

Spektrometrija masa fragmenata peptidnih iona nastalih djelovanjem radikala

Horvatić, Anita

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:178919>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Anita Horvatić

**SPEKTROMETRIJA MASA FRAGMENTA
PEPTIDNIH IONA NASTALIH DJELOVANJEM
RADIKALA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Anita Horvatić

MASS SPECTROMETRY OF PEPTIDE FRAGMENT IONS INDUCED BY RADICALS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Anita Horvatić

**SPEKTROMETRIJA MASA FRAGMENTA
PEPTIDNIH IONA NASTALIH DJELOVANJEM
RAKIKALA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Dr. sc. Mario Cindrić

Zagreb, 2014.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Anita Horvatić

MASS SPECTROMETRY OF PEPTIDE FRAGMENT IONS INDUCED BY RADICALS

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. sc. Mario Cindrić

Zagreb, 2014

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za sistemsku biomedicinu
Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković
pod vodstvom dr. sc. Maria Cindrića.

Veliko hvala...

... L'Oréalu ADRIA d.o.o. i Hrvatskom povjerenstvu za UNESCO pri Ministarstvu kulture na dodijeljenoj stipendiji „Za žene u znanosti“ u finalnoj fazi izrade doktorske disertacije.

... mentoru na pruženom povjerenju, savjetima i konstruktivnim raspravama tijekom izrade i pisanja disertacije.

... Silviu, Sisti i obitelji na bezgraničnoj podršci.

... prijateljima i kolegama na poticaju, razgovorima, savjetima, druženju i pomoći u svakodnevnom radu.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Svrha rada.....	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Određivanje primarne strukture proteina.....	3
2.1.1. Primjena spektrometrije masa u određivanju primarne strukture proteina	5
2.1.2. Spektrometrija masa MALDI (MALDI-MS)	6
2.1.2.1. Uloga matrice	7
2.1.2.2. Priprava proteinskih uzoraka	8
2.1.2.3. Tehnika MALDI.....	10
2.2. Sekvenciranje peptida spektrometrijom masa.....	12
2.2.1. Fragmentacija peptidnih iona	13
2.2.1.1. Utjecaj unutarnje energije na fragmentaciju peptidnih iona	13
2.2.1.2. Aktivacijski procesi	14
2.2.2. Nomenklatura fragmenata peptidnih iona	16
2.2.3. Mehanizmi fragmentacije peptidnih iona	18
2.3. Načini poboljšanja fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF.....	22
2.3.1. Kemijska modifikacija peptida	23
2.3.2. Pristup koji ne uključuje kemijsku modifikaciju peptida	26
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	30
3.1. Kemikalije i punila	30
3.1.1. Kemikalije	30
3.1.2. Derivati sulfonske kiseline	30
3.1.3. Peptidi	31
3.1.4. Pribor za pročišćavanje peptida	31
3.1.5. Instrumenti i ostala oprema	31
3.2. Priprava otopina	31
3.2.1. Priprava MALDI- matrice	31
3.2.2. Priprava otopina za kalibraciju.....	32

3.3. Priprava peptida za ispitivanje učinka poboljšanja fragmentacije.....	32
3.3.1. Autoliza tripsina.....	34
3.3.2. Pročišćavanje peptida na koloni tehnikom ZipTip.....	34
3.3.3. Pročišćavanje proteina na membranama Microcon YM-10.....	35
3.4. Priprava potencijalnih inicijatora fragmentacije.....	35
3.4.1. Priprava sulfatnih spojeva.....	35
3.4.2. Priprava inicijatora radikala.....	36
3.4.3. Sinteza aceton peroksida.....	36
3.5 Nanošenje uzoraka na MALDI-pločicu	37
3.6. Kemijsko obilježavanje peptida benzaldehid-2,4-disulfonskom kiselinom i benzaldehid-3,4-disulfonskom kiselinom	38
3.7. Analiza uzoraka tehnikom spektrometrije masa MALDI-TOF/TOF	38
3.8. Računalna obrada podataka dobivenih spektrometrijom masa.....	40
§ 4. REZULTATI.....	41
4.1. Odabir peptida	41
4.2. Utjecaj dodatka sulfatnih soli i derivata benzensulfonske kiseline na fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF	42
4.2.1. Utjecaj dodatka amonijevog sulfata i amonijevog persulfata na fragmentaciju peptidnih iona.....	42
4.2.2. Utjecaj derivata benzensulfonske kiseline na fragmentaciju peptidnih iona	51
4.2.3. Kemijsko obilježavanje peptida derivatima disulfonske kiseline.....	61
4.3. Utjecaj inicijatora radikala na fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF	63
4.3.1. Peroksidi kao potencijalni inicijatori fragmentacije.....	64
4.3.2. Inicijatori nastanka radikala kao potencijalni inicijatori fragmentacije.....	69
§ 5. RASPRAVA	78
5.1. Utjecaj svojstva peptida i proteina na fragmentaciju iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI TOF/TOF.....	78
5.2. Sulfatne soli kao inicijatori fragmentacije.....	79
5.3. Derivati benzensulfonske kiseline kao inicijatori fragmentacije	85
5.4. Inicijatori nastanka radikala kao inicijatori fragmentacije.....	88
§ 6. ZAKLJUČAK	92
§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	94
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	96
§ 9. DODATAK	XVII
§ 10. ŽIVOTOPIS	XXI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

SPEKTROMETRIJA MASA FRAGMENTATA PEPTIDNIH IONA NASTALIH DJELOVANJEM RADIKALA

Anita Horvatić

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, HR-10000 Zagreb

Određivanje primarne strukture proteina temeljni je zahtjev većine proteomskih analiza. Za određivanje slijeda aminokiselina se, uz metode Edmanove odgradnje, koristi tandemna spektrometrija masa temeljena na fragmentaciji peptidnih iona. Fragmentacija uvelike ovisi o sastavu i broju aminokiselina te posttranslacijskim modifikacijama. Radi poboljšanja ionizacije i fragmentacije se, osim kemijskog obilježavanja peptida, koriste i inicijatori fragmentacije koji desolvatiraju peptidne ione ili generiraju radikale u plinovitoj fazi spektrometra masa.

Tijekom izrade doktorske disertacije ispitana je kontrolirana fragmentacija peptida u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF (matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem-analizator vremena leta/ analizator vremena leta) djelovanjem inicijatora fragmentacije iz skupine persulfata, peroksida, sulfona te nitrila, dodanih u smjesu peptida i matrice. Predloženi su mehanizmi fragmentacije peptidnih iona inicirani radikalima, koji su dodatno eksperimentalno potvrđeni fragmentacijom kemijski obilježenih peptida. Spektri masa peptida nakon dodatka inicijatora fragmentacije u prvom stupnju MS-analize odgovaraju tandemnom spektru masa uz korištenje kolizijske ćelije, a ione produkte moguće je fragmentirati u drugom stupnju analize, čime je omogućena višestruka tandemna spektrometrija masa (tzv. pseudo MS³).

(XXIII+103 stranice, 44 slike, 19 tablica, 103 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: inicijatori fragmentacije/ ISD/ MALDI/ spektrometrija masa/ radikalski mehanizam fragmentacije

Mentor: Doc. dr. sc. Mario Cindrić
Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Vlasta Drevenkar
Doc. dr. sc. Mario Cindrić
Doc. dr. sc. Boris Mildner

Rad prihvaćen: 4. lipnja 2014.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

MASS SPECTROMETRY OF PEPTIDE FRAGMENT IONS INDUCED BY RADICALS

Anita Horvatić

Ruder Bošković Institute, Bijenička cesta 54, HR-10000 Zagreb

Protein primary structure elucidation is the key requirement in proteomics analyses. Except the Edman degradation, unambiguous amino acid sequence determination can be regularly performed by usage of tandem mass spectrometry, based on peptide ion fragmentation. Protein characteristics such as size, amino acid composition or post-translational modifications affect fragmentation. For ionization and fragmentation efficacy improvements, except chemical modification of peptides, fragmentation initiators can be used. Fragmentation initiators facilitate desolvation and generate gas phase radicals in the mass spectrometer.

In this thesis, controlled in source peptide ion fragmentation induced by addition of fragmentation initiators was studied by means of matrix-assisted desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS). Fragmentation initiators used were classified as persulfates, peroxides, sulphones and nitriles. Radical mechanisms of peptide ion fragmentation mediated by fragmentation initiators were elucidated and confirmed by orthogonal experiment - chemically modified peptides fragmentation.

Mass spectra obtained in the first stage mass spectrometry after fragmentation initiators addition are almost identical to conventional tandem mass spectra produced by collision induced dissociation. Product ions formed in ion source can be further fragmented in the second step of MS analysis. This concept enables multiple tandem mass spectrometry (pseudo MS³).

(XXIII+103 pages, 44 figures, 19 tables, 103 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: fragmentation initiators/ ISD/ MALDI/ mass spectrometry/ radical mediated fragmentation mechanism

Supervisor: Dr. sc. Mario Cindrić, assistant professor

Reviewers: Dr. sc. Vlasta Drevenkar, professor

Dr. sc. Mario Cindrić, assistant professor

Dr. sc. Boris Mildner, assistant professor

Thesis accepted: June 4th, 2014

§ 1. UVOD

Proteini su sastavni dio svakog organizma, kao i nositelji svih bioloških funkcija na razini staničnih procesa. Budući da se proteom mijenja ovisno o genetskim i vanjskim čimbenicima, identifikacija proteina te utvrđivanje njihovih svojstava, funkcije i interakcija ključno je za razumijevanje fizioloških i patoloških procesa, kao i pronalazak dijagnostičkih molekula (biomarkera) za pojedina stanja.¹⁻³ Razvoj instrumentacije i visokoprotočnih analitičkih tehnika (poput tekućinske kromatografije, elektroforeze i spektrometrije masa) te bioinformatike (dostupnost proteinskih baza podataka i računalnih algoritama za njihovo pretraživanje) tijekom proteklih dvadesetak godina omogućio je istovremenu identifikaciju velikog broja proteina proteomskim pristupom.⁴

Spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionization*, ESI) ili matricom pomognutu ionizaciju uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) postala je nezamjenjiv alat u proteomskim studijama omogućujući karakterizaciju proteina na razini aminokiselina mjerenjem točne mase.^{3,4} Rutinski postupak identifikacije proteina koristeći spektrometriju masa u kombinaciji s pretraživanjem proteinskih baza podataka temelji se na usporedbi eksperimentalnih podataka s teoretskim masama u bazi. No, nepoznavanje genomskog slijeda svih organizama, diskrepancije između genomskog i aminokiselinskog slijeda, posttranslacijske modifikacije ili nedovoljna kvaliteta spektra masa djelomično ili u potpunosti onemogućuju identifikaciju proteina koristeći baze podataka. U tom slučaju je za nedvojbeno određivanje slijeda aminokiselina neophodno tzv. sekvenciranje *de novo* peptida i proteina koje se temelji na principima tandemne spektrometrije masa.⁵

Budući da svojstva proteina poput sastava aminokiselina, broja aminokiselina (molekulske mase proteina) i posttranslacijskih modifikacija uvjetuju uspješnu fragmentaciju, nedvojbeno određivanje slijeda aminokiselina spektrometrijom masa ovisno o navedenim svojstvima može predstavljati značajan problem.⁶ U tom slučaju se za poboljšanje fragmentacije peptidnih iona pribjegava kemijskom obilježavanju proteina ili uporabi inicijatora fragmentacije poput određene MALDI-matrice ili amonijevih soli.^{7,8} Kao rezultat

postiže se veći intenzitet signala iona produkata i određivanje većeg dijela slijeda aminokiselinske sekvencije.

1.1. Svrha rada

Cilj istraživanja bio je poboljšati fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF bez prethodnog kemijskog obilježavanja peptida u svrhu dobivanja čim detaljnije strukturne informacije. Istraživanje je bilo usmjereno na dobivanje detaljnijeg uvida u radikalske mehanizme fragmentacije peptidnih iona koji ne uključuju molekule matrice već inicijatore fragmentacije. Polazeći od činjenice da amonijev sulfat inicira fragmentaciju iona u izvoru iona,⁸ za fragmentacijske studije korišten je amonijev persulfat, koji je strukturom sličan amonijevom sulfatu.

Ispitan je učinak poboljšanja fragmentacije modelnih peptida ovisno o molekulskoj masi, strukturi (ciklički i linearni peptidi) i vrsti modifikacija (lipidacija, amidacija N-kraja, acetilacija C-kraja te intermolekulske i intramolekulske disulfidne veze). Obzirom na značajno poboljšanje fragmentacije u izvoru iona djelovanjem nastalih sulfatnih radikala i potvrdu radikalskog mehanizma fragmentacijom kemijski obilježenih peptida u kolizijskoj ćeliji, istraživanje je prošireno na korištenje inicijatora radikala te organskih fotoinicijatora (sulfona i spojeva koji nužno ne sadrže sulfo-skupinu) kao potencijalnih inicijatora fragmentacije. Osim spektrometrije masa i pripadajućih računalnih programa na čijoj uporabi se temelji cijeli rad, u ovom istraživanju su za pročišćavanje peptida korištene separacijske tehnike ultrafiltracija i tekućinska kromatografija obrnutih faza.

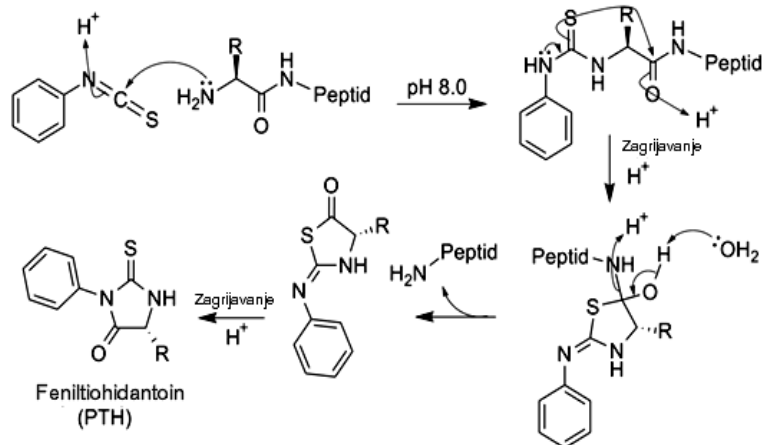
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Određivanje primarne strukture proteina

Slijed aminokiselina u proteinu određen je komplementarnim slijedom parova baza u genetskom kodu, čineći ga informacijski povezanom cjelinom.⁹ Aminokiseline u proteinu međusobno su vezane peptidnim (amidnim) vezama; dušik amino-skupine jedne aminokiseline vezan je na ugljik karbonilne skupine druge aminokiseline. Iako je poznato više od 500 aminokiselina,¹⁰ peptidi i proteini nastali u živim organizmima sastoje se većim dijelom od 20 osnovnih aminokiselina koje su L-stereoizomeri.¹¹ Nekanonske aminokiseline također su prisutne u proteinima, no one nastaju modifikacijom *in vivo* nakon ugradnje u protein (npr. hidroksiprolin ili hidroksilizin u kolagenu)¹² ili ugradnjom tijekom kemijske sinteze *in vitro* (npr. kinurenin). Osim hidroksilacije, aminokiseline mogu sadržavati i druge posttranslacijske modifikacije, poput acetilacije (metionin, lizin, N-kraj), fosforilacije (serin, treonin, tirozin), metilacije (N-metilacija i O-metilacija) te vezanja ugljikohidrata (asparagin, serin, treonin) ili lipida (C-kraj, N-kraj, cistein).¹³ Peptidi i proteini mogu se nadproducirati različitim tehnikama: ekstrakcijom iz prirodnog uzorka,¹⁴ produkcijom u staničnim kulturama,¹⁵ transgeničnim biljkama i životinjama¹⁶ kao i kemijskom sintezom (najčešće sintezom na čvrstom nosaču; poput bivalirudina, enfuvirtida, eksenatida, somatostatina i sl.).¹⁷

Određivanje primarne strukture peptida temeljni je zahtjev gotovo svake analize bioloških ili proteinskih uzoraka. Osmišljena 50-ih godina prošlog stoljeća, Edmanova odgradnja postala je iznimno važan alat za određivanje primarne strukture peptida i proteina.¹⁸ Tehnika omogućava određivanje slijeda aminokiselina s N-kraja peptida ili proteina obilježavanjem fenil-izotiocijanatom (Slika 1). Kemijska reakcija obilježavanja N-kraja peptida odvija se u ciklusima, a svaki ciklus se sastoji od nekoliko koraka. Početni korak uključuje vezanje fenil-izotiocijanata na α -amin polipeptidnog lanca u bazičnim uvjetima (pH 8) pri čemu nastaje fenil-tiokarbamil-peptid. Blagim zakiseljavanjem reakcijske smjese kida se peptidna veza između aminokiseline obilježene anilintiazolinom i ostatka peptida. Anilintiazolinon ciklizacijom prelazi u stabilniji fenil-tiohidantoin (PTH) derivat. Po

završetku reakcije, PTH-obilježena aminokiselina odvaja se najčešće tekućinskom kromatografijom od neobilježenog ostatka peptida i detektira usporedbom sa standardom.



Slika 1. Reakcije tijekom jednog ciklusa Edmanove odgradnje.¹⁹

Kao standard za identifikaciju svake pojedine aminokiseline u ciklusu koriste se komercijalno dostupne obilježene aminokiseline. Opisani proces sekvenciranja odvija se u strogo kontroliranim uvjetima, reproducibilan je te su jasno definirani produkti reakcija. Osim obilježene aminokiseline u svakom ciklusu Edmanove odgradnje nastaju nusprodukti uslijed metanolize i hidrolize fenil-izotiocijanata: difeniltiourea, *N*-fenil-*O*-metil-tiokarbonat te difenilurea.

Razlike u izvedbi aparature za Edmanovu odgradnju omogućuju sekvenciranje peptida na čvrstoj fazi, kao i korištenja reagensa u plinovitom stanju u reakciji vezanja fenil-izotiocijanata i odvajanja obilježene aminokiseline.^{20,21} Upotreba tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i sustava obrnutih faza (engl. *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) te kapilarnih kolona za razdvajanje i detekciju PTH-obilježenih aminokiselina snizila je osjetljivost metode na razinu femtomola (300 fmol do 500 fmol pročišćenog proteina).²² Osim trajanja analize i količine biološkog materijala potrebnog za određivanje cjelokupnog slijeda aminokiselina, ograničenja upotrebe Edmanove odgradnje odnose se na veličinu peptida, nemogućnost određivanja posttranslacijskih modifikacija te onemogućene analize proteina s modificiranim N-krajom.^{22,23} Većina nedostataka Edmanove odgradnje zaobidena je razvojem tehnika spektrometrije masa, koje su gotovo u potpunosti zamijenile navedeni postupak ili se pak koriste u kombinaciji kao nadopuna.²²

2.1.1. Primjena spektrometrije masa u određivanju primarne strukture proteina

Spektrometrija masa je instrumentalna tehnika kojom se proučavaju ioni nastali ionizacijom atoma ili molekula i njihove reakcije u vakuumu instrumenta spektrometra masa.²⁴ Spektrometar masa sastoji se od tri osnovna dijela: izvora ionizacije, analizatora masa i detektora.²⁵ Ovisno o izvedbi instrumenta, uzorak u čvrstom ili tekućem agregatnom stanju uvodi se u izvor ionizacije u kojemu molekule prelaze u plinovito stanje i ioniziraju. Nastali ioni ekstrahiraju se u analizator masa u kojem se razdvajaju na temelju omjera mase i naboja (m/z) u vremenu ili prostoru. Nakon detekcije kojom se bilježi broj iona te omjer mase i naboja iona koji dolaze s detektora, signal se računalno obrađuje što rezultira nastankom spektra masa.

Primjena spektrometrije masa pokriva područja prirodnih znanosti (kemije, biologije, fizike), biomedicine, biotehnologije, farmaceutike i ekologije.²⁶⁻²⁸ Razvojem ionizacijskih tehnika MALDI i ESI omogućena je ionizacija velikih, nehlapljivih i termolabilnih molekula.²⁵ Spektrometrija masa postala je nezamjenjiva tehnika u cijelom nizu analiza vezanih uz strukturnu i kvantitativnu karakterizaciju bioloških makromolekula, metala, farmaceutika, toksina itd.^{25,26,29} Točno mjerenje mase peptida i proteina (kao i njihovih fragmenata) tehnikama spektrometrije masa omogućuje određivanje slijeda aminokiselina, kao i posttranslacijskih modifikacija (karakterizacija vrste i položaja modifikacije), određivanje mutacija, te provjeru strukture, čistoće, stabilnosti i konformacijskih promjena.^{25,26,30-32}

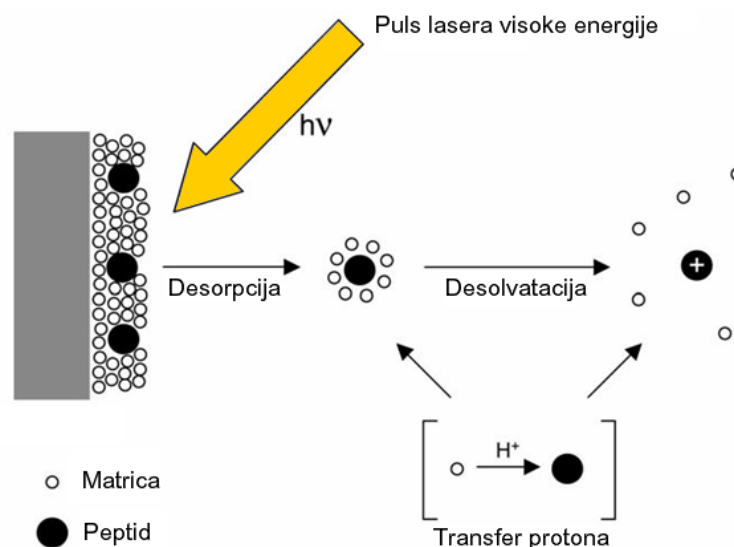
Analizi proteina tehnikama spektrometrije masa moguće je pristupiti na dva načina: odozgor nadolje (engl. *top-down*) i odozdol nagore (engl. *bottom-up*).^{25,33} Pristup odozgor nadolje podrazumijeva analizu proteina koji se u plinovito stanje u spektrometru masa prevodi intaktan, bez prethodne enzimske razgradnje.³³ Ovisno o korištenom spektrometru masa, tj. sposobnosti točnog mjerenja mase i postignutoj rezoluciji, moguće je odrediti točnu masu intaktnog proteina ili ga pocijepati tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS) upotrebom kolizijom aktivirane disocijacije (engl. *Collision Induced Dissociation*, CID) ili poslijeionizacijske disocijacije (engl. *Post Source Decay*, PSD).^{33,34} Kombinacijom izmjerenih masa nasumičnih peptidnih fragmenata dobivaju se podaci o građi proteina. Osnovna prednost ovog pristupa je određivanje gotovo cjelokupne primarne strukture proteina, kao i bolja detekcija posttranslacijskih modifikacija, dok nedostaci uključuju nedostupnost potrebne instrumentacije visokog razlučivanja, npr. spektrometra masa ionsko

ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju (engl. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*, FT ICR) koja je zbog kompleksnosti i visoke cijene relativno slabo zastupljena u znanosti i industriji.³³

Tradicionalni pristup identifikaciji proteina odozdol nagore omogućava detaljniju strukturnu analizu proteina. Temelji se na metodi otiska prsta (engl. *Peptide Mass Fingerprinting*, PMF), kao i tandemnim tehnikama spektrometrije masa (CID ili PSD).³⁴ Navedeni pristup uključuje enzimsku razgradnju proteina, najčešće tripsinom te točno mjerenje masa dobivenih triptičkih fragmenata. Peptidni fragmenti dobiveni enzimskom razgradnjom dodatno se cijepaju tandemnom spektrometrijom masa. Eksperimentalni podaci uspoređuju se s teorijskim izračunatim masama peptidnih fragmenata pohranjenim u bazama podataka pomoću specijaliziranih računalnih programa (MASCOT, Sequest, BlastP, Protein Prospector).^{35,36} Spektralne baze podataka (NCBI, Uniprot/Swiss-Prot, MSDB) sadrže teorijske mase dobivene prevođenjem slijeda nukleotida iz mRNA u slijed aminokiselina te proteolitičkom razgradnjom *in silico*.³⁵⁻³⁷ Točnost identifikacije povećava se dodatnim cijepanjem peptidnih fragmenata te kombiniranom pretragom baza podataka (spektar masa prvog stupnja analize-MS, i tandemni spektar-MS/MS). Ukoliko protein nije identificiran u bazi podataka, određivanje nedvojbenog slijeda aminokiselina neophodno je za daljnje biološke i biokemijske studije (sekvenciranje *de novo*).^{36,37}

2.1.2. Spektrometrija masa MALDI (MALDI-MS)

Tehniku ionizacije MALDI su krajem 20. stoljeća razvili Hillenkamp i Karas, a ionizaciju biomolekula usavršili su Tanaka i suradnici.³⁸ MALDI je pulsna ionizacijska tehnika u kojoj kratki intenzivni pulsevi laserske zrake pomoću matrice induciraju desorpciju i nastanak iona u plinovitom stanju (Slika 2) u vakuumu spektrometra masa.^{25,26,38} Smatra se „blagom“ ionizacijskom tehnikom koja omogućuje nastanak gotovo intaktnih, jednostruko nabijenih ionskih vrsta. Vrlo često koristi se u analizi molekula velike molekulske mase ($m/z > 1000$) poput peptida i proteina zbog jednostavnosti pripreme uzoraka, osjetljivosti i visokoprotočnosti analiza. Tehnika MALDI zahtijeva vrlo malo uzorka, što omogućuje detekciju iznimno malih količina pojedinog proteina ($n \geq \text{atomol}$).²⁵



Slika 2. Prikaz desorpcije i ionizacije molekula matrice i analita.²⁶

2.1.2.1. Uloga matrice

Matricu čine relativno jednostavne organske molekula koje sadrže kromofore visoke apsorpcijske sposobnosti. Matrica apsorbira energiju laserske zrake određene valne duljine (u UV-području) i prenosi ekscitacijsku energiju na molekule analita. Prije analize matrica se otapa u otapalu i miješa s uzorkom. Budući da su u smjesi molekule matrice u suvišku, navedene molekule smanjuju intermolekulske interakcije među molekulama analita. Aktivna uloga matrice je sublimacija molekula analita okruženih kristalima matrice, desorpcija i ionizacija fotoekscitacijom (fotoionizacijom) neovisno o apsorpcijskim karakteristikama i veličini molekula analita te u konačnici prijenos protona s matrice na molekule analita (ili obrnuto u slučaju negativne ionizacije).^{39,40} Klasifikacija MALDI-matrice koje se najčešće koriste temeljena je na razlikama u strukturi. Prvu skupinu čine derivati cimetne kiseline, poput α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline (CHCA) i sinapinske kiseline (SA), koji se koriste za ionizaciju peptida i proteina. Derivati aromatskih karbonilnih spojeva, poput 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline (DHB), salicilne kiseline ili antranilne kiseline, svrstani su u drugu skupinu matrica koje se većinom koriste za ionizaciju ugljikohidrata, organskih molekula ili polimera.^{25,39,40}

2.1.2.2. Priprava proteinskih uzoraka

Priprava uzoraka za analizu tehnikom MALDI-MS sastoji se od pročišćavanja proteina ili peptida, miješanja s odgovarajućom matricom te nanošenja na MALDI-pločicu (inertni nosač od nehrđajućeg čelika ili teflona). Ukoliko je polazni materijal prokariotski ili eukariotski biološki uzorak (stanice, tkivo, tjelesne tekućine i sl.), proteine ili peptide je od nepoželjnih organskih ili anorganskih onečišćenja moguće izolirati taloženjem, ekstrakcijom, kromatografski ili elektroforezom.⁴¹⁻⁴⁵ Taloženje acetonom, metanolom ili trikloroocetnom kiselinom učestali je postupak pročišćavanja biološkog materijala.⁴² Dodatkom otapala manje polarosti u otopljeni uzorak dolazi do smanjenja topljivosti proteina te denaturacije i agregiranja uslijed povećanih hidrofobnih interakcija, rezultirajući nastankom taloga. Centrifugiranjem se talog proteina odvaja od supernatanta koji sadrži ostatke soli, nukleinske kiseline i lipide te otapa u odgovarajućem puferu pogodnom za daljnu analizu. Nukleinske kiseline mogu ometati analizu proteinskih uzoraka jer koprecipitiraju s proteinima. Klasičan pristup uklanjanja nukleinskih kiselina obuhvaća jednu od metoda: dodatak restrikcijskih endonukleaza u uzorak, selektivnu precipitaciju nukleinskih kiselina kationima (npr. kalcijem) i precipitaciju trikloroocetnom kiselinom ili organskim otapalima.⁴⁴ Ukoliko taloženjem nisu u potpunosti uklonjene nukleinske kiseline, ekstrakcija smjesom kloroforma, fenola i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 25:24:1 omogućava efikasno uklanjanje DNA. Nakon ekstrakcije nukleinske kiseline su otopljene u vodenoj fazi (smjesa vode i alkohola), dok se proteini nalaze u sloju između organske i vodene faze.⁴²

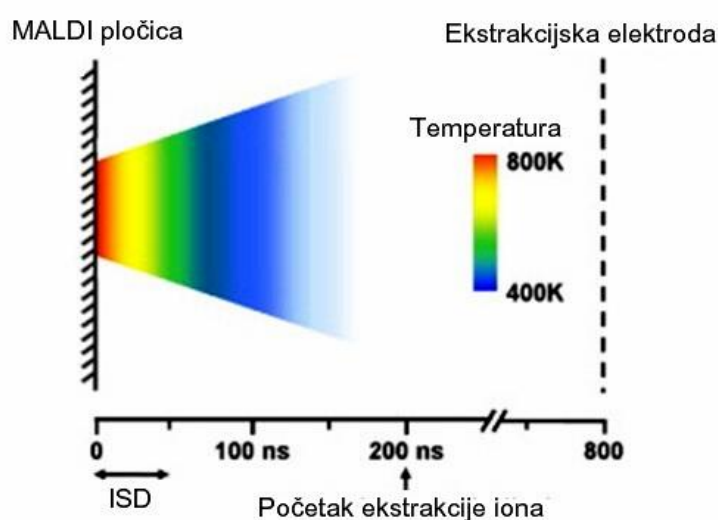
Osim neproteinskih bioloških molekula, uzorci peptida i proteina sadrže razna onečišćenja unesena tijekom pripreme uzorka. Navedena onečišćenja obuhvaćaju nehlapljive anorganske soli (npr. fosfate), kaotropne tvari (npr. urea, gvanidin hidroklorid) ili surfaktante (npr. natrijev dodecilsulfat, triton) koje je potrebno ukloniti prije analize spektrometrijom masa.⁴⁵ Uklanjanje soli, kao i razdvajanje peptidnih i proteinskih smjesa, moguće je postići primjenom tekućinske kromatografije obrnutih faza (razdvajanje na temelju hidrofobnosti), ionskom izmjenom (razdvajanje temeljeno na naboju ili izoelektričnoj točki, pI), afinitetnom kromatografijom (specifično vezanje proteina na kolonu s imobiliziranim protutijelima ili metalnim ionima) te kromatografskim razdvajanjem temeljenim na veličini molekula (gel-filtracija).^{25,46} Odabir prikladne tehnike tekućinske kromatografije ovisi o količini uzorka kojeg je potrebno pročistiti. Za manje količine uzorka, osim tekućinske kromatografije

ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) ili kapilarne tekućinske kromatografije, koriste se tehnike ZipTip (tehnika razdjelne kromatografije vezana uz kruti nosač nanesen u završetak pipete), ekstrakcija na čvrstoj fazi uz pomoć vakuumske crpke (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) ili ekstrakcija mikroekstrakcijskim kolonama koristeći centrifugalnu silu za propuštanje otopina kroz kolonu (engl. *spin tube*).⁴⁶⁻⁴⁸

Uz više vrsta separacijskih i purifikacijskih tehnika koje prethode konvencionalnoj tehnici MALDI-MS, vrlo važnu ulogu ima nanošenje pročišćenih proteina i peptida na metalnu MALDI-pločicu neposredno prije analize.³⁹ Najčešća tehnika nanošenja otopljenih proteina i peptida je tzv. suha kapljica, ujedno i najjednostavniji način pripreme uzorka. Postupak se sastoji od miješanja otopine matrice i analita, nanošenja određene količine na pločicu i sušenja smjese pri čemu dolazi do kristalizacije matrice i analita prije analize spektrometrijom masa.⁴⁹ Iako je MALDI ionizacijska tehnika pogodna za analizu proteina i peptida s određenim udjelom anorganskih onečišćenja (soli) u uzorku, poželjno je navedena onečišćenja ukloniti radi postizanja optimalne ionizacije molekula analita.⁵⁰ Ukoliko proteinski ili peptidni uzorak sadrži ione alkalijskih metala, učestala je pojava adukata analit-protona (npr. analita i Na^+ i/ili K^+) vidljivih u spektru masa. Ione metala moguće je naknadno ukloniti s pločice ispiranjem kristala hladnom vodom. Sušenje vakuumom je varijacija prethodno opisane metode u kojoj se smjesa matrice i analita na pločici suši u vakuumskoj komori.⁵¹ Odabir načina nanošenja i sušenja otopine proteina i peptida uvelike utječe na veličinu kristala povećavajući njihovu homogenost, što povoljno utječe na rezoluciju i točnost mjerenja mase. Sljedeća metoda koja se temelji na brzom isparavanju otapala uvedena je radi poboljšanja razlučivanja i točnosti mjerenja.⁵² Matrica se nanosi na pločicu te se nakon isparavanja otapala nanosi otopina uzorka. Nakon sušenja pristupa se analizi spektrometrijom masa. Ovakav postupak omogućava nastanak jednoličnog filma matrice koji se koristi kao podloga za nanošenje uzoraka koji nisu prethodno miješani s matricom. Jedna od često korištenih tehnika pripreme uzoraka je tzv. metoda sendvič.⁵³ Sastoji se od nanošenja otopine uzorka na osušeni sloj matrice, na koji se potom nanosi novi sloj otopine matrice.

2.1.2.3. Tehnika MALDI

Mehanizam ionizacije peptida tehnikom MALDI objašnjen je prijenosom protona s fotoioniziranih molekula matrice (Slika 3).²⁶ Iradijacijom laserom u UV-području zagrijava se matrica koja apsorbira energiju lasera u obliku topline. Tijekom desorpcije razara se kristalna rešetka koju čine molekule matrice i analita. Desorbirane molekule imaju karakterističan oblik perjanice koja se hladi i expandira u vakuumu izvora iona spektrometra masa i stabilizira na oko 400 K (Slika 3).⁵⁴ Na površini matrice dolazi do adijabatskog procesa u kojem molekule sublimiraju pod visokim tlakom. Temperatura sublimacije matrica je između 409 K i 455 K.⁵⁵ Prosječne brzine iona i neutralnih molekula su između 200 m s^{-1} i 1200 m s^{-1} ovisno o vrsti matrice i analita, naboju, duljini pulsa lasera, jačini laserske snage i pripremi uzorka.⁵⁵

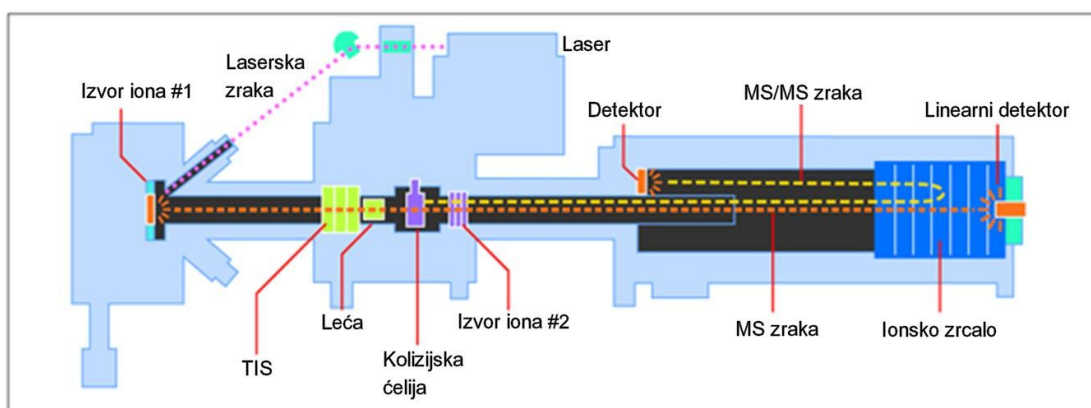


Slika 3. MALDI perjanica.⁵⁴

MALDI je tehnika kojom nastaju uglavnom jednostruko nabijeni ioni. Nastanak jednostruko i višestruko nabijenih klustera fotoionizacijom i fotokemijskim procesima temeljni su ionizacijski procesi koji se odvijaju istovremeno u izvoru iona.⁵⁴ Nastanak slobodnih elektrona i njihov gubitak u vakuumu rezultira nastankom pozitivno nabijenih iona u neutralnoj perjanici što povećava ukupno iskorištenje ionizacije. Uz negativnu ionizaciju elektroni i višak protoniranih iona matrice induciraju neutralizaciju iona u perjanici. Ovakvi procesi vrlo su efikasni kod neutralizacije višestruko nabijenih klustera iona.⁵⁵

Budući da je MALDI pulsna tehnika, najčešće se povezuje s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time of Flight*, TOF), analizatorom kvadrupol-TOF (engl. *Quadrupole-Time of Flight*, Q-TOF) ili analizatorima TOF/TOF omogućavajući razdvajanje iona u analizatoru (tzv. prostorno razdvajanje iona). Također je moguće povezivanje s analizatorima koji skladište ione, primjerice ionska stupica (engl. *Ion Trap*, IT) i analizator FT ICR (spektrometrija masa u vremenu).²⁶

Schema spektrometra masa MALDI-TOF/TOF prikazana je na Slici 4.⁵⁶ Sastoji se od izvora ionizacije MALDI (izvor iona #1), analizatora vremena leta (TOF) te dva detektora (linearnog i detektora koji bilježi ione nakon odbijanja od ionskog zrcala) koji su u uvjetima vakuumu.



Slika 4. Shematski prikaz MALDI-TOF/TOF spektrometra masa.⁵⁶

Ioni nastaju i raspršuju se u izvoru iona spektrometra masa. Nakon vrlo kratkog vremena, ioni se istovremeno ekstrahiraju u analizator masa pulsnim naponom. Princip rada analizatora masa TOF temelji se na ubrzanju iona odgovarajućim potencijalom (pulsno električno polje), pri čemu ioni dobivaju kinetičku energiju. Budući da su svi ioni ubrzani istim potencijalom, ioni istog naboja različite mase putuju različitim brzinama (manji ioni putuju većom, a veći manjom brzinom). Omjer mase i naboja određuje se mjerenjem vremena potrebnog za prolazak kroz regiju između izvora iona i detektora. Vrijeme leta iona od ulaska u analizator do detektora je 5 μs do 100 μs .²⁵

Spektrometar masa MALDI-TOF/TOF sadrži kolizijsku ćeliju između dva analizatora, čime je omogućena tandemna analiza. U prvom stupnju analize (MS) kolizijska ćelija se ne koristi te ioni nesmetano prolaze kroz ćeliju. Tijekom tandemne analize, TIS (engl. *Timed Ion*

Selector) omogućava odabir iona uskog raspona masa prije ulaska u kolizijsku ćeliju, koji se potom cijepaju u samoj ćeliji.

