobuhvatan skup proteina sintetiziranih unutar određene stanice ili tkiva naziva se proteom. Dok genom predstavlja skup potencijalnih proteina stanice, proteom je skup aktivnih sintetiziranih proteina, te se razlikuje od stanice do stanice s obzirom na staničnu okolinu i unutarstanične procese. Poznavanje proteoma je od izrazite važnosti za razumijevanje fenotipa i funkcionalnih razlika među stanicama, ali i načina odgovora stanica na stres ili oboljenje. Proteomska analiza spektrometrijom masa obuhvaća pripremu proteina (izolacijske, razdijelne i kvantifikacijske metode), analizu spektrometrijom masa i bioinformatičku obradu dobivenih podataka.

Analiza proteina spektrometrijom masa obuhvaća analizu intaktnog proteina ili analizu peptida nastalih enzimskom ili kemijskom razgradnjom proteina, te se može provoditi pristupima: odozgor nadolje (engl. *Top-Down*) i odozdol nagore (engl. *Bottom Up*). Učestaliji način analize je odozdol nagore, a uključuje cijepanje proteina i odstranjivanje posttranslacijskih modifikacija enzimskim putem (protease ili glikozidaze), kemijskim putem (hidrolizirajući reagensi) ili kombinirano. Nakon odgradnje proteina nastali peptidni fragmenti se analiziraju u spektrometru masa, a od dobivenih podataka gradi se uređeni bročani skup, kojem se nakon usporedbe sa *in silico* bazama podataka pridružuje identifikacijski broj (npr. kod NCBIInr baze podataka engl. *Gi Number*). Analiza odozgor nadolje vezana je uz analizu primarnog slijeda aminokiselina i posttranslacijskih modifikacija intaktnog proteina unutar samog instrumenta. Takva analiza zahtijeva točno mjerenje masa i prilikom same analize ili obrade podataka često dolazi do gubitka informacija o strukturi proteina.

### 2.2.1. Priprema proteina za analizu spektrometrijom masa

Priprema proteina za analizu spektrometrijom masa najprije podrazumijeva separacijsku tehniku. Eukariotska stanica može sadržavati i preko 50 000 različitih proteina od kojih su neki visoko zastupljeni, sa nekoliko milijuna istovjetnih kopija po stanici, dok su drugi slabo

zastupljeni sa svega nekoliko desetaka kopija po stanici.<sup>21</sup> Iz tog je razloga dobra separacija proteina počelo uspješne identifikacije ili kvantifikacije peptida i proteina. Bazične separacijske tehnike u svrhu razdvajanja peptida i proteina dijele se na elektroforetske i tehnike tekućinske kromatografije. Ako se koristi neka od separacijskih tehnika elektroforeze, analiza proteina spektrometrijom masa se gotovo isključivo provodi pristupom odozdol nagore, koji uključuje analizu peptidnih fragmenata nastalih odgradnjom proteina enzimskim ili kemijskim putem. Enzimsko cijepanje proteina provodi se proteazama, a najčešće korišteni kemijski reagensi za razgradnju proteina su cijanogenbromid i hidrosilamin. U Tablici 2.1. dani su najčešće korišteni proteolitički reagensi i specifično mjesto cijepanja peptidne veze proteina.

**Tablica 2.1.** Najčešće korišteni proteolitički reagensi.<sup>22</sup>

<b>Specifično mjesto cijepanja</b>	
<b>Proteaza</b>	
Tripsin	Iza Lys i Arg ako iza njih nema Pro
Kimotripsin	Iza aromatskih aminokiselina (Phe, Tyr, Trp)
Pepsin	Iza Leu, Phe, Tyr, Trp
Glu-C	Ispred Asp i Glu ako iza njih nema Glu ili Pro
Lys-C	Iza Lys ako iza njega nema Pro
Asp-N	Ispred Asp
<b>Kemijski reagens</b>	
Cijanogenbromid	Iza Met
Hidrosilamin	Između Asn i Gly

Zbog visokospecifične i ponovljive reakcije cijepanja proteina najčešće korišteni proteolitički reagens je tripsin. Cijepanjem tripsinom u većini slučajeva nastaju peptidi duljine od 5 - 30 aminokiselina, što je optimalna duljina niza za analizu spektrometrijom masa. Triptički fragmenti su peptidi sa bazičnim aminokiselinama arginina i lizina na C-kraju nastali tripsinolizom proteina.<sup>23</sup>

### 2.2.2. Spregnuti sustav tekućinski kromatograf-spektrometar masa (LC-MS)

Tehnike tekućinske kromatografije (LC, engl. *Liquide Chromatography*) su pogodne za razdvajanje peptida i proteina nastalih kemijskom ili enzimskom razgradnjom, budući da su i proteini i peptidi topivi u vodi ili smjesi vode i pogodnog organskog otapala (npr. acetonitril). Tekućinski kromatograf može se spregnuti sa spektrometrom masa (vezani sustav LC-MS) i kao vezani sustav pokriva široki raspon analize molekula tj. iona od biopolimera do malih farmaceutika. Tekućinski kromatograf i spektrometar masa povezani su međuspojem (engl. *Interface*), koji ima višestruku ulogu: otparavanje otapala, ionizacija neutralnih molekula analita i uvođenje istih u analizator. Princip na kojemu se temelji razdvajanje peptida i proteina tekućinkom kromatografijom je različita interakcija otopljenog analita sa nepokretnom i tekućom pokretnom fazom. Razlika interakcije analita sa nepokretnom fazom može nastati djelovanjem: adsorpcije, ionske izmjene, razdiobe među fazama ili veličine analita koji se razdvajaju. Valja napomenuti da afinitetna kromatografija kao specifična vrsta vezanja analita na protutijelo, koje je vezano na nepokretnu fazu, često predstavlja najjednostavniji način separacije peptida i proteina. Ograničenja vezana uz afinitetnu kromatografiju kao što je mogućnost separacije samo jedne vrste analita (specifična interakcija protutijela i supstrata), ovu kromatografsku tehniku izdvaja iz spregnutih sustava LC-MS. Međutim, analiza eluata nastalih nakon primjene afinitetne kromatografije je učestali način upotrebe afinitetne kromatografije u diskontinuiranom načinu rada spregnutog sustava LC-MS. Posljedica interakcije analita s pokretnom i nepokretnom fazom odražava se u različitom vremenu zadržavanja analita na koloni ili tankom sloju. Za pročišćavanje smjese peptida ili proteina uglavnom se koristi tekućinska kromatografija obrnutih faza, ionska kromatografija, kromatografija isključenjem ili neka od kombinacija navedenih tehnika kromatografske separacije.

### 2.2.3. Tekućinska kromatografija obrnutih faza

Kromatografija obrnutih faza (RP, engl. *Reverse Phase*) koja se koristi u razdvajanju i pročišćavanju smjese peptida i proteina prije analize spektrometijom masa temelji se na

razdvajanju proteina po njihovoj hidrofobnosti, tj. hidrofilnosti. Nepokretne faze koje se koriste su nepolarni oktadecilsilicijev dioksid (C<sub>18</sub>), oktilsilicijev dioksid (C<sub>8</sub>) i butilsilicijev dioksid (C<sub>4</sub>), dok je pokretna faza polarna i gradijentno se primjenjuje. Gradijentno eluiranje podrazumijeva promjenu ukupnog sastava pokretne faze, koja se postiže dobavljanjem dvije pokretne faze različitih polarnosti iz dvaju kanala (npr. sustav puferiranog vodenog otapala i metanola). Jedan kanal sadrži pokretnu fazu vodene otopine trifluoroctene kiseline (npr. 0,1 % TFA, *v/v*), a drugi određeni postotni udio prvog kanala pomiješan sa organskim otapalom (npr. metanol ili acetonitril, MeCN). Udio organske faze povećava se tijekom eluiranja pa se hidrofilniji proteini i peptidi ranije eluiraju, dok se hidrofobniji eluiraju pri većem postotku organskog otapala (tzv. gradijentna elucija).

### 2.3. Identifikacija proteina

Dva osnovna pristupa u identifikaciji proteina su identifikacija proteina putem pretrage baze podataka i identifikacija proteina *de novo* sekvenciranjem. Identifikacija proteina putem pretrage baze podataka temelji se na usporedbi eksperimentalno dobivenih podataka sa teoretskim podacima u bazama podataka, dok se identifikacija proteina sekvenciranjem *de novo* temelji na eksperimentalnom iščitavanju slijeda aminokiselina. Spektralne baze podataka, kao sredstvo identifikacije određenog proteina, pružaju određenu vjerojatnost da je identificirani protein onaj pravi. ESI-MS/MS baza podataka sadrži sve moguće teorijski nastale peptide triptičkim cijepanjem gdje su proteinski standardi visoke čistoće pocijepani tripsinom i potom analizirani. Jedna od najvećih baza podataka peptida i proteina koja se može koristiti kod identifikacije proteina ili određivanja aminokiselinskog slijeda proteina je SwissProt.

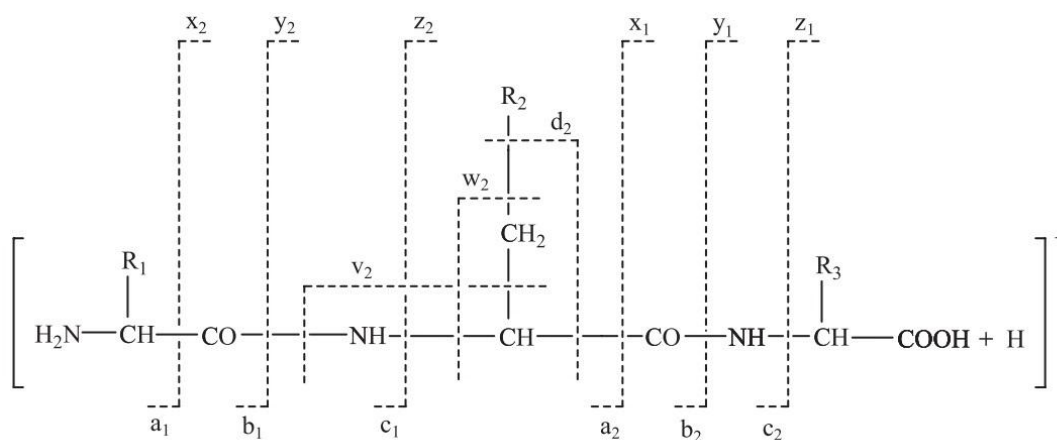
#### 2.3.1. Tandemna spektrometrija masa

Određivanje mase čitavog proteina, kao i peptida nastalih enzimskom ili kemijskom odgradnjom proteina, provodi se MS analizom. No, za određivanje slijeda aminokiselina (tj. strukturnu karakterizaciju proteina i peptida), potrebna je daljnja fragmentacija nastalih peptidnih iona. Način fragmentacije ovisi o vrsti spektrometra masa, uvjetima ionizacije, vrsti kolizijske ćelije, te korištenom inertnom plinu. Određivanje aminokiselinskog slijeda MS/MS načinom analize moguće je u načelu, kod peptida koji na sebi ne nose posttranslacijske modifikacije i čiji aminokiselinski sastav pogoduje određenom tipu ionizacije (npr. ESI ili MALDI). U slijedu produkcije iona po redosljedu nastajanja, razlikujemo ione prekursore iz kojih nastaju ioni produkti ili neutralne molekule zvane neutralni gubitak. Tandemna spektrometrija masa (MS/MS) podrazumijeva dva koraka analize: u prvom koraku analize ( $MS^1$ ) ioni prekursori određene molekulske mase se izoliraju i uvode u kolizijsku ćeliju, u kojoj se fragmentiraju sudarom s molekulama plina, a u drugom koraku se nastali ioni produkti razdvajaju na temelju  $m/z$  vrijednosti, te detektiraju

na detektoru. MS/MS analiza često se označava i kao MS<sup>2</sup>, dok se MS analiza označava kao MS<sup>1</sup>, pri čemu potencija označava generaciju analiziranih iona.<sup>24</sup>

### 2.3.2. Fragmentacija peptida

Postoje različite tehnike prijenosa energije u kolizijskoj ćeliji u svrhu izazivanja fragmentacije, od kojih se često rabi kolizijom inducirana disocijacija (engl. *Collision-Induced Dissociation*, CID), do koje dolazi u kolizijskoj ćeliji hibridnog spektrometra masa interakcijom iona prekursora i propuštenog inertnog plina. Nomenklaturu fragmentnih proteinskih iona predložili su 1984. godine Roepstroff i Fohlman,<sup>25</sup> a doradio 1988. godine Biemann.<sup>26</sup> Razlikujemo serije iona a<sub>n</sub>, b<sub>n</sub>, c<sub>n</sub> koji sadrže N-kraj peptida i serije x<sub>m</sub>, y<sub>m</sub> i z<sub>m</sub> koji sadrže C-kraj peptida, gdje je n redni broj aminokiseline s obzirom na udaljenost od N-kraja, tj. m redni broj aminokiseline s obzirom na udaljenost od C-kraja peptida (Slika 2.8.).



**Slika 2.8.** Fragmenti proteinskih iona dobiveni tehnikama CID ili PSD.

Nastali fragmentni ioni se tijekom MS/MS eksperimenta mogu i dodatno fragmentirati, a pri visokom naponu u kolizijskoj ćeliji moguć je i nastanak satelitnih iona u MS/MS spektru, koji se označavaju slovima d, v i w.

### 2.3.3. Proteinske baze podataka

Proteinske baze podataka sadrže informacije o eksperimentalno određenim trodimenzionalnim strukturama proteina, te time pružaju znanstvenoj zajednici pristup korisnim informacijama. Jedna od prvih proteinskih baza podataka je PDB<sup>27</sup> (The Protein Data Bank), osnovana 1971. godine kao glavni informacijski centar trodimenzijskih struktura proteina i nukleinskih kiselina. Danas tu bazu održava međunarodni konzorcij pod imenom wwPDB (Worldwide Protein Data Bank), čija je glavna zadaća održati proteinsku bazu podataka javno dostupnom široj zajednici. PDB baza sadrži gotovo sve informacije o riješenoj strukturi proteina, samog ili u kompleksu s ligandima. Mnoštvo različitih baza podataka osnovano je do danas, a u svrhu identifikacije proteina tehnikama spektrometrije masa najčešće se koristi NCBI<sup>28</sup> Swiss-Prot<sup>29</sup> baza podataka.

NCBI proteinska baza podataka sadrži slijedove iz više izvora, uključujući translacije kodirajućih slijedova iz genomskih baza podataka: GenBank (Genome Bank), RefSeq (Reference Sequence Project) i TPA (Third-Party Annotation), kao i zapise iz Swiss-Prot-a, PIR (Protein Information Resource), PRF (Protein Research Foundation) i PDB (Protein Data Bank). Swiss-Prot je jedna od najiscrpnijih baza podataka s mnoštvom podataka o pojedinom proteinu, kao što je biološka funkcija, posttranslacijske modifikacije, domene i vezna mjesta i dr.