Faktori o kojima ovisi raspodjela u vremenu leta između iona s istim omjerom mase i naboja utječu na smanjenje razlučivanja.²⁴ Dva su načina ujednačavanja vremenske (određene vremenom nastanka iona), mjesne (određene mjestom nastanka iona) te kinetičke (određene energijom nastanka iona) raspodjele iona. Široku raspodjelu uslijed razlika u mjestu i vremenu nastanka iona moguće je izbjeći uvođenjem odgođene ekstrakcije iona, dok se upotrebom ionskog zrcala, tzv. reflektiona, smanjuju varijacije u raspodjeli kinetičke energije. Ionsko zrcalo stvara polje koje odbija ione prema detektoru. Ioni veće energije dublje prodiru u polje prije reflektiranja. Produljenje puta omogućava ionima istog omjera mase i naboja, a različite energije da stignu na detektor istovremeno.⁵⁷

2.2. Sekvenciranje peptida spektrometrijom masa

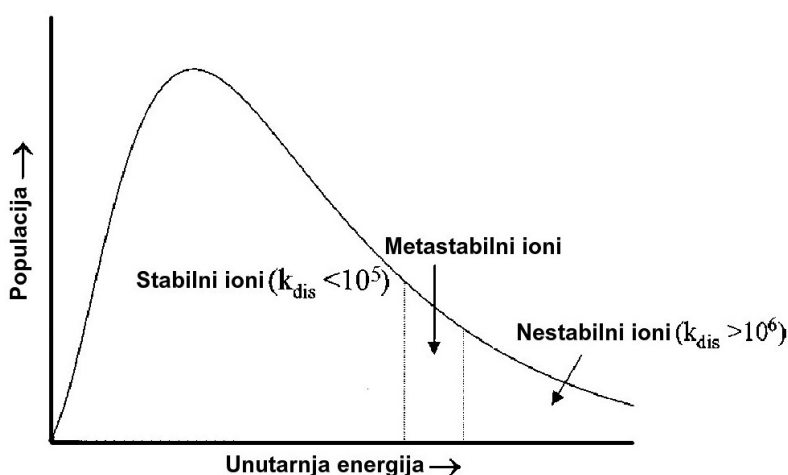
Preduvjet za određivanje slijeda aminokiselina spektrometrijom masa je generiranje jedne serije uzastopnih iona fragmenata ili kombinacije više serija iona (a-, b-, c- i x-, y-, z- serije) u svrhu pokrivenosti cijelog slijeda aminokiselina.⁵⁸ Da bi određivanje cjelokupnog slijeda aminokiselina bilo točno, pouzdano i olakšano, potrebno je postići gotovo idealne uvjete fragmentacije. Idealna fragmentacija peptidnih iona uključuje kidanje veza isključivo peptidne okosnice. Fragmentacijski profil treba olakšavati interpretaciju spektra masa. Brzina fragmentacije treba biti brža od intramolekulske pregradnje jer u protivnom ioni fragmenata neće odgovarati stvarnoj strukturi. Labilne veze moraju ostati intaktne radi utvrđivanja njihovog položaja u molekuli. Intenziteti iona fragmenata moraju biti reproducibilni i karakteristični za određenu strukturu i molekularni sastav.⁵⁹ U praksi vrsta iona fragmenata ovisi o mnogobrojnim faktorima, poput aminokiselinskog slijeda, veličine fragmenta, količine unutarnje energije, naboja iona, posttranslacijskim modifikacijama, koji mogu uvelike otežavati analizu.⁶⁰ Navedeni faktori biti će detaljnije opisani u daljnjem tekstu.

2.2.1. Fragmentacija peptidnih iona

2.2.1.1. Utjecaj unutarnje energije na fragmentaciju peptidnih iona

Sadržaj unutarnje energije formiranog iona generiran je iz dva izvora: unutarnje (toplinske) energije molekule prije ionizacije i energije koju ion dobije ionizacijom.²⁴ Unutarnja energija vrlo je važan čimbenik kod ionizacije nestabilnih molekula koje lako degradiraju ili ukoliko se radi o molekulama veće mase (1000 Da na više), jer doprinos unutarnje energije znatno nadilazi energiju primljenu ionizacijom. U takvim slučajevima formirani ion moguće je detektirati jedino ako je unutarnja energija vrlo niska (ionizacija niske energije u rasponu od 5 eV do 20 eV ili spektri niske temperature). Pojmovi laka i teška ionizacija proizlaze iz sadržaja unutarnje energije. Teška ionizacija (npr. 70 eV) odnosi se na tehnike ionizacije u kojoj nastaju ioni visoke unutarnje energije. Kao posljedica količine energije, u spektru masa vidljivi su intenzivni ioni nastali fragmentacijom, dok je intaktni (molekulski) ion malog relativnog intenziteta. Laka ionizacija (npr. 12 eV) ukazuje na suprotno: intaktni ion je najvećeg, dok su ioni nastali fragmentacijom intaktnog iona vrlo malog relativnog intenziteta.^{57,61}

Ovisno o unutarnjoj energiji iona i konstanti disocijacije (Slika 5), fragmentacija iona u spektrometru masa MALDI tijekom desorpcije i ionizacije moguća je neposredno nakon iradijacije laserom u izvoru iona, a prije ekstrakcije iona (engl. *In-Source Decay*, ISD) ili poslije ekstrakcije.²⁴ Ioni s konstantom disocijacije $k_{\text{dis}} < 10^5 \text{ s}^{-1}$ ostaju intaktni, dok se ioni s konstantom disocijacije $k_{\text{dis}} < 10^6 \text{ s}^{-1}$ fragmentiraju u izvoru iona spektrometra masa. Fragmente nastale prije ekstrakcije moguće je detektirati i u linearnom načinu rada spektrometra masa, dok su ioni nastali nakon ekstrakcije vidljivi isključivo uz korištenje ionskog zrcala ili u načinu rada PSD smanjujući napon ionskog zrcala.²⁴ Spontanom fragmentacijom uslijed dovoljne količine unutarnje energije u regiji između izvora iona i analizatora nastaju metastabilni ioni s konstantom disocijacije $10^6 \text{ s}^{-1} > k_{\text{dis}} > 10^5 \text{ s}^{-1}$. U spektru masa moguće ih je prepoznati kao proširene signale iona smanjenog razlučivanja. Kinetička energija metastabilnih iona oslobođena tijekom fragmentacije dovodi do disperzije brzine iona, što se odražava na razlučivanje.²⁴



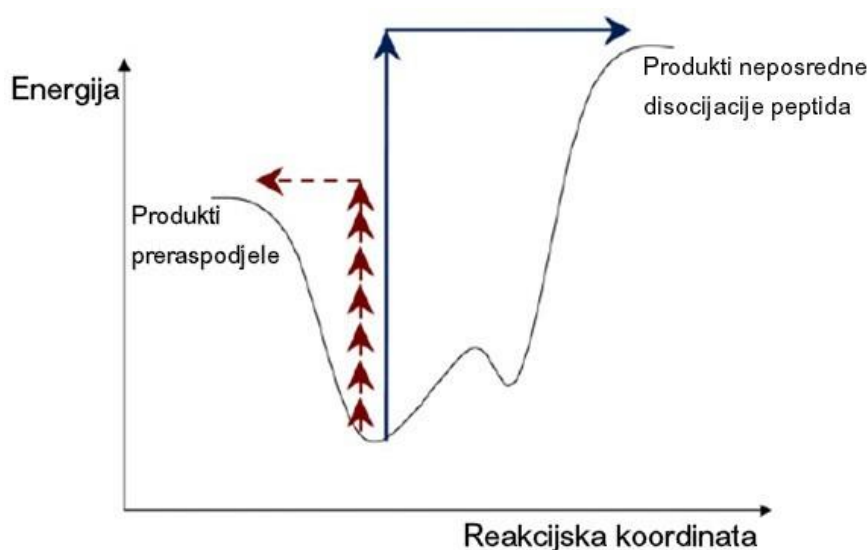
Slika 5. Hipotetska distribucija unutarnje energije iona nastalih u pulsnom spektrometru masa.²⁴

2.2.1.2. Aktivacijski procesi

Budući da fragmentacija iona prije i nakon ekstrakcije najčešće nije dostatna za određivanje cjelokupnog slijeda aminokiselina, potrebna je sekundarna ekscitacija kojom se povećava unutarnja energija iona prekursora. Aktivacijski procesi osim PSD i ISD obuhvaćaju i CID, disocijaciju prijenosom ili zahvatom elektrona (engl. *Electron Transfer Dissociation/ Electron Capture Dissociation*, ETD/ECD), disocijaciju zračenjem crnog tijela (engl. *Blackbody Infrared Radiative Dissociation*, BIRD), i multifotonsku infracrvenu disocijaciju (engl. *Infrared Multiphoton Dissociation*, IRMPD).²⁴ Većina fragmentacijskih tehnika, poput CID, bazirane su na ekscitaciji vibracijskih energetske nivoa. Vibracijska ekscitacija raspodjeljuje se po slobodnim stupnjevima slobode. Fragmentacija ovisi o ukupnoj količini dovedene energije, a ne o načinu raspodjele.⁵⁹

CID je konvencionalna aktivacijska tehnika koja se koristi za fragmentaciju tandemnom spektrometrijom masa.²⁴ Kolizija iona prekursora odabrane mase s česticama inertnog plina (najčešće dušika ili helija) odvija se u kolizijskoj ćeliji spektrometra masa. Ovisno o vrsti ionizacije, ioni imaju određenu količinu unutarnje energije. Uslijed neelastične kolizije s česticama visoke translacijske energije povećava se unutarnja energija iona te dolazi do disocijacije, tj. nastanka iona fragmenata (Slika 6).³³ Fragmentacija iona prekursora može se dogoditi samo ako je kolizijska energija dovoljna da pobudi ion iznad granice disocijacije (tzv. kinetički pomak). Što je kraće vrijeme potrebno za aktivaciju, potreban je povećani

kinetički pomak za disocijaciju. Ioni prekursori, ovisno o strukturi i unutarnjoj energiji, fragmentiraju se kompetitivnim reakcijama.⁵⁹ Fragmentacijom peptidnih iona mogu nastati produkti preraspodjele i direktnog kidanja veza peptidne okosnice.³³ O konstantama reakcije ovisi koji će ioni fragmenti nastati (m/z), kao i u kojoj količini (intenzitet signala iona). Ako fragmentacijom dolazi do pucanja samo jedne veze, to će biti ona najmanje energije veze, neovisno o položaju i važnosti za određivanje strukture.³³



Slika 6. Razlike u fragmentacijskom putu ovisno o vrsti aktivacije.³³

Kolizijom inducirana disocijacija ovisna je o masi čestica koje se sudaraju. Proces kolizijom inducirane disocijacije odvija se u dva vremenski odvojena koraka koje čine ekscitacija prekursora te unimolekularna disocijacija:

pri čemu je m_p^+ ion prekursor, N neutralna molekula inertnog plina, $m_p^{+\neq}$ aktivirani ion u prijelaznom stanju, m_f^+ ion fragment, a m_n neutralna molekula. Vrijeme aktivacije iona kraće je od vremena disocijacije aktiviranog kompleksa. Prijenos energije tijekom kolizijske aktivacije i oslobađanje kinetičke energije tijekom procesa disocijacije aktiviranih iona odvijaju se uz očuvanje momenta sile i energije.²⁴

Ovisno o konstrukciji i vrsti instrumenata, a bazirano na translacijskoj energiji iona prekursora, CID je moguće kategorizirati u koliziju niske i visoke energije.²⁴ Razlika u

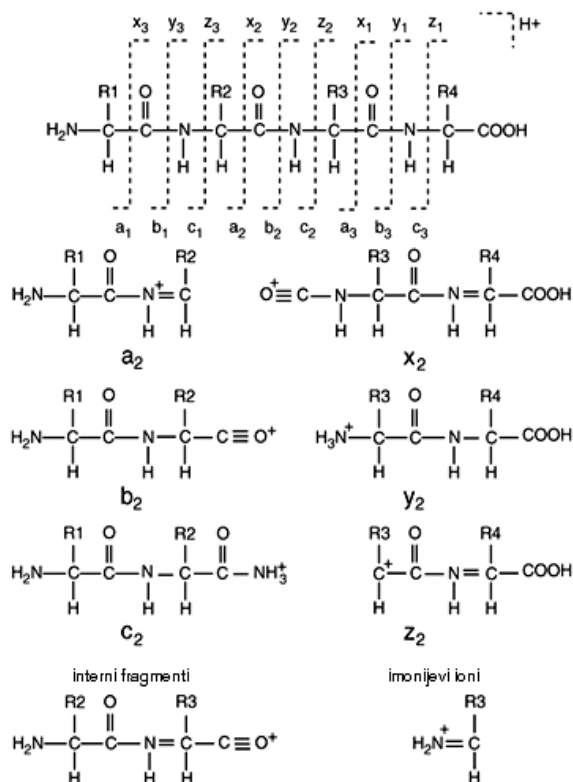
kolizijskim energijama rezultira razlikom u izgledu tandemnih spektara masa. Kolizija niske energije proces je karakterističan za spektrometre masa koji sadrže kvadrupol ili ionsku stupicu, a odvija se u rasponu od 1 eV do 100 eV. Kolizija se kod instrumenata s trostrukim kvadrupolom odvija u drugom kvadrupolu u ćeliji koja je ispunjena inernim plinom (dušikom ili argonom). Aktivacija je postignuta višestrukim kolizijama. U ovom slučaju tlak plina ima značajnu ulogu, jer porastom tlaka raste vjerojatnost sudara pojedinog iona s molekulama plina. Ioni produkti nastaju disocijacijom iona prekursora te se dodatno aktiviraju i disociraju:

pri čemu je m_p^+ ion produkt, N neutralna molekula inertnog plina, m_f ion fragment, a m_p^{+*} aktivirani ion. Masa neutralne čestice ima važnu ulogu u CID-u niske energije, jer je veći prijenos energije ukoliko je masa čestice veća. Iako je u ovakvom načinu kolizije kolizijska energija znatno niža od kolizije visoke energije, prinos iona produkata je velik radi višestrukih kolizija. U hibridnim spektrometrima masa koji sadrže kvadrupol i ionsku stupicu, kao i spektrometru masa FT ICR, izolacija iona i ekscitacija odvijaju se na istom mjestu (stupica u elektromagnetskom polju). Ioni se ekscitiraju uvođenjem napona na rubnim elektrodama u vremenu, pri čemu dolazi do fragmentacije i nastanka iona produkata. Kolizijska aktivacija u spektrometrima masa koji sadrže TOF, kao i onima sa sektorom (spektrometrija masa u prostoru), omogućena je sudarima iona prekursora visoke kinetičke energije i čestica inertnog plina (dušik ili helij) u kolizijskoj ćeliji. Kao što je navedeno, kolizijska ćelija obično se nalazi između dva analizatora masa. Ioni prekursori ulaze u kolizijsku ćeliju kinetičkom energijom od nekoliko keV, pri čemu dolazi do jednostrukog sudara, nakon čega se nastali ioni produkti razdvajaju u drugom analizatoru masa.²⁴

2.2.2. Nomenklatura fragmenata peptidnih iona

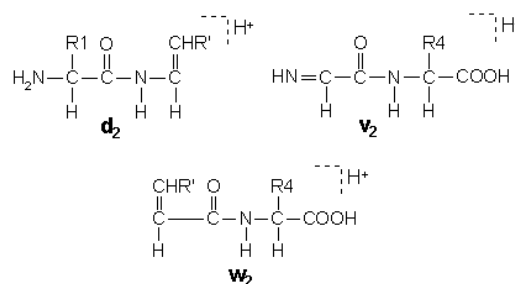
Nomenklaturu fragmenata peptidnih iona predložili su Roepstroff i Fohlman, a modificirao Biemann.⁵⁸ Serije iona razlikuju se po mjestu na kojem je lokaliziran naboj. Ukoliko naboj nakon fragmentacije ostaje na N-kraju, ioni produkti označavaju se oznakama a_n , b_n i c_n , a ako je naboj na C-kraju označavaju se kao x_n , y_n i z_n (n označava broj aminokiselina sadržanih

u ionu produktu). Strukture peptidnih iona produkata navedenih serija prikazane su na Slici 7. Susjedni ioni pojedine serije dobiveni tandemnom spektrometrijom masa predstavljaju ione produkte koji se međusobno razlikuju za masu određene aminokiseline te odgovaraju slijedu aminokiselina iona prekursora.



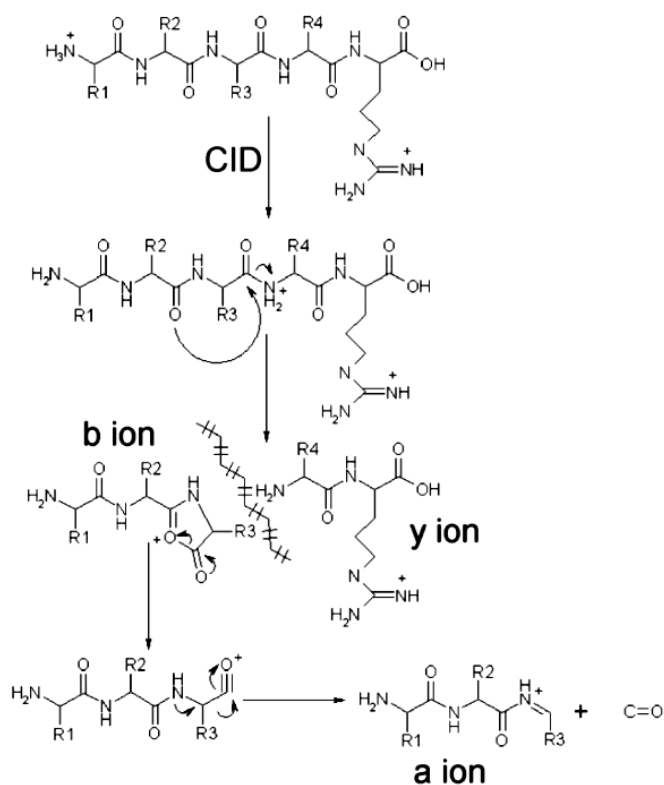
Slika 7. Nomenklatura peptidnih iona prekursora.⁶²

Dvostruko kidanje peptidne okosnice rezultira nastankom internih fragmenata. Empirijski je pokazano da interni fragmenti nastaju ako je u slijedu aminokiselina prisutan prolin ili aspartat.⁶¹ Interni fragmenti najčešće nastaju kombinacijom b- i y-serije iona pri čemu nastaje amino-acilijev ion. Osim navedenog, interni fragment može nastati kombinacijom a- i y-serije iona (amino-imonijev ion). Interni fragment nastao kombinacijom iona a- i y-serije koji sadrži samo jedan bočni lanac naziva se imonijev ion. Modifikacijama bočnog lanca aminokiseline nastaju satelitni ioni d- i w-serije (npr. leucin i izoleucin) te v-serije (Slika 8).⁶²

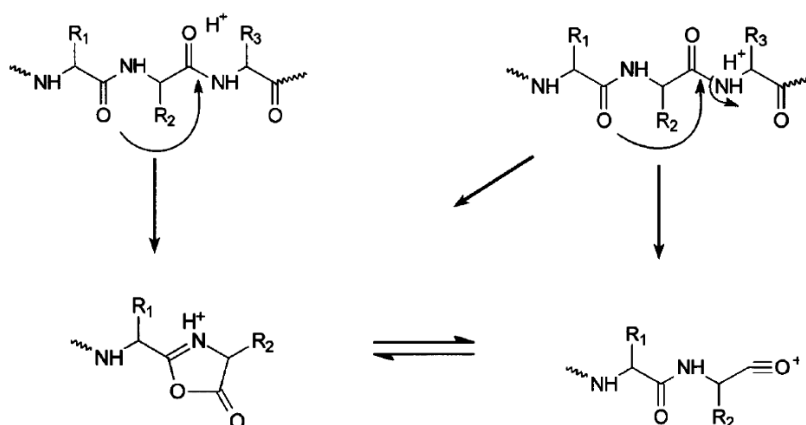
Slika 8. Strukture satelitnih iona.⁶²

2.2.3. Mehanizmi fragmentacije peptidnih iona

Kao što je navedeno, fragmentacija iona se odvija u izvoru iona, poslije ekstrakcije, kao i u kolizijskoj ćeliji. Postoje dva osnovna mehanizma koji opisuju fragmentaciju: termalno inducirani mehanizam koji pogoduje nastanku iona a-, b- i y-serije (Slike 9 i 10) te mehanizam induciran radikalima koji vodi nastanku iona c-, z-, w- i d-serije (Slika 11).⁶³

Slika 9. Mehanizam nastanka iona a-, b- i y-serije.³⁴

Protonacijom peptida u izvoru iona spektrometra masa nastaje populacija različito protoniranih peptidnih iona (N-kraj, karbonilna ili amino-skupina peptidne veze, bočni ogranci aminokiselina). Udio pojedinih populacija iona ovisi o njihovoj unutarnjoj energiji. Istraživanja su pokazala ovisnost intenziteta iona fragmenata o kolizijskoj energiji. Također je utvrđena korelacija između bazičnosti bočnog lanca aminokiselina i kolizijske energije potrebne za disocijaciju, što ukazuje da je kidanje veze tijekom fragmentacije ovisno o mjestu protonacije.⁶¹ Energija disocijacije najveća je kod peptida koji sadrže specifične bočne ogranke sljedećim redoslijedom: arginin > lizin > nebazične aminokiseline.⁶⁰ Dodatak energije u sustav (aktivacija u eksperimentima tandemne spektrometrije masa) povećava populaciju protoniranih ionskih vrsta mobilizirajući proton s bazičnog bočnog ogranka aminokiseline na peptidnu okosnicu. Energija potrebna za mobilizaciju protona s bočnog ogranka aminokiseline ovisi o primarnoj strukturi peptidnog iona. Lokalizacija protona na peptidnu okosnicu može biti dvojaka: protonacija karbonilnog kisika ili amidnog dušika peptidne veze. Protonacijom kisika dolazi do nukleofilnog napada kisika susjedne karbonilne skupine pri čemu nastaje protonirani oksazolon-ion b-serije (Slika 10). Protonacija dušika amidne veze manje je vjerojatna zbog manje bazičnosti u plinovitom stanju, ali produkt reakcije ostaje isti.⁶⁰



Slika 10. Mehanizmi nastanka iona b-serije.⁶⁰

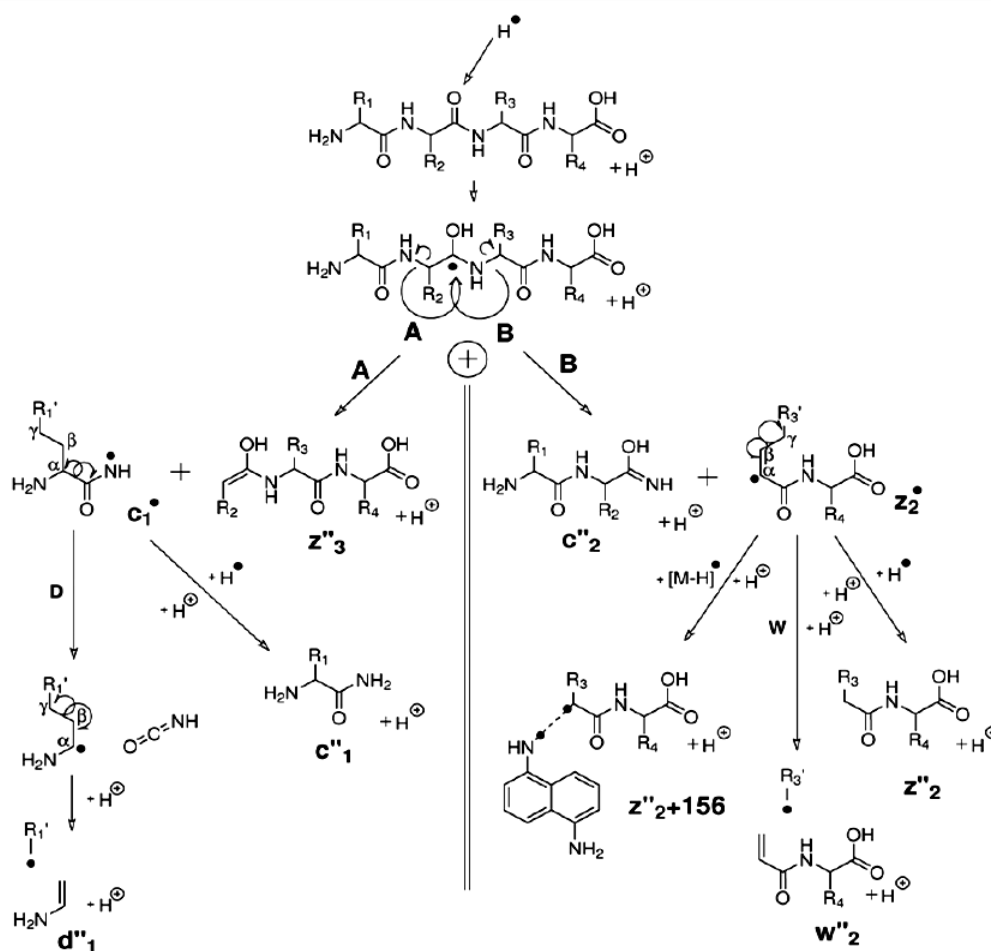
Intenziteti iona produkata y-serije najčešće su veći od komplementarnih iona b-serije, što je objašnjeno većom stabilnošću iona y-serije zbog lokalizacije protona na bazičnoj strani peptida (N-kraj). Ioni b-serije nemaju favorizirano mjesto protonacije te su podložni daljnjoj

fragmentaciji i preraspodjeli. Ako je kolizijska energija dovoljno visoka, ioni b-serije disociraju u ione a-serije uz otpuštanje ugljikovog monoksida.⁶⁰

Fragmentaciji pogoduju pojedine aminokiseline poput prolina, aspartata i glutamata (ako peptid sadrži arginin) te u blizini protoniranog histidina. Budući da je imidna veza prolina bazičnija od bilo koje amidne veze, prema teoriji mobilnog protona, dostupnost za vezanje protona je statistički veća za navedenu imidnu vezu, što utječe na bolju fragmentaciju upravo na tome mjestu. Slično je i s aspartatom i glutamatom, koji utječu na bazičnost iona u plinovitom stanju.⁶⁰

Za razliku od termalno induciranog mehanizma, mehanizam koji uključuje radikale temelji se na zahvatu slobodnih elektrona ili interakciji s radikalima.^{59,64,65} Učestala upotreba radikalskog mehanizma za disocijaciju proteinskih i peptidnih iona temelj je ionizacijskih tehnika spektrometrija masa ECD i ETD.^{64,65} Početni je korak nastanak hipervalentnog radikala ($\text{RNH}_3^{\cdot+}$) koji disocira u produkte RNH_2 i radikal vodikova atoma. Dodatak radikala vodikova atoma karbonilnoj skupini peptidne okosnice vodi nastanku homologne serije komplementarnih fragmenata iona c- i z-serije (Slika 11).⁵⁵ Kidanje veze inducirano je radikalskom kemijom. Tehnika ETD vrlo je slična tehnici ECD, ali se kao inicijatori fragmentacije koriste fenil-radikali ili radikali antracena.⁶⁶ ECD je tehnika primjenjiva u slučaju nastanka višestruko nabijenih iona, jer se jednostruko nabijeni kationi neutraliziraju te ih je kao takve nemoguće detektirati spektrometrijom masa. Višak elektrona neutralizira se autoemisijom ili vezanjem na kation.⁵⁹

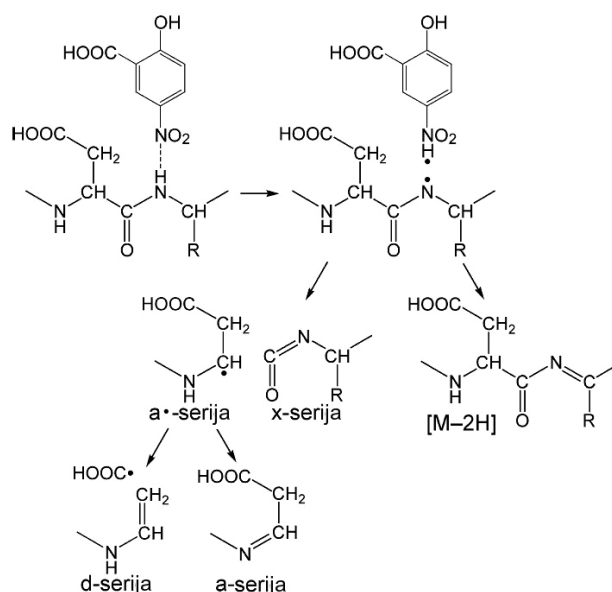
Osim kod ionizacije ECD, fragmentacijski radikalski mehanizam opisan je i kod tehnike fragmentacije proteina i peptida MALDI-MSD. Koristeći MALDI-MSD, omogućen je prijenosom radikala vodikova atoma s pobuđene molekule reducirajuće matrice na karbonilni kisik peptidne okosnice (Slika 11). Slijedi radikalom inducirano kidanje veze NH-C_α (put A, Slika 11), pri čemu nastaju radikali serije c ($\text{c}^{\cdot+}$), kao i ioni d- i z-serije.⁵⁵ Ako pak dođe do kidanja veze NH-C_α s C-kraja peptidnog iona, nastaju ioni fragmenti c-, z- i w-serije. Radikali z-serije ($\text{z}^{\cdot+}$) u plinovitom stanju gube ili primaju radikal vodikova atoma te reagiraju s radikalima matrice (npr. DHB), pri čemu nastaju ioni z- i w-serije ili adukti navedenih serija iona s matricom (put B, Slika 11).⁵⁵



Slika 11. Nastanak različitih vrsta iona produkata radikalskim mehanizmom.⁵⁵

Uočeno je da upotrebom oksidirajućih molekula matrice (npr. 5-nitrosalicilne kiseline) nastaju ioni a- i x-serije, pri čemu dolazi i do oksidacije peptidnog iona $[M-2H+H]^+$. Nastanak peptidnog iona s manjkom vodika objašnjen je oduzimanjem vodikova atoma s radikala peptida $[M-H]^•$ koji sadrži slobodni elektron na dušiku amidne veze uz kidanje veze C_α-C (Slika 12). U navedenoj reakciji nastaje radikal a-serije (a[•]) koji disocira na ione a- i d-serije uz gubitak karboksil-radikala ($\cdot\text{COOH}$). Gubitak vodikova atoma te karboksil-radikala događa se kompetitivno u perjanici izvora iona spektrometra masa MALDI ovisno o korištenoj matrici.⁶⁵

Kod peptida koji sadrže prolin (Xxx-Pro), oduzimanjem protona nastaju radikali b-serije (b[•]) i ioni y-serije. Gubitkom formil-radikala ($\cdot\text{CHO}$), iz radikala b-serije (b[•]) nastaju ioni a- i b-serije. Mehanizam radikalske fragmentacije neovisan je o procesu ionizacije te se može primijeniti i na deprotonirane peptide uslijed negativne ionizacije.⁶⁵



Slika 12. Fragmentacija peptida koji sadrži slobodni elektron (radikalno mjesto) na dušiku amidne veze.⁶⁵

2.3. Načini poboljšanja fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF

Tijekom desorpcije i ionizacije ili aktivacije kolizijom protoniraju se amino-skupine peptidnih veza duž cijele okosnice dajući različite ione produkte.⁶⁰ Ovisno o strukturi proteina, različiti peptidi pokazuju varijacije u načinu fragmentacije, producirajući složene spektre masa. Pristup analize odozdol nagore uključuje enzimsko cijepanje proteina tripsinom pri čemu nastaju peptidi koji na C-kraju sadrže lizin ili arginin.^{33,67} Pokazano je da fragmentacijom peptida koji sadrže arginin na C-kraju nastaju ioni fragmenti jačeg intenziteta nego oni koji sadrže C-terminalni lizin. Fragmentacijom triptičkih peptida koji sadrže C-terminalni lizin nastaju ioni produkti različitih serija, vrlo slabog intenziteta i nerijetko samo dijela serije, čime je određivanje cjelokupne primarne strukture peptida, a time i proteina, vrlo otežano ili čak onemogućeno.^{67,68} Radi olakšane interpretacije spektara masa poželjno je poboljšati efikasnost fragmentacije, kao i povećati intenzitet iona fragmenata. Poboljšana fragmentacija se postiže kemijskom modifikacijom peptida prije analize, kao i dodatkom pojedinih tvari (tzv. inicijatora fragmentacije) u smjesu uzorka i matrice tijekom pripreme uzoraka te varijacijom uvjeta analize.^{8,68}

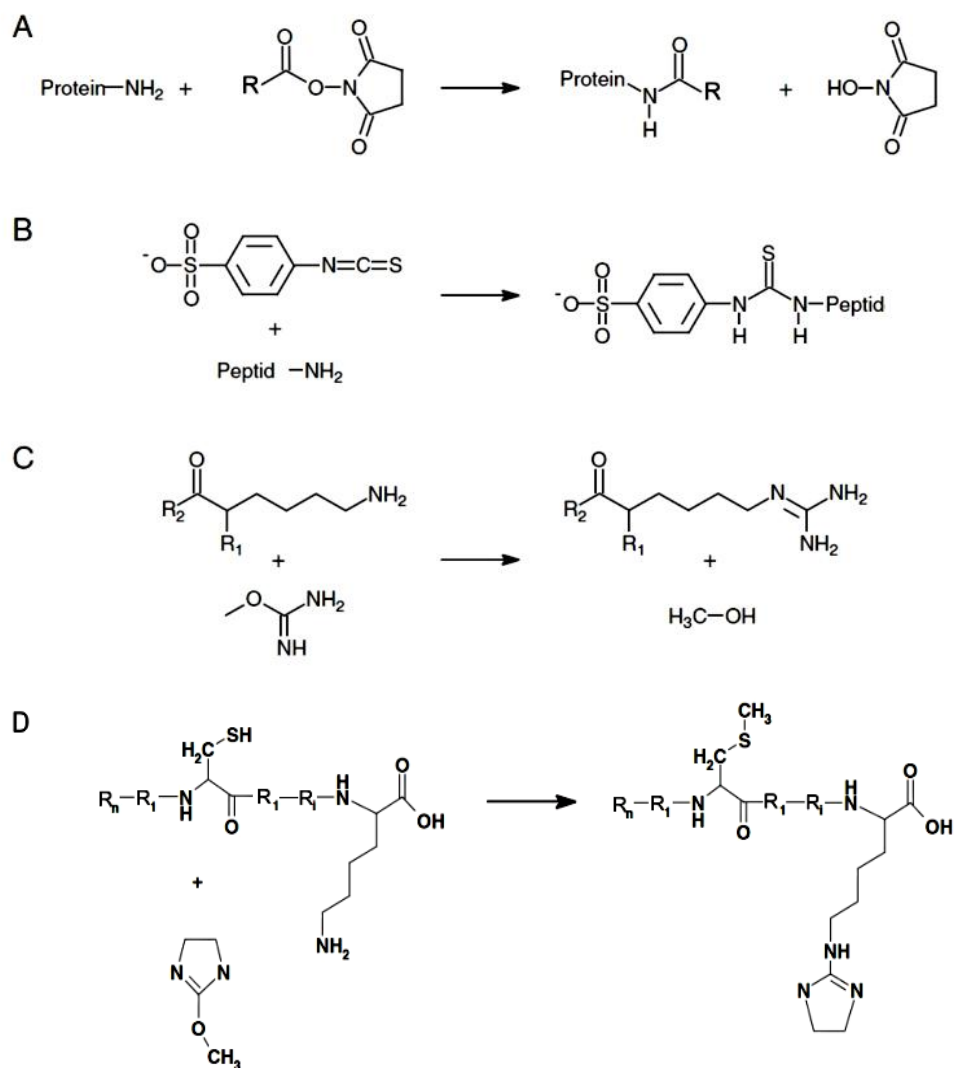
2.3.1. Kemijska modifikacija peptida

Redukcija složenosti spektara masa omogućena je primjenom kemijske modifikacije peptida. Kemijsku modifikaciju peptida moguće je provesti samo ako peptid sadrži aminokiseline koje se mogu kemijski obilježiti. Obilježavanje peptida kovalentno vezanim skupinama utječe na bazičnost peptida, pri čemu se povećavaju unutarnja i kolizijska energija potrebna za fragmentaciju.⁶⁹ Time je omogućena bolja ionizacija i fragmentacija, uz nastanak gotovo isključivo (ili pretežno) jedne serije fragmentnih iona sa C-kraja ili N-kraja peptidnog iona. Nastanak jedne serije iona olakšava sekvenciranje *de novo* te smanjuje vrijeme pretraživanja baza podataka, a time i ubrzava vrijeme identifikacije proteina.^{68,69} Iako je opisana primjena reagensa s različitim funkcionalnim skupinama (npr. kvarterna amonijeva skupina, acetilirana sulfohidrilna skupina, fosfonij-acetilna skupina, klorosulfonilna skupina i sl.) za kemijsku modifikaciju peptida, samo ih se nekoliko učestalo koristi za poboljšanje fragmentacije i intenziteta signala. Najčešće korišteni reagensi za obilježavanje peptida vežu se na amino-skupinu lizina ili N-kraja peptida, a uključuju sulfoniranje, gvanidinaciju lizina ili vezanje 2-metoksi-4,5-dihidro-1*H*-imidazola (*Lys-tag*; Slika 13).^{47,68,70}

Reagensi koji se najčešće koriste za sulfoniranje su 2-sulfobenzojeva kiselina, sulfo-NHS esteri (*N*-hidroksi-sukcinimid, NHS; CAF) i 4-sulfofenilizotiocijanat (SPITC). Derivati sulfonske kiseline koriste se za sekvenciranje peptida velike mase, kao i za identifikaciju subpikomolarnih količina proteina u proteomskim istraživanjima.⁶⁸⁻⁷⁰ *N*-hidroksi-sukcinimid (NHS-estri) najčešće su upotrebljavane amino-reaktivne tvari koje se koriste u većini obilježavajućih reagensa, uključujući komercijalno dostupne reagense Ettan CAF[®], iTRAQ[®] i DIGE. Budući da su mnogi NHS-estri netopljivi u vodenim otopinama, za kemijsko obilježavanje koriste se sulfo-NHS-estri topljivi u vodi koji imaju sličnu specifičnost i reaktivnost. Reakcija vezanja amina kompetitivna je hidrolizi NHS-estera u vodenj otopini, posebice pri bazičnim uvjetima. Zbog konstante ravnoteže najčešće se provodi pri pH 7 do pH 9. Valja napomenuti da je *pKa* vrijednost ϵ -amino-skupine lizina oko 11, dok je pH *N*-terminalne amino-skupine vrlo često oko 8. Upotreba SPITC-a omogućava uvođenje negativnog naboja na *N*-kraj peptida.⁷⁰

Peptid kemijski obilježen derivatima sulfonske kiseline nakon ionizacije sadrži istovremeno pozitivan i negativan naboj. Nasumično mjesto protoniranja određuje mjesto prekida peptidne veze pri čemu nastaju ioni produkti *b*- (obilježeni) i *y*-serije (neobilježeni).