Pretraga baze podataka se koristi za identifikaciju proteina analiziranih spektrometrijom masa pristupom odozdol nagore, a temelji se na činjenici da je svaki MS spektar smjese peptida nastalih enzimskom odgradnjom proteina svojevrsan otisak prsta tog proteina. Eksperimentalno određene mase peptida uspoređuju se s teoretski izračunatim masama pohranjenim u bazama podataka. Opisana metoda naziva se metoda otiska prsta (engl. *Peptide Mass Fingerprint*, PMF).<sup>30</sup> Na ovaj način moguće je identificirati samo proteine koji se nalaze u bazi podataka i uvijek treba biti svjestan krajnjeg očekivanog rezultata.

Neki od algoritama za identifikaciju proteina na temelju masa peptida rade pretraživanje nakon pretvorbe spektralnih podataka u tekstualni numerički oblik. Oni su vremenski zahtjevniji i većinom dostupni putem interneta (npr. ProteinProspector),<sup>31</sup> te nisu namijenjeni visokofrekventnim analizama. Drugim algoritmima je dostatan sirovi podatak

(engl. *Raw Data*), odnosno spektar masa u originalnom digitalnom zapisu za pretraživanje baze podataka. Oni su komercijalni i vezani uz proizvođače spektrometara masa (npr. GlobalLynx, Mascot).



### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Kemikalije

U eksperimentalnom radu koristile su se sljedeće kemikalije:

- Izopropanol,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ , *J. T. Baker (Baker HPLC Analyzed) Deventer, Nizozemska*
- Formaldehid,  $\text{CH}_2\text{O}$ , 36 %, *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- 2-fenil-2-oksoetanal,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCHO}$ , *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD*
- 2,2-dimetilpropanal,  $(\text{CH}_3)_3\text{CCHO}$ , *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD*
- Etil-metanoat,  $\text{HCOOCH}_2\text{CH}_3$ , *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD*
- Leucin Enkefalin,  $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_7$ , *Waters, Milford, MA, SAD*
- Metanska kiselina,  $\text{HCOOH}$ , 98-100 %, *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Acetonitril,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , za LC, 99,9 %, *Merck, Njemačka*
- MilliQ voda, pročišćena, predestilirana, deionizirana, otpornost kod 25 °C manja od  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-3}$
- Albumin iz seruma goveda, BSA, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD*
- Tripsin, izoliran iz svinjske gušterače, pročišćen imunoafinitetnom kromatografijom, *Merck, Njemačka*

#### 3.2. Instrumenti

Analiza je provedena na spektrometru masa visoke rezolucije ESI-T-val-Q-TOF SYNAPT G2-Si (Waters, Milford, MA, SAD), koji je bio spregnut s tekućinskim kromatografom nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, SAD).

### 3.3. Priprava otopina

#### 3.3.1. Priprava triptičkih peptida proteina BSA

Uzorak BSA masene koncentracije  $\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$  pripremljen je otapanjem BSA u otopini  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  koncentracije  $c = 25 \text{ mM}$ . Na  $100 \text{ }\mu\text{L}$  otopine BSA dodan je volumen otopine tripsina koncentracije  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  tako da je konačni maseni omjer tripsina i proteina u uzorku bio 1:50, te je uzorak stavljen na razgradnju preko noći na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon razgradnje, otopina triptičkih peptida proteina BSA je alikvotirana po  $10 \text{ }\mu\text{L}$  u plastične epruvete (tubice), koje su nakon toga stavljene na sušenje. Masa triptičkih peptida proteina BSA iznosila je  $10 \text{ }\mu\text{g}$  po tubici. Otopina triptičkih peptida proteina BSA masene koncentracije  $\gamma = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  pripremljena je otapanjem  $10 \text{ }\mu\text{g}$  triptičkih peptida proteina BSA u  $100 \text{ }\mu\text{L}$  otopine mravlje kiseline volumnog udjela  $\varphi = 0,1 \text{ \%}$ .

#### 3.3.2. Priprava otopina 2-fenil-2-oksoetanal, 2,2-dimetilpropanal, etil-metanoata i formaldehida

Ishodne otopine 2-fenil-2-oksoetanal koncentracije  $c_1 = 10 \text{ mM}$  i  $c_2 = 1 \text{ mM}$  pripravljene su otapanjem 2-fenil-2-oksoetanal monohidrata mase  $m_1 = 30,40 \text{ mg}$ , odnosno mase  $m_2 = 3,04 \text{ mg}$  ( $M = 152,15 \text{ g mol}^{-1}$ ) u  $20 \text{ mL}$  izopropanola. Razrjeđivanjem ishodne otopine 2-fenil-2-oksoetanal koncentracije  $c_1 = 10 \text{ mM}$  dobivene su otopine koncentracije  $7,5 \text{ mM}$ ,  $5 \text{ mM}$  i  $2,5 \text{ mM}$ . Razrjeđivanjem ishodne otopine 2-fenil-2-oksoetanal koncentracije  $c_2 = 1 \text{ mM}$  dobivene su otopine koncentracije  $0,5 \text{ mM}$  i  $0,1 \text{ mM}$ .

Ishodne otopine 2,2-dimetilpropanal koncentracije  $c_1 = 10 \text{ mM}$  i  $c_2 = 1 \text{ mM}$  pripravljene su umiješavanjem 2,2-dimetilpropanal volumena  $V_1 = 21,72 \text{ }\mu\text{L}$ , odnosno volumena  $V_2 = 2,17 \text{ }\mu\text{L}$  ( $M = 86,13 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\rho = 0,793 \text{ g cm}^{-3}$ ) u  $20 \text{ mL}$  izopropanola. Razrjeđivanjem ishodne otopine 2,2-dimetilpropanal koncentracije  $c_1 = 10 \text{ mM}$  dobivene su otopine koncentracije  $7,5 \text{ mM}$ ,  $5 \text{ mM}$  i  $2,5 \text{ mM}$ . Razrjeđivanjem ishodne otopine 2,2-dimetilpropanal koncentracije  $c_2 = 1 \text{ mM}$  dobivene su otopine koncentracije  $0,5 \text{ mM}$  i  $0,1 \text{ mM}$ .

Ishodne otopine etil-metanoata koncentracije  $c_1 = 10$  mM i  $c_2 = 1$  mM pripravljene su umiješavanjem etil-metanoata volumena  $V_1 = 16,16$   $\mu\text{L}$ , odnosno volumena  $V_2 = 1,62$   $\mu\text{L}$  ( $M = 74,08$  g mol<sup>-1</sup>,  $\rho = 0,917$  g cm<sup>-3</sup>) u 20 mL izopropanola. Razrjeđivanjem ishodne otopine etil-metanoata koncentracije  $c_1 = 10$  mM dobivene su otopine koncentracije 7,5 mM, 5 mM i 2,5 mM. Razrjeđivanjem ishodne otopine etil-metanoata koncentracije  $c_2 = 1$  mM dobivene su otopine koncentracije 0,5 mM i 0,1 mM.

Ishodna otopina formaldehida koncentracije  $c = 20$  mM pripravljena je umiješavanjem 30,9  $\mu\text{L}$  formaldehida ( $M = 30,031$  g mol<sup>-1</sup>,  $\rho = 1,08$  g cm<sup>-3</sup>,  $w = 36$  %) u 20 mL izopropanola. Pipetiranjem 5 mL ishodne otopine i dodatkom 5 mL izopropanola pripravljena je otopina formaldehida koncentracije  $c = 10$  mM. Pipetiranjem 5 mL ishodne otopine i dodatkom 15 mL izopropanola pripravljena je otopina formaldehida koncentracije  $c = 5$  mM.

#### **3.4. Analiza peptida vezanim sustavom nano-tekućinske kromatografije i spektrometrije masa visoke rezolucije**

Razdvajanje peptida BSA provedeno je na analitičkoj koloni Acquity UPLC column BEH130 C<sub>18</sub>, 100  $\mu\text{m}$   $\times$  100 mm (Waters, Milford, MA, SAD) uz korištenje pretkolone 2G-V/M Trap 5 $\mu\text{m}$  Symmetry C<sub>18</sub>, 180  $\mu\text{m}$   $\times$  20 mm (Waters, Milford, MA, SAD). Uvjeti linearnog gradijentnog ispiranja primijenjeni za optimalno razdvajanje triptičkih peptida kromatografijom obrnutih faza opisani su u Tablici 3.1. Kao pokretna faza A korištena je vodena otopina mravlje kiseline (0,1 %;  $\varphi$ ), dok je pokretna faza B bila vodena otopina koja sadrži 0,1 % mravlje kiseline i 95 % acetonitrila ( $\varphi$ ). Protok je bio 1  $\mu\text{L min}^{-1}$  i nije se mijenjao kroz 30 minuta. Temperatura kolone iznosila je 40 °C. Injektirano je 4  $\mu\text{L}$  uzorka.

**Tablica 3.1.** Uvjeti primijenjenog linearnog gradijenta na analitičkoj koloni za razdvajanje triptičkih peptida kromatografijom obrnutih faza. A = pokretna faza A (0,1 % mravlja kiselina, 99,9 % voda;  $\varphi$ ), B = pokretna faza B (0,1 % mravlja kiselina, 4,9 % voda, 95 % acetonitril;  $\varphi$ ).

Vrijeme (min)	Protok ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	A (%)	B (%)
0	1	99,0	1,0
20	1	40,0	60,0
22	1	1,0	99,0
24	1	99,0	1,0
30	1	99,0	1,0

Snimljeni su kromatogrami ukupne ionske struje i odgovarajući spektri masa. Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) je bila negativna, pri čemu je napon kapilare iznosio 3,00 kV, a elektrode u obliku stošca u koju ulazi ionizirani uzorak 40 V. Temperatura izvora bila je 80 °C. Tlak plina iznosio je 1 bar. Spektri masa snimani su u rasponu od 500 do 4000 Da. Program za kontrolu tekućinskog kromatografa i spektrometra masa bio je MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA, SAD).

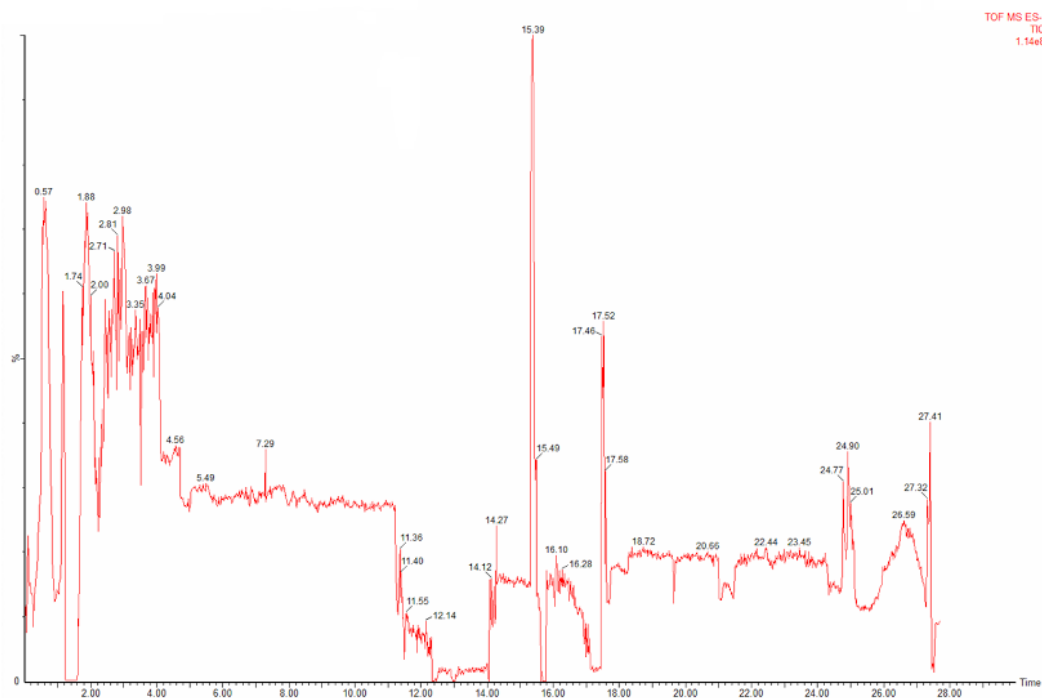
Točno određivanje masa postignuto je upotrebom otopine leucin enkefalina (1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  leucin enkefalin; 50 % voda, 50 % izopropanol;  $\varphi$ ). Protok leucin enkefalina bio je 0,4  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Točna masa negativnog iona leucin enkefalina ( $[\text{M-H}]^-$ ) iznosi 554,2615 Da. Poboljšivači ionizacije uvedeni su pomoćnom pumpom za nadodani protok nakon razdvajanja peptida na kromatografskoj koloni, a prije ulaska u ionski izvor spektrometra masa. Protok poboljšivača ionizacije iznosio je 0,4  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Otopine poboljšivača ionizacije pripremljene su kako je opisano u poglavlju 3.3.2.

## 4. Rezultati i rasprava

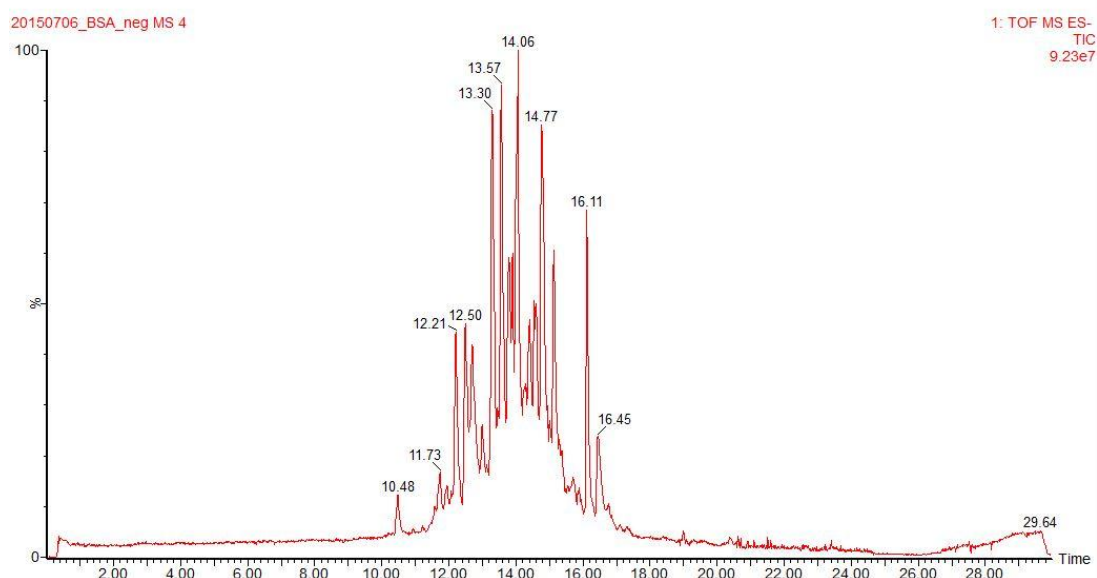
Analiza peptida i proteina u negativnom načinu rada spektrometra masa otežano je izvediva iz sljedećih razloga:

- nedostatnog nastajanja negativnih iona u negativnom načinu rada spektrometra masa, u odnosu na količinu nastalih pozitivnih iona u pozitivnom načinu rada spektrometra masa za isti promatrani analit,
- nestabilnog raspršenja u električnom polju pri nano- ili mikrolitarskim protocima,
- otežane detekcije fragmenata u tandemnom načinu rada spektrometra masa.