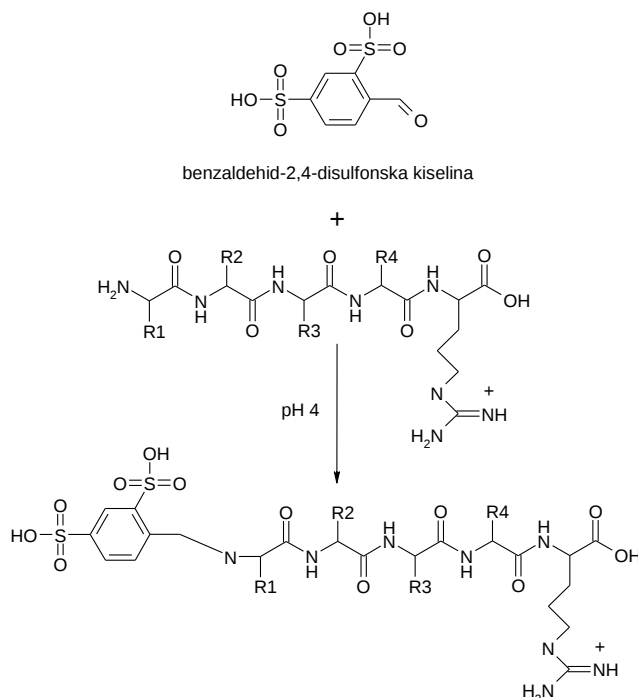
Budući da detekcija neutralnih iona nije moguća, u analizi tandemnom spektrometrijom masa u pozitivnom načinu rada neće biti vidljivi obilježeni ioni b-serije, već samo signali iona y-serije. Supresija iona jedne serije omogućava poboljšanu detekciju neobilježenih iona.⁷¹



Slika 13. Reakcijske sheme obilježavanja peptida. A- obilježavanje N-kraja *N*-hidroksisukcinimidom (NHS-esterima), B- reakcija sulfoniranja N-kraja 4-sulfofenilizotiocijanatom (SPITC), C- reakcija gvanidinacije lizina *O*-metilizoureom, D- obilježavanje lizina 2-metoksi-4,5-dihidro-1*H*-imidazolom (tzv. *Lys-tag*).⁷⁰

Sulfonacija je moguća i reagensima koji sadrže dvije sulfo-skupine. Jedan od takvih je benzaldehid-2,4-disulfonska kiselina, koja se pri kiselom pH selektivno veže na N-terminalnu amino-skupinu peptida (Slika 14). Osim što je izbjegnuta prethodna zaštita lizina gvanidinacijom, uvođenje dvije sulfo-skupine omogućavaju detekciju obilježenih iona

produkata b-serije tandemnom spektrometrijom masa uz negativnu ionizaciju, gdje su vidljivi samo obilježeni ioni produkti.⁷²



Slika 14. Reakcija sulfoniranja peptida benzaldehid-2,4-disulfonskom kiselinom.⁷²

Bazičnost lizina, a time i poboljšanu fragmentaciju peptidnih iona koji sadrže lizin, moguće je povećati gvanidinacijom *O*-metilizourea pri čemu nastaje homoarginin (Slika 14).⁷⁰ Osim *O*-metilizouree, za gvanidinaciju se koriste *S*-alkiltiourea, derivati pirazol-1-karboksamida i supstituirana metansulfonska kiselina. Reakcija gvanidinacije je specifična za amino-skupinu lizina, dok samo minimalno obuhvaća amin na N-kraju peptida. Gvanidinacija omogućava porast intenziteta obilježenog peptidnog iona, porast broja lizinskih fragmenata, kao i veću pokrivenost primarne strukture peptida ili proteina. Zbog selektivnosti reakcije, gvanidinacija najčešće prethodi sulfoniranju radi blokiranja amino-skupine lizina, što omogućava specifično vezanje sulfonirajućeg reagensa na N-kraj. Ovim međukorakom olakšava se sekvenciranje *de novo* manje zastupljenih triptičkih peptida.^{68,70,71} Važno je napomenuti da gvanidinacija u dvostupanjskoj reakciji obilježavanja peptida uzrokuje gubitak uzorka i osim ako nije neophodna u slučajevima sulfonacije lizina, preporuča se njezino izbjegavanje. Osim gvanidinacije, amino-skupinu lizina moguće je obilježiti 2-metoksi-4,5-dihidro-1*H*-imidazolom.⁴⁷ Sekundarni amini vezani na lizin klasificirani su u vrlo jake

neionske baze, osobito ako je naboj stabiliziran rezonancijom u prstenu. Bazičnost 2-metoksi-4,5-dihidro-1*H*-imidazola povezana je s porastom intenziteta signala obilježenog peptidnog iona u odnosu na neobilježeni. Ioni produkti obilježeni 2-metoksi-4,5-dihidro-1*H*-imidazolom daju isključivo ione y -serije, pojednostavljujući interpretaciju tandemnog spektra masa. Reakcija obilježavanja lizina može se provoditi u otopini, na mikroekstrakcijskoj koloni obrnutih faza namijenjenoj za pročišćavanje peptida centrifugiranjem ili punilu pakiranom u nastavak za pipete (ZipTip). Osim za poboljšanje fragmentacije, navedeni spoj je, u kombinaciji s obilježavanjem peptida stabilnim izotopnim oblikom koji sadrži deuterij umjesto vodika, moguće koristiti u diferencijalnim kvantitativnim analizama peptida i proteina.⁴⁷ Iako oba tipa reakcija obilježavanja lizina sulfonacijom (osim obilježivača koji sadrže dvije sulfo-skupine omogućavajući detekciju iona b -serije) i vezanjem 2-metoksi-4,5-dihidro-1*H*-imidazola daju ione y -serije, postoji razlika u mehanizmu fragmentacije. Sulfonacija inicira aktivaciju dodatnog mobilnog protona sa sulfo-skupine, dok 2-metoksi-4,5-dihidro-1*H*-imidazol lokalizira proton na dušik imidazolnog prstena.⁷³

Unatoč navedenim prednostima u detekciji obilježenih iona spektrometrijom masa, postoje i nedostaci kemijske modifikacije peptida. Osnovni nedostatak navedene metode je nemogućnost kemijske modifikacije svih peptida čija je fragmentacija otežana (npr. koji imaju modificiran N-kraj ili ne sadrže lizin na N-kraju). Nadalje, zbog dugotrajnosti postupka obilježavanja peptida (nekoliko sati ili preko noći), moguća je njihova degradacija. Također, reakcija obilježavanja može biti nepotpuna zbog lošeg iskorištenja, što povećava kompleksnost spektra masa.^{71,74} U reakciji obilježavanja lizina koriste se puferi koji sadrže nehlapljive soli te je peptide potrebno dodatno pročistiti prije analize spektrometrijom masa MALDI. Iako se mikroekstrakcijom postiže pročišćavanje i povećanje koncentracije peptida, gubitak peptida je neizbježan. Mala početna količina biološkog materijala također može predstavljati potencijalni problem (čak i femtomolarne količine) jer zbog gubitaka uslijed manipulacije uzorkom nije moguće detektirati obilježene peptide.⁷⁵

2.3.2. *Pristup koji ne uključuje kemijsku modifikaciju peptida*

Fragmenti peptidnih iona nastali u izvoru iona spektrometra masa MALDI sastavni su dio gotovo svakog spektra masa. Iako su nerijetko slabog intenziteta (često se ne mogu razlikovati od šuma), njihovom detekcijom moguće je dobiti djelomičnu ili potpunu pokrivenost

aminokiselinskog slijeda.⁸ Budući da fragmentacija u izvoru iona spektrometra masa MALDI ne ovisi o masi biomolekule, tehnika je primjenjiva za sekvenciranje većih peptida i intaktnih proteina.⁷⁶

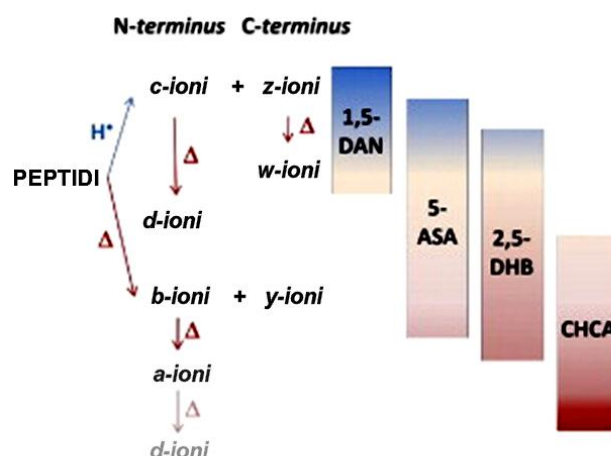
Fizikalno-kemijska svojstva peptida i proteina utječu na reaktivnost, tj. sklonost fragmentaciji tijekom procesa desorpcije i ionizacije. Desorpcijska sposobnost peptida uvelike ovisi o njegovom aminokiselinskom sastavu, koji značajnije pridonosi desorpciji od prosječne hidrofobnosti peptida. Nedostajanje pojedinog aminokiselinskog ostatka koji poboljšava desorpcijske sposobnosti može onemogućiti detekciju signala peptidnog iona, što znatno otežava samu analizu. Polarni peptidi pokazuju bolja fragmentacijska svojstva za razliku od kiselih i bazičnih.⁶⁰ Bazične aminokiseline poput arginina, lizina i histidina važne su za nastanak fragmenata u izvoru iona jer su najučestalije mjesto protonacije.⁸ Arginin neovisno o položaju povećava intenzitet signala.⁶⁴

Osim kemijskim obilježavanjem, intenzitet iona fragmenata moguće je povećati bez kemijskog obilježavanja. Prema literaturnim navodima, metode za poboljšanje fragmentacije peptida u izvoru iona spektrometra masa MALDI uključuju varijaciju/optimizaciju parametara analize (vrijeme zadržavanja u izvoru iona ili intenzitet lasera), ili su vezane uz kemizam matrice i molekula analita.⁸

Svojstvo spektrometra masa MALDI je mogućnost varijacije vremena zadržavanja iona u izvoru iona. Optimizacija vremena zadržavanja rezultira povećanjem broja detektiranih iona fragmenata, njihovih relativnih intenziteta i rezolucije. Vrijeme leta iona mijenja se linearno s ekstrakcijom. Ioni se zadržavaju i refokusiraju u izvoru iona kao funkcija omjera mase i naboja (m/z). Osim poboljšanja razlučivanja molekulskog iona, zadržavanjem iona u izvoru produljuje se vrijeme za fragmentaciju i povećava intenzitet iona fragmenata vidljivih na spektru masa. Odabir optimalnog vremena zadržavanja iona u izvoru iona ovisi o traženim masama iona fragmenata. Skraćeno vrijeme zadržavanja pogoduje detekciji iona manje mase, ali i detekciji iona matrice koji interferiraju sa signalima peptidnih iona.⁶⁸

Odabir matrice i njezina svojstva utječu na fragmentaciju peptida. Osim učinkovitije desorpcije i ionizacije analita, matrica olakšava prijenos energije i time inducira fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa. Za analizu peptida i proteina najčešće se upotrebljavaju matrice CHCA, DHB i SA, koje ovisno o svojstvima analiziranog peptida daju različite profile fragmentacije.⁸ Unatoč fragmentacijskim svojstvima peptidnih iona, matrica može uvelike utjecati na profil nastalih peptidnih fragmenata, iako nije pronađena korelacija

između pH vrijednosti smjese matrice i peptida, hidrofobnosti matrice ili afiniteta matrice za proton. Eksperimentalno je dokazano da polarni peptidi fragmentiraju jednako dobro u matricama CHCA i DHB, bazični u CHCA, a neutralni u DHB/DHA (2,6-dihidroksi-acetofenon).⁷⁰ Ovisno o korištenoj matrici, fragmentacijom iona u izvoru nastanka iona nastaju ioni a-, b- i y-serije, kao i ioni c- i z-serije (Slika 15). Matrice koje su bolji donori protona, poput 1,5-diaminonaftalena (1,5-DAN), 5-aminosalicilne kiseline (5-ASA) i 5-nitrosalicilne kiseline (5-NSA), pogoduju fragmentaciji radikalnim mehanizmom uz nastanak iona c-, z- i w-serije.^{63,77} Navedeni ioni produkti nastaju redukcijom iona prekursora radikalima vodikova atoma generiranog s matrice.⁷⁸ Fragmentacija uz oksidirajuću matricu poput 5-NSA omogućena je prijenosom protona s dušika amidne veze s peptidne okosnice na molekulu matrice, pri čemu nastaju ioni a- i x-serije.⁷⁷



Slika 15. Najčešće serije iona produkata nastalih u izvoru iona korištenjem matrica 1,5-diaminonaftalena (1,5-DAN), 5-aminosalicilne kiseline (5-ASA), 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline (2,5-DHB) i α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline (CHCA).⁶³

Uočeno je da ioni c-, z- i w-serije, osim upotrebom spomenutih matrica, mogu nastati i upotrebom matrice DHB. Matrica CHCA uglavnom pogoduje nastanku fragmentnih iona b- i y-serije. Kombinacijom matrica CHCA i DHB detektirane su promjene u strukturi bočnih lanaca aminokiselina tijekom fragmentacije u izvoru iona (gubitak metansulfonske kiseline s bočnog lanca oksidiranog metionina) te deglikozilacija.⁷⁹

Iako je tehnika MALDI otporna na malu količinu nečistoća u uzorku, dodatak soli, kiselina ili hlapljivih tvari u otopinu matrice može značajno utjecati na ionizaciju analita.

Osim što spomenute tvari mogu suprimirati ionizaciju ili dodatno onečistiti spektar masa, adukti analit-protuion (analit i iona metala Na^+ , K^+ ili Ag^+) mogu i povoljno utjecati na detekciju iona i osjetljivost.⁸ U analizi peptida i proteina posebno su značajne amonijeve soli poput amonijevog dihidrogenfosfata ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), amonijevog citrata ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$) i amonijevog sulfata ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) koje smanjuju količinu uzorka potrebnog za analizu tehnikom MALDI na razinu atomola, povećavaju osjetljivost te pospješuju fragmentaciju peptida.^{80,81} Dodatak amonijevog fosfata u koncentraciji od 1 do 50 mmol l^{-1} i amonijevog citrata u koncentraciji od 0,5 do 10 mmol l^{-1} otopini matrice ili uzorka smanjuju nastanak adukata peptidnih iona s matricom CHCA, povećavajući omjer signala i šuma.⁸⁰ Amonijeve soli (amonijev citrat i amonijev acetat) u ekvimolarnoj količini s matricom koriste se za poboljšavanje intenziteta signala fosfopeptida, čineći njihove signale najintenzivnijima u spektru masa.⁸² Dodatak veće količine amonijevog sulfata (3 mol l^{-1}) pospješuje fragmentaciju peptidnih iona u plinovitom stanju u izvoru iona spektrometra masa. Sulfatni ioni povećavaju površinsku napetost stupajući u interakcije s molekulama vode, pri čemu dolazi do precipitacije peptida. Peptidi su smanjeno solvatirani te ubrzano kristaliziraju s molekulama matrice. Iako utječe na kristalizaciju matrice, navedena sol olakšava ionizaciju, uzrokuje nastanak većeg broja fragmenata peptidnih iona i smanjuje nastanak adukata analit-protuion (npr. analita i Na^+) radi vezanja kationa na sulfatnu skupinu. Time se umanjuje vjerojatnost vezanja nepoželjnih anorganskih kontaminanata na peptidni ion.⁸ Povoljan utjecaj amonijevih soli na fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa ispitan je na modelu sintetskih peptida, kao i na biološkim uzorcima. No, uočena je nedostatna fragmentacija vezana uz duljinu peptida, različite vrste posttranslacijskih modifikacija i slijed aminokiselina.^{80,81,82}

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije i punila

3.1.1. Kemikalije

Aceton, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska), acetonitril, za LC (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska), amonijev hidrogenkarbonat, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska), amonijev persulfat, čistoće $\geq 98\%$ (APS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), azitromicin, čistoće 99,8 % (Pliva, Zagreb, Hrvatska), azobisisobutironitril, čistoće 98 % (AIBN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), benzofenon, čistoće 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), benzoil-peroksid, čistoće 75 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), cink (Kemika, Zagreb, Hrvatska), α -cijano-4-hidroksicimentna kiselina, čistoće 99 % (CHCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), kalijev dihidrogenfosfat, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska), klorovodična kiselina, min. 36,5 %, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska), natrijev cijanoborhidrid, za sintezu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), tiamin mononitrat, čistoće 99,5 % (Cedevita, Zagreb, Hrvatska), trifluoroctena kiselina, za spektroskopiju (TFA) (Merck, Darmstadt, Njemačka), 2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina, čistoće 95 % (TNBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), trifenilmetil-klorid, čistoće 97 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), urea peroksid, čistoće 97 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), vodikov peroksid, 30 %-tna otopina, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Derivati sulfonske kiseline

Za potrebe eksperimenata sintetizirana je grupa spojeva koji sadrže sulfo-skupinu:

- benzaldehid-2,4-disulfonska kiselina i benzaldehid-3,4-disulfonska kiselina (dr. sc. Zdenko Hemersak, Institut Ruđer Bošković)
- 3,5-di-*tert*-butil-benzensulfonil-klorid, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfon, 3,5-di-*tert*-butil-benzensulfonamid, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonska kiselina, (3,5-di-*tert*-butilfenil)-(4-*tert*-butilfenil)-sulfon, di-(4-*tert*-butilfenil)-sulfonamid, *p*-*tert*-butilbenzensulfonil-klorid, (4-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfon (Pliva Hrvatska d.d.)

3.1.3. Peptidi

ACTH fragment 18-39, 10 nmol/ vial (humani, *Agilent Technologies, Wilmington, DE, SAD*), apomioglobin, 10 nmol/ vial (*Agilent Technologies, Wilmington, DE, SAD*), daptomicin, čistoće 99,0 % (*Chengdu Kaijie Bio-Pharmaceuticals Co. Ltd., Shanghai, Kina*), ekstenatid, čistoće 99,5 % (*LGM Pharma, Mumbai, Indija*), enfuvirtid, čistoće 99,8 % (*Cubist Pharmaceuticals, Lexington, MA, SAD*), inzulin, 10 nmol/ vial (*Agilent Technologies, Wilmington, DE, SAD*), čimbenik rasta granulocitnih kolonija, *in bulk*, koncentracije 2,5 mg ml⁻¹ (*rHuG-CSF; filgrastim*) *Hospira, Zagreb, Hrvatska*), tripsin, pročišćen afinitetnom kromatografijom za sekvenciranje proteina (*Merck, Darmstadt, Njemačka*)

3.1.4. Pribor za pročišćavanje peptida

Membrane za dijalizu Microcon YM-10 (*Amicon, Millipore, Bedford, MA, SAD*), pipetni nastavci ZipTip C4 (butilsilicijev dioksid, *Millipore, Bedford, MA, SAD*)

3.1.5. Instrumenti i ostala oprema

Analitička vaga AT261 (*Mettler Toledo, Riessen, Njemačka*), centrifuga 5415R (*Eppendorf, Hamburg, Njemačka*), pH-metar SevenEasy (*Mettler Toledo, Riessen, Njemačka*), spektrometar masa 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (*Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD*), termomikser (*Eppendorf, Hamburg, Njemačka*), vakuum centrifuga Concentrator 5301 (*Eppendorf, Hamburg, Njemačka*)

3.2. Priprava otopina

3.2.1. Priprava MALDI-matrice

Matrica α -cijano-4-hidroksicimentna kiselina (CHCA) koncentracije 5 mg ml⁻¹ pripravljena je otapanjem u vodenoj otopini acetonitrila (1:1; v/v).

3.2.2. Priprava otopina za kalibraciju

Azitromicin i tiamin mononitrat pripremljeni su u koncentraciji 1 mg ml^{-1} u vodenoj otopini acetonitrila (1:1, v/v). Inzulin, ACTH fragment 18-39 i apomiglobin koncentracije $10 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ pripremljeni su otapanjem u vodi. Za kalibraciju spektrometra masa MALDI-TOF/TOF korištena je smjesa koja sadrži po $1 \text{ } \mu\text{l}$ otopine azitromicina i tiamin mononitrata pomiješanih s $8 \text{ } \mu\text{l}$ matrice CHCA, dok su peptidi ACTH, apomiglobin i inzulin pripremljeni miješanjem $1 \text{ } \mu\text{l}$ otopine peptida s $4 \text{ } \mu\text{l}$ matrice CHCA.

Za kalibraciju spektrometra masa MALDI-TOF/TOF korišteni su peptidi pripremljeni autolizom tripsina prema protokolu opisanom u odjeljku 3.3.1. *Autoliza tripsina*. U svrhu kalibracije spektrometra masa osušeni pročišćeni triptički peptidi otopljeni su u $5 \text{ } \mu\text{l}$ matrice CHCA.

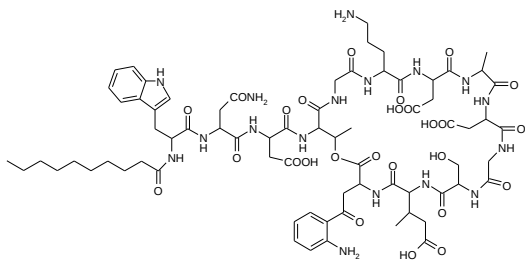
3.3. Priprava peptida za ispitivanje učinka poboljšanja fragmentacije

U istraživanju je korišteno šest modelnih peptida (Tablica 1): ACTH fragment 18-39 (dalje u tekstu ACTH), daptomicin, enfuvirtid, eksenatid, inzulin te čimbenik rasta granulocitnih kolonija (*rHuG-CSF*). Odabrani su peptidi sa širokim rasponom masa od $1,6 \text{ kDa}$ do $18,8 \text{ kDa}$. Ovisno o građi, odabrani peptidi mogu se svrstati u linearne i cikličke. Linearni peptidi su ACTH, enfuvirtid, eksenatid, *rHuG-CSF*, a ciklički je daptomicin. Dok peptid ACTH sadrži samo konvencionalne aminokiseline, ostatak korištenih peptida sadrži modificirane aminokiseline. Linearni peptidi korišteni u radu sadrže pojedine modifikacije na N-kraju (acetilacija kod eksenatida i enfuvirtida), C-kraj (amidacija kod eksenatida), intermolekulske disulfidne veze kojima su međusobno vezana dva peptidna lanca (inzulin) te intramolekulske disulfidne veze (*rHuG-CSF*). Iako ne spada u skupinu tzv. *head-to-tail* cikličkih peptida, daptomicin je ciklički lipopeptid građen od 10 cikliziranih aminokiselina te ostatkom od tri egzocikličke aminokiseline na čiji je N-kraj vezan lipid. Obzirom na izoelektričnu točku, analizirani peptidi su kiseli (pI 4-6).

Farmaceutski peptidi daptomicin, enfuvirtid, eksenatid (Tablica 1) pripremljeni su u koncentraciji 1 mg ml^{-1} otapanjem u vodi te dodatno razrijeđeni vodom do koncentracije $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$. Volumen od $10 \text{ } \mu\text{l}$ otopine pročišćen je tehnikom ZipTip (postupak opisan u

odjeljku 3.3.2. *Pročišćavanje peptida na koloni tehnikom ZipTip*). Nakon sušenja pročišćeni peptidi su otopljeni u 5 µl matrice CHCA.

Tablica 1. Peptidi korišteni za ispitivanje fragmentacije.

Peptid	Struktura/ Molekulska formula	Teorijska monoizotopna masa [M+H] ⁺
ACTH fragment 18- 39	$\text{NH}_2\text{---R P V K V Y P N G A E D E S A E A F P L E F---COOH}$ $\text{C}_{112}\text{H}_{165}\text{N}_{27}\text{O}_{36}$	2456,1989
Daptomicin	 $\text{C}_{72}\text{H}_{101}\text{N}_{17}\text{O}_{26}$	1620,7176
Enfuvirtid	 $\text{C}_{202}\text{H}_{298}\text{N}_{50}\text{O}_{64}$	4490,1939
Eksenatid	 $\text{C}_{184}\text{H}_{282}\text{N}_{50}\text{O}_{60}\text{S}$	4185,0346
Čimbenik rasta granulocitnih kolonija**	$\text{MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATYKLC HPEELVLLGHSLGIPW}$ $\text{APLSSCP SQALQLAGCLSQLSHGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLD VADFATTIW}$ $\text{QQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP}$ $\text{C}_{845}\text{H}_{1339}\text{N}_{223}\text{O}_{243}\text{S}_9$	18799,52*
Inzulin	$\text{NH}_2\text{---G I V E Q C C A S V C S L Y Q L E N Y C N---COOH}$ $\text{NH}_2\text{---F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V C G E R G F F Y T P K A---COOH}$ $\text{C}_{254}\text{H}_{378}\text{N}_{65}\text{O}_{75}\text{S}_6$	5730,6087

* prosječna masa

** plavo su označeni cisteini koji tvore disulfidne veze na položajima 36-42 i 64-74

Zbog zadovoljavajuće čistoće, peptidi ACTH i inzulin nisu dodatno pročišćavani prije analize. Pripravljani su u koncentraciji 100 nmol ml^{-1} otapanjem u vodi. Nakon dodatnog razrjeđivanja peptida vodom, $1 \text{ } \mu\text{l}$ otopine peptida pomiješan je s $9 \text{ } \mu\text{l}$ matrice CHCA.

Čimbenik rasta granulocitnih kolonija pripremljen je u koncentraciji 1 mg ml^{-1} (u $100 \text{ } \mu\text{l}$ otopine) otapanjem u vodi, odsoljen prema protokolu opisanom u odjeljku 3.3.3. *Pročišćavanje proteina na membranama Microcon* te dopunjen vodom na početni volumen. Volumen od $1 \text{ } \mu\text{l}$ otopine peptida pomiješan je s $9 \text{ } \mu\text{l}$ matrice CHCA.

3.3.1. Autoliza tripsina

Tripsin je endoproteinaza koja cijepa peptidnu vezu iza lizina ili arginina ukoliko nisu prethodeni prolinom, no u otopini tripsina također dolazi do autolize (tj. samorazgradnje) neovisno o prisutnosti drugih peptida ili proteina. Pripravljena je vodena otopina tripsina koncentracije 50 mg ml^{-1} . Za produkciju triptičkih peptida $1 \text{ } \mu\text{l}$ otopine tripsina pomiješan je s $50 \text{ } \mu\text{l}$ $50 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NH}_4\text{HCO}_3$ (pH 7,6) te je otopina inkubirana 18 sati na $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ na termomikseru. Dobiveni peptidni fragmenti pročišćeni su tehnikom ZipTip (opisanom u odjeljku 3.3.2. *Pročišćavanje peptida na koloni tehnikom ZipTip*) te osušeni koristeći vakuum centrifugu. Osušeni peptidi korišteni su za kalibraciju spektrometra masa MALDI-TOF/TOF ili kemijsko obilježavanje.

3.3.2. Pročišćavanje peptida na koloni tehnikom ZipTip

Za pročišćavanje peptida korišten je nastavak za pipete koji sadrži malu količinu punila - nepokretne faze širokih pora (npr. C4; butilsilicijev dioksid ili C18; oktadecilsilicijev dioksid) na koju se, prema uputama proizvođača, može vezati najviše $5 \text{ } \mu\text{g}$ peptida (ZipTip). Postupak pročišćavanja temelji se na principu tekućinske kromatografije obrnutih faza. Kolona se kondicionira nizom otapala rastuće polarnosti, nakon čega se na kolonu nanosi uzorak (vodena otopina peptida). Peptidi iz uzorka vežu se na čestice punila elektrostatskim interakcijama. Molekule soli koje se ne vežu na punilo ispiru se polarnim otapalom (vodenom otopinom TFA), dok se peptidi eluiraju otapalom manje polarnosti (vodenom otopinom acetonitrila).

Prije analize pipetni nastavak ZipTip C4 ispran je tri puta s 10 µl vodene otopine koja sadrži 80 % acetonitrila/ 0,1 % TFA (v/v), zatim s 10 µl vodene otopine koja sadrži 50 % acetonitrila/ 0,1 % TFA (v/v), te na kraju s 10 µl vodene otopine 0,1 % TFA. Nanošenje peptida vršeno je ispiranjem nastavka ZipTip s 10 µl otopine uzorka. Soli i ostala anorganska onečišćenja isprana su s 10 µl vodene otopine 0,1 % TFA ponavljanjem postupka ispiranja pet puta. Peptidi vezani na ZipTip eluirani su s 10 µl vodene otopine koja sadrži 80 % acetonitrila/ 0,1 % TFA (v/v). Eluat je osušen u vakuum centrifugi i tako svježe pripravljen korišten za daljnju analizu.

3.3.3. Pročišćavanje proteina na membranama Microcon YM-10

Membrane Microcon YM-10 omogućavaju propuštanje molekula mase manje od 10 kDa kroz pore pod utjecajem centrifugalne sile, dok se proteini veće mase zadržavaju na membrani. Time je omogućeno uklanjanje soli i ostalih tvari koje služe kao stabilizatori proteina u otopini (tenzidi, poliol i šećeri).

Uzorak čimbenika rasta granulocitnih kolonija nanesen je na membranu (100 µl) i centrifugiran 30 minuta pri 2300 x g. Proteini na membrani isprani su vodom (volumenom koji odgovara volumenu uzorka) te centrifugirani uzastopno tri puta po 30 minuta pri 2300 x g. Naposljetku je membrana okrenuta i centrifugirana 5 minuta pri 800 x g. Eluat koji sadržava pročišćene proteine razrijeđen je vodom do željenog volumena, tj. koncentracije proteina. Prije analize spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF, 1 µl otopine peptida pomiješan je s 9 µl matrice CHCA.

3.4. Priprava potencijalnih inicijatora fragmentacije

3.4.1. Priprava sulfatnih spojeva

Amonijev sulfat pripravljen je u koncentraciji 1 i 0,5 mol l⁻¹ otapanjem u vodi. Amonijev persulfat pripravljen je u koncentraciji 0,5; 0,1 i 0,03 mol l⁻¹ otapanjem u vodi.

U svrhu ispitivanja poboljšane fragmentacije pripravljene su otopine derivata sulfonske kiseline u koncentraciji od 10, 5, 1 i 0,5 mg ml⁻¹ u odgovarajućem otapalu (acetonitril ili

vodena otopina acetonitrila u volumnom udjelu 80%). Zbog zanemarive topljivosti u vodi, 2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina, benzaldehid-3,4-disulfonska kiselina, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonil-klorid, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfon, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamid, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonska kiselina, (3,5-di-*tert*-butilfenil)-(4-*tert*-butilfenil)-sulfon, di-(4-*tert*-butilfenil)-sulfonamid, *p*-*tert*-butilbenzensulfonil-klorid, 4-*tert*-butilbenzensulfonamid, 4-*tert*-butilbenzensulfonil-klorid, (4-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfon, otopljeni su u acetonitrilu. Budući da spoj (3,5-di-*tert*-butilfenil)-(4-*tert*-butilfenil)-sulfon nije bio topljiv u acetonitrilu, kao niusmjesi acetonitrila i vode, nije bio korišten u daljnjim analizama.

3.4.2. Priprava inicijatora radikala

Inicijatori nastanka radikala također su korišteni kao mogući inicijatori fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI. Radi niske temperature homolitičke razgradnje pri čemu nastaju radikali, navedeni spojevi izrazito su reaktivni.

Ispitan je utjecaj inicijatora radikala pripremljenih u četiri različite koncentracije: 10, 5, 1 i 0,5 mg ml⁻¹. Kao inicijatori radikala korišteni su peroksidi (urea peroksid i benzoil peroksid), nitrilni spoj (azobisizobutironitril), keton (benzofenon) te alkil-halogenid (tritol-klorid). Urea peroksid otopljena je u vodi. Zbog zanemarive topljivosti u vodi, preostali inicijatori radikala: benzoil peroksid, azobisizobutironitril, benzofenon i tritol-klorid otopljeni su u acetonitrilu.

Djelovanje azobisizobutironitrila i benzofenona na fragmentaciju peptidnih iona ispitano je i u kombinaciji s amonijevim persulfatom.

Trifenilmetil-klorid je za fragmentacijske studije, osim otapanjem u acetonitrilu, pripremljen i aktivacijom cinkom. U 1 ml otopine trifenilmetil-klorida (koncentracije 10 mg ml⁻¹) dodana je granula cinka te je nakon 1 minute uklonjena iz otopine.

3.4.3. Sinteza aceton peroksida

Aceton peroksid sintetiziran je miješanjem 3,5 ml acetona i 6,5 ml vodikovog peroksida (30 %, w/v). Smjesa je hlađena na 4 °C u hladnjaku 4 sata, nakon čega je u smjesu dodano 3,5 ml koncentrirane klorovodične kiseline. Nakon laganog miješanja i hlađenja smjese na 4 °C, nakon 1 sat nastali su bijeli kristali aceton peroksida koji su profiltrirani, osušeni i

čuvani na 4 °C u hladnjaku do daljnje analize. Dobiveni spoj je eksplozivan u količinama od nekoliko grama, zbog čega je bilo potrebno oprezno rukovanje.

Kristali aceton peroksida dodani su direktno na uzorak na MALDI-pločici bez prethodnog otapanja, kao i otopljeni u acetonitrilu te smjesi acetonitrila i vode (1:1, v/v).

3.5. Nanošenje uzoraka na MALDI-pločicu

U svrhu ispitivanja učinka potencijalnih inicijatora fragmentacije na fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona, pronalaženja optimalne koncentracije i načina pripreme uzorka, otopine inicijatora fragmentacije nanese su na MALDI-pločicu različitim tehnikama; tzv. suha kapljica, tehnikom temeljenom na brzom isparavanju otapala te direktnom pripremom na MALDI-pločici. Za fragmentaciju su korišteni peptidi pripremljeni s matricom na način opisan u odjeljku 3.3. *Priprava peptida za ispitivanje učinka poboljšanja fragmentacije.*

Uzorci peptida za fragmentacijske studije pripremljeni su miješanjem matrice CHCA, peptida i inicijatora fragmentacije ispitivane koncentracije (10, 5, 1 i 0,5 mg ml⁻¹) u određenom omjeru. Volumen od 1 µl smjese nanesen je na MALDI-pločicu i ostavljen da se osuši.

Nadalje, otopina inicijatora fragmentacije odgovarajuće koncentracije pomiješana je sa smjesom peptida i matrice CHCA u volumnom omjeru 1:1 te je 1 µl nanesen na MALDI-pločicu i ostavljen da se osuši. Na osušeni uzorak na pločici nanese se 0,5 µl otopine inicijatora fragmentacije pripremljene u koncentracijama od 10, 5, 1 i 0,5 mg ml⁻¹ te osušeno.

Osim navedenog, uzorci su pripremljeni i miješanjem svih komponenti na MALDI-pločici. Volumen od 1 µl smjese peptida i matrice CHCA pomiješanih u volumnom omjeru 1:1 nanesen je na pločicu. Na smjesu je odmah (prije sušenja) dodano 0,5 µl otopine inicijatora fragmentacije pripremljene u koncentracijama od 0, 5, 1 i 0,5 mg ml⁻¹ te osušeno na MALDI-pločici.

Jedina iznimka od spomenutih načina pripreme bila je pri korištenju aceton peroksida, koji je osim navedenim tehnikama, pripremljen i nanošenjem vrlo male količine kristalića na već osušenu smjesu peptida i matrice (1 µl) na MALDI-pločici.

3.6. Kemijsko obilježavanje peptida benzaldehid-2,4-disulfonskom kiselinom i benzaldehid-3,4-disulfonskom kiselinom

Provedena je sulfonacija triptičkih peptida nastalih autolizom tripsina reagensima koji sadrže dvije sulfo-skupine na položajima *meta-para* i *ortho-para*: benzaldehid-2,4-disulfonskom kiselinom i benzaldehid-3,4-disulfonskom kiselinom. Navedeni reagensi se pri kiselom pH selektivno vežu na N-kraj peptida. Time je omogućena selektivna detekcija obilježenih iona produkata tehnikom tandemne spektrometrije masa uz negativnu ionizaciju.

Peptidi dobiveni autolizom tripsina (priprava peptida opisana je u odjeljku 3.3.1. *Autoliza tripsina*) pročišćeni su tehnikom ZipTip (odjeljak 3.2.2. *Pročišćavanje peptida na koloni tehnikom ZipTip*). Nakon sušenja u vakuum centrifugi, talog peptida otopljen je u 5 μl 10 mmol l^{-1} KH_2PO_4 (pH 4). Otopini peptida dodano je 15 μl derivatizacijskog reagensa koji sadrži natrijev cijanoborhidrid koncentracije 4 mg ml^{-1} te reagentse benzaldehid-2,4-disulfonsku kiselinu i benzaldehid-3,4-disulfonsku kiselinu koncentracije 1 mg ml^{-1} otopljene u fosfatnom puferu (10 mmol l^{-1} KH_2PO_4 , pH 4). Nakon inkubacije na 4 °C preko noći, kemijski obilježeni peptidni uzorci ponovo su pročišćeni tehnikom ZipTip radi uklanjanja soli. Prije analize, osušeni obilježeni peptidi otopljeni su u 5 μl matrice CHCA te nanjeni na MALDI-pločicu (1 μl smjese).

3.7. Analiza uzoraka tehnikom spektrometrije masa MALDI-TOF/TOF

Spektri masa dobiveni su koristeći spektrometar masa MALDI-TOF/TOF opremljen laserom Nd:YAG valne duljine 355 nm, pulsa 3 do 7 ns te frekvencije 200 Hz. Analiza uzoraka provedena je uz pozitivnu ionizaciju, osim u slučaju kemijski obilježenih disulfoniranih spojeva koji su detektirani uz negativnu ionizaciju. Uvjeti instrumentalne analize kontrolirani su koristeći računalni program 4000 Series Explorer (verzija 3.5.3.). Analiza je provedena koristeći ionsko zrcalo (tzv. reflektrom), kao i linearni način rada.

Kada je kao analizator korišteno ionsko zrcalo, za svaki je uzorak snimljen spektar masa pri 1600 pulseva laserom u području mjerenja masa prilagođenom masi peptida, fokusu mase od 1000 Da i vremenu zadržavanja iona od 500 ns. Tandemni spektri masa dobiveni su kolizijom induciranom disocijacijom pri energiji od 1 keV uz supresiju iona prekursora. Kao plin za koliziju u kolizijskoj ćeliji korišten je dušik. Kalibracija spektrometra masa provedena

je prije analize uzoraka koristeći vanjske kalibrante teorijskih monoizotopnih masa navedenih u Tablici 2.

Tablica 2. Molekule korištene za kalibraciju instrumenta MALDI-TOF/TOF uz korištenje ionskog zrcala tijekom MS-analize i MS/MS-analize.

Spoj/ peptid	Molekulska formula	Teorijska monoizotopna masa $[M+H]^+$
MS-analiza		
azitromicin	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	749,5157
tiamin mononitrat	$C_{12}H_{17}N_4OS$	265,1118
VATVSLPR*	$C_{37}H_{68}N_{11}O_{11}$	842,5094
LGEHNIDVLEGNEQFINAAK*	$C_{96}H_{152}N_{27}O_{33}$	2211,1040
APVLSDSCK/SSYPGQITGNMICVGFLEGGK*	$C_{135}H_{218}N_{35}O_{45}S_3$	3161,4957
Peptidni ion	Ion fragment	Teorijska monoizotopna masa
MS/MS-analiza– ion prekursor: LGEHNIDVLEGNEQFINAAK (m/z 2211,1040)		
H	imonijev ion	110,0720
LGEHN	b_5	551,2580
LGEHNIDVLEG	$b_{11}-H_2O$	1159,5750
LGEHNIDVLEGNEQF	b_{15}	1695,7980

* fragment autolize tripsina

U linearnom načinu rada spektri su snimljeni pri 1600 pulseva laserom u području mjerenja masa optimalnom za pojedini peptid, fokusom mase 2000 Da i vremenom zadržavanja 500 ns. Za kalibraciju su korišteni peptidi navedeni u Tablici 3.

Tablica 3. Peptidi korišteni za kalibraciju instrumenta MALDI-TOF/TOF u linearnom načinu rada.

Peptid	Molekulska formula	Teorijska monoizotopna masa $[M+H]^+$
ACTH fragment 18-39	$C_{112}H_{166}N_{27}O_{136}$	2456,1989
inzulin	$C_{254}H_{378}N_{65}O_{75}S_6$	5734,51*
apomiglobin	$C_{769}H_{1213}N_{210}O_{218}S_2$	16952,27*

*prosječna masa

3.8. Računalna obrada podataka dobivenih spektrometrijom masa

Obrada dobivenih spektara masa provedna je računalnim programom Data Explorer (verzija 4.9, Applied Biosystems), koji je također korišten za izračun teorijske monoizotopne i prosječne mase. Elementni sastava peptida, kao i fragmentacija peptida *in silico* je određeni su pomoću alata za analizu peptida i proteina ProteinProspector (verzija 5.10.11, računalni programi: MS-Digest i MS-Product) dostupnog na <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>. Za crtanje struktura korišten je računalni program MLD/ ISISTM/ Draw (verzija 2.5).

§ 4. REZULTATI

4.1. Odabir peptida

U svrhu istraživanja fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF izabrani su peptidi različitih svojstava, uključujući građu (sastav aminokiselina), broj aminokiselina (tj. molekulsku masu) ili modifikacije (C-kraja i N-kraja, intermolekulske i intramolekulske disulfidne veze). U istraživanju su korišteni peptidi ACTH, daptomicin, enfuvirtid, eksenatid, inzulin te *rHuG-CSF*. Uzorci peptida koji su sadržavali nusprodukte sinteze (daptomicin, enfuvirtid, eksenatid) te stabilizatore poput šećera ili poliolnih alkohola (*rHuG-CSF*), pročišćeni su tehnikom ZipTip. Pročišćavanje je detaljnije opisano u odjeljku 3.3.2. *Pročišćavanje peptida na koloni tehnikom ZipTip*. Nakon ispiranja navedenih onečišćenja s punila u pipetnom nastavku, peptidi su eluirani smjesom acetonitrila i vodene otopine TFA. Prilikom analize proteina *rHuG-CSF* uočeno je da pročišćavanje tehnikom ZipTip nije bilo dostatno, jer su spektrometrijom masa detektirani ioni polimerne izotopne raspodjele s porastom mase za $\Delta m/z$ 44. Uočeni polimer odgovara polisorbata, koji nije bio u potpunosti uklonjen s punila prije eluiranja proteina. Stoga je *rHuG-CSF* najprije pročišćen tehnikom membranske filtracije uz korištenje membrane veličine pora 10 kDa te pročišćeno tehnikom ZipTip.

Da bi se istražio utjecaj inicijatora fragmentacije na nastanak fragmenata peptidnih iona u izvoru iona, bilo je potrebno odrediti optimalnu količinu intaktnog peptida koji se uvodi u spektrometar masa. Za svaki pojedini peptid ispitan je niz koncentracija, pri čemu je za pripravu uzoraka korištena matrica CHCA. Ukoliko je na pločicu bila nanescena prevelika količina peptida, pozitivni učinak poboljšane fragmentacije nakon dodatka inicijatora fragmentacije je izostao. U tom slučaju, ioni produkti nastali u izvoru iona tijekom MS-analize bez dodatka inicijatora fragmentacije preuzimaju veći dio protona potrebnih za nastajanje većeg broja fragmenata, pa je konačan ishod uvelike smanjeni broj fragmenata u odnosu na optimalan odabir koncentracije uz dodatak inicijatora fragmentacije. Nakon eksperimentalnog utvrđivanja optimalne količine pojedinog peptida (Tablica 4) obzirom na relativni intenzitet molekulskog iona (reda veličine 10^4), pristupljeno je daljnjim pokusima poboljšanja fragmentacije.

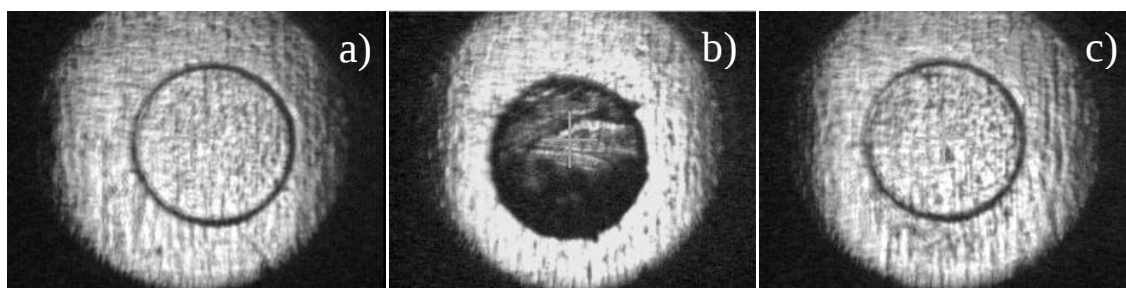
Tablica 4. Optimalne mase peptida/proteina na MALDI-pločici.

Peptid/ protein	Masa na pločici/ μg	Peptid/ protein	Masa na pločici/ μg
ACTH	0,03	eksenatid	0,04
daptomicin	0,05	inzulin	0,05
enfuvirtid	0,05	rHuG-CSF	0,10

4.2. Utjecaj dodatka sulfatnih soli i derivata benzensulfonske kiseline na fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF

4.2.1. Utjecaj dodatka amonijevog sulfata i amonijevog persulfata na fragmentaciju peptidnih iona

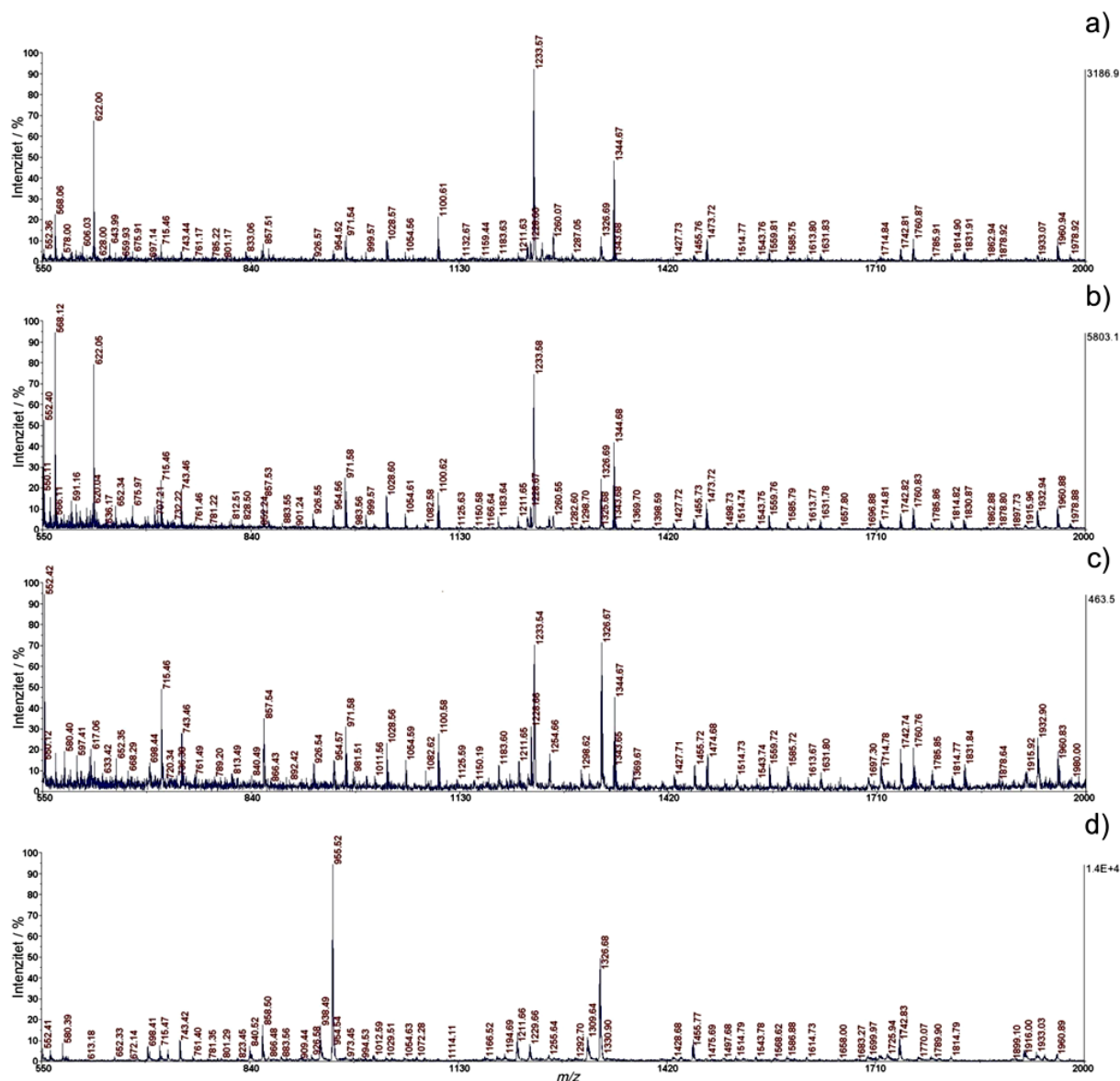
Prema literaturnim referencijama dokazano je da dodatak amonijevog sulfata (AS) u velikim količinama (3 mol l^{-1}) povoljno utječe na fragmentaciju.⁶³ Literaturni navod je eksperimentalno provjeren koristeći peptid ACTH, no navedeni povoljan učinak na poboljšanu fragmentaciju uočen je već nakon dodatka 500 mmol l^{-1} AS. Tijekom pripreve uzorka uočena je razlika u kristalizaciji matrice s i bez dodatka amonijevog sulfata (Slika 16). Dok su kristali matrice i peptida vrlo sitni i homogeni (Slika 16 a), dodatkom amonijevog sulfata dolazi do narušavanja kristalizacije (Slika 16 b), što ne utječe na rezultat analize. Optimalna ionizacija peptida nakon dodatka amonijevog sulfata, kao i fragmentacija peptidnih iona u izvoru iona postignuta je pojačanjem laserske snage u odnosu na analizu bez dodatka amonijevog sulfata.



Slika 16. Prikaz razlika u kristalizaciji matrice CHCA ovisno o dodanoj količini inicijatora fragmentacije: (a) smjesa peptida i matrice, (b) dodatak 500 mmol l^{-1} amonijevog sulfata smjesi peptida i matrice, (c) dodatak 30 mmol l^{-1} amonijevog persulfata smjesi peptida i matrice.

Slijedom dobivenih rezultata ispitan je potencijalni učinak amonijeve soli koja nije opisana u literaturi, amonijevog persulfata (APS), na fragmentaciju peptidnih iona prije ekstrakcije u analizator masa (u izvoru iona) spektrometra masa MALDI-TOF/TOF. U pokusima su korišteni peptidi: ACTH, daptomicin, inzulin te protein *rHuG-CSF*. Amonijev persulfat otopljen je u vodi u različitim koncentracijama (od 3 mol l⁻¹ do 3 mmol l⁻¹). Priprava uzorka prije analize spektrometrijom masa sastojala se od dodatka otopine soli u smjesu uzorka i matrice te nanošenja na pločicu. Nadalje, otopina amonijevog persulfata nanescena je na otopinu peptida i matrice na pločici te ostavljena da molekule kristaliziraju zajedno s matricom. Postupak je detaljnije opisan u odjeljku 3.5. *Nanošenje uzorka na MALDI-pločicu*. Koncentracija od 30 mmol l⁻¹ amonijevog persulfata pokazala se optimalnom za nastanak veće količine iona produkata u prvom stupnju MS-analize. Također je zabilježeno da dodatak navedene količine amonijevog persulfata ne utječe na kristalizaciju smjese peptida i matrice (Slika 16 c). Sa stanovišta povećanja fragmentacije, odnosno ukupne količine iona u izvoru iona, ustanovljeno je da priprava koja uključuje naknadno nanošenje amonijevog persulfata i rekristalizaciju svih sastojaka smjese na pločici povoljnije utječe na nastanak većeg broja iona.

Spektri masa peptida ACTH prije (Slika 17 a) te poslije dodatka amonijevog persulfata (Slika 17 b) i amonijevog sulfata (Slika 17 c) uspoređeni su s tandemnim spektrom masa ACTH (ion prekursor *m/z* 2465,2; Slika 17 d). Razlike u fragmentaciji peptida su najočitije upravo u prikazanom rasponu masa od 550 Da do 2000 Da.



Slika 17. MALDI-TOF/TOF spektar masa peptida ACTH s ionima produktima prikazanim u Tablici 5: (a) bez dodatka APS ili AS, (b) uz dodatak 30 mmol l^{-1} APS (c) uz dodatak 500 mmol l^{-1} AS i (d) spektar masa iona produkata intaktnog peptida ACTH (ion prekursor m/z 2465,2).

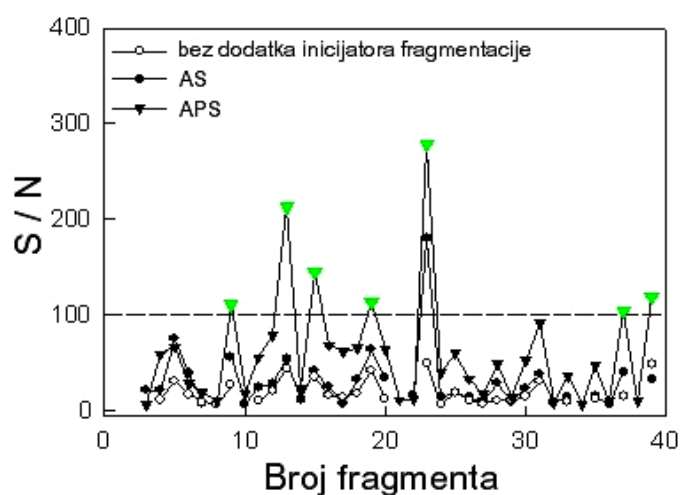
Iz priloženih spektara vidljivo je da fragmentacijski profili ACTH ovisi o dodatku amonijevih soli. Spektri se razlikuju po broju i vrsti nastalih iona te relativnim intenzitetima novonastalih iona. Uzimajući u obzir ione nastale fragmentacijom peptidnog iona ACTH (izuzevši ione matrice) u izvoru iona u prvom stupnju MS-analize detektirano je 28 iona fragmenata bez dodatka sulfatnih soli, 33 s dodatkom amonijevog sulfata te 37 iona fragmenata uz dodatak amonijevog persulfata (Tablica 5).

Tablica 5. Usporedba intenziteta fragmenata peptida ACTH nastalih u izvoru iona. Pripadajući spektri prikazani su na Slici 17 a-c, pri čemu su uspoređeni spektri uzoraka bez dodatka inicijatora fragmentacije, kao i s dodatkom 500 mmol l⁻¹ AS ili 30 mmol l⁻¹ APS.

<i>m/z</i>	Fragment peptidnog iona ACTH	Fragmentni ion	Bez dodatka inicijatora	S/N	
				Dodan AS	Dodan APS
580.38	RPVKV	b5	ND	21.65	7.21
652.35	FPLEF	y5	11.98	21.28	59.48
715.46	RPVKVY	a6	31.34	75.17	66.92
743.46	RPVKVY	b6	17.13	39.76	29.07
761.17	GAEDSAE-CO	IF-28	9.22	8.17	19.94
781.22	PVKVYPN-NH ₃	IF-17	6.99	ND	10.47
857.51	RPVKVYP	c7	27.04	55.89	111.26
883.51	RPVKVYPN	d-a8	ND	7.21	18.26
926.57	RPVKVYPN	a8	10.79	24.52	55.97
954.52	RPVKVYPN	b8	20.81	28.47	79.07
971.56	RPVKVYPN	c8	44.75	54.30	212.81
1011.59	RPVKVYPNG	b9	ND	11.83	23.28
1029.57	AEDESAEAF-H ₂ O	IF-18	35.92	42.14	145.24
1054.56	RPVKVYPNGA	a10	16.08	25.11	68.66
1183.63	RPVKVYPNGAE	a11	14.19	7.84	61.69
1211.63	RPVKVYPNGAE	b11	18.30	32.64	66.36
1228.66	RPVKVYPNGAE	c11	42.53	64.05	113.28
1254.62	DESAEAFPLEF	y11	12.62	34.72	63.96
1282.60	PVKVYPNGAEDE-NH ₃	IF-17	ND	ND	11.44
1309.66	RPVKVYPNGAED-NH ₃	b12-17	ND	15.90	12.25
1326.69	RPVKVYPNGAED	b12	50.29	180.16	278.54
1427.72	RPVKVYPNGAEDE	a13	6.85	14.32	39.56
1455.76	RPVKVYPNGAEDE	b13	19.12	19.35	59.81
1514.74	RPVKVYPNGAEDES	a14	11.20	14.19	33.70
1543.75	VKVYPNGAEDESAEA-NH ₃	IF	7.66	10.28	17.78
1585.76	PVKVYPNGAEDESAE	IF	11.36	28.70	49.08
1613.80	RPVKVYPNGAEDESA	b15	10.61	10.08	15.03
1714.84	RPVKVYPNGAEDESAE	a16	15.47	24.23	53.10
1742.81	RPVKVYPNGAEDESAE	b16	30.63	38.11	92.30
1768.92	RPVKVYPNGAEDESAEA	a17	ND	9.12	9.15
1785.91	RPVKVYPNGAEDESAEA-NH ₃	a17-17	9.82	13.94	36.92
1796.77	RPVKVYPNGAEDESAEA-NH ₃	b17-17	ND	ND	7.35
1814.90	RPVKVYPNGAEDESAEA	b17	12.38	15.57	47.42
1915.61	RPVKVYPNGAEDESAEAF-NH ₃	a18-17	ND	6.68	10.24
1933.07	RPVKVYPNGAEDESAEAF	a18	15.41	40.94	104.45
1943.92	RPVKVYPNGAEDESAEAF-NH ₃	b18-17	ND	ND	10.75
1960.94	RPVKVYPNGAEDESAEAF	b18	48.58	33.60	119.42
Ukupan broj detektiranih fragmenata (maksimalan broj 37)			28/37	33/37	37/37

S/N – omjer visine signala i kemijskog šuma, ND – nije detektiran, IF – interni fragment

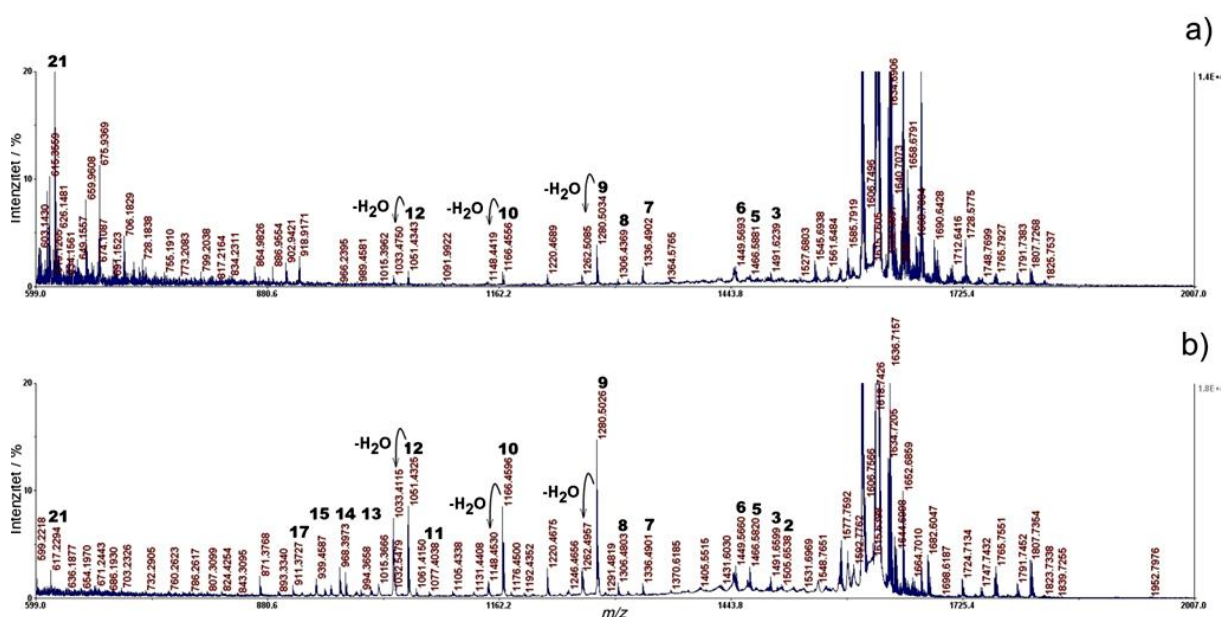
Povećanje broja iona produkata nastalih u prvom stupnju MS-analize uslijed dodatka amonijevih soli praćeno je smanjenjem tzv. kemijskog šuma, tj. povećanjem omjera signala i šuma (S/N) za postojeće fragmente, pri čemu su ioni najvećeg omjera S/N detektirani u slučaju dodatka amonijevog persulfata. Novonastali fragmenti nakon dodatka inicijatora fragmentacije odnose se na ione a- i b-serije (b5, b9, b12-17, a17, a18-17, b18-17), te interne fragmente. Povećanje intenziteta signala uočeno je za ione c-, b- i a-serije (c7, c8, c11, c18, b12 i a18; Tablica 5 i Slika 18), čiji omjer signala i šuma $S/N > 100$ omogućava daljnju fragmentaciju navedenih iona koristeći CID u drugom stupnju MS-analize (pseudo MS^3).



Slika 18. Grafički prikaz podataka dobivenih usporedbom intenziteta fragmenata peptida ACTH prema Tablici 5. Zelenom bojom su označeni intenzitet iona produkata nastalih u izvoru iona dodatkom inicijatora fragmentacije (APS) koji su prelazili prag S/N koji je neophodan za uspješan drugi stupanj MS-analize (pseudo MS^3).

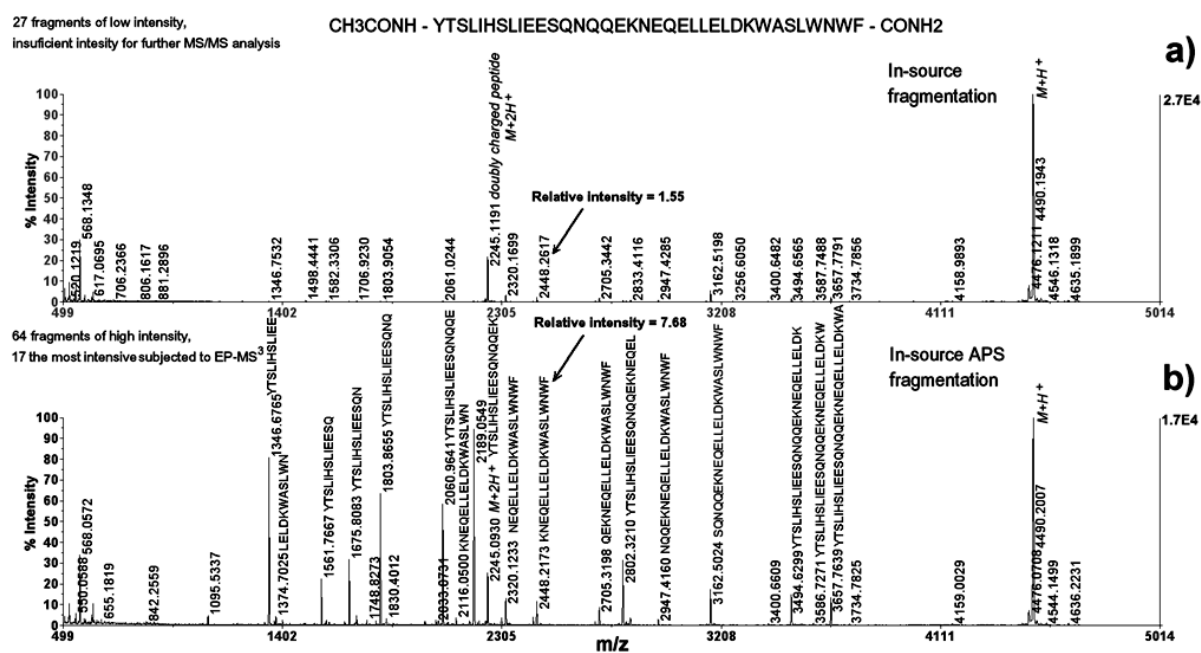
Učinak povećanja intenziteta signala te nastanak novih iona fragmenata kod peptida koji ima linearni slijed aminokiselina bez posttranslacijskih modifikacija nije izostao. Međutim, mnoštvo peptida nema linearni slijed aminokiselina, a poznato je iz literature da slijed amino kiselina u peptidu kao i posttranslacijske modifikacije utječu na uspješnost fragmentacije.⁶ Iz navedenih razloga ispitan je učinak amonijevog persulfata na fragmentaciju cikličkog lipopeptida daptomicina. U analizi je korištena vodena otopina amonijevog persulfata koncentracije 30 mmol l^{-1} , koja je nanescena na otopinu matrice i peptida na MALDI-pločici, kao što je prethodno opisano (3.5. *Nanošenje uzorka na MALDI-pločicu*). Spektar masa peptida nakon dodatka amonijevog persulfata (Slika 18 b) ukazuje na znatno povećanje intenziteta signala iona produkata nastalih fragmentacijom iona daptomicina u

izvoru iona u odnosu na stupanj fragmentacije iona daptomicina bez dodatka amonijevog persulfata (Slika 19 a). Strukture iona produkata nastalih fragmentacijom daptomicina prikazane su u Tablici D1 u *Dodataku*. Usporedbom spektara masa daptomicina prikazanih na Slici 19 i u Tablici 6, ustanovljeno je da je nastalo šest iona koji ne nastaju fragmentacijom daptomicina u izvoru iona bez dodatka amonijevog persulfata u prvom stupnju MS-analize. Nastali ioni pripadaju internim fragmentima, kao i ionima x-, y- i b-serije iona. Zamijećen je znatan porast intenziteta signala iona b- i y-serije te y-serije iona uz gubitak molekule vode (y-18; ioni produkti mase m/z 1262, m/z 1148 i m/z 1033). Nastanak iona produkata mase m/z 1077 i m/z 1336 karakterističan je samo za fragmentaciju uz dodatak amonijevog persulfata, jer navedeni ioni nisu prisutni ukoliko se za fragmentaciju koristi kolizijska ćelija, tj. CID (Slika 20). Uzimajući u obzir omjer signala i šuma kao kriterij ($S/N > 100$) odabira pogodnog iona prekursora za daljnju analizu, u slučaju iona nastalih fragmentacijom daptomicina bez inicijatora fragmentacije u izvoru iona moguće je dodatno fragmentirati samo jedan ion produkt u drugom stupnju MS-analize koristeći CID (pseudo MS³). Međutim, nakon dodatka amonijevog persulfata uz poštivanje jednakih kriterija koji su pogodni za drugi stupanj analize broj iona pogodnih za pseudo MS³ fragmentaciju raste na četrnaest.



Slika 19. MALDI-TOF spektar masa daptomicina (a) prije dodatka amonijevog persulfata; (b) poboljšani spektar masa iona produkata nastalih cijepanjem daptomicina nakon dodatka 30 mmol l⁻¹ amonijevog persulfata. Brojevi označavaju strukture iona produkata prikazanih u Tablici D1 u *Dodataku*.

U svrhu ispitivanja utjecaja amonijevog persulfata na fragmentaciju sintetskog peptida s linearnim slijedom amino kiselina koji sadrži kemijski modificirane N-krajeve i C-krajeve (amidacija i acetilacija). Kao modelni peptid korišten je farmaceutski peptid enfuvirtid. Vodena otopina amonijevog persulfata koncentracije 30 mmol l^{-1} nanjena je na otopinu matrice i peptida na MALDI-pločici, kao i u prethodnim pokusima. Snimljeni su spektri masa peptida sa i bez amonijevog persulfata (Slika 21).

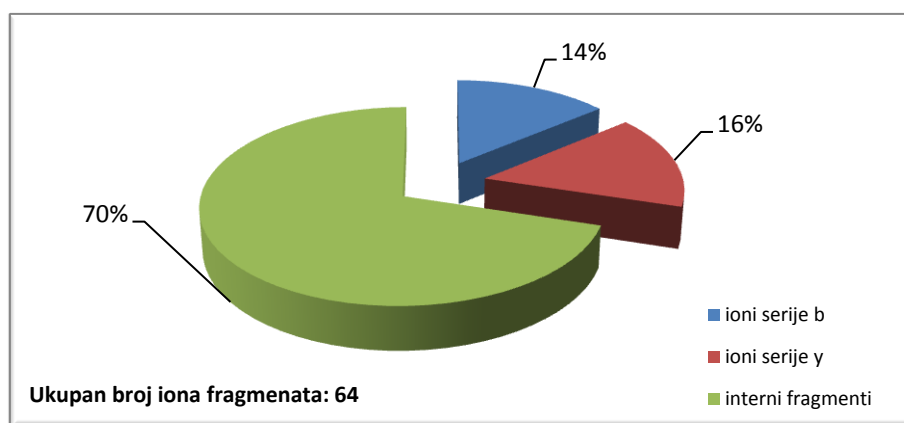


Slika 21. MALDI-TOF spektar masa enfuvirtida s označenim ionima produktima (a) bez dodatka APS (b) s dodatkom 30 mol l^{-1} APS. Nakon dodatka APS nastala su 64 nova fragmentna iona, od kojih je 17 dodatno fragmentirano tandemnom spektrometrijom masa (pseudo MS³).⁶⁸

Spektri masa prikazani na Slici 21 upućuju na znatno poboljšanje fragmentacije iona enfuvirtida u izvoru iona dodatkom amonijevog persulfata, koje se očituje u povećanju broja iona produkata nastalih u prvom stupnju MS-analize te povećanju intenziteta postojećih fragmenata, čiji je intenzitet bez dodatka amonijevog persulfata bio na razini šuma. Nastali ioni pripadaju ionima b- i y-serije te internim fragmentima.

Uslijed djelovanja amonijevog persulfata u plinovitom stanju tijekom MS-analize nastalo je 64 fragmenta visokog relativnog intenziteta, od kojih 14 % pripada ionima b-serije, 16 % ionima y-serije te ostatak ionima nastalim internom fragmentacijom intaktnog peptidnog iona (Slika 22). Obzirom na omjer S/N i relativni intenzitet, 17 nastalih iona

pogodno je za daljnju fragmentaciju tandemnom spektrometrijom masa uz primjenu CID (fragmentni ioni označeni na Slici 21 b uz pripadajući slijed aminokiselina). Sljedovi aminokiselina svih identificiranih fragmentnih iona nastalih u izvoru iona zajedno s relativnim intenzitetima detaljno su opisani u literaturi.⁶⁸



Slika 22. Raspodjela vrsta nastalih fragmentnih iona nakon fragmentacije enfuvirtida uslijed djelovanja APS-a u izvoru iona.

Dodatak amonijevog persulfata kao inicijatora fragmentacije ima i svojih ograničenja. Poboljšanje fragmentacije peptidnih iona uz dodatak amonijevog persulfata ispitano je kod ekstenatida, linearnog peptida s modificiranim N-krajom (acetilacija), no nije zamijećena značajnija razlika između spektara masa u prvom stupnju MS-analize s i bez dodatka amonijevog persulfata. Osim toga, amonijev persulfat također nije utjecao na poboljšanje fragmentacije inzulina, peptida kojem su dva lanca povezana s dvije disulfidne veze. Pažljivom usporedbom spektara masa nisu detektirani novi ioni peptidnih fragmenata nastali fragmentacijom inzulina u izvoru iona spektrometra masa uslijed djelovanja amonijevog persulfata. No, ioni istog omjera mase i naboja prisutni u oba spektra masa imali su manji intenzitet ukoliko je korišten amonijev persulfat. Ograničenja djelovanja amonijevog persulfata vezana su uz veličinu proteina ili peptida te nepovoljnom slijedu amino kiselina koji kod ionizacije sprječava nastanak fragmenata, pa sulfatni inicijatori fragmentacije ne pospješuju cijepanje peptidne veze.

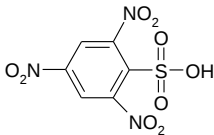
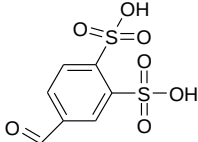
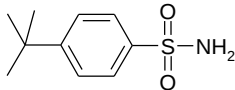
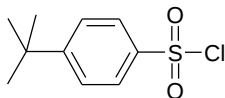
Fragmentacija proteina *rHuG-CSF* koji sadrži dvije intramolekulske disulfidne veze praćena je u linearnom načinu rada spektrometra masa (raspon masa od 2 kDa do 25 kDa), kao i uz korištenje ionskog zrcala (raspon masa od 1 kDa do 8 kDa). U linearnom načinu rada

detektirani su ioni 18,8 kDa, što odgovara intaktnom ionu *rHuG-CSF* te ioni 9 kDa (dvostruko protonirani ion *rHuG-CSF*). Obje detektirane vrste iona bile su slabog intenziteta i loše simetrije signala. Dodatak amonijevog pesulfata je suprimirao ionizaciju, jer nijedan od navedenih iona (jednostruko i dvostruko protonirani ion *rHuG-CSF*) nije bio vidljiv na spektru masa nakon dodatka amonijevog persulfata. Koristeći ionsko zrcalo, nisu zamijećene razlike u spektrima masa s i bez inicijatora fragmentacije, tj. nisu uočeni manji fragmenti proteinskog iona (raspon masa od 1 kDa do 8 kDa).

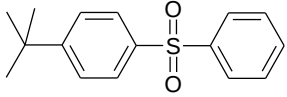
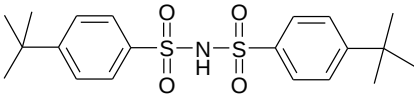
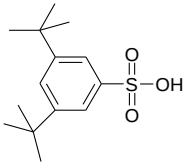
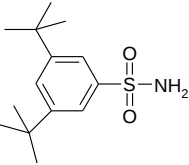
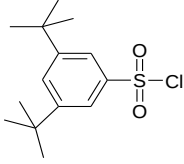
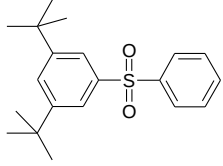
4.2.2. Utjecaj derivata benzensulfonske kiseline na fragmentaciju peptidnih iona

Radi utvrđivanja utjecaja spojeva koji sadrže sulfo-skupinu na fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF ispitana je grupa derivata benzensulfonske kiseline (Tablica 7).

Tablica 7. Potencijalni inicijatori fragmentacije peptidnih iona uz navedene peptide i proteine na kojima je uočen ili izostao učinak poboljšanja fragmentacije.

Struktura i kemijsko ime inicijatora fragmentacije	10	Masena koncentracija/ mg ml ⁻¹		
		5	1	0.5
 2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina	ACTH	-	-	-
 benzaldehid-3,4-disulfonska kiselina	-	-	-	-
 4-tert-butilbenzensulfonamid	-	-	-	-
 4-tert-butilbenzensulfonil-klorid	-	-	-	-

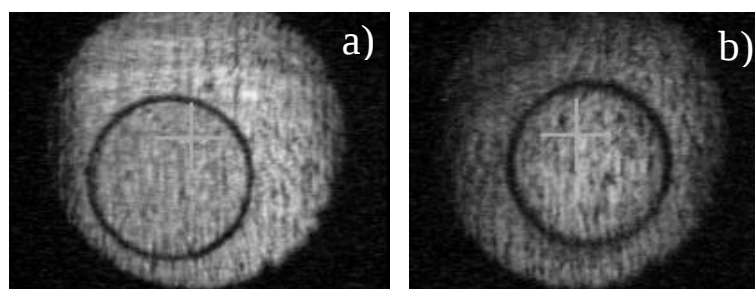
Tablica 7. Nastavak s prethodne stranice.

Struktura i kemijsko ime inicijatora fragmentacije	Masena koncentracija/ mg ml ⁻¹			
	10	5	1	0.5
 (4- <i>tert</i> -butilfenil)-fenil-sulfon	-	-	-	-
 di-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-sulfonamid	-	-	-	-
 3,5-di- <i>tert</i> -butilbenzensulfonska kiselina	-	-	-	-
 3,5-di- <i>tert</i> -butilbenzensulfonamid	daptomicin ACTH	daptomicin ACTH <i>rHuG</i> -CSF (višestruko protonirani ioni)	daptomicin ACTH	-
 3,5-di- <i>tert</i> -butilbenzensulfonyl-klorid	daptomicin	daptomicin	-	-
 (3,5-di- <i>tert</i> -butilfenil)-fenil-sulfon	daptomicin ACTH <i>rHuG</i> -CSF (višestruko protonirani ioni)	daptomicin ACTH	-	-
- Nije uočen učinak poboljšanja fragmentacije.				

Potencijalni inicijatori fragmentacije pripremljeni su u četiri različite koncentracije, kao što je opisano u odjeljku 3.4.1. *Priprava sulfatnih spojeva*. Obzirom na relativno slabu topljivost navedenih inicijatora fragmentacije u korištenim otapalima, najveća ispitana koncentracija bila je 10 mg ml⁻¹. Za fragmentacijske studije korišteni su peptidi ACTH, daptomicin, inzulin te protein *rHuG*-CSF.