Načini na koje se navedeni nedostaci mogu ukloniti, opisani su u literaturnim izvorima, gdje je opisan dodatak formaldehida u tok pokretne faze nakon kromatografske separacije sa ciljem pospješivanja negativne ionizacije. Valja napomenuti da se literaturni izvor nije bavio ionizacijom peptida i proteina, već ionizacijom selektivnih modulatora androgenih receptora (SARM, engl. *Selective Androgen Receptor Modulator*).<sup>6</sup> Na Slici 4.1. i 4.2. prikazani su nano-UPLC kromatogrami triptičkih peptida albumina iz seruma goveda (BSA) u negativnom načinu rada spektrometra masa sa i bez dodatka poboljšivača ionizacije negativnih iona. Poboljšivač ionizacije dodan je poslije kromatografskog razdvajanja (engl. *Post-Column Addition*) pri protoku od  $0,4 \mu\text{L min}^{-1}$ .



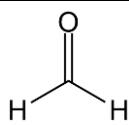
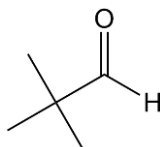
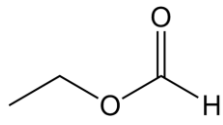
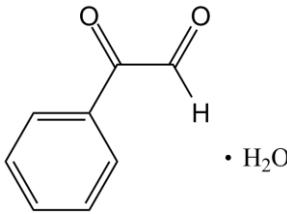
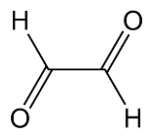
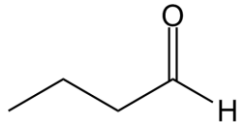
**Slika 4.1.** Nano-UPLC kromatogram triptičkih peptida albumina iz seruma goveda (BSA) snimljen u negativnom načinu rada spektrometra masa bez dodatka poboljšivača ionizacije negativnih iona.



**Slika 4.2.** Nano-UPLC kromatogram triptičkih peptida albumina iz seruma goveda (BSA) snimljen u negativnom načinu rada spektrometra masa uz poslijekolonski dodatak 2,5 mM otopine 2-fenil-2-oksoetanal u izopropanolu u tok pokretne faze.

Selekcija ketona, aldehida i estera po svojstvima topivosti, hlapivosti i inertnosti izdvojila je pet reagensa po navedenim fizikalno-kemijskim svojstvima (2-fenil-2-oksoetanal, 2,2-dimetilpropanal, etil-metanoat, etan-1,2-dial i butanal) koji su pogodni za umiješavanje u pokretnu fazu (Tablica 4.1.). Poboljšivači ionizacije koji su pokazali veći ionizacijski potencijal peptida i proteina u negativnom načinu rada spektrometra masa od formaldehida (2-fenil-2-oksoetanal, 2,2-dimetilpropanal i etil-metanoat) su korišteni za daljnja istraživanja. Provedeni su pokusi poboljšavanja ionizacije peptida i proteina na način da je poboljšivač ionizacije umiješan u tok matičnice pokretne faze, nakon kromatografske separacije. Osim definiranja formaldehida kao standardne otopine, prema kojoj će se uspoređivati efekt poboljšane ionizacije peptida i proteina ispitivanim poboljšivačima ionizacije, bilo je neophodno ustanoviti minimalnu koncentraciju kod koje se može opaziti efekt, kao i razjasniti kemijski mehanizam djelovanja, koji do sada nije bio razjašnjen.

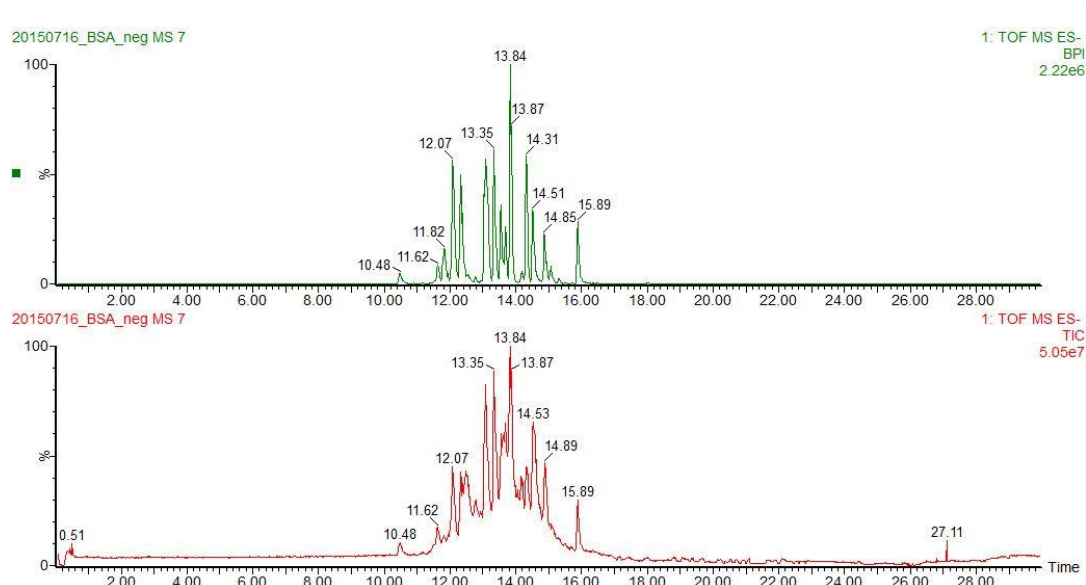
**Tablica 4.1.** Fizikalno-kemijska svojstva poboljšivača ionizacije (formaldehida, 2-fenil-2-oksoetanal, 2,2-dimetilpropanal, etil-metanoata, etan-1,2-dial i butanal) korištenih u eksperimentu pospješenja ionizacije negativnih iona peptida i proteina u negativnom načinu rada spektrometra masa.

Poboljšivač ionizacije	Strukturna formula	$M_r$	Temperatura vrelišta/°C	Gustoća/g cm <sup>-3</sup>
Formaldehid		30,03	-22,1	1,08 ( $w = 36\%$ )
2,2-dimetilpropanal		86,13	74-76	0,793
Etil-metanoat		74,08	52-54	0,92
2-fenil-2-oksoetanal monohidrat		152,15	64 (bezvodni) 142 (monohidrat)	1,1 (bezvodni), kao monohidrat nalazi se u krutom stanju
Etan-1,2-dial		58,04	104	1,27
Butanal		72,11	75-76	0,802

U svrhu ispitivanja ponovljivosti, pri svakoj koncentraciji dodanog poboljšivača ionizacije mjerenja su izvršena tri puta. Proučavali su se intenziteti TIC kromatograma (engl. *Total Ion Current*, hrv. ukupna ionska struja) i BPI kromatograma (engl. *Base Peak Intensity*, hrv. intenzitet osnovnog pika, Slika 4.3.) i intenziteti četiri mjerene mase  $m/z$ : 787,4565 (jednostruko negativno nabijeni ion peptida), 920,4729 (jednostruko negativno nabijeni ion peptida), 1161,6156 (jednostruko negativno nabijeni ion peptida) i 782,3599 (dvostruko negativno nabijeni ion peptida). Obzirom na gradijentni način rada tekućinskog



kromatografa, pikovi su odabrani na način da predstavljaju reprezentativnu raspodjelu retencijskih vremena u kromatogramu (početak, sredina i kraj). Intenzitet u svakoj točki TIC kromatograma je suma svih intenziteta pri tom snimanju, tj. suma šuma i signala. BPI kromatogram, s druge strane prikazuje ekstrahirani intenzitet najintenzivnijeg signala u svakoj točki TIC kromatograma. Pri tome je vidljiva poboljšana rezolucija pikova peptida i proteina na kromatogramu, a ekstrakcijom najintenzivnijih signala postiže se poboljšani omjer signala i šuma.






**Slika 4.3.** Nano-UPLC kromatogram triptičkih peptida albumina iz seruma goveda (BSA) u negativnom načinu rada spektrometra masa uz poslijekolonski dodatak 2,5 mM otopine 2,2-dimetilpropanala u izopropanolu u tok pokretne faze. Donji TIC kromatogram pokazuje ukupnu ionsku struju, dok gornji BPI kromatogram pokazuje intenzitet ekstrahiranih signala osnovnih pikova.

Vrijednosti koje su praćene uz intenzitet signala, a smatraju se bitnima za probir navedenih iona prikazane su u Tablici 4.2. Za razdvajanje i pročišćavanje smjese peptida i proteina prije analize MS-om, koristila se kromatografija obrnutih faza kojom se peptidi i proteini razdvajaju po svojstvima hidrofobnosti tj. hidrofilnosti. Pri tome je za razdvajanje

korištena kromatografska kolona s nepokretnom fazom oktadecilsilicijev dioksid (C<sub>18</sub>), dok je za pokretnu fazu korištena smjesa acetonitrila i vode uz dodatak mravlje kiseline. Polarna faza u gradijentnom načinu ispiranja sastojala se od pokretne faze A tj. vodene otopine mravlje kiseline (0,1 % mravlja kiselina, 99,9 % voda;  $\varphi$ ) i pokretne faze B, tj. otopine mravlje kiseline u acetonitrilu (0,1 % mravlja kiselina, 4,9 % voda, 95 % acetonitril;  $\varphi$ ). Kod ispiranja peptida i proteina sa kolone, na retencijsko vrijeme elucije istih najveći utjecaj su imali: veličina peptida (broj aminokiselina), razmještaj aminokiselina u peptidu i broj hidrofobnih građevnih jedinica peptida (aminokiseline ili posttranslacijske modifikacije). Hidrofobniji i veći peptidi duže su se zadržavali na koloni, tj. imali su veće retencijsko vrijeme. Kod probira četiri mjerena peptida uzimala se u obzir veličina, hidrofobnost i vrijeme zadržavanja na koloni. Poželjno svojstvo poboljšivača ionizacije je pospešenje ionizacije negativnih iona proteina i peptida različite hidrofobnosti, vremena zadržavanja na koloni i veličine.

**Tablica 4.2.** Fizikalno-kemijska svojstva peptida prema čijim je intenzitetima signala mjeren efekt poboljšavanja ionizacije negativnih iona elektroraspršenjem.

<i>m/z</i>	Vrijeme zadržavanja na koloni/min	Aminokiselinski slijed peptida	Broj aminokiselina	BB indeks <sup>32</sup> (hidrofobnost)
787,4565 (1-)	12	LVTDLTK	7	50,1
920,4729 (1-)	12,5	AEFVEVTK	8	40,1
1161,6156 (1-)	14	LVNELTEFAK	10	45,8
782,3599 (2-)	16	DAFLGSFLYEYSR	13	52,1

	Nepolarni, alifatski i aromatski bočni ogranci
	Pozitivno nabijeni bočni ogranci
	Polarni, nenabijeni bočni ogranci

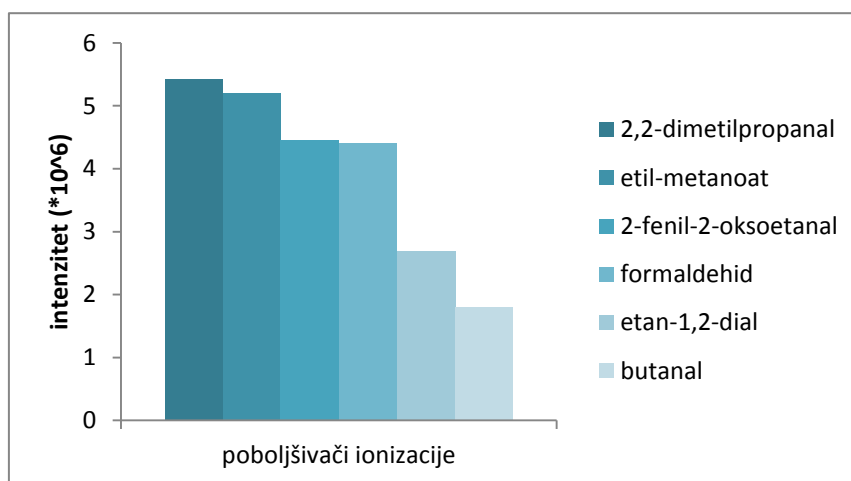
Svi peptidi nastali triptičkom razgradnjom albumina iz seruma goveda mogu se prikazati cijepanjem u programskom paketu dostupnom putem interneta naziva Protein Prospector.<sup>33</sup> Pri korištenju navedenog programskog paketa u sam program je unesen aminokiselinski slijed u FASTA formatu albumna iz seruma goveda (P02769 iz baze

UniProt),<sup>34</sup> namješteni su parametri na cijepanje tripsinom i zadan je raspon peptidnih masa od 500 do 4000 Da, te je provedena *in silico* razgradnja. Programski paket na osnovi teorijski zadanih parametara uz mnoge druge opcije računa postotak hidrofobnosti prema indeksu Bull Breese (BB indeks, Tablica 4.2.).<sup>32</sup>

#### 4.1. Utjecaj poboljšivača ionizacije na ionizaciju negativnih iona peptida

##### 4.1.1. Selekcija poboljšivača ionizacije koji pokazuju veći ionizacijski potencijal peptida i proteina u negativnom načinu rada spektrometra masa od formaldehida

Početni eksperimenti pokazali su da otopine poboljšivača ionizacije u izopropanolu volumnog udjela  $\varphi = 0,1$  % veoma onečišćuju ionski izvor, te je potrebno učestalo čišćenje istoga. Stoga su pripremljene otopine poboljšivača ionizacije 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata, 2-fenil-2-oksoetanal, etan-1,2-diala i butanala u izopropanolu volumnog udjela  $\varphi = 0,05$  %, te je uspoređen utjecaj na formiranje negativnih iona peptida i proteina u odnosu na otopinu formaldehida u izopropanolu volumnog udjela  $\varphi = 0,1$  %, koja je inače korištena za standardna proteomska istraživanja. Otopine 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal pokazale su veći utjecaj na ionizaciju negativnih iona peptida i proteina od otopine formaldehida, te su s njima nastavljena daljnja istraživanja. Otopine etan-1,2-diala i butanala pokazale su najmanji utjecaj na ionizaciju negativnih iona, te su izostavljene iz daljnjih istraživanja (Slika 4.4., Tablica 4.3.).



**Slika 4.4.** Grafički prikaz intenziteta BPI kromatograma triptičkih peptida albumina iz seruma goveda (BSA) za otopine 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata, 2-fenil-2-oksoetanal, etan-1,2-diala i butanala u izopropanolu (0,05 % poboljšivač ionizacije, 99,95 % izopropanol;  $\varphi$ ) i otopine formaldehida u izopropanolu (0,1 % formaldehid, 99,9 % izopropanol;  $\varphi$ ) umiješanih u tok pokretne faze.