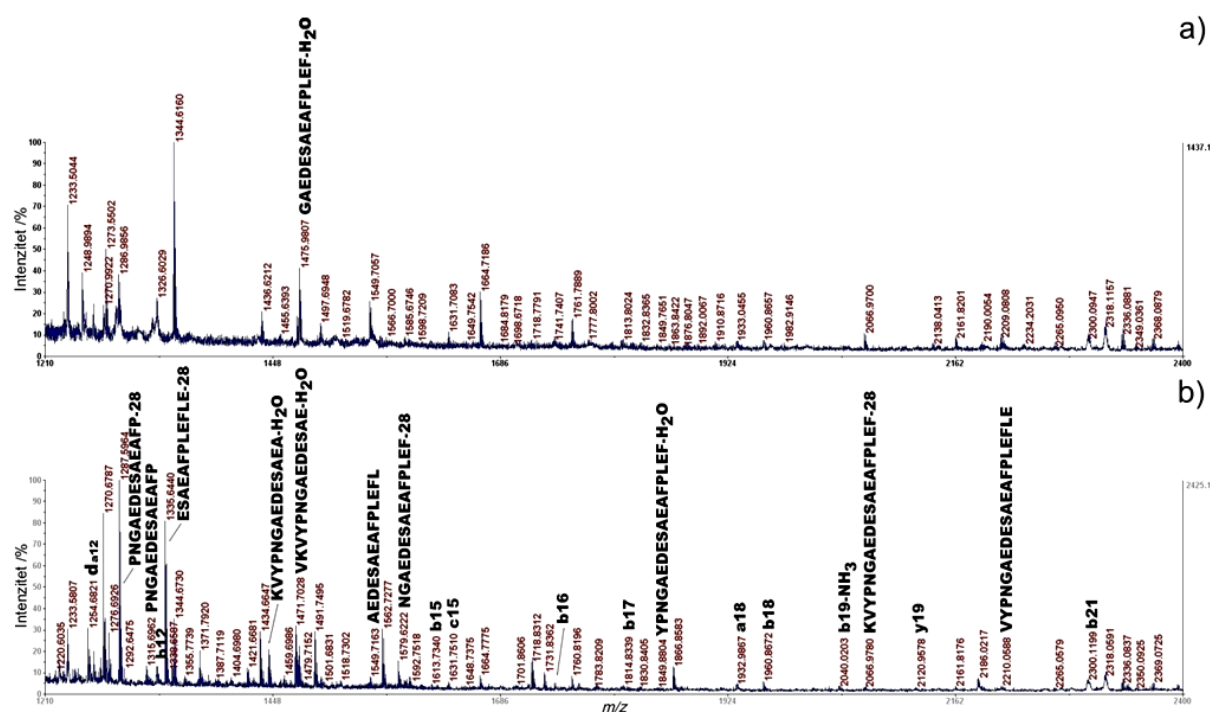
Učinak ispitanih potencijalnih inicijatora fragmentacije na fragmentaciju peptidnih iona u plinovitoj fazi u izvoru iona prikazan je u Tablici 7. Od 10 ispitanih derivata benzensulfonske kiseline, šest njih nije pokazivalo značajniji učinak poboljšanja fragmentacije niti u jednoj od pripremljenih koncentracija: benzaldehid-3,4-disulfonska kiselina, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonska kiselina, 4-*tert*-butilbenzensulfonamid, di-(4-*tert*-butilfenil)-sulfonamid, 4-*tert*-butilbenzensulfonil-klorid i (4-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfon. Navedeni spojevi suprimirali su ionizaciju pri višim koncentracijama reagensa (10 i 5 mg ml⁻¹), dok su pri koncentracijama 1 i 0,5 mg ml⁻¹ spektri masa obzirom na fragmentacijski profil bili gotovo identični referentnim spektrima masa peptida bez dodatka derivata sulfonske kiseline.

Utjecaj 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline (TNBS) na fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona ispitan je na peptidu ACTH. Uzorci za analizu pripremljeni su na nekoliko načina. Otopina peptida i matrice pomiješana je s TNBS i nanescena na MALDI-pločicu. Nadalje, otopina TNBS-a dodana je otopini peptida i matrice prethodno nanescenoj na pločicu prije sušenja te nakon sušenja na pločici (u dva odvojena eksperimenta). Samo najviša ispitana koncentracija reagensa TNBS (10 mg ml⁻¹) nanescena na otopinu peptida i matrice uz kristalizaciju svih sastojaka smjese pokazala je učinak poboljšanja fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona. Iako je kristalizacija matrice i peptida ACTH bila narušena (kristali nisu bili homogeni kao kod smjese matrice CHCA i ACTH; Slika 23 a i b), učinak poboljšanja fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa nije izostao, ali tek uz pojačanu lasersku snagu u odnosu na analizu bez dodatka TNBS.



Slika 23. Prikaz razlika u kristalizaciji matrice CHCA ovisno o dodanoj količini inicijatora fragmentacije: (a) smjesa peptida i matrice, (b) dodatak 10 mg ml⁻¹ 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline (TNBS) smjesi peptida i matrice.

Usporedbom spektara masa ACTH s i bez dodatka TNBS uočeno je da dodatak navedenog reagensa utječe na poboljšanje fragmentacije iona ACTH koje je najizraženije u rasponu masa od 1200 Da do 2210 Da (Slika 24, Tablica 8). Djelovanjem TNBS nastalo je 15 novih iona produkata u prvom stupnju MS-analize, od kojih je najviše internih fragmenata detektiranih uz gubitak ugljikova monoksida ($-\text{CO}$, smanjenje mase za 28 Da) ili vode ($-\text{H}_2\text{O}$, smanjenje mase za 18 Da), kao i iona b-, c-, a- i y-serije. Iako su samo tri detektirana iona produkta nastala u prvom stupnju MS-analize dovoljnog intenziteta ($S/N > 100$) za daljnje analize tandemnom spektrometrijom masa uz upotrebu kolizijsku ćeliju (pseudo MS^3), bez dodatka TNBS nije zamijećen niti jedan ion produkt intenziteta dovoljnog za nastanak spektra masa pseudo MS^3 .



Slika 24. MALDI-TOF spektar masa peptida ACTH s označenim ionima produktima: (a) bez dodatka TNBS, (b) nakon dodatka TNBS uz nastajanje osam novih fragmentnih iona, od kojih je tri dodatno fragmentirano tandemnom spektrometrijom masa (pseudo MS^3).

Osim navedenog, ispitivanjem utjecaja TNBS na fragmentaciju inzulina i *rHuG-CSF*, uočeno je da TNBS ne utječe na fragmentaciju navedenog peptida i proteina u izvoru iona. Pri nižim koncentracijama TNBS u prvom stupnju MS-analize nastaju ioni produkti iste mase kao i bez dodatka sulfonske kiseline. U slučaju fragmentacije *rHuG-CSF*, koja je praćena i u linearnom načinu rada (raspon masa od 2 kDa do 25 kDa), došlo je do supresije ionizacije

koja se očitovala u nemogućnosti detekcije jednostruko i dvostruko protoniranih iona proteina koji su, iako slabog intenziteta, vidljivi bez dodatka TNBS.

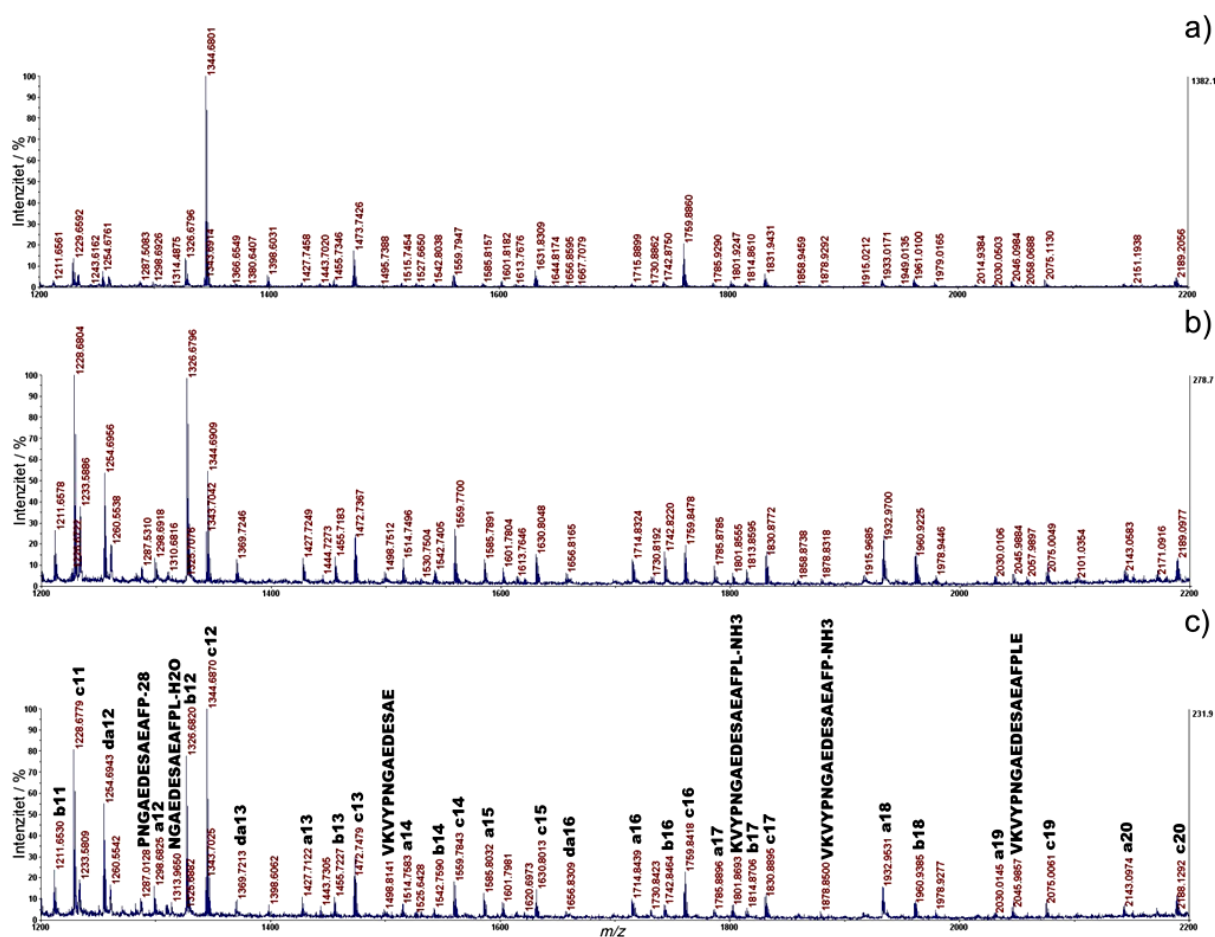
Tablica 8. Usporedba intenziteta fragmenata peptida ACTH nastalih u izvoru iona bez dodatka inicijatora fragmentacije i s dodatkom TNBS (10 mg ml⁻¹). Pripadajući spektri masa prikazani su na Slici 24.

<i>m/z</i>	Fragment peptidnog iona	Fragmentni ion	S/N	
			Bez dodatka inicijatora	Dodan TNBS
1254,6953	RPVKVYPNGAED	d-a12	ND	63,76
1287,5488	PNGAEDESAAFP-CO	IF-28	35,63	260,16
1315,5437	PNGAEDESAAFP	IF	ND	30,41
1326,6801	RPVKVYPNGAED	b12	21,43	23,18
1335,6467	ESAEAFPLEFLE-CO	IF-28	ND	259,31
1342,6274	VKVYPNGAEDESA-H ₂ O	IF-18	ND	40,14
1443,6387	KVYPNGAEDESAA-H ₂ O	IF-18	ND	75,50
1471,6700	VKVYPNGAEDESAA-H ₂ O	IF-18	ND	124,98
1475,6325	GAEDESAFAFPLEF-H ₂ O	IF-18	77,30	62,23
1549,7057	AEDESAAFPLEFL	IF	57,09	23,61
1579,6911	NGAEDESAAFPLEF-CO	IF-28	ND	62,57
1590,7071	KVYPNGAEDESAAFP-H ₂ O	IF-18	ND	32,34
1613,7918	RPVKVYPNGAEDESA	b15	ND	13,17
1630,8184	RPVKVYPNGAEDESA	c15	ND	10,12
1742,8344	RPVKVYPNGAEDESAA	b16	ND	21,55
1759,861	RPVKVYPNGAEDESAA	c16	15,22	10,61
1849,7915	YPNGAEDESAAFPLEF-H ₂ O	IF-18	ND	10,95
1932,945	RPVKVYPNGAEDESAAFP	a18	10,14	20,93
1960,9399	RPVKVYPNGAEDESAAFP	b18	27,89	34,71
2029,9978	RPVKVYPNGAEDESAAFP	a19	ND	17,77
2040,9661	RPVKVYPNGAEDESAAFP-NH ₃	b19-17	ND	19,67
2066,9706	KVYPNGAEDESAAFPLEF-CO	IF-28	45,47	21,68
2120,9771	KVYPNGAEDESAAFPLEF	y19	ND	12,18
2208,9972	VYPNGAEDESAAFPLEFLE	IF	37,01	13,02
2300,1194	RPVKVYPNGAEDESAAFPLE	b21	13,75	15,05
2366,0823	PVKVYPNGAEDESAAFPLEF-NH ₃	y21	49,94	21,00
Ukupan broj detektiranih fragmenata (maksimalan broj 26)			11/26	26/26

S/N – omjer visine signala i kemijskog šuma, ND – nije detektiran, IF – interni fragment

Najniža koncentracija preostala tri derivata benzensulfonske kiseline: 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamida, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonil-klorida i (3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfona, nije imala utjecaj na fragmentaciju peptidnih iona ACTH i daptomicina u izvoru iona. Iako su navedeni spojevi u koncentracijama 5 i 10 mg ml⁻¹ omogućili nastanak većeg broja iona produkata uz porast intenziteta njihovih signala, koncentracija 1 mg ml⁻¹ sulfonamida se ipak pokazala optimalnom.

Učinak 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamida (1 mg ml^{-1}) na poboljšanje fragmentacije peptida ACTH u izvoru iona prikazan je na Slici 25 b, dok su intenziteti nastalih iona navedeni u Tablici 9. Kod već postojećih iona produkata (x- i y-serije iona te internih fragmenata) detektiranih u prvom stupnju MS-analize bez dodatka navedenog inicijatora fragmentacije, (Slika 25 a) uočeno je povećanje intenziteta signala uslijed dodatka sulfonamida te nastanak tri satelitna iona d-serije koji nisu prisutni u referentnom uzorku. Dodatak 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfona koncentracije 5 mg ml^{-1} (Slika 25 c, Tablica 9) u konačnici nije pospješio nastanak većeg broja fragmenta, iako je zamijećen nastanak različitih ionskih vrsta (umjesto iona a- i b-serije, nastali su interni fragmenti te ioni d-serije).



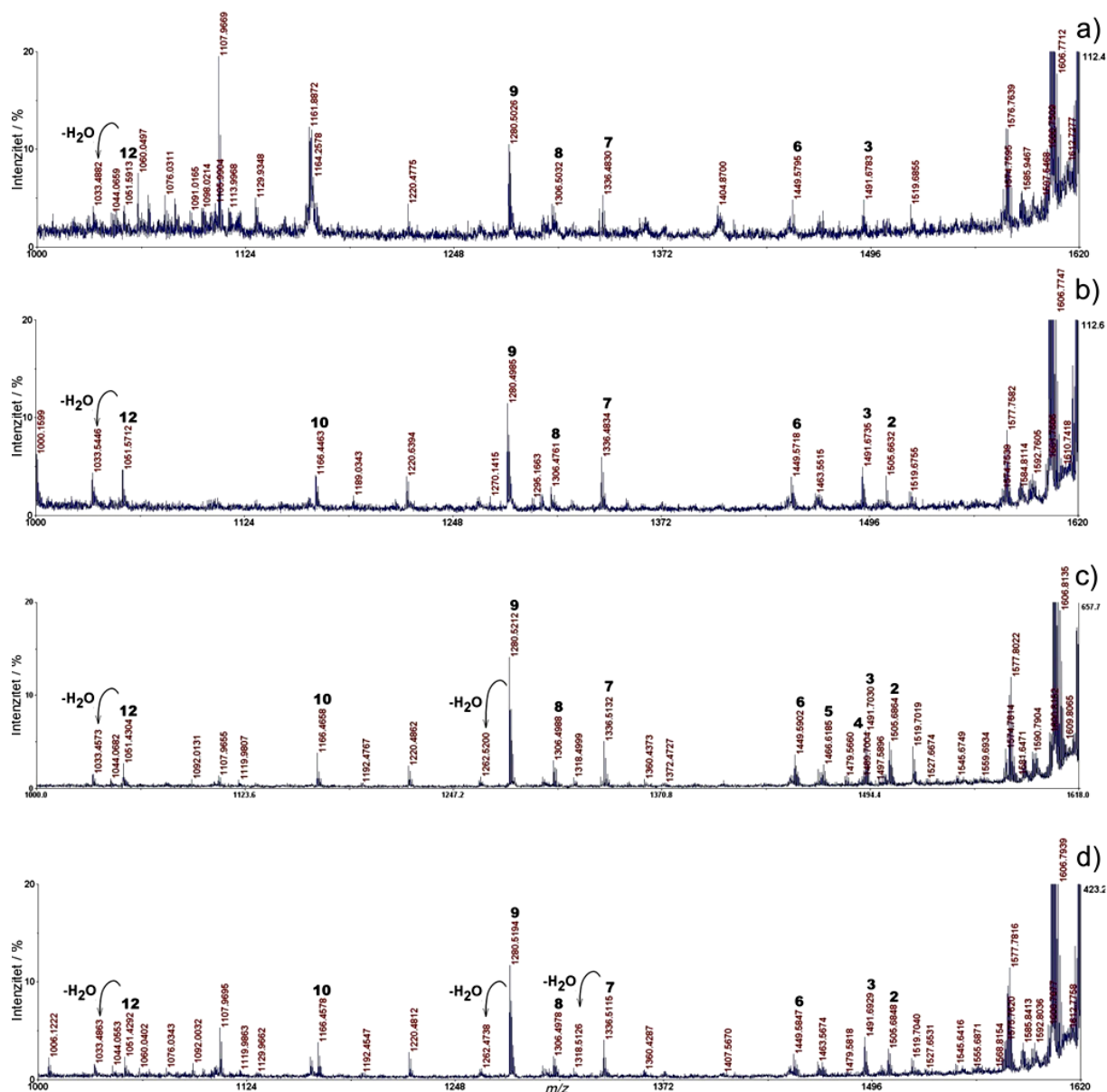
Tablica 9. Usporedba intenziteta fragmenata peptida ACTH nastalih u izvoru iona prije i nakon dodatka inicijatora fragmentacije 3,5-di-*tert*-butilbensensulfonamida (1 mg ml^{-1}) i (3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfona (5 mg ml^{-1}). Pripadajući spektri prikazani su na Slici 25.

<i>m/z</i>	Fragment peptidnog iona ACTH	Fragmentni ion	Bez dodatka inicijatora	S/N Dodan 3,5-di- <i>tert</i> -butilbenzen-sulfonamid	S/N Dodan 3,5-di- <i>tert</i> -butilfenil-fenil-sulfon
1211,6531	RPVKVYPNGAE	b11	19,70	45,35	52,13
1228,6797	RPVKVYPNGAE	c11	82,30	242,67	156,94
1254,6953	RPVKVYPNGAE	da12	60,99	123,34	115,56
1287,5488	PNGAEDESAEAF- CO	IF-28	17,63	14,87	16,27
1313,5644	NGAEDESAEAFPL- H_2O	IF-18	ND	ND	10,19
1326,6801	RPVKVYPNGAED	b12	139,69	256,43	180,51
1343,7066	RPVKVYPNGAED	c12	32,68	68,06	10,15
1369,7223	RPVKVYPNGAEDE	da13	ND	29,94	19,76
1427,7278	RPVKVYPNGAEDE	a13	16,47	31,30	28,98
1455,7227	RPVKVYPNGAEDE	b13	32,96	39,67	26,14
1472,7492	RPVKVYPNGAEDE	c13	149,66	72,59	51,65
1489,6805	VKVYPNGAEDESAE	IF	ND	ND	10,51
1514,7598	RPVKVYPNGAEDES	a14	13,31	29,40	19,56
1542,7547	RPVKVYPNGAEDES	b14	13,01	17,93	8,62
1559,7812	RPVKVYPNGAEDES	c14	79,04	89,83	61,80
1585,7969	RPVKVYPNGAEDESA	a15	16,34	36,43	30,37
1613,7918	RPVKVYPNGAEDESA	b15	12,98	13,71	7,05
1630,8184	RPVKVYPNGAEDESA	c15	49,52	55,46	23,14
1656,834	RPVKVYPNGAEDESAE	da16	7,30	21,96	10,18
1714,8395	RPVKVYPNGAEDESAE	a16	13,90	40,72	27,59
1742,8344	RPVKVYPNGAEDESAE	b16	27,34	59,61	22,84
1759,861	RPVKVYPNGAEDESAE	c16	72,94	59,41	43,10
1785,8766	RPVKVYPNGAEDESAEA	a17	20,76	34,38	13,85
1787,8123	VKVYPNGAEDESAEAF- NH_3	IF-17	10,18	15,11	10,12
1801,8279	KVYPNGAEDESAEAFPL- NH_3	IF-17	38,60	24,81	19,99
1813,8715	RPVKVYPNGAEDESAEA	b17	15,56	18,83	11,54
1830,8981	RPVKVYPNGAEDESAEA	c17	54,09	60,14	40,59
1915,9185	RPVKVYPNGAEDESAEAF- NH_3	a18-17	74,47	9,10	ND
1932,945	RPVKVYPNGAEDESAEAF	a18	38,14	69,39	38,98
1960,9399	RPVKVYPNGAEDESAEAF	b18	45,44	54,64	27,72
2029,9978	RPVKVYPNGAEDESAEAF	a19	31,84	13,17	8,31
2046,9655	VKVYPNGAEDESAEAFPLE	IF	31,52	16,83	ND
2057,9927	RPVKVYPNGAEDESAEAF	b19	7,48	14,18	ND
2075,0192	RPVKVYPNGAEDESAEAF	c19	40,48	21,60	21,65
2101,0349	RPVKVYPNGAEDESAEAFPL	da20	ND	12,30	ND
2143,0818	RPVKVYPNGAEDESAEAFPL	a20	11,52	16,94	12,98
2171,0768	RPVKVYPNGAEDESAEAFPL	b20	ND	10,27	ND
2188,1033	RPVKVYPNGAEDESAEAFPL	c20	18,25	18,55	11,10
Ukupan broj detektiranih fragmenata (maksimalan broj 38)			33/38	36/38	33/38

S/N – omjer visine signala i kemijskog šuma, ND – nije detektiran, IF – interni fragment

U prvom stupnju MS-analize djelovanjem svakog od inicijatora fragmentacije nastala su tri iona čiji je omjer $S/N > 100$. Navedeni omjer S/N definira pogodnost iona za daljnje fragmentacijske studije tandemnom spektrometrijom masa (nastanak pseudo MS^3).

Derivati sulfonske kiseline 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamid, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonil-klorid i 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfon poboljšali su fragmentaciju daptomicina u izvoru iona spektrometra masa, kao što je prikazano na Slici 26.



Slika 26. MALDI-TOF spektar masa daptomicina s označenim ionima produktima: (a) bez dodatka inicijatora fragmentacije, (b) nakon dodatka 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonil-klorida koncentracije 5 mg ml^{-1} , (c) nakon dodatka 3,5-di-*tert*-butilsulfonamida koncentracije 1 mg ml^{-1} i (d) nakon dodatka 3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfona koncentracije 10 mg ml^{-1} . Brojevi označavaju strukture iona produkata prikazane u Tablici D1 u Dodatku.

Tablica 10. Usporedba intenziteta signala fragmenata daptomicina nastalih u izvoru iona bez dodatka inicijatora fragmentacije i s dodatkom derivata sulfonske kiseline 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonil-klorida, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamida, i (3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfona (pripadajući spektri prikazani su na Slici 26, a strukture nastalih iona u Tablici D1 u *Dodatku*).

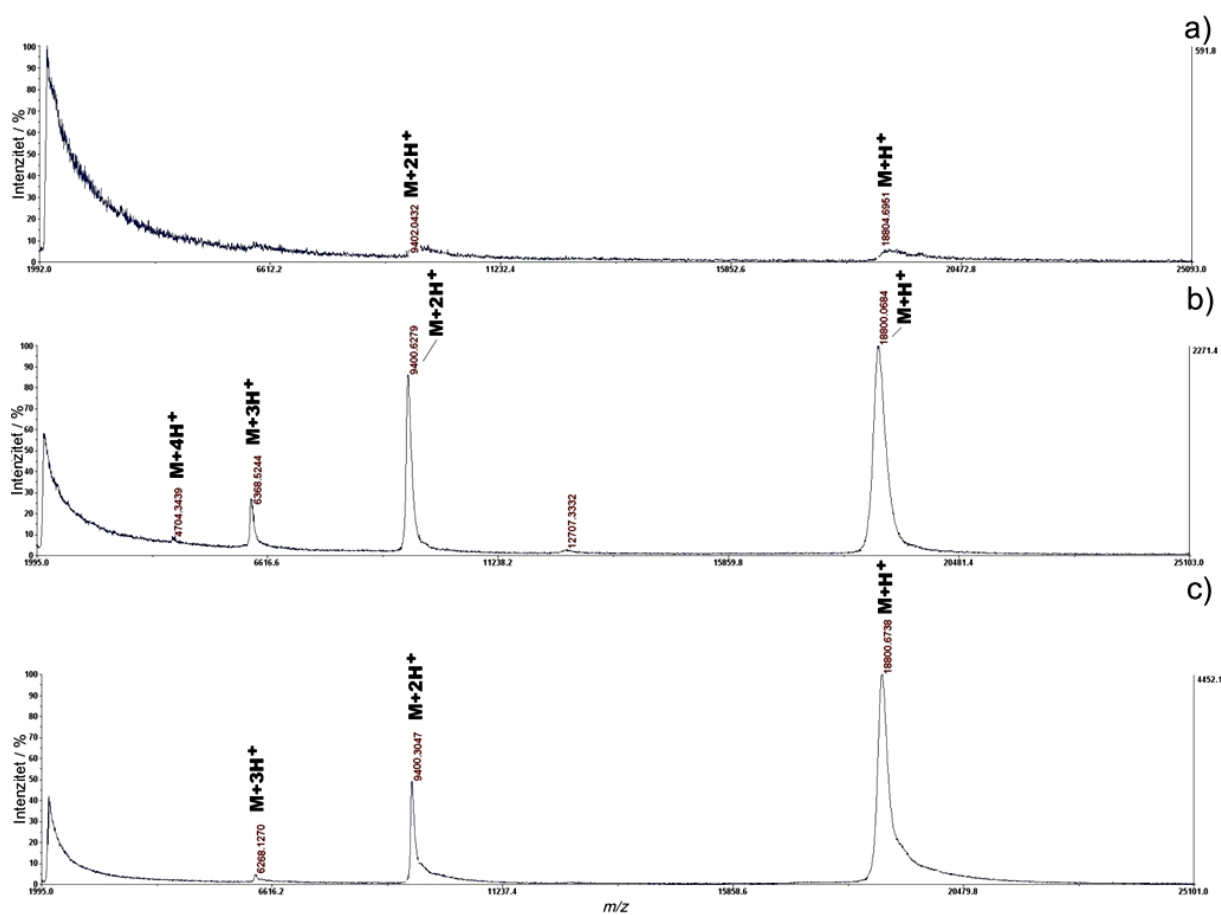
<i>m/z</i>	Fragment peptidnog iona daptomicina	Ion fragment	Bez dodatka derivata sulfonske kiseline	S/N		
				Dodan 3,5-di-(<i>tert</i> -butil)-benzen-sulfonil-klorid	Dodan 5-di-(<i>tert</i> -butil)-benzen-sulfonamid	Dodan 3,5-di-(<i>tert</i> -butil)-fenilfenil-sulfon
1505,6755	2	IF	ND	21,64	106,61	44,82
1491,6598	3	x	17,73	152,03	105,27	57,93
1489,6440	4	IF	ND	ND	16,94	ND
1466,5818	5	y	17,07	ND	24,22	34,60
1449,5553	6	z	14,95	158,17	78,20	37,10
1336,5288	7	IF	28,03	140,57	106,60	410,28
1318,5188	7-H ₂ O	IF-18	ND	ND	10,09	11,15
1306,4829	8	x	27,09	61,08	68,95	278,16
1280,5026	9	y	112,22	381,77	297,90	1257,62
1262,4926	9-H ₂ O	y-18	ND	ND	21,60	163,29
1166,5495	10	y	33,12	18,13	57,89	45,76
1051,4326	12	y	33,03	20,75	42,77	25,73
1033,4226	12-H ₂ O	y-18	11,78	20,65	11,13	19,59
Ukupan broj detektiranih fragmenata (maksimalan broj 13)			9/13	9/13	13/13	12/13

S/N – omjer visine signala i kemijskog šuma, IF – interni fragment, ND – nije detektiran

Intenziteti signala detektiranih iona produkata u rasponu masa od 1000 Da do 1620 Da u kojem je najvidljiviji utjecaj derivata sulfonske kiseline na fragmentaciju daptomicina opisani su u Tablici 10, dok su strukture iona produkata prikazane u Tablici D1 u *Dodatku*.

Osim postojećih iona čiji je intenzitet signala povećan dodatkom navedenih derivata u prvom stupnju MS-analize, u izvoru iona nastali su interni fragmenti degradacijom bočnog lanca triptofana (*m/z* 1489 i *m/z* 1505). Ispitani sulfonamid i sulfon povoljno su utjecali na nastanak y-serije iona uz gubitak vode (smanjenje mase za 18 Da; detektirani ioni *m/z* 1262, *m/z* 1033 i *m/z* 1318). Prema broju novih fragmenata nastalih djelovanjem derivata sulfonske kiseline u izvoru iona u promatranom rasponu masa, najveći učinak imao je 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamid. Od 13 nastalih iona produkata, četiri iona čiji je omjer S/N > 100 bila su pogodna za daljnje fragmentacijske studije tandemnom spektrometrijom masa (nastanak pseudo MS³).

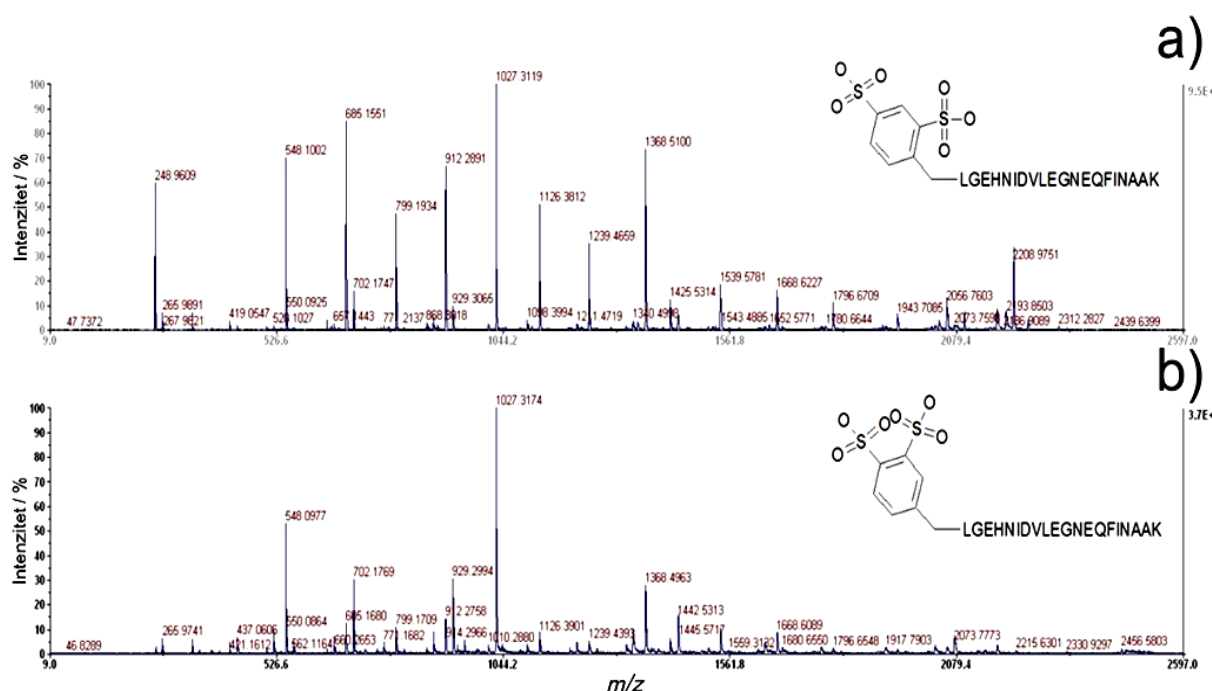
U linearnom načinu rada vidljivi su ioni mase 18,8 kDa, što odgovara intaktnom ionu *rHuG-CSF*, kao i ion mase 9,4 kDa (dvostruko protonirani ion *rHuG-CSF*, Slika 27 a). Dodatak ispitanih sulfonamida i sulfona smjesi proteina i matrice omogućio je višestruki porast intenziteta i simetrije signala u spektru masa (Slika 27 b i c). U spektru masa *rHuG-CSF* uz dodatak 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamida vidljivi su jednostruko, dvostruko, trostruko i četverostruko protonirani ioni *rHuG-CSF*, dok (3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfon omogućava detekciju trostruke protonacije proteina *rHuG-CSF*. Koristeći ionsko zrcalo, nisu zamijećene razlike u spektrima masa s i bez inicijatora fragmentacije, tj. nisu uočeni manji fragmenti proteinskog iona (od 1 Da do 8 kDa).



Slika 27. MALDI-TOF spektar masa *rHuG-CSF* snimljen u linearnom načinu rada spektrometra masa: (a) bez dodatka inicijatora fragmentacije, (b) nakon dodatka 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamida koncentracije 5 mg ml^{-1} i (c) nakon dodatka (3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfona koncentracije 10 mg ml^{-1} pri čemu nastaju višestruko protonirani ioni.

4.2.3. *Kemijsko obilježavanje peptida derivatima disulfonske kiseline*

U svrhu utvrđivanja mehanizma fragmentacije djelovanjem sulfata, posebice persulfata, provedeno je kemijsko obilježavanje peptida te njihovo cijepanje tandemnom spektrometrijom masa u kolizijskoj ćeliji bez uvođenja kolizijskog plina u ćeliju (tzv. „CID OFF“). Peptidni fragmenti nastali autolizom tripsina nakon pročišćavanja (postupak opisan u odjeljku 3.6. *Kemijsko obilježavanje peptida benzaldehid-2,4-disulfonskom kiselinom i benzaldehid-3,4-disulfonskom kiselinom*) obilježeni su koristeći dva derivata disulfonske kiseline koja su se međusobno razlikovala po položaju sulfo-skupina (*ortho*, *para* i *meta*, *para*): benzaldehid-2,4-disulfonskom kiselinom i benzaldehid-3,4-disulfonskom kiselinom. Spektri masa iona produkata nastali cijepanjem triptičkih peptida (u ovom slučaju LGEHNIDVLEGNEQFINAAK) kemijski obilježenih navedenim reagensima snimljeni uz negativnu ionizaciju prikazani su na Slici 28. Budući da je uz negativnu ionizaciju moguće detektirati ione produkte obilježene reagensom, vidljive su samo a-, b- i c-serije iona (a ne i x-, y- i z-serije iona koje ostaju neutralne).



Slika 28. Spektar masa iona produkata nastalih cijepanjem peptida LGEHNIDVLEGNEQFINAAK obilježenog (a) benzaldehid 2,4-disulfonskom kiselinom (*ortho*, *para* položaj sulfonskih skupina i (b) benzaldehid 3,4-disulfonskom kiselinom (*meta*, *para* položaj sulfonskih skupina). Spektri su snimljeni uz negativnu ionizaciju negativnom bez korištenja kolizijskog plina u kolizijskoj ćeliji.

Masa navedenih iona izračunata za detekciju spektrometrijom masa uz pozitivnu ionizaciju uvećana je za $\Delta m/z$ 247,9455 što odgovara masi derivata disulfonske kiseline. Iako je masa oba derivata jednaka, a time i masa obilježenih iona prekursora (izobarne mase), cijepanjem fragmenata tandemnom spektrometrijom masa nisu dobiveni isti fragmentacijski profili (Slika 28 a i b, Tablica 11).

Tablica 11. Detektirani ioni produkti dobiveni fragmentacijom peptida LGEHNIDVLEGNEQFINAAK kemijski obilježenog benzaldehid 2,4-disulfonskom kiselinom (*o, p*) i benzaldehid 3,4-disulfonskom kiselinom (*m, p*). Spektri masa prikazani su na Slici 28.

<i>m/z</i>	Fragment peptidnog iona	Fragmentni ion	S/N	
			<i>o, p</i> -peptid	<i>m, p</i> -peptid
520,10598	LG	a2	55,94	121,83
657,16488	LGE	a3	70,66	84,21
771,20778	LGEH	a4	39,35	50,92
884,29188	LGEHN	a5	115,97	79,99
999,31878	LGEHNI	a6	ND	7,88
1098,38718	LGEHNID	a7	79,25	39,33
1211,47128	LGEHNIDV	a8	55,73	42,33
1340,51388	LGEHNIDVL	a9	63,68	100,51
1397,53538	LGEHNIDVLE	a10	6,07	9,28
1511,57828	LGEHNIDVLEG	a11	15,89	10,32
1640,62088	LGEHNIDVLEGN	a12	22,89	39,06
1768,67948	LGEHNIDVLEGNE	a13	23,23	29,62
1915,74788	LGEHNIDVLEGNEQ	a14	20,17	8,96
2028,83188	LGEHNIDVLEGNEQF	a15	27,35	18,02
2142,87488	LGEHNIDVLEGNEQFI	a16	ND	13,36
2213,91198	LGEHNIDVLEGNEQFIN	a17	26,9	11,93
2284,94908	LGEHNIDVLEGNEQFINA	a18	8,33	ND*
419,05828	L	b1	126,02	68,47
548,10088	LG	b2	2201,88	686,96
685,15978	LGE	b3	2347,75	144,24
799,20268	LGEH	b4	1162,47	113,26
912,28678	LGEHN	b5	1473,22	134,66
1027,31368	LGEHNI	b6	2168,99	1038,48
1126,38218	LGEHNID	b7	1041,13	75,28
1239,46618	LGEHNIDV	b8	692,16	44,45
1425,53028	LGEHNIDVLE	b10	251,12	58,24
1539,57318	LGEHNIDVLEG	b11	387,07	57,89
1668,61578	LGEHNIDVLEGN	b12	338,01	72,93
1796,67438	LGEHNIDVLEGNE	b13	249,27	24,16
1943,74278	LGEHNIDVLEGNEQ	b14	125,04	ND
2056,82688	LGEHNIDVLEGNEQF	b15	241,76	17,14
2170,86978	LGEHNIDVLEGNEQFI	b16	190,28	15,37
2241,90688	LGEHNIDVLEGNEQFIN	b17	89,47	ND

Tablica 11. Nastavak s prethodne stranice.