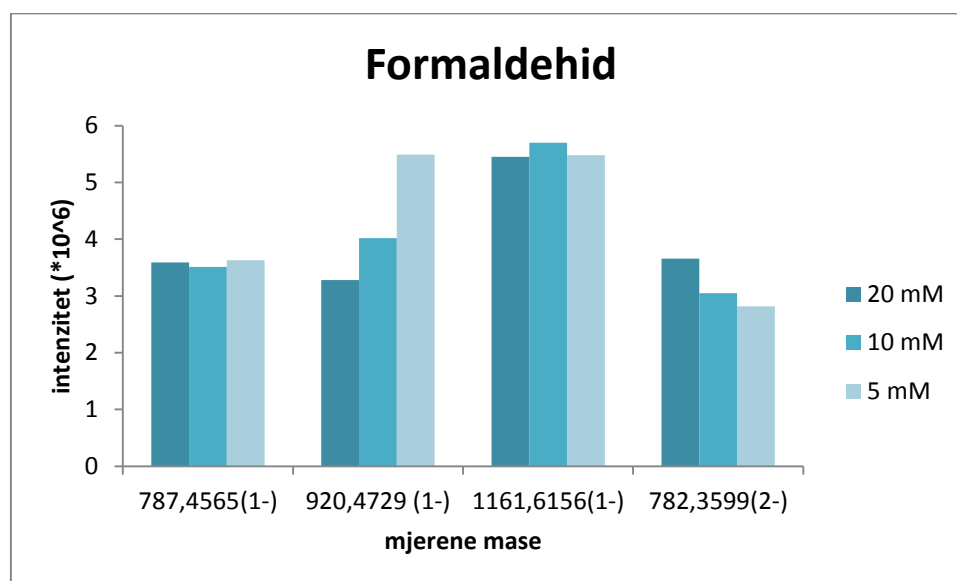
**Tablica 4.3.** Intenziteti TIC i BPI kromatograma (tri uzastopna mjerenja) i intenziteti četiri mjerene mase  $m/z$  787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za provedene analize uz poslijekolonsko umiješavanje otopina 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata, 2-fenil-2-oksoetanal, etan-1,2-diala i butanala u izopropanolu (0,05 % poboljšivač ionizacije, 99,95 % izopropanol;  $\varphi$ ) i otopine formaldehida u izopropanolu (0,1 % formaldehid, 99,9 % izopropanol;  $\varphi$ ) u matičnicu pokretne faze.

	TIC/10 <sup>7</sup>	BPI/10 <sup>6</sup>	787,4565 (1-)/10 <sup>6</sup>	1161,6156 (1-)/10 <sup>6</sup>	782,3599 (2-)/10 <sup>6</sup>
<b>Formaldehid</b>	6,54	4,1	3,47	6,01	3,56
	7,21	3,59	3,17	4,40	3,32
	10,3	5,53	5,10	7,25	3,67
$\bar{x}$	8,02	4,41	3,91	5,89	3,52
<b>% RSD</b>	25,02	22,82	26,54	23,90	5,09
<b>2-fenil-2-oksoetanal</b>	12,1	5,30	6,10	11,3	4,20
	10,8	3,97	3,62	9,21	6,07
	8,8	4,10	5,86	8,66	6,07
$\bar{x}$	10,6	4,45	5,19	9,72	5,45
<b>% RSD</b>	15,73	17,17	26,34	14,32	19,82
<b>2,2-dimetilpropanal</b>	7,36	4,67	6,09	6,89	4,67
	7,83	5,44	6,09	6,85	5,17
	7,45	6,15	6,11	7,80	5,36
$\bar{x}$	7,55	5,42	6,10	7,18	5,07
<b>% RSD</b>	3,31	13,66	0,19	7,48	7,03
<b>Etan-1,2-dial</b>	8,03	3,28	4,65	2,46	5,15
	5,23	1,78	2,01	1,65	1,91
	12,2	3,01	3,81	2,91	2,21
$\bar{x}$	8,49	2,69	3,49	2,34	3,09
<b>% RSD</b>	41,33	29,72	38,65	27,29	57,94
<b>Butanal</b>	4,11	2,04	3,60	3,37	1,66
	3,74	1,56	3,18	3,03	1,18
	5,19	1,82	2,21	3,93	1,72
$\bar{x}$	4,35	1,81	3,00	3,44	1,52
<b>% RSD</b>	17,33	13,30	23,79	13,20	19,47
<b>Etil-metanoat</b>	9,22	4,72	7,29	9,96	5,23
	7,73	5,16	6,82	8,85	4,99
	8,01	5,73	6,72	9,22	4,11
$\bar{x}$	8,32	5,20	6,94	9,34	4,78
<b>% RSD</b>	9,52	9,73	4,38	6,05	12,35

## 4.1.2. Formaldehid

Utjecaj formaldehida na ionizaciju negativnih iona peptida praćen je pri koncentracijama 5 mM, 10 mM i 20 mM. Pri manjim koncentracijama formaldehida od 5 mM nije se moglo uspostaviti stabilno raspršenje i u konačnici efekt elektroraspršenja, što znači da je 5 mM najmanja moguća koncentracija formaldehida otopljenog u izopropanolu, koji se može koristiti kao poboljšivač ionizacije negativnih iona.

Kako je vidljivo sa Slike 4.5. i iz Tablice 4.4., mjerene mase  $m/z$  787,4565 i 1161,6156 nisu pokazale značajnu razliku u intenzitetu (tj. broju ioniziranih peptida) promjenom koncentracije formaldehida. Tako kod mjerene mase  $m/z$  920,4729, peptida koji je po svojim svojstvima najmanje hidrofoban peptid u odnosu na ostale mjerene peptide, smanjenjem koncentracije formaldehida došlo je do povećanja broja ioniziranih peptida. Kod mjerene mase  $m/z$  782,3599, peptida koji je s druge strane najhidrofobniji peptid, smanjenjem koncentracije formaldehida došlo je do smanjene ionizabilnosti (Slika 4.5. i Tablica 4.4.).



**Slika 4.5.** Grafički prikaz intenziteta iona četiri mjerene mase  $m/z$  787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za otopine formaldehida otopljenog u izopropanolu i umiješanog u tok pokretne faze u koncentraciji 5 mM, 10 mM i 20 mM.

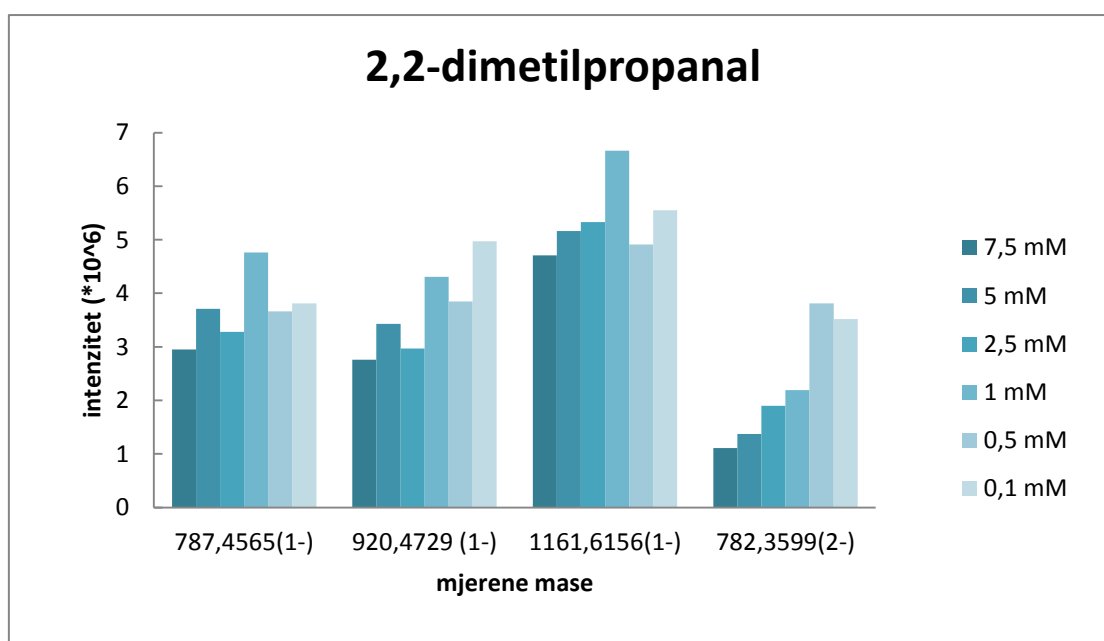
**Tablica 4.4.** Intenziteti TIC i BPI kromatograma (tri uzastopna mjerenja) i intenziteti četiri mjerene mase  $m/z$  787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za provedene analize uz poslijekolonsko umiješavanje formaldehida u izopropanolu u matičnicu pokretne faze koncentracija 5 mM, 10 mM i 20 mM.

c/mM	TIC/10 <sup>7</sup>	BPI/10 <sup>6</sup>	787,4565 (1-)/10 <sup>6</sup>	920,4729 (1-)/10 <sup>6</sup>	1161,6156 (1-)/10 <sup>6</sup>	782,3599 (2-)/10 <sup>6</sup>
<b>5 mM</b>	6,93	2,74	3,70	5,37	5,24	3,42
	8,25	2,58	3,50	5,71	5,80	2,40
	7,59	2,62	3,68	5,39	5,39	2,64
$\bar{x}$	7,59	2,65	3,63	5,49	5,48	2,82
<b>% RSD</b>	8,70	3,15	3,04	3,48	5,29	18,91
<b>10 mM</b>	7,95	2,76	3,53	3,94	5,43	2,68
	6,93	2,46	3,48	4,19	6,01	3,61
	7,51	2,60	3,53	3,92	5,66	2,85
$\bar{x}$	7,46	2,61	3,51	4,02	5,70	3,05
<b>% RSD</b>	6,85	5,76	0,82	3,75	5,12	16,25
<b>20 mM</b>	9,49	2,32	3,20	2,93	5,12	4,79
	8,61	2,63	4,06	3,53	5,71	2,40
	9,01	2,49	3,51	3,38	5,52	3,78
$\bar{x}$	9,04	2,48	3,59	3,28	5,45	3,66
<b>% RSD</b>	4,88	6,26	12,13	9,52	5,53	32,81

## 4.1.3. 2,2-dimetilpropanal

Utjecaj 2,2-dimetilpropanala na ionizaciju negativnih iona peptida praćen je pri koncentracijama od 0,1 mM do 7,5 mM. Najniža uočena koncentracija 2,2-dimetilpropanala pri kojoj se moglo uspostaviti stabilno elektroraspršenje bila je 0,1 mM, dok je kod formaldehida najmanja koncentracija za približno jednak izmjereni učinak bila 5 mM, što je 50 puta veća koncentracija. Manja upotrebljena količina poboljšivača ionizacije u spektrometriji masa uzrokuje manje onečišćenje ionskog izvora, što u konačnici omogućava bolji omjer signala i šuma i pouzdaniji rad spektrometra masa bez učestalog čišćenja ionskog izvora.

Ionizacija peptida  $m/z$  787,4565 i  $m/z$  1161,6156 pokazala je intenzivno stvaranje negativnih iona pri koncentraciji 2,2-dimetilpropanala od 1 mM, dok su peptidi  $m/z$  920,4729 i  $m/z$  782,3599 najveći ionizacijski potencijal postigli pri manjim koncentracijama od 0,1 mM i 0,5 mM, kako je prikazano na Slici 4.6. i u Tablici 4.5.



**Slika 4.6.** Grafički prikaz intenziteta iona četiri mjerene mase  $m/z$  787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za otopine 2,2-dimetilpropanala otopljenog u izopropanolu i umiješanog u tok pokretne faze u koncentraciji od 0,1 mM do 7,5 mM.



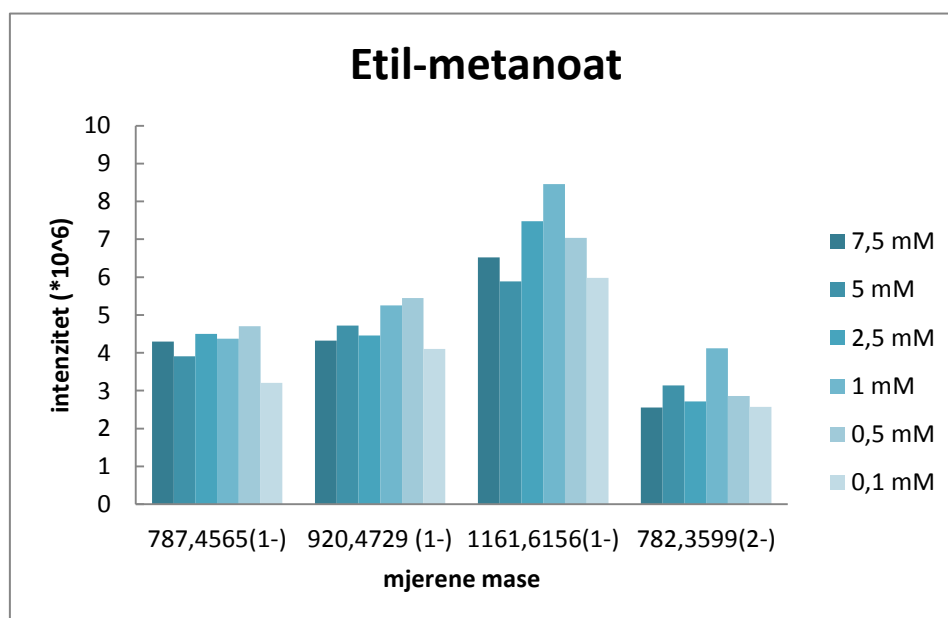
**Tablica 4.5.** Intenziteti TIC i BPI kromatograma (tri uzastopna mjerenja) i intenziteti četiri mjerene mase  $m/z$  787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za provedene analize uz poslijekolonsko umiješavanje 2,2-dimetilpropanala u izopropanolu u matičnicu pokretne faze koncentracija od 0,1 mM do 7,5 mM.