<i>m/z</i>	Fragment peptidnog iona	Fragmentni ion	<i>S/N</i>	
			<i>o, p-peptid</i>	<i>m, p-peptid</i>
1368,50878	LGEHNIDVL	b9	1473,59	272,66
379,06338	L	c1	13,04	21,91
436,08488	LG	c2	12,14	11,00
565,12738	LGE	c3	28,81	20,04
702,18638	LGEH	c4	418,5	370,34
929,31328	LGEHNI	c6	232,72	339,26
1044,34028	LGEHNID	c7	8,66	10,87
1143,40868	LGEHNIDV	c8	10,99	9,52
1256,49278	LGEHNIDVL	c9	ND	12,66
1385,53538	LGEHNIDVLE	c10	ND	7,45
1442,55678	LGEHNIDVLEG	c11	134,49	155,61
1685,64228	LGEHNIDVLEGNE	c13	ND	6,18
2073,85338	LGEHNIDVLEGNEQFI	c16	33,34	55,81
2329,97058	LGEHNIDVLEGNEQFINAA	c19	15,23	ND

S/N – omjer visine signala i kemijskog šuma, ND – nije detektiran

Koristeći disulfonsku kiselinu sa sulfo-skupinama u *o, p*-položaju najintenzivnija je serija uzastopnih iona b-serije (Tablica 11). Uz b-seriju iona, uočene su i a- i c-serije iona (značajno manjeg intenziteta, uz izostanak uzastopne serije iona). Također je detektiran vrlo intenzivan ion disulfonske kiseline *m/z* 248,9. U slučaju kad je korištena kiselina sa sulfo-skupinom u *m, p*-položaju, osim b-serije iona koja nije najintenzivnija u spektru, uočene su vrlo intenzivne c- i a-serije iona. Većina iona detektirana je u oba pokusa, dok su zamijećeni i ioni karakteristični samo za određeni položaj sulfo-skupina (*o, p*-obilježeni ioni produkti b17 i c19; *m, p* - obilježeni ioni produkti a6, a16, c10 i c9). Kovalentnim vezanjem dviju sulfatnih skupina u susjednim položajima u molekuli (*m, p*-položaj sulfo-skupina) nakon ionizacije nastaje persulfatna veza koja omogućava stvaranje kisikovih radikala tijekom fragmentacije. Kisikovi radikali pogoduju nastajanju više serija iona (a-, b- i c-serije iona) za razliku od željenog učinka slobodnog protona postignutog kod *o, p*-položaja sulfo-skupina obilješanih iona koji gotovo isključivo producira b-seriju iona.

4.3. Utjecaj inicijatora radikala na fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF

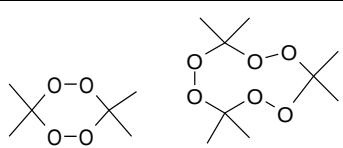
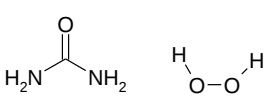
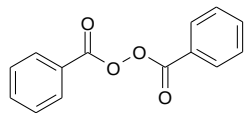
Sljedeća skupina fragmentacijskih eksperimenata obuhvaćala je ispitivanje utjecaja spojeva koji se koriste u različitim kemijskim reakcijama kao inicijatori nastanka radikala na fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF. Korišteni

inicijatori nastanka radikala uključivali su perokside (aceton peroksid, urea peroksid i benzoil-peroksid), benzofenon, trifenilmetil-klorid (tritol-klorid) i azobisisobutironitril (AIBN). Zbog svojstva iniciranja nastanka radikala toplinom ili zračenjem (termoinicijatori ili fotoinicijatori), ispitan je učinak navedenih inicijatora na fragmentaciju iona u izvoru iona spektrometra masa. Kao modelni peptidi korišteni su ACTH, daptomicin, eksenatid, inzulin te protein *rHuG-CSF*.

4.3.1. Peroksidi kao potencijalni inicijatori fragmentacije

Za fragmentacijske studije korištena su tri potencijalna inicijatora fragmentacije iz skupine peroksida; aceton peroksid, urea peroksid i benzoil-peroksid. Njihove koncentracije, kao i učinak na poboljšanje fragmentacije pojedinih peptida opisani su u Tablici 12.

Tablica 12. Peroksidni inicijatori nastanka radikala korišteni kao potencijalni inicijatori fragmentacije peptida na kojima je uočen ili je izostao učinak poboljšanja fragmentacije.

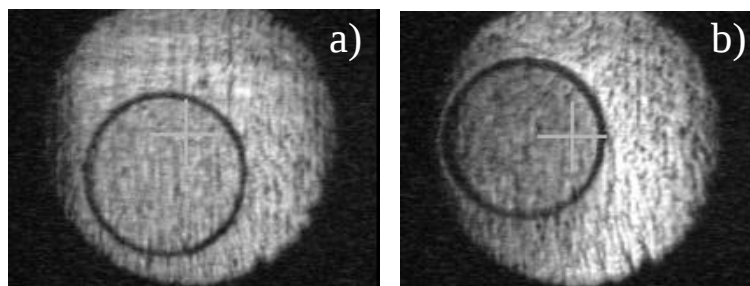
Struktura i kemijsko ime inicijatora	Masena koncentracija/ mg ml ⁻¹			
	10	5	1	0.5
 Aceton peroksid (dimer i trimer)	-	-	-	-
 Urea peroksid	-	-	-	-
 Benzoil-peroksid	-	daptomicin ACTH	daptomicin	daptomicin
-	Nije uočen učinak poboljšanja fragmentacije.			

Aceton peroksid izrazito je reaktivan te je za potrebe eksperimenta prilikom rukovanja sintetiziranom kristalnom supstancijom zbog oksidirajućeg djelovanja na metal korišten plastični laboratorijski pribor. Uzorak je pripremljen nanošenjem smjese daptomicina i matrice

na pločicu koja je otporna na oksidaciju te vrlo male količine uree peroksida. Spektri masa ukazivali su na kemijski šum nastao izuzetno intenzivnom produkcijom kisikovih radikala, ali ne i na signale peptidnih iona i iona matrice. Potom su pripravljene otopine aceton peroksida otapanjem u smjesi acetonitrila i vode u volumnom omjeru 1:1, kao samo u acetonitrilu. Navedene otopine nanosene su na već osušenu smjesu peptida i matrice na MALDI-pločici. Analiza pripremljenih uzoraka pokazala je da dodatkom aceton peroksida otopljenog u acetonitrilu nastaju ioni peptida, dok aceton peroksid otopljen u smjesi acetonitrila i vode ne utječe značajnije na ionizaciju niti poboljšava fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona.

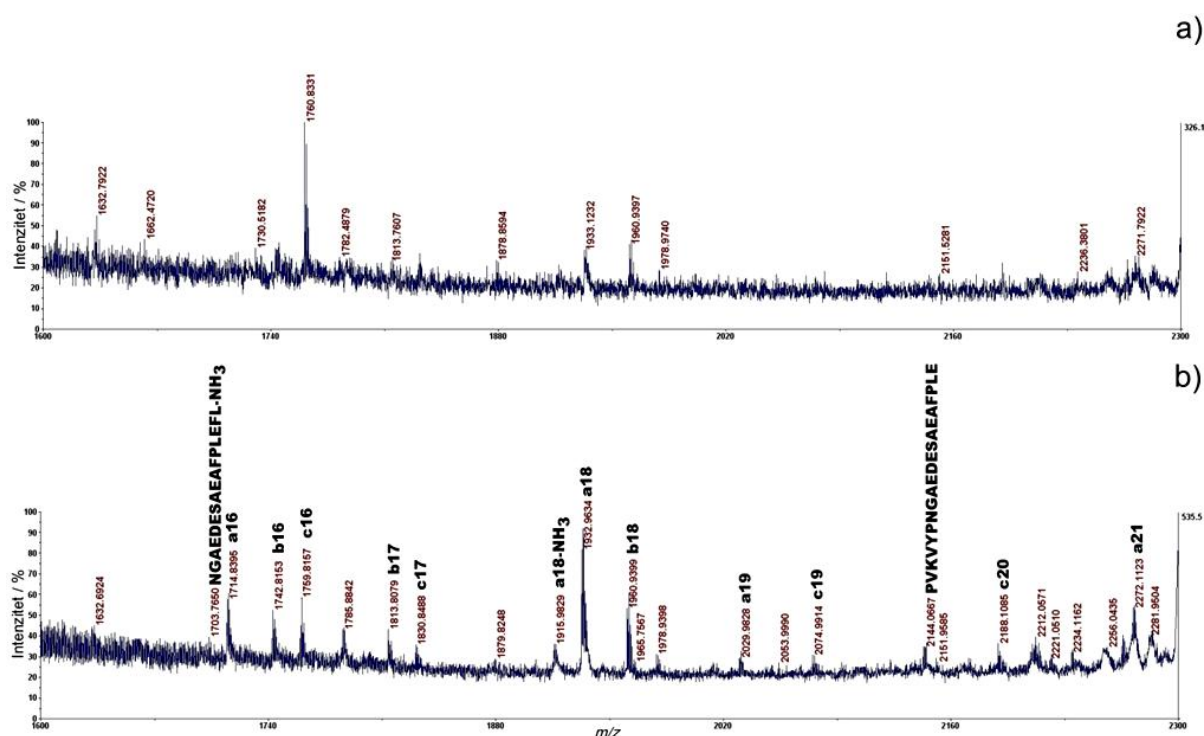
Dodatak urea peroksida na MALDI-pločicu smjesi daptomicina, ACTH ili eksenatida i matrice u ispitanim masenim koncentracijama (10, 5, 1 i 0,5 mg ml⁻¹) nije utjecao na nastanak novih peptidnih fragmenata. Pri višim koncentracijama urea peroksida (10 i 5 mg ml⁻¹) došlo je do supresije ionizacije najintenzivnijeg iona u spektru masa (molekulskog iona) i iona produkata nastalih u izvoru iona koji su postojali i bez dodatka uree peroksida. Uz supresiju ionizacije zabilježen je i značajniji porast kemijskog šuma. Pri nižim koncentracijama (1 i 0,5 mg ml⁻¹) nisu postojale značajnije razlike među fragmentacijskim profilima peptida prije i nakon dodatka inicijatora fragmentacije.

Za razliku od navedenih peroksida, najveći utjecaj na poboljšanje fragmentacije u izvoru iona zabilježen je korištenjem organskog fotoinicijatora benzoil-peroksida. Eksperimentalno je utvrđeno da benzoil-peroksid u koncentraciji 5 i 1 mg ml⁻¹ utječe na povećanje intenziteta signala već postojećih fragmenata peptida ACTH nastalih u izvoru iona spektrometra masa u prvom stupnju MS-analize, neovisno o pripremi uzorka (dodatak otopine benzoil-peroksida u matricu prije nanošenja na MALDI-pločicu ili smjesi matrice i peptida na MALDI-pločici ili na osušenu smjesu matrice i peptida na MALDI-pločici). Najveće poboljšanje fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona postignuto je nanošenjem otopine benzoil-peroksida na smjesu matrice i peptida na MALDI-pločici. Razlike u kristalizaciji matrice s dodatkom benzoil-peroksida (Slika 29) nisu utjecale na rezultate MS-analize (npr. na intenzitet signala, omjer intenziteta signala i kemijskog šuma, profil iona ili nastajanje novih peptidnih iona). Utvrđeno je da benzoil-peroksid omogućava poboljšanu fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona pri nižoj laserskoj snazi u odnosu na analizu bez dodatka benzoil-peroksida.



Slika 29. Prikaz razlika u kristalizaciji matrice CHCA u ovisnosti o dodanoj količini inicijatora fragmentacije: (a) smjesa peptida i matrice, (b) dodatak benzoil-peroksida koncentracije 5 mg ml^{-1} smjesi peptida i matrice.

Na Slici 30 prikazan je dio spektra masa ACTH prije i nakon nanošenja benzoil-peroksida na smjesu peptida i matrice s najočitijom razlikom u fragmentacijskom profilu peptida (od 1600 Da do 2300 Da). Nastalo je osam novih peptidnih fragmenata a-serije (a16, a18 - NH_3 , a19), b-serije (b16) i c-serije (c17, c19) iona te internih fragmenata navedenih u Tablici 13. Signali peptidnih iona prisutni u spektru masa ACTH bez dodatka benzoil-peroksida manjeg su intenziteta, a manji je i omjer intenziteta signala i kemijskog šuma. Također je u navedenom području vidljiv nastanak većeg broja metastabilnih iona.



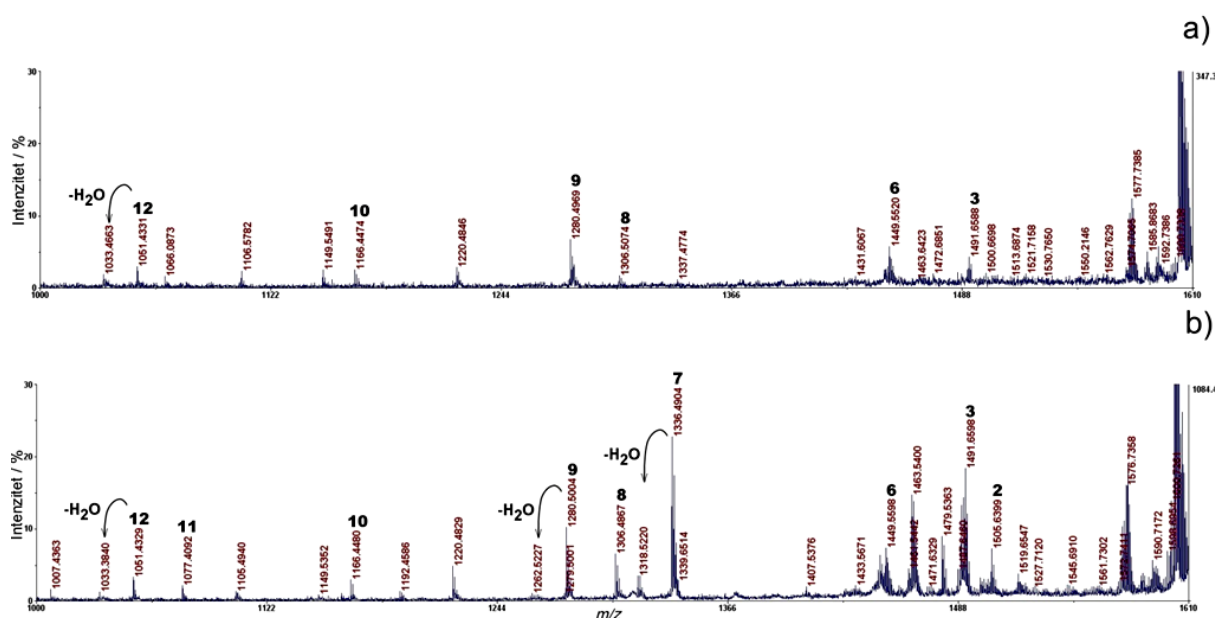
Slika 30. MALDI-TOF spektar masa peptida ACTH s označenim ionima produktima: (a) prije dodatka benzoil-peroksida i (b) nakon dodatka benzoil-peroksida (10 mg ml^{-1}) pri čemu je nastalo osam novih iona produkata.

Tablica 13. Usporedba intenziteta signala fragmenata peptida ACTH nastalih u izvoru iona prije i nakon dodatka benzoil-peroksida (10 mg ml^{-1}). Pripadajući spektri prikazani su na Slici 30.

<i>m/z</i>	Fragment peptidnog iona ACTH	Fragmentni ion	S/N	
			Bez dodatka inicijatora	Dodan benzoil-peroksid
1703,7071	YPNGAEDESAEAFPLE-NH ₃	IF-17	ND	1,62
1714,8395	RPVKVYPNGAEDESAE	a16	ND	31,58
1742,8344	RPVKVYPNGAEDESAE	b16	ND	26,45
1759,8610	RPVKVYPNGAEDESAE	c16	47,22	22,31
1813,8715	RPVKVYPNGAEDESAEA	b17	2,05	21,13
1830,8981	RPVKVYPNGAEDESAEA	c17	ND	18,71
1915,9185	RPVKVYPNGAEDESAEAF-NH ₃	a18-17	ND	11,51
1932,9450	RPVKVYPNGAEDESAEAF	a18	10,42	74,83
1960,9399	RPVKVYPNGAEDESAEAF	b18	12,03	46,70
2029,9978	RPVKVYPNGAEDESAEAFP	a19	ND	14,67
2075,019	RPVKVYPNGAEDESAEAFP	c19	ND	15,41
2144,018	PVKVYPNGAEDESAEAFPLE	IF	ND	11,58
2188,103	RPVKVYPNGAEDESAEAFPL	c20	3,31	14,94
2272,124	RPVKVYPNGAEDESAEAFPLE	a21	7,88	24,21
Ukupan broj detektiranih fragmenata (maksimalan broj 14)			6/14	14/14

S/N – omjer visine signala i kemijskog šuma, IF – interni fragment, ND – nije detektiran

Utjecaj benzoil-peroksida na fragmentaciju cikličkog lipopeptida daptomicina prikazan je na Slici 31.



Slika 31. MALDI-TOF spektar masa daptomicina s označenim ionima produktima čije su strukture prikazane u Tablici D1 u *Dodatku*: (a) prije dodatka inicijatora fragmentacije (b) nakon dodatka benzoil-peroksida koncentracije 5 mg ml^{-1} .

Uočen je nastanak triju novih iona produkta (npr. ion x-serije m/z 1077, uz gubitak vode), kao i povećanje intenziteta signala već postojećih iona (x- i y-serije te internih fragmenata) prikazanih u Tablici 14.

Tablica 14. Usporedba intenziteta fragmenata daptomicina nastalih u izvoru iona prije i nakon dodatka benzoil-peroksida (pripadajući spektri prikazani su na Slici 31, a strukture iona produkata u Tablici D1 u *Dodatku*).

m/z	Fragment peptidnog iona daptomicina	Fragmentni ion	S/N	
			Bez dodatka inicijatora	Dodan benzoil-peroksid
1505,6755	2	IF	ND	64,63
1491,6598	3	x	18,45	113,31
1449,5553	6	z	57,45	57,45
1336,5288	7	IF	10,09	227,96
1318,5188	7-H ₂ O	IF-18	ND	41,14
1306,4829	8	x	17,45	84,47
1280,5026	9	y	86,17	144,83
1262,4926	9-H ₂ O	y-18	ND	12,40
1166,5495	10	y	30,10	44,68
1077,4130	11	x	ND	36,70
1051,4326	12	y	25,58	54,30
1033,4226	12-H ₂ O	y-18	18,20	11,92
Ukupan broj detektiranih fragmenata (maksimalan broj 12)			9/12	12/12

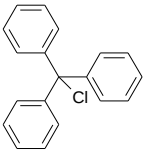
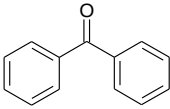
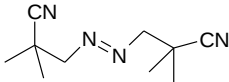
S/N – omjer visine signala i kemijskog šuma, IF – interni fragment, ND – nije detektiran

Dodatkom benzoil-peroksida smjesi matrice i daptomicina na MALDI-pločici uočena značajnija promjena u fragmentacijskom profilu daptomicina. U oba spektra masa (s i bez dodatka benzoil-peroksida) zamijećeni su ioni istog omjera mase i naboja, ali zamjetno manjeg intenziteta u slučaju dodatka benzoil-peroksida. Detektiran je i fragment koji upućuje na degradaciju bočnog ogranka triptofana (m/z 1505). Strukture nastalih iona produkata prikazane su u Tablici D1 u *Dodatku*. Obzirom na intenzitet iona produkata ($S/N > 100$) nastalih djelovanjem benzoil-peroksida u prvom stupnju MS-analize, za daljnje fragmentacijske analize tandemnom spektrometrijom masa (pseudo MS³) mogu se koristiti tri iona, dok bez dodatka benzoil-peroksida niti jedan ion nije bio dostatnog intenziteta da bi se mogao dodatno fragmentirati (pseudo MS³). Također je uočeno da benzoil-peroksid suprimira ionizaciju *rHuG-CSF*, kako u linearnom načinu rada spektrometra masa (u rasponu masa od 8 do 25 kDa), tako i uz korištenje ionskog zrcala (u rasponu masa od 1 kDa do 8 kDa).

4.3.2. Inicijatori nastanka radikala kao potencijalni inicijatori fragmentacije

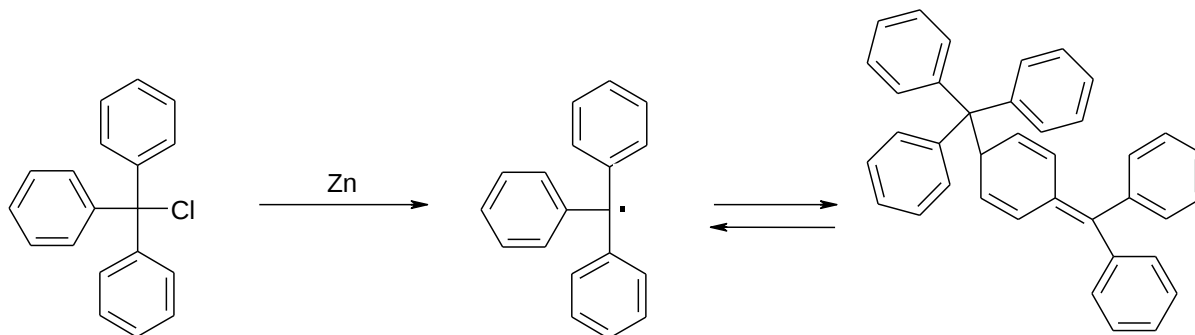
Osim peroksida, za poboljšanje fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF korišteni su benzofenon, trifenilmetil-klorid i azobisisobutironitril (Tablica 15). Navedeni potencijalni inicijatori fragmentacije pripremljeni su u četiri različite masene koncentracije (10, 5, 1 i 0,5 mg ml⁻¹). Potencijalni inicijatori fragmentacije dodani su u smjesu peptida i matrice prije nanošenja na pločicu te na smjesu peptida i matrice na pločici, kao što je opisano u odjeljku 3.5. *Nanošenje uzoraka na MALDI-pločicu.*

Tablica 15. Inicijatori nastanka radikala korišteni kao potencijalni inicijatori fragmentacije peptidnih iona te peptidi na kojima je uočen ili je izostao učinak poboljšanja fragmentacije.

Struktura i kemijsko ime inicijatora	Masena koncentracija/ mg ml ⁻¹			
	10	5	1	0.5
 Trifenilmetil-klorid	-	-	-	-
 Benzofenon	daptomicin ACTH	daptomicin ACTH	daptomicin ACTH	daptomicin ACTH
 Azobisisobutironitril	-	-	-	-
- Nije uočen učinak na poboljšanje fragmentacije.				

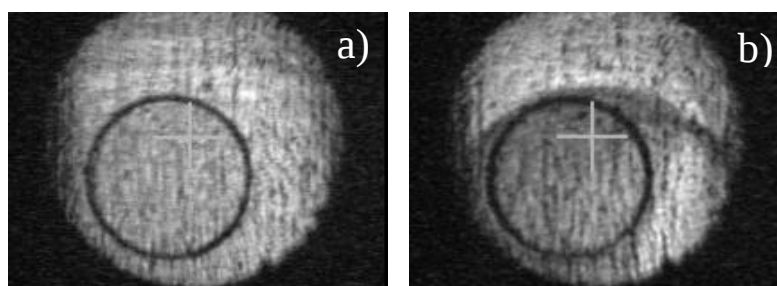
Trifenilmetil-klorid je pripremljen u određenim koncentracijama otapanjem u acetonitrilu te je nanesen na smjesu daptomicina i matrice prije i nakon nanošenja na pločicu (u dva odvojena pokusa). Budući da nisu zamijećeni značajniji učinci na poboljšanje fragmentacije, nastanak trifenilmetil-radikala potenciran je na način detaljnije opisan u odjeljku 3.4.2. *Priprava inicijatora radikala.* Trifenilmetil-klorid koncentracije 10 mg ml⁻¹ pripremljen je otapanjem u acetonitrilu. Otopini je dodana granula cinka koja je uklonjena nakon 1 minute. Otopina je promijenila boju iz bezbojne u žutu, što ukazuje na nastanak

trifenilmetil-radikala (Slika 32). Žuta otopina cinka i trifenilmetil-klorida dodana je na smjesu određenog peptida (daptomicina i ACTH) i matrice na pločici. Dobiveni spektri masa ukazivali su na supresiju ionizacije svih detektiranih peptidnih iona te nije uočen nastanak novih iona produkata.



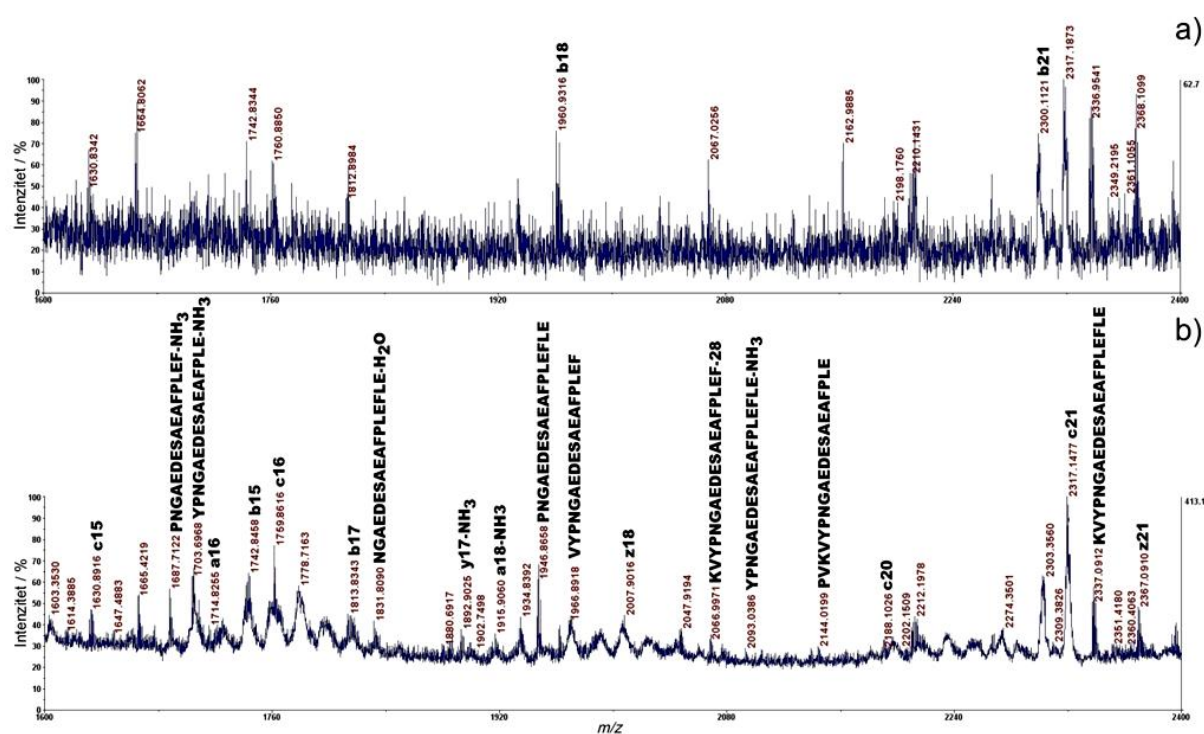
Slika 32. Nastajanje trifenilmetil-radikala u otopini.

Fotoinicijator benzofenon pripravljen je u ispitivanim masenim koncentracijama otapanjem u acetonitrilu te je dodan u smjesu određenog peptida i matrice prije nanošenja na pločicu. Osim toga je, u odvojenom eksperimentu, nanesen na smjesu peptida i matrice na pločici. Kao modelni peptidi korišteni su ACTH, daptomicin i inzulin te protein *rHuG-CSF*. Uočena je razlika u kristalizaciji matrice s dodatkom i bez dodatka benzofenona (Slika 33), što nije imalo utjecaj na analizu spektrometrijom masa. Poboljšana fragmentacija uočena je u pokusima u kojima je benzofenon dodan na smjesu peptida i matrice na MALDI-pločici.



Slika 33. Prikaz razlika u kristalizaciji matrice CHCA ovisno o dodanoj količini inicijatora fragmentacije: (a) smjesa peptida i matrice, (b) dodatak 5 mg ml^{-1} benzofenona smjesi peptida i matrice.

Snimljeni su spektri masa peptida ACTH prije i nakon dodatka benzofenona te je uočeno da benzofenon u koncentraciji 10 i 5 mg ml⁻¹ smanjuje kemijski šum, pogoduje nastanku novih iona produkata (Slika 34, Tablica 16), ali i nastanku metastabilnih iona koji nisu prisutni u referentnom uzorku u koji nije dodan inicijator fragmentacije. Detaljnijom analizom identificirano je 11 novonastalih iona produkata u prvom stupnju MS-analize (internih fragmenata te iona a-, y- i c-serije) čiji je intenzitet signala bio ispod granice $S/N > 100$ neophodne za daljnje analize tandemnom spektrometrijom masa (pseudo MS³).



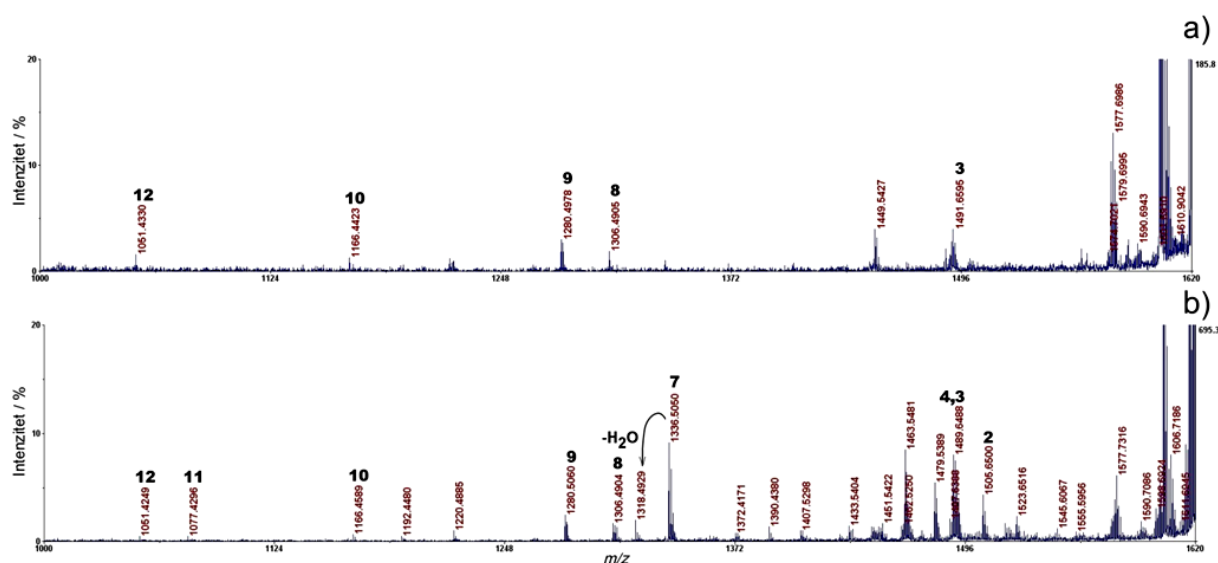
Slika 34. MALDI-TOF/TOF spektar masa ACTH s označenim ionima fragmentima (a) prije dodatka i (b) nakon dodatka benzofenona koncentracije 5 mg ml⁻¹ pri čemu je nastalo 11 novih iona produkata.

Tablica 16. Usporedba intenziteta signala fragmenata ACTH nastalih u izvoru iona s dodatkom i bez dodatka benzofenona (pripadajući spektri na Slici 34).

<i>m/z</i>	Fragment peptidnog iona ACTH	Fragmentni ion	S/N	
			Bez dodatka inicijatora	Dodan benzofenon
1630,8184	RPVKVYPNGAEDESA	c15	10,71	16,44
1687,7122	PNGAEDESAEAFPLEF-NH ₃	IF-17	ND	36,20
1703,7071	YPNGAEDESAEAFPLE-NH ₃	IF-17	ND	36,76
1714,8395	RPVKVYPNGAEDESAE	a16	ND	11,62
1742,8344	RPVKVYPNGAEDESAE	b16	16,79	16,85
1759,861	RPVKVYPNGAEDESAE	c16	10,80	44,39
1813,8715	RPVKVYPNGAEDESAEA	b17	10,99	14,52
1831,8021	NGAEDESAEAFPLEFLE-H ₂ O	IF-18	ND	21,83
1892,8549	RPVKVYPNGAEDESAEA-NH ₃	y17-17	ND	23,54
1915,9185	RPVKVYPNGAEDESAEAF-NH ₃	a18-17	ND	11,48
1946,8654	PNGAEDESAEAFPLEFLE	IF	ND	57,76
1960,9399	RPVKVYPNGAEDESAEAF	IF	21,70	ND
1966,8705	VYPNGAEDESAEAFPLEF	IF	ND	14,25
2007,9056	RPVKVYPNGAEDESAEAF	z18	11,58	13,35
2066,9706	KVYPNGAEDESAEAFPLEF-CO	IF-28	ND	19,21
2092,9022	YPNGAEDESAEAFPLEFLE-NH ₃	IF-17	ND	10,16
2144,0182	PVKVYPNGAEDESAEAFPLE	IF	ND	10,48
2188,1033	RPVKVYPNGAEDESAEAF	c20	ND	12,98
2300,1194	RPVKVYPNGAEDESAEAFPL	b21	12,41	15,46
2317,1459	RPVKVYPNGAEDESAEAFPL	c21	11,67	61,32
2337,0921	KVYPNGAEDESAEAFPLEFLE	IF	30,65	63,94
2367,0901	RPVKVYPNGAEDESAEAFPL	z21	12,34	15,29
Ukupan broj detektiranih fragmenata (maksimalan broj 22)			10/22	21/22

S/N – omjer visine signala i kemijskog šuma, IF – interni fragment, ND – nije detektiran

Dodatkom benzofenona smjesi daptomicina i matrice na MALDI-pločici nastalo je novih 11 iona produkata u izvoru iona u prvom stupnju MS-analize koji nisu prisutni u referentnom uzorku. Nastali ioni pripadaju internim fragmentima te x-, y- i c-seriji iona (Slika 35, Tablica 17). Također je zamijećen nastanak iona produkata koji sadrže modifikaciju bočnog lanca triptofana (*m/z* 1489 i *m/z* 1505). Strukture nastalih iona daptomicina prikazane su u Tablici D1 u *Dodatku*.



Slika 35. MALDI-TOF spektar masa daptomicina s označenim ionima produktima (strukture su prikazane u Tablici D1 u *Dodatku*): (a) bez dodatka i (b) nakon dodatka benzofenona koncentracije 5 mg ml⁻¹ pri čemu su nastala su četiri nova iona produkta.

Tablica 17. Usporedba intenziteta fragmenata daptomicina nastalih u izvoru iona prije i nakon dodatka benzofenona (pripadajući spektri prikazani su na Slici 35, a strukture iona produkata u Tablici D1 u *Dodatku*).

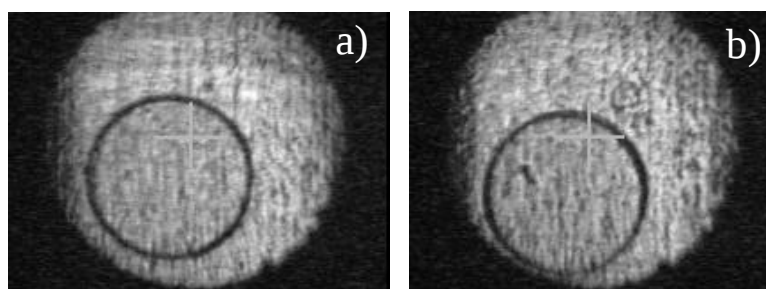
m/z	Fragment peptidnog iona daptomicina*	Fragmentni ion	S/N	
			Bez dodatka inicijatora	Dodan benzofenon
1505,6755	2	IF	ND	49,21
1491,6598	3	x	27,71	53,56
1489,6440	4	IF	ND	89,81
1336,5288	7	IF	ND	14,07
1318,5188	7-H ₂ O	IF-18	ND	32,12
1306,4829	8	x	14,78	31,18
1280,5026	9	y	29,35	56,72
1166,5495	10	y	13,30	ND
1077,4130	11	x	ND	16,03
1051,4326	12	y	12,23	16,72
Ukupan broj detektiranih fragmenata (maksimalan broj 10)			5/10	9/10

S/N – omjer visine signala i kemijskog šuma, IF – interni fragment, ND – nije detektiran

Dodatkom benzofenona smjesi matrice i inzulina na MALDI-pločici fragmentacijski profil inzulina se nije značajnije promjenio. Ioni produkti istog omjera mase i naboja bili su prisutni u oba spektra (prije i nakon dodatka benzofenona), ali značajno manjeg intenziteta u slučaju dodatka benzofenona. Također je uočeno da benzofenon suprimira ionizaciju proteina *rHuG-CSF* ukoliko je dodan smjesi proteina i matrice na pločici i u linearnom načinu rada

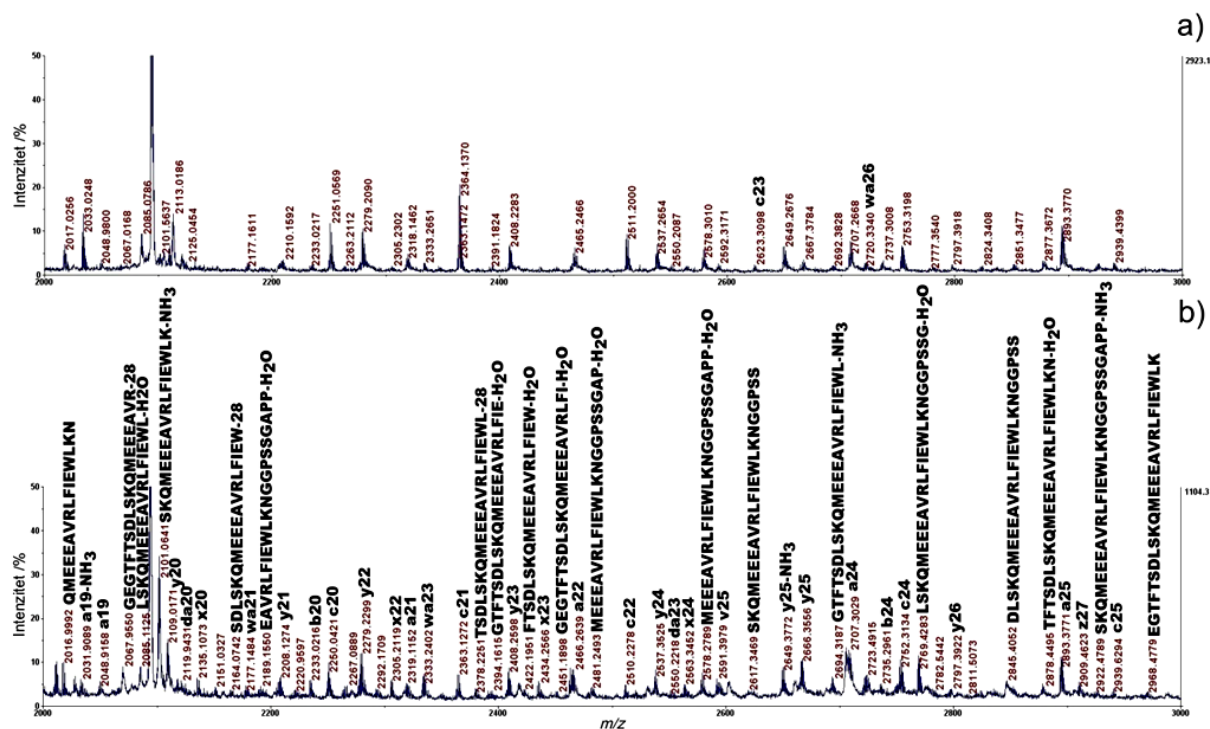
spektrometra masa (raspon masa od 8 kDa do 25 kDa) i uz korištenje ionskog zrcala (raspon masa od 1 kDa do 8 kDa).