<b>c/mM</b>	<b>TIC/10<sup>7</sup></b>	<b>BPI/10<sup>6</sup></b>	<b>787,4565 (1-)/10<sup>6</sup></b>	<b>920,4729 (1-)/10<sup>6</sup></b>	<b>1161,6156 (1-)/10<sup>6</sup></b>	<b>782,3599 (2-)/10<sup>6</sup></b>
<b>0,1</b>	9,30	3,50	4,15	4,91	7,84	3,67
	7,98	2,66	3,98	5,51	4,66	3,32
	6,01	2,39	3,32	4,48	4,14	3,56
<b><math>\bar{x}</math></b>	7,76	2,85	3,81	4,97	5,55	3,52
<b>% RSD</b>	21,33	20,31	11,49	10,42	36,11	5,09
<b>0,5</b>	6,15	2,59	4,15	2,46	3,60	5,09
	7,26	2,28	2,89	4,16	5,01	3,58
	7,89	3,36	3,95	4,93	6,11	2,78
<b><math>\bar{x}</math></b>	7,10	2,74	3,66	3,85	4,91	3,81
<b>% RSD</b>	12,41	20,27	18,48	32,83	25,64	30,73
<b>1</b>	8,49	3,74	5,13	4,31	7,24	2,84
	6,26	2,55	3,93	3,62	5,68	1,51
	7,40	3,16	5,21	4,99	7,08	2,22
<b><math>\bar{x}</math></b>	7,38	3,15	4,76	4,31	6,66	2,19
<b>% RSD</b>	15,10	18,89	15,07	22,50	12,87	30,39
<b>2,5</b>	4,64	1,87	3,39	2,79	4,18	2,79
	5,05	2,22	2,83	2,51	4,57	1,53
	6,78	3,50	3,63	3,62	7,25	1,39
<b><math>\bar{x}</math></b>	5,49	2,53	3,28	2,97	5,33	1,90
<b>% RSD</b>	20,69	33,92	12,50	19,41	31,34	40,51
<b>5</b>	6,11	2,70	5,27	4,46	6,04	0,844
	5,65	2,42	2,82	2,80	5,01	1,83
	5,29	1,93	3,04	3,02	4,42	1,43
<b><math>\bar{x}</math></b>	5,68	2,35	3,71	3,43	5,16	1,37
<b>% RSD</b>	7,23	16,58	36,54	26,31	15,90	36,25
<b>7,5</b>	4,30	2,07	2,86	2,74	4,47	0,815
	5,43	2,80	3,88	3,62	4,58	1,12
	4,90	2,36	2,12	1,92	5,07	1,39
<b><math>\bar{x}</math></b>	4,88	2,41	2,95	2,76	4,71	1,11
<b>% RSD</b>	11,59	15,25	29,92	30,80	6,79	25,96

## 4.1.4. Etil-metanoat

Utjecaj etil-metanoata na ionizaciju negativnih iona peptida praćen je pri koncentracijama od 0,1 mM do 7,5 mM. Stabilno elektroraspršenje izvora nije se moglo postići pri koncentraciji etil-metanoata nižoj od 0,1 mM.

Peptidni ioni  $m/z$  787,4565 i  $m/z$  920,4729 postigli su približno jednaku ionizaciju pri svim koncentracijama umiješanog etil-metanoata, osim pri najnižoj koncentraciji od 0,1 mM pri kojoj je ionizacija bila osjetno manje intenzivna. Optimalni rezultati odnosa intenziteta mjerenih iona i dodanog poboljšivača ionizacije dobiveni su kod 1 mM otopine etil-metanoata, kako je prikazano na Slici 4.7. i u Tablici 4.6.



**Slika 4.7.** Grafički prikaz intenziteta iona četiri mjerene mase  $m/z$  787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za otopine etil-metanoata otopljenog u izopropanolu i umiješanog u tok pokretne faze u koncentraciji od 0,1 mM do 7,5 mM.

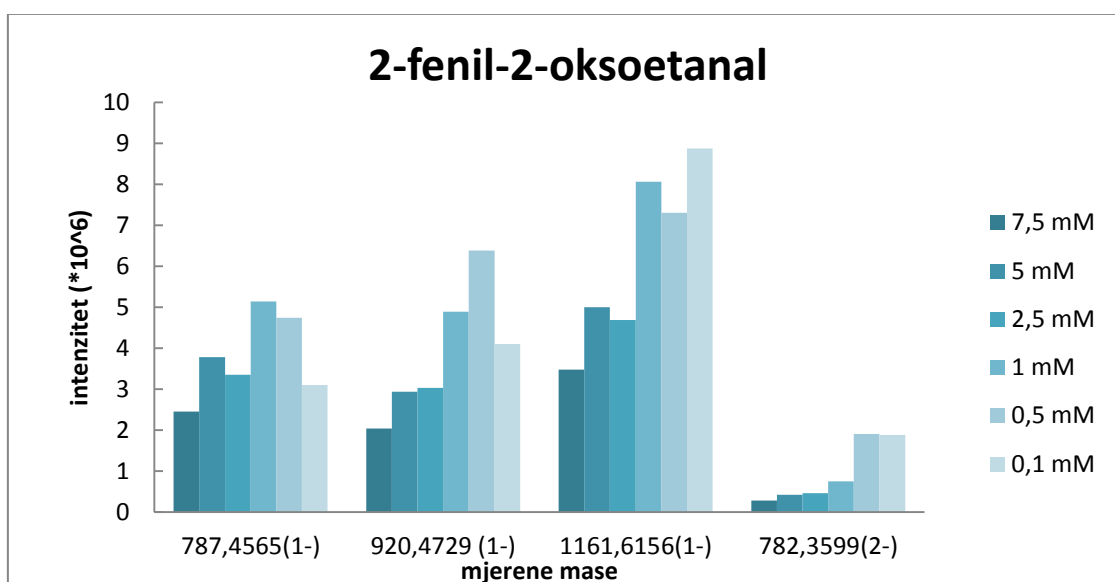
**Tablica 4.6.** Intenziteti TIC i BPI kromatograma (tri uzastopna mjerenja) i intenziteti četiri mjerene mase  $m/z$  787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za provedene analize uz poslijekolonsko umiješavanje etil-metanoata u izopropanolu u matičnicu pokretne faze koncentracija od 0,1 mM do 7,5 mM.

<b>c/mM</b>	<b>TIC/10<sup>7</sup></b>	<b>BPI/10<sup>6</sup></b>	<b>787,4565 (1-)/10<sup>6</sup></b>	<b>920,4729 (1-)/10<sup>6</sup></b>	<b>1161,6156 (1-)/10<sup>6</sup></b>	<b>782,3599 (2-)/10<sup>6</sup></b>
<b>0,1</b>	6,20	3,13	3,13	4,23	6,58	2,58
	6,90	2,90	3,20	4,10	5,99	2,57
	7,69	2,64	3,31	3,98	5,36	2,55
<b><math>\bar{x}</math></b>	6,93	2,89	3,21	4,10	5,98	2,57
<b>% RSD</b>	10,76	8,48	2,82	3,05	10,21	0,60
<b>0,5</b>	9,54	4,29	4,72	5,58	8,21	2,75
	10,2	5,01	4,74	5,49	7,97	2,90
	7,49	2,40	4,63	5,28	4,94	2,92
<b><math>\bar{x}</math></b>	9,08	3,90	4,70	5,45	7,04	2,86
<b>% RSD</b>	15,57	34,56	1,25	2,82	25,89	3,25
<b>1</b>	8,40	5,35	6,88	5,71	8,06	2,91
	8,14	4,72	3,30	4,88	9,73	4,90
	9,57	5,44	2,92	5,15	7,60	4,55
<b><math>\bar{x}</math></b>	8,70	5,17	4,37	5,25	8,46	4,12
<b>% RSD</b>	8,75	7,59	50,04	8,07	13,24	25,79
<b>2,5</b>	8,92	5,16	6,47	5,94	8,03	2,31
	6,92	3,96	4,25	4,26	8,46	2,70
	7,68	3,96	2,78	3,18	5,94	3,16
<b><math>\bar{x}</math></b>	7,84	4,36	4,50	4,46	7,48	2,72
<b>% RSD</b>	12,88	15,89	41,28	31,18	18,03	15,62
<b>5</b>	7,74	5,97	3,17	4,82	5,97	2,83
	6,84	4,44	3,47	4,18	4,44	3,45
	7,24	4,84	5,10	5,15	7,25	3,15
<b><math>\bar{x}</math></b>	7,27	5,08	3,91	4,72	5,89	3,14
<b>% RSD</b>	6,20	15,61	26,54	10,46	23,90	9,86
<b>7,5</b>	6,24	3,48	5,56	5,72	5,47	3,19
	6,38	3,76	4,83	4,48	6,83	2,08
	7,46	3,63	2,52	2,77	7,26	2,42
<b><math>\bar{x}</math></b>	6,69	3,62	4,30	4,32	6,52	2,56
<b>% RSD</b>	9,97	3,87	36,88	34,26	14,33	22,19

## 4.1.5. 2-fenil-2-oksoetanal

Utjecaj 2-fenil-2-oksoetanela na ionizaciju negativnih iona peptida praćen je pri koncentracijama od 0,1 mM do 7,5 mM. Najniža koncentracijska granica za uspostavljanje stabilnog elektroraspršenja izvora kod 2-fenil-2-oksoetanela, kao i kod 2,2-dimetilpropanala i etil-metanoata bila je 0,1 mM, što je u konačnici dalo izraženu prednost u uporabi nad formaldehidom, koji nije bilo moguće koristiti u koncentraciji nižoj od 5 mM.

Optimalni rezultati ionizacije negativnih iona postignuti su u koncentracijskom području 2-fenil-2-oksoetanela od 1 mM do 0,1 mM. Peptidni ioni  $m/z$  1161,6156 i 782,3599 smanjenjem koncentracije 2-fenil-2-oksoetanela pokazali su porast ionizacije, te se najintenzivnija ionizacija postigla pri koncentraciji od 0,1 mM (Slika 4.8., Tablica 4.7.).



**Slika 4.8.** Grafički prikaz intenziteta iona četiri mjerene mase  $m/z$  787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za otopine 2-fenil-2-oksoetanela otopljenog u izopropanolu i umiješanog u tok pokretne faze u koncentraciji od 0,1 mM do 7,5 mM.

**Tablica 4.7.** Intenziteti TIC i BPI kromatograma (tri uzastopna mjerenja) i intenziteti četiri mjerene mase  $m/z$  787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za provedene analize uz poslijekolonsko umiješavanje 2-fenil-2-oksoetanala u izopropanolu u matičnicu pokretne faze koncentracija od 0,1 mM do 7,5 mM.

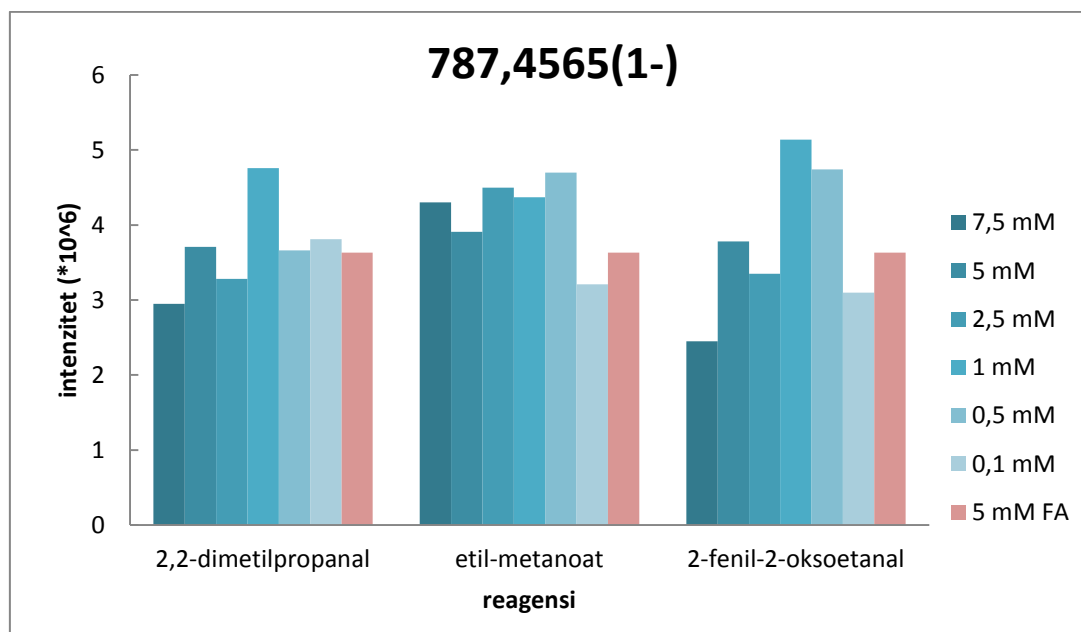
<b>c/mM</b>	<b>TIC/10<sup>7</sup></b>	<b>BPI/10<sup>6</sup></b>	<b>787,4565 (1-)/10<sup>6</sup></b>	<b>920,4729 (1-)/10<sup>6</sup></b>	<b>1161,6156 (1-)/10<sup>6</sup></b>	<b>782,3599 (2-)/10<sup>6</sup></b>
<b>0,1</b>	9,84	4,50	3,37	4,45	9,78	1,70
	8,91	4,08	2,57	3,53	8,93	1,77
	7,55	3,66	3,37	4,32	7,91	2,16
<b><math>\bar{x}</math></b>	8,76	4,08	3,10	4,1	8,87	1,88
<b>% RSD</b>	13,14	10,29	14,88	12,14	10,55	13,21
<b>0,5</b>	11,2	4,74	4,95	6,89	8,38	1,78
	10,1	4,31	5,64	6,64	7,16	1,19
	8,01	3,97	3,64	5,60	6,36	2,75
<b><math>\bar{x}</math></b>	9,77	4,34	4,74	6,38	7,30	1,91
<b>% RSD</b>	16,59	8,89	21,42	10,73	13,93	41,31
<b>1</b>	4,93	2,58	3,14	3,21	5,43	0,696
	7,10	4,20	6,34	5,88	9,01	0,747
	6,99	4,61	5,93	5,57	9,74	0,819
<b><math>\bar{x}</math></b>	6,34	3,80	5,14	4,89	8,06	0,754
<b>% RSD</b>	19,28	28,27	33,90	29,88	28,62	8,20
<b>2,5</b>	5,43	2,00	3,50	3,52	4,45	0,441
	6,39	2,50	4,08	3,55	5,64	0,600
	4,47	1,80	2,46	2,01	3,99	0,340
<b><math>\bar{x}</math></b>	5,43	2,10	3,35	3,03	4,69	0,460
<b>% RSD</b>	17,68	17,17	24,53	29,09	18,14	28,47
<b>5</b>	6,33	2,31	4,33	3,32	5,12	0,487
	8,29	3,32	4,75	3,59	7,39	0,606
	3,48	1,45	2,27	1,90	2,49	0,167
<b><math>\bar{x}</math></b>	6,03	2,36	3,78	2,94	5,00	0,42
<b>% RSD</b>	40,09	39,66	35,08	30,92	49,04	54,06
<b>7,5</b>	4,15	2,07	1,71	1,41	3,46	0,284
	4,51	2,50	3,17	2,65	3,49	0,278
	4,84	2,31	2,46	2,06	3,50	0,283
<b><math>\bar{x}</math></b>	4,50	2,29	2,45	2,04	3,48	0,282
<b>% RSD</b>	7,67	9,40	29,84	30,40	0,60	1,14

## 4.2. Usporedba utjecaja poboljšivača ionizacije po mjerenim masama

Uspoređen je utjecaj poboljšivača ionizacije, 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata, 2-fenil-2-oksoetanala i formaldehida na ionizaciju negativnih iona četiri mjerene mase  $m/z$  787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599.

### 4.2.1. Peptidni ion $m/z$ 787,4565

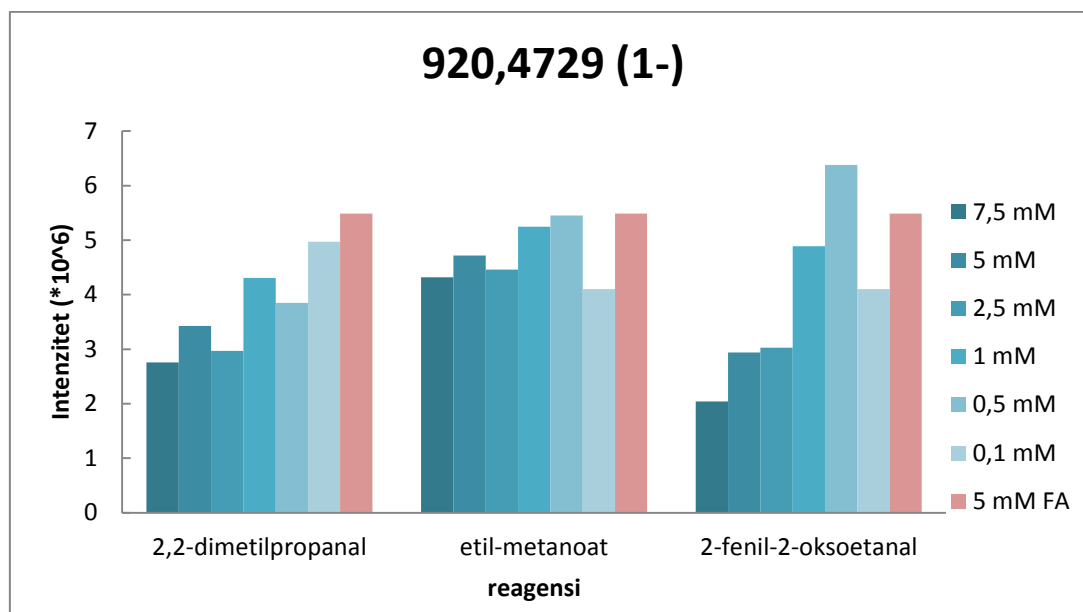
Peptidni ion  $m/z$  787,4565 ima vrijeme zadržavanja na koloni 12 minuta, a građen je od 7 aminokiselina. Prilikom usporedbe djelovanja dodatka poboljšivača ionizacije, 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanala u tok pokretne faze, zaključeno je da dodatak svakog od njih ima približno jednaki utjecaj na ionizaciju negativnih peptidnih iona  $m/z$  787,4565, iako je najizraženiji rezultat pospješivanja negativne ionizacije pokazao 1 mM 2-fenil-2-oksoetanal (Slika 4.9.). U slučaju formaldehida, najintenzivnija ionizacija peptidnog iona  $m/z$  787,4565 postignuta je pri koncentraciji formaldehida od 5 mM, koja je prikazana na Slici 4.8. crvenom bojom. Umiješavanjem poboljšivača ionizacije 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanala postignuta je izraženija ionizacija peptidnog iona  $m/z$  787,4565 pri manjim koncentracijama od optimalne koncentracije umiješanog formaldehida koja je iznosila 5 mM.



**Slika 4.9.** Grafički prikaz intenziteta peptidnog iona  $m/z$  787,4565 prilikom umiješavanja otopina 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal otopljenih u izopropanolu koncentracija od 0,1 mM do 7,5 mM u tok pokretne faze (označeni plavom bojom) i umiješavanjem otopine formaldehida koncentracije 5 mM koja je dala najveći intenzitet pri mjerenoj masi  $m/z$  787,4565 (označeni crvenom bojom).

#### 4.2.2. Peptidni ion $m/z$ 920,4729

Peptid  $m/z$  920,4729 ima vrijeme zadržavanja na koloni 12,5 minuta, građen je od 8 aminokiselina i najmanje je hidrofoban od četiri mjerena peptida. Najveći utjecaj na ionizaciju zamijećen je u slučaju dodatka 2-fenil-2-oksoetanal, a on je ujedno dao i najbolji rezultat pri umiješanoj koncentraciji 0,5 mM (Slika 4.10.). Najveći utjecaj na ionizaciju peptidnog iona  $m/z$  920,4729 u slučaju formaldehida zamijećen je pri umiješanoj koncentraciji od 5 mM, a veća ionizacija spomenutog peptida postignuta je jedino umiješavanjem 0,5 mM 2-fenil-2-oksoetanal. 2,2-dimetilpropanal imao je slabiji utjecaj na ionizaciju peptidnog iona  $m/z$  920,4729 od drugih korištenih poboljšivača ionizacije, a u slučaju etil-metanoata pri koncentraciji od 0,5 mM postignut je približno jednaki utjecaj na ionizaciju kao i kod 5 mM formaldehida.

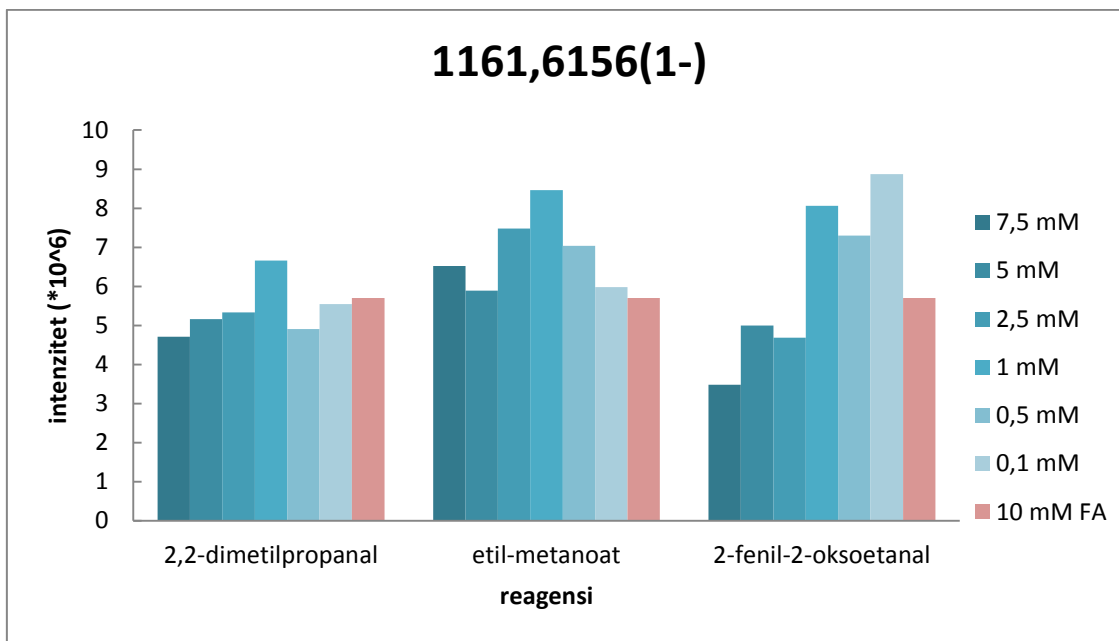


**Slika 4.10.** Grafički prikaz intenziteta peptidnog iona  $m/z$  920,4729 prilikom umiješavanja otopina 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal otopljenih u izopropanolu koncentracija od 0,1 mM do 7,5 mM u tok pokretne faze (označeno plavom bojom) i umiješavanjem otopine formaldehida koncentracije 5 mM koja je dala najveći intenzitet pri mjerenoj masi  $m/z$  920,4729 (označeno crvenom bojom).

#### 4.2.3. Peptidni ion $m/z$ 1161,6156

Peptid  $m/z$  1161,6156 ima vrijeme zadržavanja na kromatografskoj koloni 14 minuta i građen je od 10 aminokiselina. Najveći utjecaj na ionizaciju spomenutog peptida zamijećen je u slučaju umiješavanja 0,1 mM otopine 2-fenil-2-oksoetanal, dok je najveći utjecaj na ionizaciju u slučaju 2,2-dimetilpropanala i etil-metanoata postignut pri umiješanim koncentracijama od 1 mM (Slika 4.11.). Najveći utjecaj na ionizaciju mjerene mase  $m/z$  1161,6156 u slučaju formaldehida izmjeren je pri koncentraciji od 10 mM. 2,2-dimetilpropanal, etil-metanoat i 2-fenil-2-oksoetanal pokazali su veći utjecaj na ionizaciju peptida  $m/z$  1161,6156 pri koncentracijama do 100 puta manjima od 10 mM formaldehida.



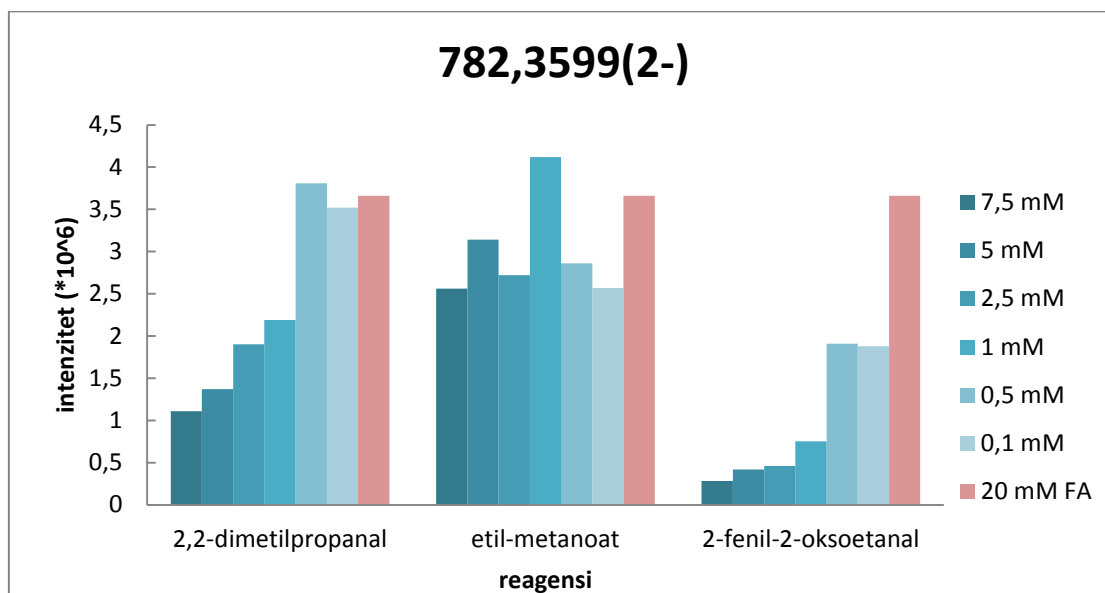


**Slika 4.11.** Grafički prikaz intenziteta peptidnog iona  $m/z$  1161,6156 prilikom umiješavanja otopina 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal otopljenih u izopropanolu koncentracija od 0,1 mM do 7,5 mM u tok pokretne faze (označeno plavom bojom) i umiješavanjem otopine formaldehida koncentracije 10 mM koja je dala najveći intenzitet pri mjerenoj masi  $m/z$  1161,6156 (označeno crvenom bojom).

#### 4.2.4. Peptidni ion $m/z$ 782,3599

Peptid  $m/z$  782,3599 ima vrijeme zadržavanja na kromatografskoj koloni 16 minuta, a građen je od 13 aminokiselina i najveće je hidrofobnosti. Najveći utjecaj na ionizaciju zamijećen je umiješavanjem 1 mM otopine etil-metanoata i 0,5 mM otopine 2,2-dimetilpropanala (Slika 4.12.). Najveći utjecaj na ionizaciju peptidnog iona  $m/z$  782,3599 u slučaju umiješavanja formaldehida izmjeren je pri koncentraciji od 20 mM. Približno jednaki utjecaj na ionizaciju pokazao je 0,5 mM 2,2-dimetilpropanal i 1 mM etil-metanoat, dok je 2-fenil-2-oksoetanal znatno manje utjecao na ionizaciju peptidnog iona  $m/z$  782,3599 od 20 mM otopine formaldehida. Iako su 20 mM formaldehid, 0,5 mM 2,2-dimetilpropanal i 1 mM etil-metanoat pokazali približno jednaki utjecaj na ionizaciju spomenutog peptida, 2,2-dimetilpropanal i etil-metanoat su optimalniji izbori poboljšivača ionizacije zahvaljujući manjoj koncentraciji

koju je potrebno umiješati u pokretnu fazu da bi se postigao približno jednaki utjecaj na ionizaciju negativnih iona od formaldehida. Manja koncentracija uzrokuje manje onečišćenje ionskog izvora spektrometra masa, a time i bolji omjer signala i šuma.



**Slika 4.12.** Grafički prikaz intenziteta peptidnog iona  $m/z$  782,3599 prilikom umiješavanja otopina 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal otopljenih u izopropanolu koncentracija od 0,1 mM do 7,5 mM u tok pokretne faze (označeno plavom bojom) i umiješavanjem otopine formaldehida koncentracije 20 mM koja je dala najveći intenzitet pri mjerenoj masi  $m/z$  782,3599 (označeno crvenom bojom).

### 4.3. Povezanost ionizabilnosti negativnih peptidnih iona s hidrofobnošću peptida

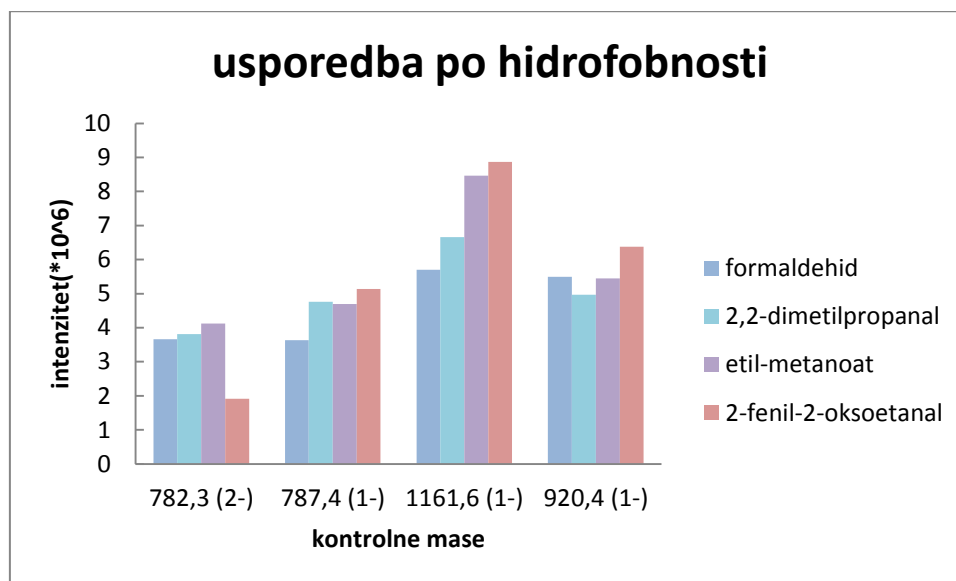
Da bi se utvrdilo da li je neki poboljšivač ionizacije pogodan za ionizaciju negativnih peptidnih iona, potrebno je da isti pomaže ionizaciju peptida različitih fizikalnih svojstava. Napravljena je usporedba utjecaja četiri korištena poboljšivača ionizacije; formaldehida, 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal na ionizaciju negativnih iona peptida različite hidrofobnosti.