Za ispitivanje poboljšanja fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona korišten je i azobisisobutironitril (AIBN). Otopina azobisisobutironitrila u acetonitrilu u ispitanim masenim koncentracijama nanosena je na smjesu peptida i matrice na MALDI-pločicu. Kao modelni peptidi korišteni su ACTH, daptomicin, ekstenatid, inzulin te protein *rHuG-SCF*. Analiza spektrometrijom masa pokazala je da AIBN ne utječe povoljno na fragmentaciju peptidnih iona nijednog od ispitanih peptida ili proteina u izvoru iona, već suprimira ionizaciju. Stoga je uz AIBN na smjese matrice i peptida daptomicina, ekstenatida te inzulina na pločici nanosena 30 mmol l⁻¹ vodena otopina amonijevog persulfata. Kao što je vidljivo na Slici 36, nisu uočene značajnije razlike u kristalizaciji matrice prije i nakon dodatka smjese inicijatora fragmentacije.



Slika 36. Prikaz razlika u kristalizaciji matrice CHCA ovisno o dodanom inicijatoru fragmentacije: (a) smjesa peptida i matrice, (b) dodatak AIBN/APS smjesi peptida i matrice.

AIBN djeluje kao inicijator nastajanja radikala u otopini, ali se i u plinovitoj fazi u izvoru iona spektrometra masa pokazao vrlo učinkovitim u kombinaciji s amonijevim persulfatom, posebice za poboljšanje fragmentacije ekstenatida (Slika 37, Tablica 18). U promatranom rasponu masa od 2000 Da do 3000 Da dodatkom azobisisobutironitrila i amonijevog persulfata kao inicijatora fragmentacije nastalo je 20 novih fragmenata a- i x-serije iona te internih fragmenata (Tablica 18). Također je uočen nastanak metastabilnih iona. Iako su u slučaju daptomicina u prvom stupnju MS-analize nastali ioni produkti koji nisu prisutni u referentnom spektru masa (bez dodatka inicijatora fragmentacije), broj i intenzitet signala nastalih iona bili su manji nego bez dodatka amonijevog persulfata.



Slika 37. MALDI-TOF spektar masa eksenatida s označenim ionima produktima (a) prije dodatka i (b) nakon dodatka smjese azobisizobutironitrila i amonijevog persulfata pri čemu je nastalo 20 novih iona produkata.

Tablica 18. Usporedba intenziteta fragmenata eksenatida nastalih u izvoru iona prije i nakon dodatka azobisizobutironitrila i amonijevog persulfata (pripadajući spektri prikazani su na Slici 37).

m/z	Fragment peptidnog iona ACTH	Fragmentni ion	S/N	
			Bez dodatka inicijatora	Dodan AIBN/APS
2017,0212	QMEEEEAVRLFIEWLKN	IF	46,68	63,58
2031,8964	HGEGTFTSDLSKQMEEEAV-NH ₃	a19-17	ND	27,15
2048,9230	HGEGTFTSDLSKQMEEEAV	a19	17,05	16,90
2067,9652	GEGTFTSDLSKQMEEEAVR-CO	IF-28	11,72	15,91
2085,0838	LSKQMEEEAVRLFIEWL-H ₂ O	IF-18	39,93	18,01
2101,0787	SKQMEEEAVRLFIEWLK-NH ₃	IF-17	25,56	137,82
2109,1240	RLFIEWLKNGPSSGAPPPS	y20	12,27	55,84
2119,9601	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVR	d ₂₀	12,74	18,33
2135,1032	RLFIEWLKNGPSSGAPPPS	x20	ND	32,65
2164,0743	SDLSKQMEEEAVRLFIEW-CO	IF-28	ND	11,51
2177,1502	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRL	w ₂₁	10,02	17,82
2189,1502	EAVRLFIEWLKNGPSSGAPP-H ₂ O	IF-18	ND	10,68
2208,1924	VRLFIEWLKNGPSSGAPPPS	y21	ND	28,35
2233,0190	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVR	b20	13,58	10,23
2250,0455	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVR	c20	46,14	45,19
2279,2295	AVRLFIEWLKNGPSSGAPPPS	y22	87,45	69,22

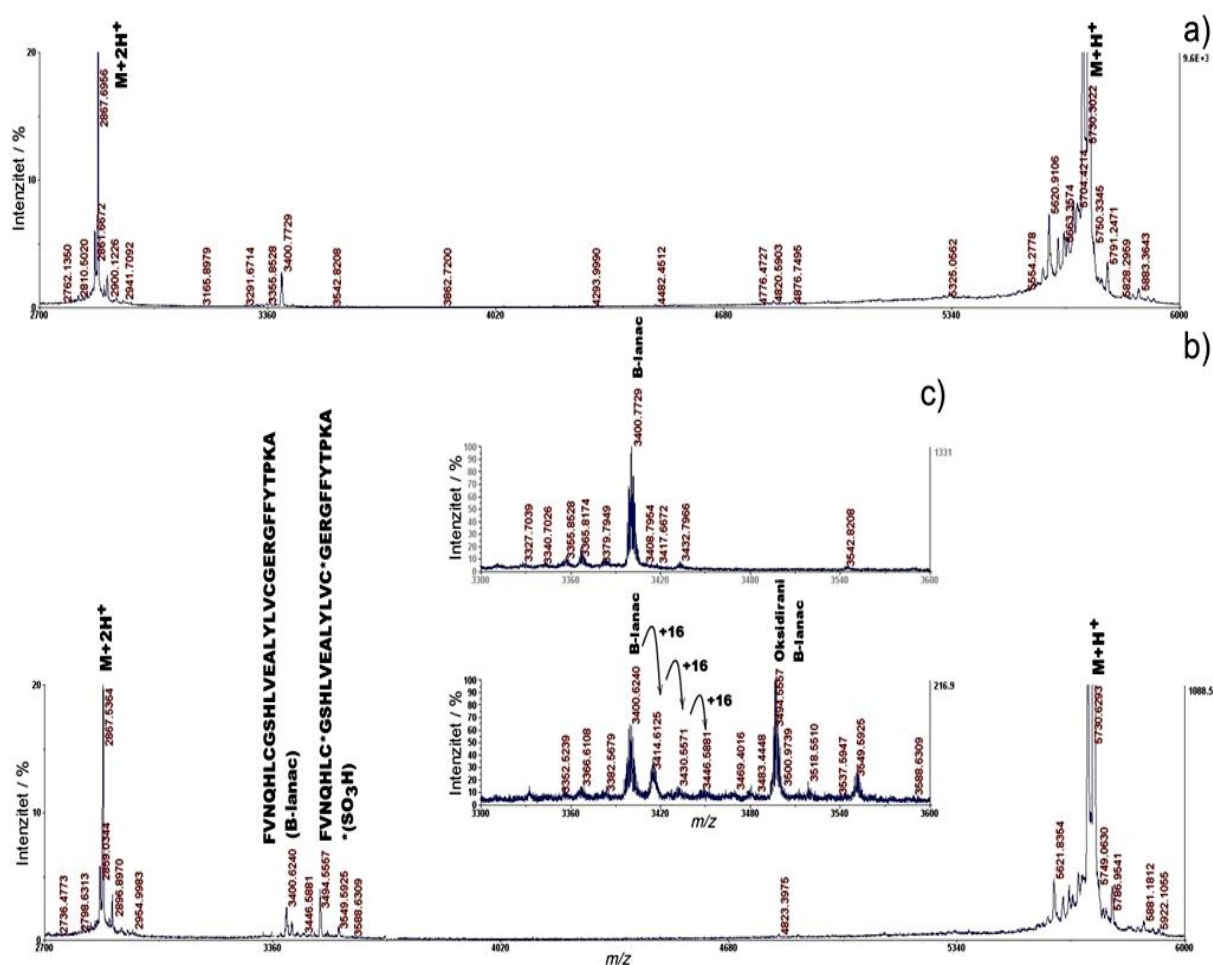
Tablica 18. Nastavak s prethodne stranice.

<i>m/z</i>	Fragment peptidnog iona ACTH	Fragmentni ion	S/N	
			Bez dodatka inicijatora	AIBN/APS
2305,2088	AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	x22	10,49	35,01
2318,1081	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRL	a21	26,85	18,37
2333,2401	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLF	w _a 23	25,09	28,64
2363,1296	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRL	c21	37,63	21,85
2378,2061	TSDLSKQMEEEEAVRLFIEWL-CO	IF-28	ND	17,40
2394,1646	EGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIE-H ₂ O	IF-18	ND	10,84
2394,1646	GTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIE-H ₂ O	IF-18	ND	10,84
2408,2721	AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	y23	59,39	44,64
2422,1748	FTSDLSKQMEEEEAVRLFIEW-H ₂ O	IF-18	ND	13,57
2434,2514	AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	x23	ND	21,39
2451,1861	GEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIE-H ₂ O	IF-18	ND	11,88
2466,1765	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLF	a22	42,66	29,83
2481,2231	MEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAP-H ₂ O	IF-18	ND	20,05
2510,1980	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLF	c22	12,77	22,18
2537,3147	EAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	y24	51,71	37,21
2550,2293	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLF	d _a 23	12,11	10,38
2563,2940	EAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	x24	ND	24,33
2578,2759	MEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAP-H ₂ O	IF-18	34,43	36,56
2592,3205	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLF	v25	12,49	23,30
2617,3079	SKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSS	IF	ND	11,26
2623,2821	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLF	c23	12,05	ND
2666,3573	EEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	y25	26,41	39,29
2692,3366	EEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	x25	11,46	16,29
2694,3771	GTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEW-NH ₃	IF-17	ND	18,54
2707,3032	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIE	a24	51,54	44,17
2720,3679	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWL	w _a 26	18,56	19,88
2735,2981	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIE	b24	11,88	10,94
2752,3247	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIE	c24	41,74	55,59
2769,4029	LSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSG-H ₂ O	IF-18	ND	68,55
2797,3978	MEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	y26	20,50	19,75
2878,4444	TFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKN-H ₂ O	IF-18	ND	12,26
2893,3825	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEW	a25	87,65	88,55
2909,4376	QMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	z27	ND	28,89
2922,4455	SKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAP-NH ₃	IF-17	ND	13,05
2938,404	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEW	c25	12,67	15,84
2964,4196	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWL	d _a 26	ND	12,40
2968,4761	EGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLK	IF	ND	13,57
Ukupan broj detektiranih fragmenata (maksimalan broj 53)			32/53	52/53

S/N – omjer visine signala i kemijskog šuma, IF – interni fragment, ND – nije detektiran

Neočekivani učinak primijećen je nakon dodatka azobisisobutironitrila i amonijevog persulfata smjesi matrice i inzulina na MALDI-pločici. Uslijed djelovanja navedenih inicijatora fragmentacije u izvoru iona spektrometra masa došlo je do oksidacije B-lanca

inzulina (Slika 38 b i c). Budući da signali iona neoksidiranog B-lanca podjednako intenziteta u oba spektra (prije i nakon dodatka smjese inicijatora fragmentacije), zaključeno je da je došlo do cijepanja disulfidnih veza i višestrukih oksidacija sumpora na bočnom ogranku cisteina (porast mase za 16 Da za svaki vezani kisik), kao što je prikazano na Slici 38 c.



Slika 38. (a) MALDI-TOF spektar masa inzulina prije dodatka inicijatora fragmentacije, (b) nakon dodatka azobisisobutironitrila i amonijevo persulfata dolazi do cijepanja disulfidnih veza između dvaju lanaca i (c) višestruke oksidacije cisteina.

Osim navedenog, u spektru masa vidljiv je i signal potpuno oksidiranog B-lanac (dva atoma kisika vezana na svaki sumpor cisteina koji su tvorili intermolekulske disulfidne veze, tj. umjesto -SH skupine nastala je -SO₃H skupina).

§ 5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj svojstva peptida i proteina na fragmentaciju iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF

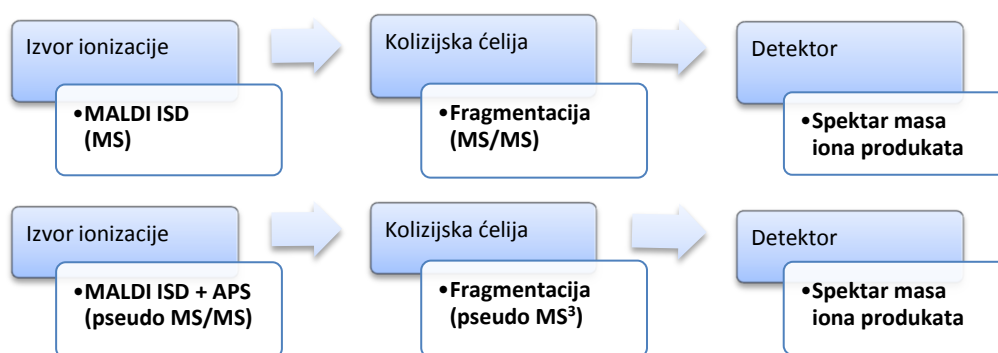
Iako je MALDI nedestruktivna ionizacijska tehnika i omogućuje desorpciju i ionizaciju polarnih, nehlapljivih i termički nestabilnih makromolekula poput peptida i proteina bez dekompozicije u izvoru iona, manja populacija iona ipak je podložna dekompoziciji.³⁸ Proces dekompozicije iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF neovisan je o veličini molekule te se stoga ISD koristi kao analitički alat za određivanje terminalnog slijeda aminokiselina, identifikaciju proteina i karakterizaciju posttranslacijskih modifikacija pristupom odozgor nadolje.⁸³ Upotrebom ISD moguće je odrediti cjelokupni slijed aminokiselina manjih peptida ili primarnu strukturu C-kraja i N-kraja manjih linearnih proteina (18 kDa).^{84,85} Fragmentacijom intaktnih proteina poput goveđeg serumskog albumina BSA (66 kDa) ili humanog apotransferina (75 kDa) u izvoru iona pristupom odozgor nadolje nije moguće u potpunosti odrediti cjelokupan slijed aminokiselina, već samo djelomičnu strukturu (5 do 10 % slijeda aminokiselina).^{84,85} U slučaju kada se protein s pripadajućim aminokiselinskim slijedom i posttranslacijskim modifikacijama ne nalazi u bazi podataka, unatoč nepotpunom određivanju slijeda aminokiselina, dobivene podatke sekvenciranja *de novo* moguće je upotrijebiti za identifikaciju proteina pretraživanjem baza podataka na temelju homologije primarne strukture proteina i peptida različitih bioloških vrsta (FASTA/BLAST). Strukturna karakterizacija cikličkih proteina spektrometrijom masa složenija je od one linearnih proteina radi utvrđivanja početka i kraja slijeda (tj. C-kraja i N-kraja).⁸⁶ Ovisno o načinu ciklizacije (npr. putem disulfidnih veza ili formacije laktonskog prstena) i sastavu aminokiselina, fragmentacija cikličkih peptida primjenom ISD može biti onemogućena (npr. vasopresina s oksidiranim disulfidnim vezama) radi premale aktivacijske energije uložene u cijepanje prstena.^{77,87} Upotrebom tehnika CID i PSD postiže se efikasnija fragmentacija uz nastajanje netipičnih iona produkata ovisno o mjestu cijepanja prstena.^{86,86} Budući da je otvaranje prstena kritično za nastanak iona produkata, cijepanje može biti potaknuto i kemijskim obilježavanjem poput esterifikacije karboksilne skupine ili otvaranja prstena prije analize spektrometrijom masa (npr. inkubacijom peptida u smjesi TFA, trietilsilana i vode u volumnom omjeru 95:2,5:2,5 dva sata na sobnoj temperaturi).⁸⁶

U ovoj disertaciji modelne makromolekule odabrane su s namjerom da u istraživanju budu obuhvaćena sva svojstva peptida ili proteina koja mogu utjecati na fragmentaciju u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF: veličina (1,6 kDa do 18,8 kDa), ciklizacija (laktonski prsten i disulfidne veze) i posttranslacijske modifikacije (amidacija, acetilacija, intramolekularne disulfidne veze, lipidacija). U dizajnu eksperimenta posebna pažnja posvećena je odabiru matrice. Naime, literaturni podaci upućuju na poboljšanje fragmentacije peptidnih iona nastajanjem radikala matrice u izvoru iona ovisno o korištenoj matrici.^{65,63,77} Da bi utjecaj na poboljšanje fragmentacije u izvoru iona uslijed djelovanja matrice bilo isključen, u pokusima je korištena matrica CHCA za koju je eksperimentalno utvrđeno da nema izražen učinak na fragmentaciju.⁶³ Budući da je utvrđeno da uvjeti snimanja spektara masa (jačina laserske snage i vrijeme zadržavanja iona) također utječu na fragmentaciju, odnosno detekciju iona fragmenata nastalih u izvoru iona,⁸ navedeni su parametri podešeni za postizanje optimalne detekcije iona fragmenata u cijelom promatranom rasponu masa. Utjecaj inicijatora fragmentacije na fragmentaciju proteina *rHu*-GCSF praćen je, osim uz korištenje ionskog zrcala i u linearnom načinu rada spektrometra masa. U linearnom načinu rada moguće je detektirati ione veće mase nego uz korištenje ionskog zrcala (u slučaju korištenog spektrometra masa čak i do 250 kDa) ali uz popratni gubitak rezolucije,¹⁷ što je za potrebe preliminarnih analiza bilo prihvatljivo.

5.2. Sulfatne soli kao inicijatori fragmentacije

MALDI je ionizacijska tehnika u kojoj mala količina nehlapljivih soli u uzorku ne utječe na ionizaciju i kao takva je pogodna za korištenje inicijatora fragmentacije koji se dodaju smjesi uzorka i matrice na pločici. Poboljšanje fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona dodatkom amonijevih soli poput sulfata ili citrata otprije je poznat i vrlo detaljno objašnjen postupak.^{8,80,81} Sulfatni ioni smanjuju solvataciju peptida vežući molekule vode čime ubrzavaju kristalizaciju matrice, ostavljajući peptide na površini kristala. Uporabom amonijevog sulfata također je evidentno smanjen nastanak adukata analit-protuion (npr. Na^+ , K^+ , NH_4^+), zbog vezanja kationa na sulfatnu skupinu.⁸ U ovom istraživanju potvrđen je utjecaj amonijeva sulfata na fragmentaciju peptida ACTH pri nižim koncentracijama ($0,5 \text{ mol l}^{-1}$) od literaturno opisanih. Uz dodatak amonijeva sulfata zamijećena je razlika u kristalizaciji koja nije prouzročila supresiju ionizacije, već poboljšanje fragmentacije

peptidnih iona u izvoru iona uz pojačanu lasersku snagu, što je u skladu s literaturnim navodima.⁸ Eksperimenti provedeni prema literaturnim navodima ponovljeni su uz korištenje amonijevog persulfata. Obzirom na strukturnu sličnost s amonijevim sulfatom, nije izostala ubrzana kristalizacija matrice zbog vezanja molekula vode na persulfatne ione elektrostatskim interakcijama. Iako je koncentracija dodanog amonijevog persulfata bila znatno niža od koncentracije amonijevog sulfata (30 mmol l^{-1} u odnosu na 500 mmol l^{-1}), uočen je značajniji učinak poboljšanja fragmentacije peptida ACTH, daptomicina⁸ i enfuvirtida⁸ u slučaju dodatka APS. U odnosu na spektar masa bez dodatka inicijatora fragmentacije, dodatkom amonijeva persulfata poboljšana je rezolucija, omjer signala i šuma te intenzitet signala iona produkata prisutnih u izvoru iona.⁷³ Uzimajući u obzir omjer signala i šuma $S/N > 100$ kao kriterij odabira pogodnog iona prekursora za daljnju analizu tandemnom spektrometrijom masa, dodatkom amonijevog persulfata nastaje značajniji broj iona koji zadovoljavaju taj kriterij. Spomenuti porast intenziteta signala koji je proporcionalan količini nastalih iona produkata u prvom stupnju MS-analize omogućio je daljnji korak u strukturnoj analizi uz korištenje kolizijske ćelije u drugom stupnju MS-analize (pseudo MS^3 , Slika 39). Omogućavanjem višestruke tandemne spektrometrije masa (pseudo MS^3), koja je u pravilu ograničena na uporabu analizatora masa ionske stupice ili hibridniog Orbitrapa³⁸ ili FT ICR,¹⁷ unaprijeđena su svojstva spektrometra masa MALDI-TOF/TOF.



Slika 39. Dodatkom inicijatora fragmentacije omogućena je višestruka tandemna spektrometrija masa uz korištenje spektrometra masa MALDI-TOF/TOF.

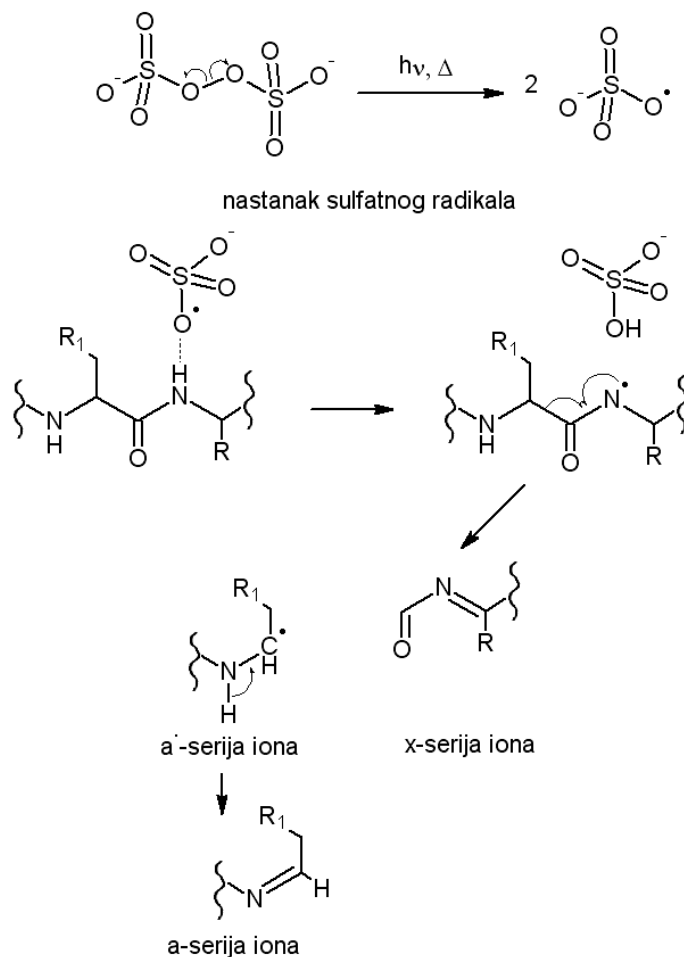
Dodatkom amonijevog persulfata nastaju fragmentacijom peptidnih iona u izvoru iona nove serije iona produkata. U slučaju peptida ACTH, nastali su novi ioni produkti a- i b-serije iona, satelitnog iona (d-ion) te internog fragmenata (Tablica 5). Pojačana laserska snaga

rezultira nastankom b-, y- i a-iona u izvoru iona,⁸³ čime je djelomično moguće objasniti porast intenziteta signala te nastanak novih iona produkata a- i b-serije. Navedene serije iona nastaju termalno induciranim mehanizmom.⁶³ Mjesto kidanja veze tijekom fragmentacije vođene termalno induciranim mehanizmom ovisi o bazičnosti bočnog lanca aminokiselina u plinovitoj fazi i mjestu protonacije. Energija disocijacije peptida koji sadrže specifične bočne ogranke opada sljedećim redoslijedom: arginin > lizin > nebazične aminokiseline.⁶⁰ Budući da ACTH sadrži arginin na N-kraju, dolazi do lokalizacije protona na bazičnom bočnom ogranku arginina te se cijepanje peptidne okosnice događa selektivno na C-terminalnom dijelu Asp, Asn, Glu ili Pro (Xxx-Asp, itd).^{60,61} Upravo su ti fragmenti najintenzivniji u MALDI-MSD spektru masa peptida ACTH. Bitno je naglasiti da ioni produkti koji nastaju dodatkom amonijevog persulfata poput iona produkata d-serije, kao i ionanastalih gubitkom vode ili amonijaka kod a- i b-serije iona (smanjenje mase za 18, tj. 17), nisu česti produkti fragmentacije u izvoru iona prije ekstrakcije iona, već su karakteristični za PSD i radikalima inducirani mehanizam fragmentacije.⁸⁸

Nastanak a- i d-serije iona moguće je objasniti radikalskim mehanizmom iniciranim sulfatnim radikalom koji nastaje homolitičkim cijepanjem persulfata.⁷³ Amonijev persulfat ima izražen oksidacijski učinak i inicijator je radikala te se rutinski koristi kao katalizator u reakciji polimerizacije akrilamida i bisakrilamida tijekom pripreme gelova za elektroforezu.⁸⁹ U slučaju upotrebe u spektrometriji masa, amonijev persulfat služi kao inicijator fragmentacije. Predloženi radikalski mehanizam fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona iniciran amonijevim persulfatom uključuje nastanak sulfatnog radikala fotodisocijacijom i termičkom dekompozicijom persulfata u plinovitoj fazi uslijed iradijacije laserom (Slika 40).⁷³ Budući da su dosad opisani radikalski mehanizmi vezani uz MALDI-MSD uključivali radikale koji sadrže nespareni elektron na dušikovu ili vodikovu atomu,^{63,65} znanstveni doprinos ovog rada je otkriće radikalskog mehanizma fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona djelovanjem radikala koji sadrži nespareni elektron na atomu kisika.

Opisani radikalski mehanizam odcjepljivanja protona (vodikova atoma) s dušika amino-skupine peptidne veze potvrđen je i nastankom iona $[M-46+H]^+$ koji je primijećen u MALDI-MSD spektru peptida ACTH. Proces nastanka iona detaljno je opisan u reakcijama fragmentacije iona djelovanjem 5-nitrosalicilne kiseline kao matrice u izvoru iona (Slika 12),⁶⁵ a povezan je s nastankom hidrokarboksilnog radikala ($\cdot\text{COOH}$), pri čemu se cijepa C_{α} -C veza. Također, detektirani ion $[M-2H+H]^+$ upućuje na odcjepljivanje vodikova atoma vezanog

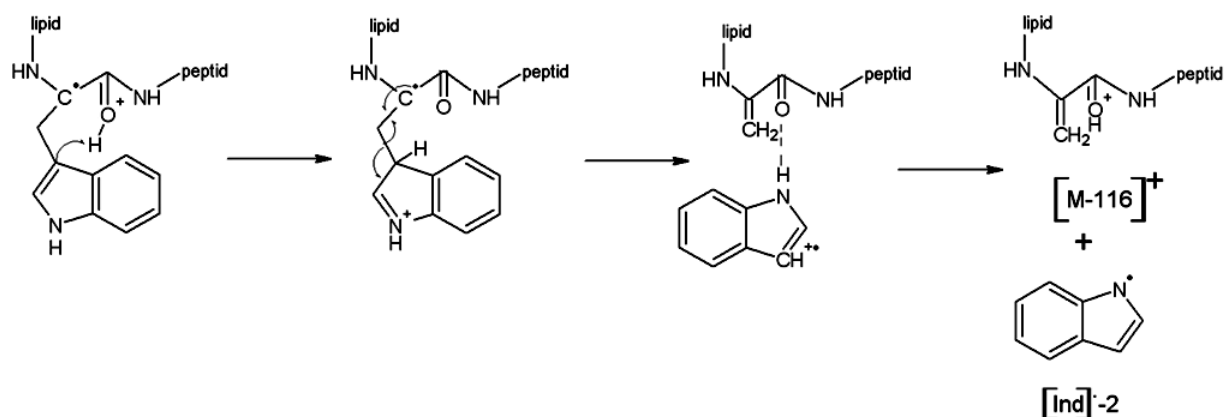
na ugljik koji nije sastavni dio peptidne veze uslijed djelovanja radikala u bimolekularnoj reakciji (djelovanjem drugog sulfatnog radikala).⁶⁵



Slika 40. Mehanizam nastanka sulfatnih radikala fotokemijskom disocijacijom persulfatnog iona u plinovitoj fazi u izvoru iona uz iniciranje nastanka α - i x-serije iona.

Sličan učinak poboljšanja fragmentacije u izvoru iona zamiyećen je tijekom fragmentacije cikličkog lipopeptida daptomicina inicirane dodatkom amonijeva persulfata. Daptomicin je ciklički peptid, cikliziran nastankom laktonskog prstena te je već energija uložena u sustav iradijacijom laserom tijekom ionizacije (bez dodatka inicijatora fragmentacije) dovoljna za cijepanje prstena u prvom stupnju MS-analize. Struktura iona produkata opisana je u Tablici D1 u *Dodatku*, a tijekom eksperimenata zamiyećeno je da se intenzitet njihova signala povećava upotrebom inicijatora fragmentacije. Dodatkom amonijeva persulfata također je uočen porast intenziteta signala iona produkata b-, x- i y-serije te y-iona uz gubitak molekule

vode (Tablica 6). Nastanak iona produkta x-serije (m/z 1077, struktura u Tablici u 9. *Dodatku*) karakterističnog za fragmentaciju iniciranu amonijevim persulfatom moguće je objasniti predloženim radikalskim mehanizmom fragmentacije. Radikalski mehanizam potkrepljuju i detektirani ioni $[M-46+H]^+$ m/z 1574 i $[M-2H+H]^+$ m/z 1618 vidljivih u spektru masa na Slici 19. Nakon dodatka amonijeva persulfata, u spektru masa daptomicina y-ioni imaju najveći zabilježeni intenzitet. Zamijećeno je da lipidacija cikličkog peptida na N-kraju triptofana nije značajnije utjecala na fragmentaciju, budući da su u spektru masa podjednako zastupljeni ioni produkti s i bez lipidacije, neovisno o prisutnosti inicijatora fragmentacije. Osim fragmentacije veza peptidne okosnice, u izvoru iona spektrometra masa MALDI, uz pucanje prstena, uočeno je i cijepanje bočnog lanca triptofana djelovanjem inicijatora fragmentacije amonijeva persulfata. Spomenute reakcije rezultirale su nastankom iona $[M-116+H]^+$ m/z 1505 (struktura u Tablici u *Dodatku*). Cijepanje ovakve vrste detektirano je primjenom hibridnog analizatora masa kvadrupol-ionska stupica.⁹⁰ Nastanak sulfatnog radikala prikazan je na Slici 40, a iniciran je fotokemijskom disocijacijom persulfatnog iona, kao što je ranije opisano. Sulfatni radikal potiče odcjepljivanje vodikova atoma vezanog na α -ugljik triptofana (analogno prikazanom na Slici 40, za razliku od odvlačenja s dušikova atoma u ovom slučaju reakcija se odvija na ugljikovu atomu peptidne okosnice), pri čemu nastaje radikal peptida sa slobodnim elektronom na atomu C_α triptofana (Slika 41). Nizom reakcija pregradnje i cijepanja C_β – C_γ veze triptofana nastaje dehidrogenirani indolni radikal $[Ind]^\bullet-2$ te ion $[M-116]^+$ čija je masa uvećana za masu protona zbog cijepanja prstena daptomicina.



Slika 41. Mehaniizam dekompozicije postranog triptofanskog lanca daptomicina pri čemu u izvoru iona nastaje ion $[M-116]^+$ djelovanjem amonijevog persulfata.⁹⁰

Dodatkom amonijevog persulfata u izvoru iona spektrometra masa pojačava se i fragmentacija enfuvirtida, peptida koji sadrži kemijski modificirani C-kraj i N-kraj (amidacija i acetilacija). Iako prema objašnjenom modelu mobilnog protona acetilacija povećava nasumični raspored protona unutar iona smanjujući bazičnost peptida, a time i učinkovitost fragmentacije,⁹¹ dodatkom amonijevog persulfata poništen je navedeni učinak. Fragmentacijom u izvoru iona zamijećene su novonastale y- i b-serije iona, no najveći udio iona pripada internim fragmentima (Slika 22). Interni fragmenti na čijem se C-kraju nalaze Asn, Glu i Gln predstavljanju najintenzivnije ione u spektru masa, što je u skladu s literaturnim navodima.^{60,61}

Predloženi radikalski mehanizam fragmentacije persulfata potvrđen je fragmentacijom kemijski obilježenih triptičkih peptida s derivatima disulfonske kiseline (*ortho*, *para* i *meta*, *para*), benzaldehid-2,4-disulfonskom kiselinom i benzaldehid-3,4-disulfonskom kiselinom uz korištenje kolizijske ćelije bez uvođenja kolizijskog plina. Zabilježeni derivatizirani ioni produkti su izobarni jer sadrže modificirani N-kraj peptida derivatima iste molekulske mase te ih je moguće detektirati uz negativnu ionizaciju kao a-, b- i c-seriju iona. Fragmentacijom peptida obilježenog *o*, *p*-derivatom dominantno nastaje b-serija iona, dok *m*, *p*-derivat fragmentira dajući vrlo intenzivnu a- i c-seriju iona (Tablica 11). Razlika u fragmentacijskim profilima proizlazi iz različitih udaljenosti supstituiranih sulfo-skupina. Budući da su sulfo-skupine u *m*, *p*-položaju sterički bliske, u plinovitoj fazi najvjerojatnije nastaje persulfat. Cijepanjem persulfata nastaju sulfatni radikali koji na prethodno opisani način mehanizmom radikala rezultiraju nastankom a- i c-serije iona.

Djelovanje amonijevog persulfata kao inicijatora fragmentacije u izvoru iona spektrometra masa ima i svoja ograničenja. Iako je pokazano da u koncentraciji 30 mmol l⁻¹ pozitivno djeluje na fragmentaciju u plinovitoj fazi u izvoru iona spektrometra masa neovisno o ciklizaciji, lipidaciji i C-terminalnoj i N-terminalnoj modifikaciji (amidaciji i acetilaciji) peptida veličine do 4,7 kDa, pri navedenim uvjetima APS nije utjecao na fragmentaciju linearnog proteina *rHuG-CSF* (18,8 kDa), koji sadrži intramolekulske disulfidne veze. Proučavajući literaturu, nije pronađeno utječe li amonijev sulfat na fragmentaciju proteina veće molekulske mase u izvoru iona te kakav je njegov utjecaj na disulfidne veze, jer su pokusi bili usmjereni na sintetske i triptičke peptide te lipide.^{8,82,92} Iako je u literaturi već opisano laserom inducirano reducirajuće djelovanje spojeva koji sadrže hidroksilnu skupinu (matrica DHB, hidrokinon, itd.) preko radikalskih intermedijera na disulfidne veze,⁹³ nije

zamijećena redukcija disulfidnih veza kod protein *rHuG-CSF* (intramolekulske disulfidne veze), kao niti kod inzulina (intermolekulske disulfidne veze). U slučaju *rHuG-CSF*, mjerljivi učinak bi se uočio pri porastu mase za 4 Da, dok bi se u spektru masa inzulina nakon redukcije disulfidnih veza trebala detektirati dva peptida, od kojih bi svakom porasla masa za 2 Da.

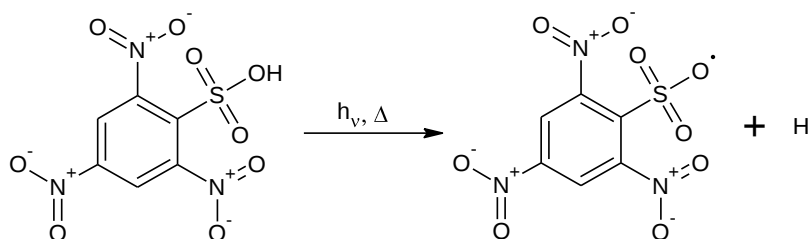
5.3. Derivati benzensulfonske kiseline kao inicijatori fragmentacije

Odabrani derivati za ispitivanje fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona uključivali su derivate benzensulfonske kiseline: nitrate, sulfonamide, sulfonil-kloride i sulfone. Potencijalni inicijatori fragmentacije odabrani su obzirom na njihovu sposobnost produkcije radikala u reakcijama sinteze. Tako je utvrđeno da arilni nitrati (npr. matrica 5-nitrosalicilna kiselina)⁷⁵ imaju oksidirajuće djelovanje tijekom iniciranja fragmentacije peptidnih iona radikalskim mehanizmom, dok pulsnom UV-fotodisocijacijom arilnih sulfona i sulfonil-klorida u otopini dolazi do nastanka radikala.⁹⁴⁻⁹⁶ Iako se fotodisocijacija odvija pri određenoj valnoj duljini (npr. 248 nm, 254 nm, 365 nm, 436 nm, itd.) arilni sulfoni i sulfonil-kloridi dodatno se mogu i termički razgraditi, pri čemu je temperatura dekompozicije ovisna o vrsti supstituenta na benzenskom prstenu.⁹⁴⁻⁹⁶ Temperature termičke dekompozicije pojedinih sulfona su, ovisno o supstituentu, oko 300 °C.⁹³

Kod dijela spojeva za koje bi se očekivalo djelovanje inicijatora fragmentacije u izvoru iona (benzaldehyd-3,4-disulfonska kiselina, 4-*tert*-butilbenzensulfonamid, di-(4-*tert*-butilfenil)-sulfonamid, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonska kiselina, 4-*tert*-butilbenzensulfonil-klorid) nije zamijećen učinak poboljšanja fragmentacije nijednog od ispitanih peptida i proteina. Uzevši u obzir gore spomenute činjenice, moguće je da su navedeni spojevi termički nestabilni pri temperaturi koja se lokalno postiže u izvoru iona u instrumenta MALDI ili da ne dolazi do njihove fotodekompozicije pri valnoj duljini iradijacije korištenog Nd:YAG lasera (355 nm). Učinak inicijatora fragmentacije peptida zamijećen je kod 2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiseline, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamida, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonil-klorida te (3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfona. Dodatkom svakog pojedinog inicijatora fragmentacije narušava se kristalizacija matrice i peptida, što se očituje u nehomogenosti kristala, no učinak poboljšanja fragmentacije nije izostao uz pojačanu lasersku

snagu, identično kao pri korištenju amonijeva sulfata.⁸ Također je uočeno smanjenje kemijskog šuma u prvom stupnju MS-analize.