Ekperimentalni podaci navedeni u tabličnom i grafičkom prikazu (Tablica 4.8., Slika 4.13.) sugeriraju da 2-fenil-2-oksoetanal izraženije poboljšava ionizaciju manje hidrofobnih peptida, a 2,2-dimetilpropanal izraženije poboljšava ionizaciju hidrofobnijih peptida. Utjecaj etil-metanoata i formaldehida na ionizaciju negativnih iona peptida prema dobivenim ekperimentalnim podacima nije povezan s hidrofobnošću istih.

**Tablica 4.8.** Prikaz utjecaja poboljšivača ionizacije; formaldehida, 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal, umiješanih u tok pokretne faze na ionizaciju negativnih iona peptida  $m/z$ ; 787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599, različite hidrofobnosti. Oznake 1 do 4 označavaju utjecaj poboljšivača ionizacije negativnih iona na ionizaciju peptida različite hidrofobnosti, gdje je pod oznakom 1 naveden poboljšivač ionizacije koji ima najveći utjecaj, a pod oznakom 4, poboljšivač ionizacije koji ima najmanji utjecaj na ionizaciju navedenog peptida.

**Poboljšivači ionizacije negativnih iona**

$m/z$	BB indeks hidrofobnosti	1	2	3	4
782,3	52,1	Etil-metanoat	2,2-dimetilpropanal	Formaldehid	2-fenil-2-oksoetanal
787,4	50,1	2-fenil-2-oksoetanal	2,2-dimetilpropanal	Etil-metanoat	Formaldehid
1161,6	45,8	2-fenil-2-oksoetanal	Etil-metanoat	2,2-dimetilpropanal	Formaldehid
920,4	40,1	2-fenil-2-oksoetanal	Formaldehid	Etil-metanoat	2,2-dimetilpropanal



**Slika 4.13.** Grafički prikaz intenziteta četiri peptidna iona  $m/z$ : 787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za otopine formaldehida, 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal u izopropanolu umiješane u tok pokretne faze.

#### 4.4. Povezanost ionizabilnosti negativnih peptidnih iona s veličinom peptida i vremenom izlaska s kolone

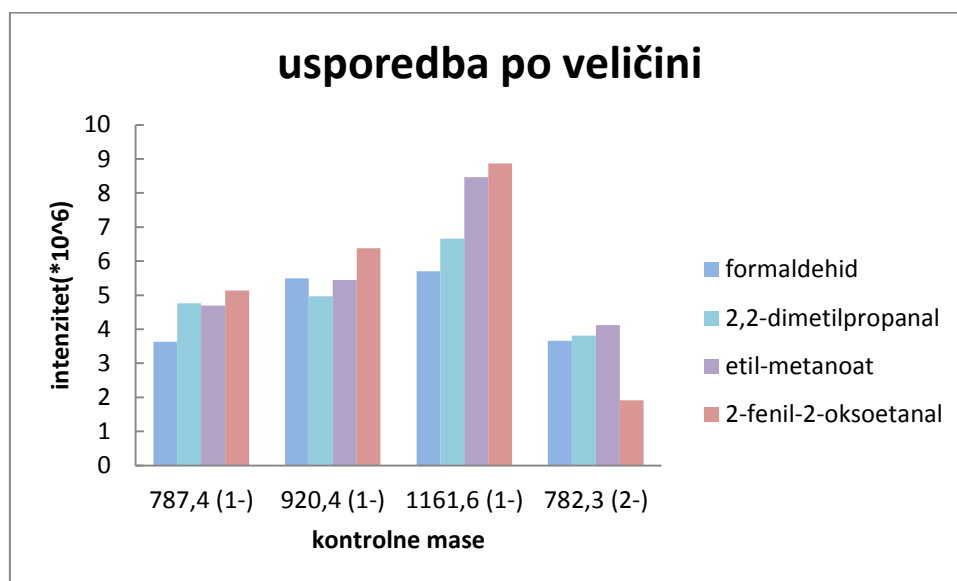
Analiziran je utjecaj poboljšivača ionizacije na ionizaciju peptidnih iona vezan uz veličinu peptida i vrijeme zadržavanja peptida na koloni. Manji peptidi se kraće zadržavaju na koloni, dok veći peptidi imaju veće vrijeme zadržavanja.

Eksperimentalni podaci dobiveni proučavanjem utjecaja poboljšivača ionizacije na nastajanje negativnih iona sugeriraju da 2-fenil-2-oksoetanal intenzivnije utječe na ionizaciju manjih peptida, dok etil-metanoat intenzivnije utječe na ionizaciju većih peptida (Tablica 4.9., Slika 4.14.). Prema dobivenim podacima može se zaključiti da utjecaj 2,2-dimetilpropanala i formaldehida na ionizaciju peptidnih iona nije povezan s njihovom veličinom.

**Tablica 4.9.** Prikaz utjecaja poboljšivača ionizacije; formaldehida, 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal, umiješanih u tok pokretne faze, na ionizaciju negativnih iona peptida  $m/z$ ; 787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599, različitih veličina. Oznake 1 do 4 označavaju utjecaj poboljšivača ionizacije negativnih iona na ionizaciju peptida različite hidrofobnosti, gdje je pod oznakom 1 naveden poboljšivač ionizacije koji ima najveći utjecaj, a pod oznakom 4, poboljšivač ionizacije koji ima najmanji utjecaj na ionizaciju navedenog peptida.

**Poboljšivači ionizacije negativnih iona**

$m/z$	Br. ak	$t_R$ /min	1	2	3	4
787,4	7	12	2-fenil-2-oksoetanal	2,2-dimetilpropanal	Etil-metanoat	Formaldehid
920,4	8	12,5	2-fenil-2-oksoetanal	Formaldehid	Etil-metanoat	2,2-dimetilpropanal
1161,6	10	14	2-fenil-2-oksoetanal	Etil-metanoat	2,2-dimetilpropanal	Formaldehid
782,3	13	16	Etil-metanoat	2,2-dimetilpropanal	Formaldehid	2-fenil-2-oksoetanal



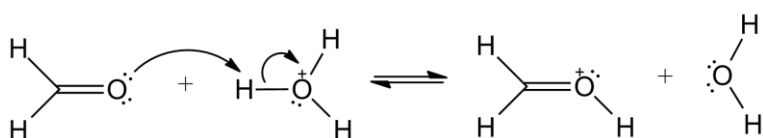
**Slika 4.14.** Grafički prikaz intenziteta četiri mjerene mase  $m/z$ : 787,4565, 920,4729, 1161,6156 i 782,3599 za otopine formaldehida, 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal u izopropanolu umiješane u tok pokretne faze.

#### 4.5. Mehanizam reakcije prijenosa protona u kiselom mediju za korištene poboljšivače ionizacije negativnih iona

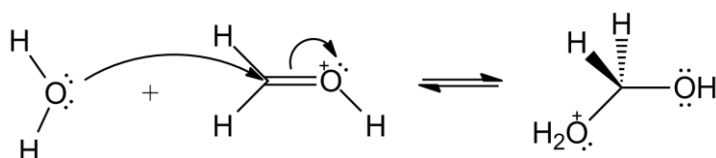
##### 4.5.1. Mehanizam reakcije prijenosa protona kod formaldehida

Formaldehid u kiselom podliježe ravnotežnoj reakciji nastajanja metandiola, koja je prikazana mehanizmom od tri koraka:

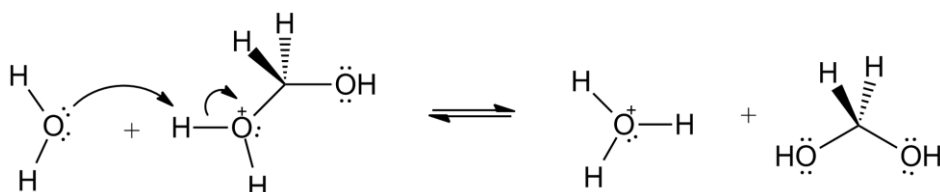
1) Protoniranje karbonilnog kisika:



2) Nukleofilna adicija na protonirani formaldehid:



3) Prijenos protona sa protonirane kiseline geminalnog diola na molekulu vode:

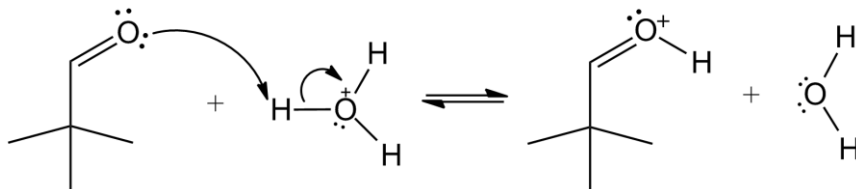


Protoni, koji ometaju proces ionizacije negativnih iona, ulaze u ravnotežnu reakciju nastajanja metandiola, te je time proces ionizacije negativnih iona olakšan.

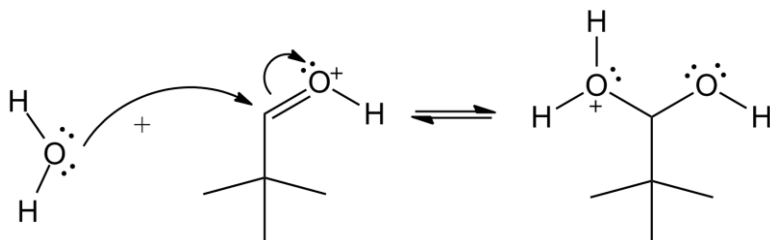
## 4.5.2. Mehanizam reakcije prijenosa protona kod 2,2-dimetilpropanala

Analogno reakciji s formaldehidom i 2,2-dimetilpropanal podliježe reakciji stvaranja diola u kiselom mediju. Mehanizam reakcije se može prikazati u tri koraka:

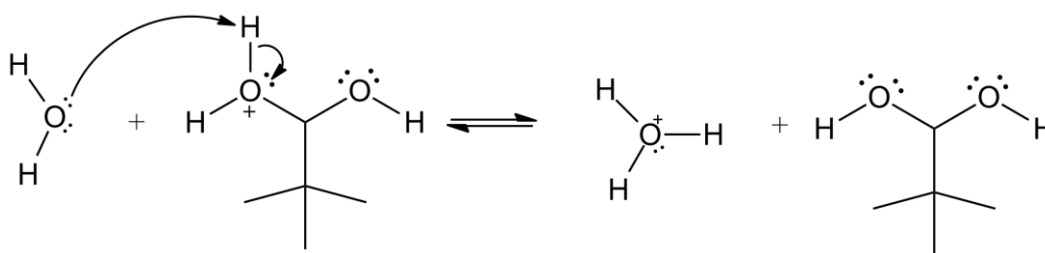
1) Protoniranje karbonilnog kisika:



2) Nukleofilna adicija na protonirani 2,2-dimetilpropanal:



3) Prijenos protona sa protoniranog geminalnog diola na molekulu vode:

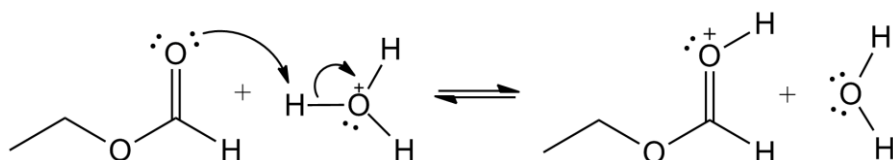




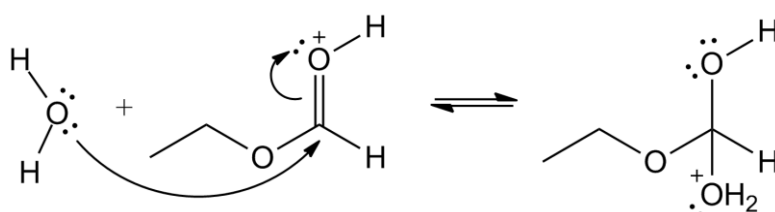
## 4.5.3. Mehanizam reakcije prijenosa protona kod etil-metanoata

Esteri u kiselom podliježu reakciji hidrolize. Iz etil-metanoata nastaje etanol i mravlja kiselina. Reakcija hidrolize kojoj podliježe etil-metanoat može se prikazati mehanizmom od četiri koraka:

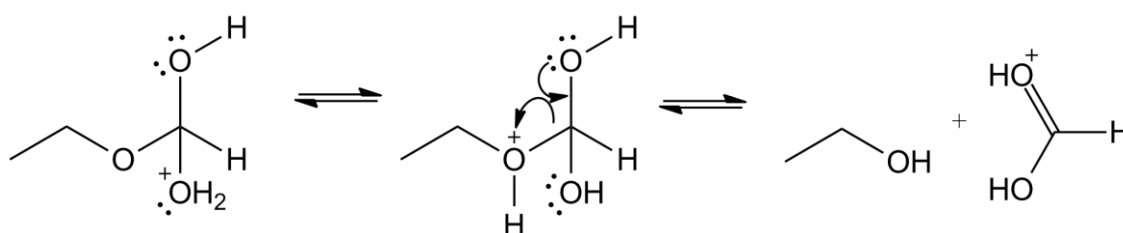
1) Protoniranje karbonilnog kisika:



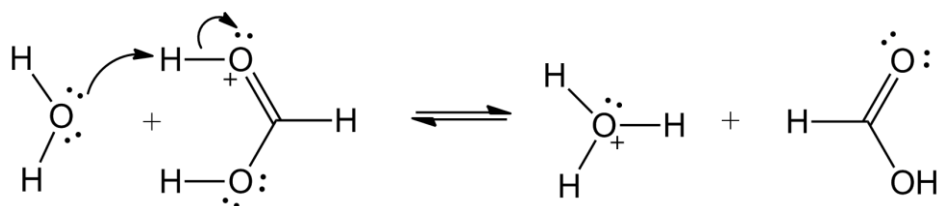
2) Nukleofilna adicija vode na aktiviranu karbonilnu skupinu:



3) Transfer protona i nastajanje etanola:



4) Prijenos protona na molekulu vode i nastajanje mravlje kiseline:

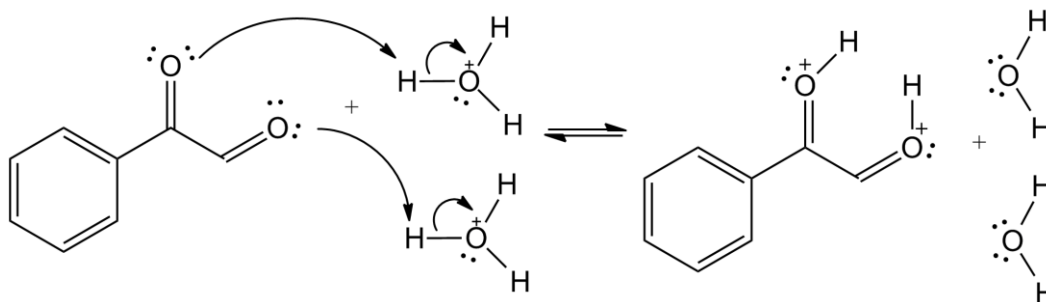


Reakcija hidrolize nije analogna reakcijama kojima podliježu ostali proučavani poboljšivači ionizacije, ali zajedničko im je sudjelovanje oksonijevog iona u ravnotežnim reakcijama prijenosa protona. Time se sprječava da protoni iz pokretne faze ometaju proces ionizacije negativnih iona.

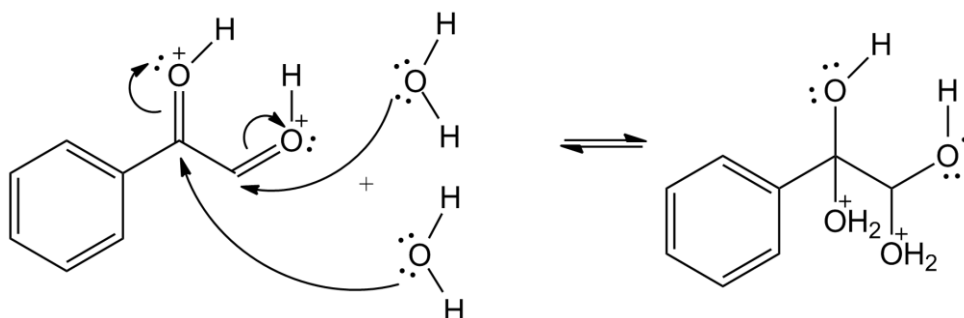
## 4.5.4. Mehanizam reakcije prijenosa protona kod 2-fenil-2-oksoetanal

2-fenil-2-oksoetanal podliježe istoj reakciji kao i formaldehid i 2,2-dimetilpropanal. On sadrži dvije karbonilne skupine i stoga je teoretski dvostruko više protona uključeno u ravnotežnu reakciju nastajanja alkohola. Stoga bi se moglo pretpostaviti da će 2-fenil-2-oksoetanal biti moguće koristiti u koncentracijama dvostruko manjima od gore navedenih poboljšivača ionizacije. Provedenim eksperimentom to nije potvrđeno zato što najniža koncentracijska granica poboljšivača ionizacije ovisi i o tome da li će biti moguće uspostaviti stabilno elektroraspršenje izvora. Reakcija kojoj podliježe 2-fenil-2-oksoetanal u kiselom prikazana je mehanizmom od tri koraka:

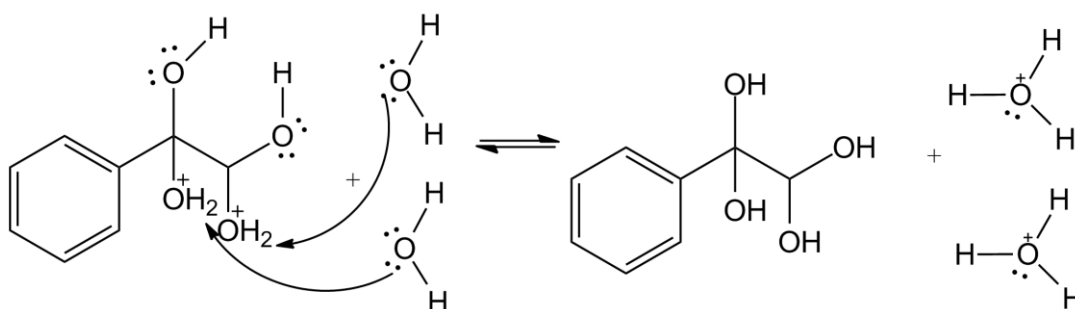
1) Protoniranje karbonilnog kisika:



2) Nukleofilna adicija na protonirani 2-fenil-2-oksoetanal:



3) Prijenos protona na molekule vode:



## 5. Zaključak

Formaldehid se pokazao kao poželjan poboljšivač ionizacije negativnih iona umiješavanjem u pokretnu fazu pri elektroraspršenju. Mehanizam reakcije kojoj podliježe formaldehid u kiselom mediju sličan je mehanizmu reakcija kojima podliježu aldehidi, ketoni i esteri u kiselom mediju, stoga smo istražili utjecaj nekoliko aldehida, ketona i estera na formiranje negativnih iona peptida i proteina u plinskoj fazi elektroraspršenja. Najbolje rezultate su pokazali 2,2-dimetilpropanal, etil-metanoat i 2-fenil-2-oksoetanal te su s njima nastavljena daljnja istraživanja.

Najniže koncentracije reagensa otopljenih u izopropanolu koje se mogu koristiti kao poboljšivači ionizacije negativnih iona su 5 mM otopina formaldehida i 0,1 mM otopina 2,2-dimetilpropanala, etil-metanoata i 2-fenil-2-oksoetanal. Pri nižim koncentracijama od navedenih nije moguće uspostaviti stabilno elektroraspršenje. Niže koncentracije su dale bolje rezultate u ionizaciji negativnih iona, pa su tako optimalni rezultati postignuti u koncentracijskom području od 0,5 mM do 1 mM za otopinu etil-metanoata, te od 0,1 mM do 1 mM za otopine 2,2-dimetilpropanala i 2-fenil-2-oksoetanal. Navedena tri poboljšivača ionizacije, 2,2-dimetilpropanal, etil-metanoat i 2-fenil-2-oksoetanal, pokazali su izraženiji utjecaj na ionizaciju negativnih iona peptida i proteina od formaldehida, čak i u nižim koncentracijskim područjima, u kojima formaldehid nije bilo moguće koristiti kao poboljšivač ionizacije jer ne pokazuje efekt formiranja negativnih iona pri stabilnom elektroraspršenju. Poželjna karakteristika poboljšivača ionizacije i jedan od ciljeva ovog rada vezan je uz postizanje čim niže umiješane koncentracije poboljšivača ionizacije u tok pokretne faze. Razlog tomu može se naći u činjenici da za stabilan rad spektrometra masa nije poželjno svakodnevno uklanjanje nataloženih soli ili analita u ionskom izvoru. Rezultati su pokazali da na ionizaciju hidrofobnijih peptida imaju veći utjecaj etil-metanoat i 2,2-dimetilpropanal, dok na ionizaciju manje hidrofobnih peptida 2-fenil-2-oksoetanal pokazuje optimalan učinak. Također, može se zaključiti da 2-fenil-2-oksoetanal izrazito povoljno utječe na ionizaciju negativnih iona manjih peptida, dok etil-metanoat izraženije utječe na

ionizaciju većih peptida. Od navedenih poboljšivača ionizacije, 2-fenil-2-oksoetanal se pokazao kao optimalni izbor pospješivanja ionizacije negativnih iona peptida i proteina. Iako su ispitivani 2,2-dimetilpropanal i etil-metanoat pokazali neznatno lošije ukupne rezultate poboljšavanja ionizacije negativnih iona.

2,2-dimetilpropanal, etil-metanoat i 2-fenil-2-oksoetanal pokazali su se kao odgovarajući poboljšivači ionizacije negativnih iona umiješani u tok pokretne faze, koji se mogu učestalo koristiti za poboljšavanje ionizacije negativnih peptida i proteina u ionskom izvoru ESI-MS-a. Pri tome valja napomenuti da je kemijski mehanizam djelovanja istih po prvi puta objašnjen u kontekstu nastajanja negativnih iona u prisustvu izrazito kisele pokretne faze uz dodatak polarne organske faze. Objašnjenje navedenih pojava u kompleksnom sustavu organskih i anorganskih otapala na granici tekuće i plinske faze pomaže u rutinskoj upotrebi nano-elektroaspršenja za analize peptida i proteina (usporedba rezultata pozitivnih i negativnih spektara masa).

## 6. Popis korištenih kratica

BB indeks	Indeks hidrofobnosti prema Bull i Bresseu
BPI	Intenzitet osnovnog pika (engl. <i>Base Peak Intensity</i> )
BSA	Albumin iz seruma goveda (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CI	Kemijska ionizacija (engl. <i>Chemical Ionization</i> )
CID	Kolizijom aktivirana disocijacija (engl. <i>Collision Induced Dissociation</i> )
EI	Ionizacija elektronima (engl. <i>Electron Ionization</i> )
ESI	Ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>Electrospray Ionization</i> )
FA	Formaldehid
FAB	Udar brzim atomima (engl. <i>Fast Atom Bombardment</i> )
FASTA	Tekstualni format koji predstavlja nukleotidni ili peptidni slijed u kojemu su nukleotidi ili aminokiseline prikazani jednoslovnim oznakama
FI	Ionizacija poljem (engl. <i>Field Ionization</i> )
FT	Fourierova transformacija (engl. <i>Fourier Transform</i> )
GenBank	Baza podataka nukleotidnih slijedova (engl. <i>Genome Bank</i> )
GlobalLynx	Računalna platforma za pretraživanje proteinskih baza podataka
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HRMS	Spektrometrija masa visoke rezolucije (engl. <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> )
ICP	Induktivno spregnuta plazma (engl. <i>Inductively Coupled Plasma</i> )
ICR	Ionsko ciklotronska rezonancija (engl. <i>Ion Cyclotron Resonance</i> )
IT	Ionska stupica (engl. <i>Ion Trap</i> )
LC	Tekućinska kromatografija (engl. <i>Liquid Chromatography</i> )
LD	Desorpcija laserom (engl. <i>Laser Desorption</i> )
$m/z$	Omjer mase i naboja

---

MALDI	Matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> )
Mascot	Računalna platforma za pretraživanje proteinskih baza podataka
MeCN	Acetonitril
MS	Spektrometrija masa (engl. <i>Mass Spectrometry</i> )
MS/MS	Tandemna spektrometrija masa
NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. <i>National Center for Biotechnological Information</i> )
PDB	Kristalografska baza podataka koja sadrži trodimenzionalne strukture velikih bioloških molekula, kao što su proteini i nukleinske kiseline (engl. <i>Protein Data Bank</i> )
PIR	Neredudantna baza podataka aminokiselinskih slijedova (engl. <i>Protein Information Resource</i> )
PMF	Metoda otiska prsta peptida(engl. <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> )
PRF	Baza koja sadrži informacije i izvještaje o trenutnim istraživanjima vezanim uz proteine (engl. <i>Protein Research Foundation</i> )
Q	Kvadrupolni analizator masa (engl. <i>Quadrupol</i> )
RefSeq	Baza podataka nukleotidnih slijedova i njihovih proteinskih produkata (engl. <i>The Reference Sequence</i> )
RP	Obrnute faze (engl. <i>Reverse Phase</i> )
RSD	Relativna standardna devijacija (engl. <i>Relative Standard Deviation</i> )
SARM	Selektivni modulator androgenih receptora (engl. <i>Selective Androgen Receptor Modulator</i> )
SwissProt	Visokokvalitetna, ručno anotirana i neredudantna baza aminokiselinskih slijedova
TFA	Trifluoroctena kiselina
TIC	Ukupna ionska struja (engl. <i>Total Ion Current</i> )
TOF	Analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. <i>Time of Flight</i> )
TPA	Third-Party Annotation

---

UniProt	Konzorcij koji okuplja European Bioinformatics Institute (EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) i Protein Information Resource (PIR)
UPLC	Tekućinska kromatografije ultra visoke djelotvornosti (engl. <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> )

## 7. Životopis

Rođena sam 17. srpnja 1990. godine u Virovitici. Nakon završenog osnovnog školovanja u Osnovnoj školi Josip Kozarac, upisujem opću gimnaziju u Srednjoj školi Marko Marulić u Slatini. Sudjelovanje na državnim natjecanjima iz kemije 2005. godine na Rabu i 2006. godine u Dubrovniku nagnalo me da po završetku srednje škole upišem Preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Nakon završetka Preddiplomskog studija kemije stječem naziv prvostupnika kemije, te upisujem Diplomski istraživački studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, smjer Biokemija i Analitička kemija. Tijekom studiranja sudjelovala sam na popularno znanstvenim događanjima, a akademske godine 2012./2013. sam, zajedno s velikom skupinom kolega, dobila posebnu Rektorovu nagradu za organizaciju i izvedbu 6. otvorenog dana Kemijskog odsjeka PMF-a.



## 8. Literaturna vrela

---

- <sup>1</sup> C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **57** (1985) 675-679
- <sup>2</sup> M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **60** (1988) 2299-2301
- <sup>3</sup> A. R. Date, A. L. Gray, *Analyst* **108** (1983) 159-165
- <sup>4</sup> D. H. Russell, R. D. Edmondson, *J. Mass Spectrom.* **32** (1997) 263-276
- <sup>5</sup> A. Pandey, M. Mann, *Nature* **405** (2000) 837-846
- <sup>6</sup> Z. Wu, W. Gao, M. A. Phelps, D. Wu, D. D. Miller, J. T. Dalton, *Anal. Chem.* **76** (2004) 839-847
- <sup>7</sup> D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, Orlando, USA, 1998, str. 499-533
- <sup>8</sup> Sir G. Taylor, *Proc. R. Soc. A* **280** (1964) 383-397
- <sup>9</sup> N. B. Cech, C. G. Enke, *Mass Spectrom. Rev.* **20** (2001) 362-387
- <sup>10</sup> R. B. Cole, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 763-772
- <sup>11</sup> P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 804-817
- <sup>12</sup> N. Galić, *Kem. Ind.* **53** (2004) 117-123
- <sup>13</sup> M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **49** (1968) 2240-2249
- <sup>14</sup> J. V. Iribarne, B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.* **64** (1976) 2287-2294
- <sup>15</sup> Back to basics
- <sup>16</sup> R. F. Straub, R. D. Voyksner, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4** (1993) 578-587
- <sup>17</sup> F. A. Carey, *Organic Chemistry*, Mc Graw-Hill, New York, USA, 5<sup>th</sup> Edition, 2003, str.
- <sup>18</sup> <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>
- <sup>19</sup> <http://msr.dom.wustl.edu/reflectrons-ion-mirrors/>
- <sup>20</sup> M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Medicina* **45** (2009) 218-232
- <sup>21</sup> M. P. Waashburn, J. R. Yates, *Curr. Opin. Microbiol.* **3** (2000) 292-297
- <sup>22</sup> N. Galić, M. Cindrić, *Kem. Ind.* **57** (2008) 231-243

- 
- <sup>23</sup> G. L. Corthals, S. P. Gygi, R. Aebersold, S. D. Patterson, *Proteome Research :2D Gel Electrophoresis and Detection Methods*, Springer, New York, USA, 1999 str. 197-231.
- <sup>24</sup> K.F. Medzihradzsky, J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falik, P. Juhsaz, M. L. Vestal, A. L. Burlingame, *Anal. Chem.* **72** (2000) 552- 558
- <sup>25</sup> P. Roepstroff, J. Fohlman, *Biomed. Mass. Spectrom.* **11** (1984) 601-
- <sup>26</sup> K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **16** (1988) 99-111
- <sup>27</sup> [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)
- <sup>28</sup> [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- <sup>29</sup> [www.expasy.org](http://www.expasy.org)
- <sup>30</sup> D. J. Pappin, P. Hojrup, A. J. Bleasby, *Curr. Biol.* **3** (1993) 327-322
- <sup>31</sup> <http://prospector.ucsf.edu>
- <sup>32</sup> H. B. Bull, K. Breese, *Arch. Biochem. Biophys.* **161** (1974) 665-670
- <sup>33</sup> <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>
- <sup>34</sup> <http://www.uniprot.org/>