Djelovanjem TNBS na peptid ACTH u izvoru iona nastali su ioni produkti b-, c-, a- i y-serije iona, kao i interni fragmenti (Tablica 8). Kao što je ranije spomenuto, pojačana laserska snaga i desorpcija peptidnih iona zbog dodatka inicijatora fragmentacije rezultira nastankom b-, y- i a-iona.^{8,83} Međutim, nastanak c-serije iona moguće je objasniti jedino radikalskim mehanizmom. Laserom inducirana termodisocijacija i fotodisocijacija 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline pri čemu nastaju 2,4,6-trinitrobenzensulfonski i vodikovi radikali, omogućuju reducirajuće djelovanje inicijatora (Slika 42). Slijedi prijenos vodikova radikala na kisik karbonilne skupine u peptidnoj vezi te cijepanje veze NH–C s C-terminalne ili N-terminalne veze što rezultira nastankom c-serije iona.⁶³



Slika 42. Mehanizam nastanka radikala fotokemijskom dekompozicijom 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline (TNBS) u plinovitoj fazi u izvoru iona.

Iako TNBS sadrži i tri nitro-skupine, bilo bi za očekivati da djeluje slično kao i oksidirajuća matrica (npr. 5-nitrosalicilna kiselina) uz nastanak a- i x-serije iona.⁶⁵ Budući da je izostao nastanak d- i x-serija iona, očito je energetski povoljniji reducirajući učinak kiseline (uz nastanak vodikovog radikala) od oksidirajućeg učinka (nastanak peptidnog radikala s manjkom vodika) jer je višak elektrona stabiliziran rezonancijskim učinkom i induktivnim učinkom elektrofilnih nitro-skupina u *o*-, *m*- i *p*-položaju.

Reducirajući učinak uočen je djelovanjem inicijatora fragmentacije 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamida čijim su djelovanjem na fragmentaciju ACTH nastali novi satelitni ioni d-serije. Uz satelitne ione, dolazi i do povećanja intenziteta signala već postojeće a-, b- i y-serije iona (Tablica 9). Ovakav učinak zamijećen je kod reducirajućih matrica (1,5-diaminonaftalena i 5-aminosalicilne kiseline), koje također sadrže amino skupinu - donor vodikova radikala.⁶⁵ Fragmentacija peptidnih iona u izvoru iona vođena je radikalskim

mehanizmom pri čemu nastaje d-serija iona, dok se porast intenziteta a-, b- i y-serije iona može objasniti termalno induciranim mehanizmom koji je zamijećen i tijekom fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona u prisutnosti reducirajućih matrica.^{26,63,65} Osim navedenog, fragmentacijom cikličkog lipopeptida daptomicina nastaje i spomenuti ion $[M-116+H]^+$ m/z 1505 (struktura prikazana u Tablici D1 u *Dodatku*) uslijed pucanja prstena i cijepanjem bočnog lanca triptofana radikalskom mehanizmom. Na isti način nastaje i detektirani ion $[M-130+H]^+$ m/z 1489 (struktura prikana u Tablici D1 u *Dodatku*), pri čemu gubitak mase od 130 Da odgovara cijepanju veze $C_\alpha-C_\beta$ triptofana, koje se odvija radikalskim mehanizmom. Cijepanje ove vrste detektirano je u peptidima koji sadrže sulfoksidne analoge metionina kovalentno vezanih peptidnom vezom na triptofan, pri čemu dolazi do prijenosa protona s N-terminalnog dijela triptofana na kisik sulfoksida, što olakšava gubitak neutralnog bočnog lanca triptofana.^{90,97} Budući da, promatrajući slijed aminokiselina daptomicina, metionin nije kovalentno vezan s N-terminalnim triptofanom, može se pretpostaviti da dolazi do prijenosa protona s N-kraja na kisik sulfonamida. Iako 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamid nije utjecao na pojačanu fragmentaciju u izvoru iona, navedeni inicijator fragmentacije omogućio je višestruku protonaciju proteina *rHuG-CSF* (čak i do četverostruke zabilježene protonacije) koja je detektirana u linearnom načinu rada spektrometra masa. Budući da je eksperimentalno dokazano da prema modelu mobilnog protona višestruka protonacija omogućuje veći broj mobilnih protona i olakšano cijepanje usmjereno nabojem, potrebno je manje energije za fragmentaciju.⁹¹ Radi toga je iznenađujuće što, unatoč nastanku vrlo intenzivnih višestruko protoniranih iona, nisu detektirani fragmenti koristeći ionsko zrcalo jer je ovaj način rada spektrometra masa osjetljiviji od linearnog. Moguće je da se fragmentacija *rHu-GCSF* i dogodila u izvoru iona, ali je količina nastalih fragmenata bila nedostatna za detekciju.⁸

Zanimljivo je da je, za razliku od 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamida, učinak poboljšanja fragmentacije izostao kod njemu strukturno sličnog 4-*tert*-butilbenzensulfonamida. To je moguće objasniti nepovoljnim položajem *tert*-butil-skupine koja, iako je elektron-akceptorskog karaktera, ne može stabilizirati višak elektrona koji bi nastao formiranjem radikala uslijed prijelaza vodikova radikala s amino-skupine sulfonamida na kisik karboksilne skupine peptidne veze. Također, uzevši u obzir fotodisocijaciju, primijenjena valna duljina od 355 nm nije prikladna za nastanak 4-*tert*-butilfenil radikala (uz oslobađanje SO_2) koji bi inicirali fragmentaciju u izvoru iona.⁹⁴

Inicijator fragmentacije (3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfon pospješio je nastanak internih fragmenata te samo jednog d-iona uz porast intenziteta signala već postojeće a- i b- i d-serije iona, koje nastaju bez dodatka ovog inicijatora fragmentacije (Tablica 9). Interni fragmenti, kao i spomenuta d-serija iona, sadrže terminalne Lys ili Glu, što je zamijećeno i kod fragmenata nastalih djelovanjem ostalih derivata sulfonske kiseline. Prema analogiji već opisanih mehanizama fotodisocijacije, kod (3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfona, mogla bi se očekivati dekompozicija spoja na 3,5-*tert*-butilfenilni i sulfonilni radikal. Nakon fotodisocijacije iz sulfonilnog radikala nastaje sumporov dioksid kao izlazna skupina.⁹⁴ Zbog nastanka radikala u izvoru iona očekivao se značajniji porast intenziteta iona produkata, uz nastanak novih serija fragmentnih iona. Nakon ispitivanja fragmentacije ACTH nije zamijećen značajan učinak poboljšanja fragmentacije nakon dodatka 3,5-di-(*tert*-butil)-benzensulfona, dok su fragmentacijom daptomicina pod istim uvjetima nastala tri nova fragmenta. Novonastali fragmenti formirani su dekompozicijom bočnog lanca triptofana radikalskim mehanizmom (m/z 1336, m/z 1489 i m/z 1505, strukture prikazane u Tablici D1 u *Dodatku*), što upućuje na djelomičnu fotodisocijaciju 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfona u izvoru iona. Količina radikala nastala fotodisocijacijom nije dovoljna za fragmentaciju peptida koji sadrže kemijski modificirane krajeve ili disulfidne veze. Dodatak (3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfona omogućava detekciju trostruke protonacije proteina *rHuG-CSF*, ali ne i poboljšanje fragmentacije, kao što je opisano u slučaju dodatka 5-di-*tert*-butilbenzensulfonamida.

Laserskom UV iradijacijom homolitički se cijepa 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonil-klorida, pri čemu nastaju klorid-sulfoksidni i 3,5-*tert*-butilfenil radikal.⁹⁴ Budući da je poboljšana fragmentacija uočena samo na razini povećanja intenziteta signala već postojećih iona (koji nastaju i bez dodatka poboljšivača), može se pretpostaviti da valna duljina lasera ne uzrokuje fotodisocijaciju i nastanak radikala. Povećana laserska snaga i olakšana desorpcija peptidnih iona u prisutnosti navedenog sulfonil-klorida omogućuju olakšanu dekompoziciju, koja se očituje povećanjem intenziteta signala već postojećih iona produkata. Ovime je moguće objasniti i izostanak učinka poboljšanja fragmentacije kod svih ostalih modelnih peptida i proteina.

5.4. Inicijatori nastanka radikala kao inicijatori fragmentacije

Učinak poboljšanja fragmentacije u plinovitoj fazi ispitan je za različite termoinicijatore i fotoinicijatora za koje je poznato da u mnogim industrijskim i laboratorijskim procesima služe

kao inicijatori nastanka radikala u otopini. Ispitani inicijatori se prema kemijskoj klasifikaciji mogu podijeliti na aril-halogenide, peroksidi, ketone, i nitrile. Od ispitanih spojeva značajan učinak poboljšanja fragmentacije pokazali su inicijatori koji su sadržavali benzenski prsten (benzoil-peroksid i benzofenon). Učinak poboljšanja fragmentacije bio je izazvan i primjenom kombinacija dvaju inicijatora azobisisobutironitrila i amonijeva persulfata. Zamijećeni učinak moguće je objasniti manjom reaktivnošću, tj. većom stabilnošću radikala koji sadrže benzenski prsten. Benzenski prsten stabilizira višak negativnog naboja (elektrona) rezonancijskim efektom. Pokazalo se da je iznimka trifenilmetil-klorid. Iako nije došlo do homolitičkog cijepanja trifenilmetil-klorida i nastanka njegovih radikala u plinovitoj fazi spektrometra masa (zaključak izveden nakon izostanka učinka poboljšanja fragmentacije), trifenilmetil-radikali dobiveni su u otopini nakon dodatka cinka.

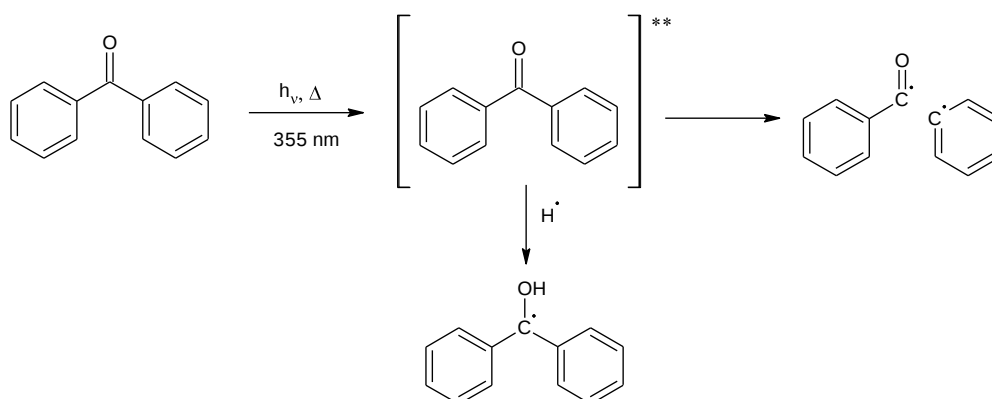
S druge strane peroksidi su pokazali veću stabilnost i bolji učinak nastanka radikala od trifenilmetilklorida u plinovitoj fazi nakon pripreme uzoraka u otopini te ionizacije i desorpcije u spektrometru masa. Peroksidi su spojevi koji se pod utjecajem zračenja ili temperature homolitički cijepaju dajući u prijelaznom stanju radikale:⁹⁸

Aceton peroksid može postojati u obliku dimera (diaceton diperoksida) ili trimera (triaceton triperoksida). Termička dekompozicija trimera aceton peroksida egzotermni je proces i uzrokuje burnu dekompoziciju, zbog čega se spoj koristi kao eksploziv.⁹⁹ Prema navodima iz literature, radi svoje reaktivnosti,⁹⁹ aceton peroksid korozivno djeluje na metalni laboratorijski pribor, uz izostanak učinka poboljšane fragmentacije. Postoji mogućnost da je prije djelovanja na proteine i peptide u spektrometru masa aceton peroksid izazvao pretjeranu degradaciju peptida ili matrice na pločici, što potvrđuje izostanak signala tijekom analize spektrometrijom masa.

Za razliku od aceton peroksida, utvrđeno je da benzoil-peroksid omogućava poboljšanu fragmentaciju peptidnih iona u izvoru iona pri nižoj laserskoj snazi unatoč uočene nehomogenosti kristala matrice. Jača laserska snaga djeluje na degradaciju benzoil-peroksida u izvoru iona neradikalnim mehanizmima, što rezultira smanjenjem učinka poboljšanja fragmentacije. Djelovanjem benzoil-peroksida na peptid ACTH nastala je a-, b- i c-serija iona, dok je djelovanjem na ciklički lipopeptid daptomicin dodatno nastao x-ion te y-serija iona uz

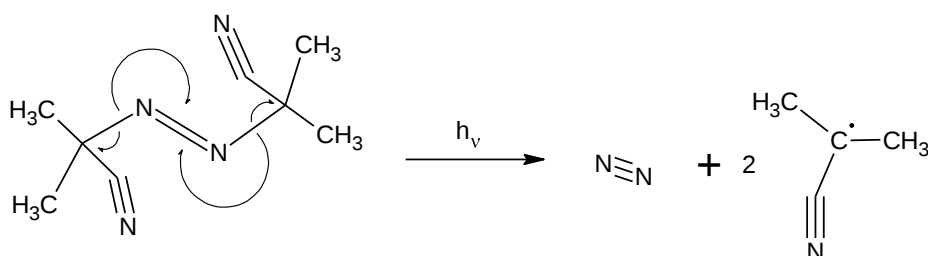
gubitak vode. Također je uočen porast intenziteta svih postojećih iona koji nastaju u izvoru iona bez dodatka benzoil-peroksida. Nastanak a- i c-serije iona moguće je objasniti radikalskim mehanizmom, budući da u plinovitom stanju dolazi do termodegradacije i fotodegradacije benzoil-peroksida na benzoiloksi-radikale.¹⁰⁰ Budući da se radikalsko mjesto (nespareni elektron) nalazi na kisiku karboksilne skupine, mehanizam djelovanja benzoil-peroksida kao inicijatora fragmentacije identičan je djelovanju amonijeva sulfata (Slika 40). Radikalskim mehanizmom fragmentacije moguće je objasniti i degradaciju bočnog lanca N-terminalnog triptofana koja je potvrđena detektiranim ionom m/z 1505 (struktura prikazana u Tablici D1 u *Dodatku*), čiji je mehanizam nastajanja već opisan (Slika 41). Nastanak iona b-, x- i y-serije objašnjen je termalno induciranim mehanizmom.^{60,63}

Benzofenon je inicijator fragmentacije koji je pogodovao smanjenju kemijskog šuma, kao i nastanku novih iona produkata peptida ACTH a-, y- i c-serije. Zamijećen je veliki broj metastabilnih iona koji nastaju spontanom fragmentacijom peptidnih iona između izvora iona i analizatora masa. Djelovanje benzofenona kao inicijatora fragmentacije moguće je objasniti nastankom radikala u izvoru iona uslijed iradijacije laserom, kao što se događa i u vodenoj otopini (Slika 43).¹⁰¹ Pri valnoj duljini 355 nm, što je ujedno i valna duljina korištenog lasera, u plinovitoj fazi nastaje radikal, koji ima oksidirajuće djelovanje na peptidne ione, oduzimajući vodikov radikal s amino-skupine peptidne veze ili α -ugljikov atom aminokiseline (nastaje a- ili c-serija iona). Radikalski mehanizam fragmentacije potvrđen je i detekcijom iona produkata nastalih fragmentacijom pojedinih peptidnih iona u izvoru iona. Navedeni ioni m/z 1505 i m/z 1489 (strukture prikazane u Tablici D1 u *Dodatku*) ukazuju na degradaciju bočnog lanca triptofana, kao što je već detaljno prikazano na Slici 41.



Slika 43. Selektivna fotodegradacija benzofenona u otopini.¹⁰¹

Koristeći azobisisobutironitril kao inicijator fragmentacije, usprkos svojstvu homolitičkog cijepanja pri čemu nastaju radikali uz oslobađanje dušika (Slika 44), izostao je učinak poboljšanja fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona. Razlog izostanka učinka poboljšane fragmentacije je što pri uvjetima postignutim u izvoru iona ili ne nastaju radikali ili su nastali radikali kratkoživi. Dodatkom amonijeva persulfata i azobisisobutironitrila uočeno je sinergijsko djelovanje ovih dvaju inicijatora fragmentacije, tj. nastanak većeg broja novih iona produkata (pretežito internih fragmenata) peptida ekstenatida. Zamijećeni učinak može se objasniti nastankom većeg broja radikala uzrokovanim kombinacijom više puteva nastanka.



Slika 44. Mehanizam nastanka radikala fotokemijskom dekompozicijom azobisisobutironitrila.

Djelovanjem dvaju navedenih inicijatora, također je zamijećeno cijepanje intermolekulskih disulfidnih veza inzulina djelovanjem oksidirajućeg inicijatora, pri čemu je došlo i do višestruke oksidacije sumpora na bočnom lancu cisteina vezanih disulfidnim vezama (porast mase za 16 Da za svaki vezani kisik). Iako je najčešći način cijepanja disulfidnih veza redukcijom, također je moguće cijepanje oksidacijom.¹⁰¹ Za oksidaciju aminokiselina koriste se reaktivni kisikovi spojevi (hidroksilni radikal $\text{OH}^\bullet$ i peroksidi ROOR), reaktivni dušikovi spojevi (dušikov oksid, $\text{NO}^\bullet$) i reaktivni halogeni spojevi. Nastavno na oksidaciju inzulina u teoriji su moguća tri stupnja oksidacije cisteina,¹⁰³ a sva tri su zabilježena u spektrima masa. Oksidacija nije zamijećena kod većih proteina, pa tako *rHuG-CSF* koji sadrži dvije intramolekulske disulfidne veze, ima tercijarnu strukturu više hijerarhije i složenosti što disulfidne veze čini sterički nedostupnima.

§ 6. ZAKLJUČAK

U ovoj disertaciji ispitan je učinak inicijatora fragmentacije na fragmentaciju intaktnih peptidnih iona u izvoru iona spektrometra masa MALDI-TOF/TOF. Najznačajniji učinak poboljšanja fragmentacije uočen je dodatkom amonijevog persulfata, kao i smjese amonijevog persulfata i azobisisobutironitrila smjesi peptida i matrice na MALDI-pločici. Valja napomenuti da se u slučaju amonijevog persulfata i azobisisobutironitrila radi o novootkrivenim i izuzetno aktivnim inicijatorima fragmentacije, koji do izrade ove doktorske disertacije nisu bili opisani u znanstvenoj literaturi. Nešto slabiji učinak uočen je kod derivata benzensulfonske kiseline 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonamida, 3,5-di-*tert*-butilbenzensulfonil-klorida i (3,5-di-*tert*-butilfenil)-fenil-sulfona te kod benzoil-peroksida i benzofenona. Poboljšanje fragmentacije očituje se u poboljšanju razlučivanja, smanjenju kemijskog šuma, nastanku većeg broja iona produkata te povećanju intenziteta signala iona koji su prisutni u izvoru iona, u odnosu na uvjete snimanja bez dodatka inicijatora fragmentacije. Spektar masa dobiven u prvom stupnju MS-analize gotovo je identičan tandemnom spektru masa uz primjenu kolizijske ćelije, a vrlo intenzivni ioni produkti nastali u prvom stupnju analize mogu se dodatno fragmentirati uz korištenje kolizijske ćelije (tzv. pseudo MS³). Metodologija poboljšane spektrometrije masa korak je ka implementaciji višestruke spektrometrije masa za rutinske analize proteina i peptida pristupom odozgor nadolje.

Korišteni inicijatori fragmentacije iniciraju fragmentaciju peptidnih iona radikalskim mehanizmom. Svi od prije navedenih inicijatora fragmentacije tvore radikale homolitičkim cijepanjem uslijed termodegradacije ili fotodegradacije djelovanjem pulsnog laserskog zračenja (valne duljine 355 nm) u plinovitoj fazi u vakuumu spektrometra masa. Mehanizam fragmentacije peptidnih iona u izvoru iona iniciran radikalima objašnjen je na primjeru djelovanja persulfata. Fotodegradacijom persulfata nastaje sulfatni radikal, a slobodni elektron na kisikovu atomu odvlači proton s iona peptida inicirajući fragmentaciju. Radikalni mehanizam potvrđen je fragmentacijom kemijski obilježenih triptičkih peptida i cijepanjem bočnog lanca triptofana. Osim radikalskog mehanizma, fragmentacijski procesi u izvoru iona uključuju i termalno inducirani mehanizam, budući da inicijatori fragmentacije imaju i desolvacijsko djelovanje na peptidne ione, čime olakšavaju fragmentaciju.

Metodologija poboljšane spektrometrije masa razvijena je uglavnom na pročišćenim farmaceutskim peptidima (osim ACTH koji to nije) te je pogodna za identifikaciju biofarmaceutika tijekom proizvodnje, ispitivanja stabilnosti i kliničkih ispitivanja. Za razliku od biofarmaceutika, implementacija navedene metodologije u proteomske analize bi uz razvoj odgovarajućeg računalnog programa uvelike ubrzala identifikaciju peptida i proteina posebice onih koji sudjeluju u nastanku, progresiji i liječenju bolesti te otkriću biomarkera.

Radikalni inicijatori fragmentacije pokazali su se izuzetno uspješnim tijekom induciranja pseudo MS^3 -spektara, gdje su uspijevali kod MS^2 -instrumenata proizvesti vrijedne strukturne podatke bez gubitka osjetljivosti i točnosti analiza prisutnih kod spektrometrije masa viših redova (MS^{3-n}). Primjenjeni pristup unaprjeđenija dosadašnjih MALDI-tehnika tandemne spektrometrije masa opisan u ovoj disertaciji doprinos je daljnjoj detaljnoj strukturnoj analizi, koja do otkrića istraživanih inicijatora fragmentacije nije bila moguća.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Kratika	Engleski naziv	Hrvatski naziv
AS	Amonium sulfate	Amonijev sulfat
AIBN	Azobisisobutyronitrile	Azobisizobutironitril
APS	Ammonium persulfate	Amonijev persulfat
5-ASA	5-aminosalicylic acid	5-aminosalicilna kiselina
BIRD	Blackbody infrared radiative dissociation	Disocijacija zračenjem crnog tijela
BSA	Bovine serum albumine	Goveđi serum albumin
CAF	Chemically activated fragmentation	Kemijski aktivirana fragmentacija
C4	Butyl-silica gel	Butilsilicijev dioksid
C18	Octadecyl-silica gel	Oktadecilsilicijev dioksid
CHCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid	α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina
1,5-DAN	1,5-diaminonaphthalene	1,5-diaminonaftalen
2,5-DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid	2,5-dihidroksibenzojeva kiselina
ECD	Electron capture dissociation	Disocijacija zahvatom elektrona
ETD	Electron transfer dissociation	Disocijacija prijenosom elektrona
FT ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance	Ionsko-ciklotronska rezonancija uz Fourierovu transformaciju
IRMPD	Infrared multiphoton dissociation	Multifotonska infracrvena disocijacija
ISD	In source decay	Dekompozicija u izvoru iona
IT	Ion trap	Ionska stupica
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization	Matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
MS	Mass spectrometry	Spektrometrija masa
MS/MS	Tandem mass spectrometry	Tandemna spektrometrija masa
m/z	Mass-to-charge ratio	Omjer mase i naboja
5-NSA	5-nitrosalicylic acid	5-nitrosalicilna kiselina
PMF	Peptide mass fingerprinting	Metoda otiska prsta
PMTc	<i>N</i> -phenyl- <i>O</i> -methyl-thiocarbonate	<i>N</i> -fenil- <i>O</i> -metil-tiokarbonat
PSD	Post source decay	Poslijeionizacijska fragmentacija
PTH	Phenylthiohydantion	Fenil-tiohidantoin
Q	Quadrupole	Kvadrupol
qTOF	Duadrupole-Time of flight	Kvadrupol-analizator vremena leta
RP-HPLC	Reverse phase high performance liquid chromatography	Tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i sustav obrnutih faza
SA	Sinapic acid	Sinapinska kiselina

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
SPITC	4-sulfophenyl isothiocyanate	4-sulfofenilizotiocijanat
<i>rHuG-CSF</i>	Recombinant human granulocyte stimulating factor	Čimbenik rasta granulocitnih kolonija
TFA	Trifluoroacetic acid	Trifluorooctena kiselina
TIS	Timed ion selector	Dio koji omogućuje odabir iona
TNBS	2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid	2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina
TOF	Time of flight	Analizator vremena leta
UPLC	Ultra performance liquid chromatography	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
UV	Ultraviolet	Ultraljubičasto

Aminokiseline

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Aspartat
Cys	C	Cistein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutamat
Gly	G	Glicin
His	H	Histidin
Ile	I	Izoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lizin
Met	M	Metionin
Phe	F	Fenilalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Treonin
Trp	W	Triptofan
Tyr	Y	Tirozin
Val	V	Valin

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. L. Zhang, H. Li, D. Benedek, X. Li i R. Ursano, A strategy for the development of biomarker tests for PTSD, *Med. Hypotheses* **73** (2009) 404–409.
2. D. Fliser, J. Novak, V. Thongboonkerd, A. Argile's, V. Jankowski, M. A. Girolami, J. Jankowski i H. Mischak, Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery, *J. Am. Soc. Nephrol.* **18** (2007) 1057–1071.
3. P. R. Graves i T. A. Haystead, A functional proteomics approach to signal transduction. *Recent Prog. Horm. Res.* **58** (2003) 1-24.
4. A. I. Nesvizhskii, F. F. Roos, J. Grossmann, M. Vogelzang, J. S. Eddes, W. Gruissem, S. Baginsky i R. Aebersold, Dynamic spectrum quality assessment and iterative computational analysis of shotgun proteomic data, *Mol. Cell. Proteomics* **5** (2006) 652–670.
5. B. Ma i R. Johnson, De novo sequencing and homology searching, *Mol. Cell. Proteomics* **11** (2012) O111.014902.
6. H. Steen i M. Mann, The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5** (2004) 699-711.
7. W. R. Alley, Jr., Y. Mechref, I. Klouckova i M. V. Novotny, Improved collision-induced dissociation analysis of peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry through 3-sulfobenzoic acid succinimidyl ester labeling, *J. Proteome Res.* **6** (2007) 124-132.
8. A. Devolve i A. S. Woods, Ammonium sulfate and MALDI *in-source* decay: a winning combination for sequencing peptides, *Anal. Chem.* **81** (2009) 9585-9589.
9. F. Crick, Central Dogma of Molecular Biology, *Nature* **227** (1970) 561-563.
10. I. Wagner i H. Musso, H. (1983), New naturally occurring amino acids, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **22** (1983) 816–828.
11. http://en.wikibooks.org/wiki/Principles_of_Biochemistry/Amino_acids_and_proteins (preuzeto 25. svibnja 2013.)
12. T. Langrock i R. Hoffmann, Analysis of hydroxyproline in collagen hydrolysates, *Methods Mol. Biol.* **828** (2012) 271-80.
13. J. Seo i K. J. Lee, Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches, *J. Biochem. Mol. Biol.* **37** (2004) 35-44.
14. P. Antonioli, A. Bachib, E. Fasoli i P. G. Righetti, Efficient removal of DNA from proteomic samples prior to two-dimensional map analysis, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3606–3612.
15. M. Močibob i I. Weygand-Đurašević, The proximal region of a noncatalytic eukaryotic seryl-tRNA synthetase extension is required for protein stability in vitro and in vivo, *Arch. Physiol. Biochem.* **470** (2008) 129-138.

16. L. Pray, Recombinant DNA technology and transgenic animals, *Nature Education* **1** (2008) 1.
17. T. D. Clark, M. Sastry, C. Brown and G. Wagner, Solid-phase synthesis of backbone-cyclized *b*-helical peptides, *Tetrahedron* **62** (2006) 9533-9540.
18. P. Edman, On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides, *Acta Chem. Scand.* **10** (1956) 761-768.
19. University of California, *Structural biochemistry*, University of California, San Diego, 2011, str 21.
20. R. A. Laursen, Solid-phase Edman degradation and automatic peptide sequencer, *Eur. J. Biochem.* **20** (1971) 89-102.
21. R. M. Hewick, M. W. Hunkapiller, L. E. Hood i W. J. Dreyer, A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator, *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 7990-9777.
22. M. Miyashita, J. M. Presley, B. A. Buchholz, K. S. Lam, Y. M. Lee, J. S. Vogel i B. D. Hammock, Attomole level protein sequencing by Edman degradation coupled with accelerator mass spectrometry, *PNAS* **98** (2001) 4403-4408.
23. B. T. Chait, R. Wang, R. C. Beavis i S. B. H. Kent, Protein ladder sequencing, *Science* **262** (1993) 89-92.
24. L. Sleno i D. A. Volmer, Ion activation methods for tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **39** (2004) 1091-1112.
25. R. Kellner, F. Lottspeich i H.E. Meyer, Microcharacterization of proteins, 2nd ed., WILEY-VCH, Weinheim, 1999, str. 70-87, 112
26. C. S. Lane, Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences, *Cell. Mol. Life Sci.* **62** (2005) 848-869.
27. J. Harald, M. Walden, S. Schaefer, S. Genz i W. Forssmann, Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **378** (2004) 883-897.
28. D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy i J. S. Cottrell, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* **20** (1999) 3551-67.
29. M. E. Lagerströma, M. P. Fielda, M. Ségureta, L. Fischerc, S. Hannc i R. M. Sherrell, Automated on-line flow-injection ICP-MS determination of trace metals (Mn, Fe, Co, Ni, Cu and Zn) in open ocean seawater, *Mar. Chem.* **155** (2013) 71-80.
30. R. Liu, X. Hou, Y. Li, M. McCooeye, L. Yang i Z. Mester, Absolute quantification of peptides by isotope dilution liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* **85** (2013) 4087-4093.
31. R. Pavišić, K. Hock, I. Mijić, A. Horvatić, M. Gecan, M. Sedić, M. Bukvić Krajačić i M. Cindrić, Recombinant human granulocyte colony stimulating factor pre-screening and screening of stabilizing carbohydrates and polyols, *Int. J. Pharm.* **387** (2010) 110-119.

32. D. Houde i J. R. Engen, Conformational analysis of recombinant monoclonal antibodies with hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Methods Mol. Biol.* **988** (2013) 269-289.
33. V. H. Wysocki, K. A. Resing, Q. Zhang i G. Cheng, Mass spectrometry of peptides and proteins, *Methods* **35** (2005) 211–222.
34. N. Galić i M. Cindrić, Analiza proteina spektrometrijom masa, *Kem. Ind.* **57** (2008) 231–243.
35. R. M. Othman, S. Deris i R. M. Illias, Computational method for annotation of protein sequence according to gene ontology terms, *Int. J. Biol. Sci.* **1** (2006) 186-199.
36. D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy i J. S. Cottrell, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* **20** (1999) 3551-67.
37. R. S. Johnson, M. T. Davis, J. A. Taylor i S. D. Patterson, Informatics for protein identification by mass spectrometry, *Methods* **35** (2005) 223-36.
38. M. Macht, A. Asperger i S. O. Deininger, Comparison of laser-induced dissociation and high-energy collision-induced dissociation using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) for peptide and protein identification, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18** (2004) 2093–2105.
39. J. Krause, M. Stoeckli i U. P. Schlunegger, Studies on the selection of new matrices for ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10** (1996) 1927-1933.
40. M. Kussmann, E. Nordho, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm i P. Roepstorf, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes, *J. Mass Spectrom.* **32** (1997) 593-601.
41. A. Bodzon-Kulakowska, A. Bierczynska-Krzysik, T. Dylag, A. Drabik, P. Suder, M. Noga, J. Jarzebinska i J. Silberring, Methods for samples preparation in proteomic research. *J. Chromatogr. B* **849** (2007)1–31.
42. P. Antonioli, A. Bachi, E. Fasoli i P. G. Righetti, Efficient removal of DNA from proteomic samples prior to two-dimensional map analysis, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3606–3612.
43. D. M. Simpson i R. J. Beynon, Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides. *J. Proteome Res.* **9** (2010) 444-50.
44. T. Rabilloud, Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol. Biol.* **112** (1999) 9-19.
45. A. Amini, S. J. Dormady, L. Riggs i F. E. Regnier, The impact of buffers and surfactants from micellar electrokinetic chromatography on matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry of peptides: Effect of buffer type and concentration on mass determination by MALDI-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **894** (2000) 345 –355.

46. J. R. Yates, C. I. Ruse i A. Nakorchevsky, Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **11** (2009) 49–79.
47. M. Cindrić, T. Čepo, A. Škrin, M. Vuletić i L. Bindila, Accelerated on-column lysine derivatization and cysteine methylation by imidazole reaction in a deuterated environment for enhanced product ion analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20** (2006) 694–702.
48. Y. Tian, Y. Zhou, S. Elliott, R. Aebersold i H. Zhang, Solid-phase extraction of N-linked glycopeptides, *Nature Protocols* **2** (2007) 334 – 339.
49. K. Strupat, M. Karas i F. Hillenkamp, 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.* **111** (1991) 89-102.
50. A. Doucette, D. Craft i L. Li, Protein concentration and enzyme digestion on microbeads for MALDI-TOF peptide mass mapping of proteins from dilute solutions, *Anal. Chem.* **72** (2000) 3355–3362.
51. S. R. Weinberger, K. O. Boernsen, J. W. Finchy, V. Roberstson i B. D. Musselman, Proceedings of the 41th Annual ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics; San Francisco, May 31-June 5, 1993, str. 775a.
52. O. Vorm, P. Roepstorff i M. Mann, Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation, *Anal. Chem.* **66** (1994) 3281-3287.
53. L. Li, R. E. Golding i R. M. Whittall, Analysis of single mammalian cell lysates by mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 11662-11663.
54. S. H. Yoona, J. H. Moonb i M. S. Kim, A comparative study of in- and post-source decays of peptide and preformed ions in matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: effective temperature and matrix effect, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21** (2010) 1876–1883.
55. E. Stevenson, K. Breukery i R. Zenobi, Internal energies of analyte ions generated from different matrix-assisted laser desorption/ionization matrices, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 1035–1041.
56. 4700 Proteomics Analyzer optics overview, The Applied Biosystems bulletin, <http://www.krssltd.com/used-refurbished-mass-spectrometer/maldi/applied-biosystem-api4700> (preuzeto (preuzeto 15. rujna 2013.))
57. D. J. Kenny, J. M. Brown, M. E. Palmer, M. F. Snel i R. H. Bateman, A parallel approach to post source decay MALDI-TOF analysis, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17** (2006) 60-66.
58. P. Roepstorff i J. Fohlman, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomed. Mass Spectrom.* **11** (1984) 601.
59. R. A. Zubarev, K. F. Haselmann, B. Budnik, F. Kjeldsen i F. Jensen, Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation: A historical perspective and modern ideas, *Eur. J. Mass Spectrom.* **8** (2002) 337-349.

60. V. H. Wysocky, G. Tsaprailis, L. I. Smith i L. A. Breci, Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide sequence, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 1399-1406.
61. K. Vekey, Internal energy effects in mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **31** (1996) 445-463.
62. http://www.matrixscience.com/help/fragmentation_help.html (preuzeto 22. kolovoza 2013.)
63. K. Demeure, V. Gabelica i E. A. De Pauw, New advances in the understanding of the in-source decay fragmentation of peptides in MALDI-TOF-MS. *J Am Soc Mass Spectrom.* **21** (2010) 1906-17.
64. R. A. Zubarev, Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15** (2004) 12-16.
65. D. Asakawa i M. Takayama, Fragmentation processes of hydrogen-deficient peptide radicals in matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry, *J. Phys. Chem. B* **116** (2012) 4016-4023.
66. A. Chi, C. Huttenhower, L. Y. Geer, J. J. Coon, J. E. P. Syka, D. L. Bai, J. Shabanowitz, D. J. Burke, O. G. Troyanskaya i D. F. Hunt, Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry, *PNAS* **104** (2007) 2193-2198.
67. E. Krause, H. Wenschuh i P. R. Jungblut, The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins, *Anal. Chem.* **71** (1999) 4160-4165.
68. T. Keough, M. P. Lacey i R. S. Youngquist, Derivatization procedures to facilitate de novo sequencing of lysine-terminated tryptic peptides using postsource decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14** (2000) 2348-56.
69. P. Conrotto i U. Hellman, Sulfonation chemistry as a powerful tool for MALDI TOF/TOF *de novo* sequencing and post-translational modification analysis, *J Biomol. Tech.* **16** (2005) 441-452.
70. M. J. García-Murria, M. L. Valero i M. M. Sánchez del Pino, Simple chemical tools to expand the range of proteomics applications, *J. Proteome Res.* **10** (2011) 137-150.
71. P. Chen, S. Nie, W. Mi, X. C. Wang i S. P. Liang. De novo sequencing of tryptic peptides sulfonated by 4-sulfophenyl isothiocyanate for unambiguous protein identification using post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18** (2004) 191-198.
72. M. Cindrić, S. Kraljević Pavelić, A. Horvatić i I. Dodig, Mass spectrometry - based protein identification, 2011, WO 2011/089453 A4.
73. A. Horvatić, I. Dodig, T. Vuletić, D. Pavoković, Z. Hameršak, A. Butorac i M. Cindrić, Comparison between enhanced MALDI in-source decay by ammonium

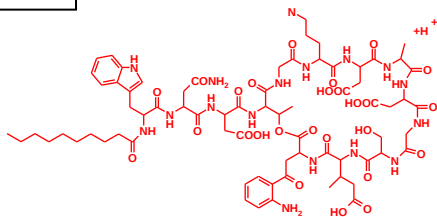
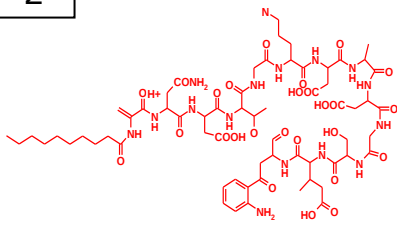
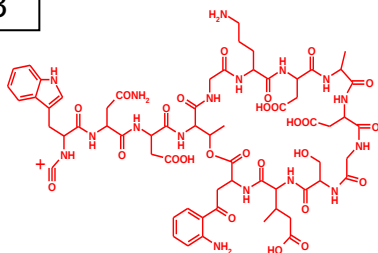
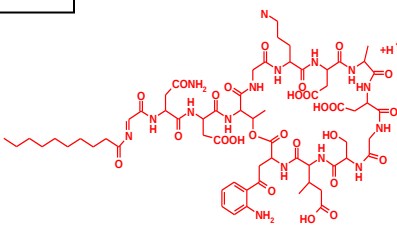
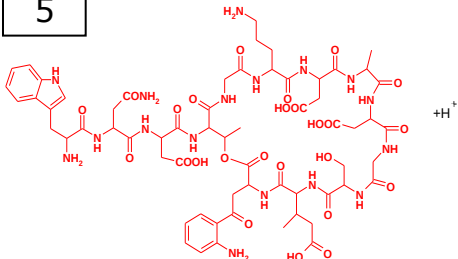
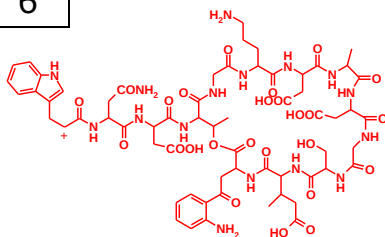
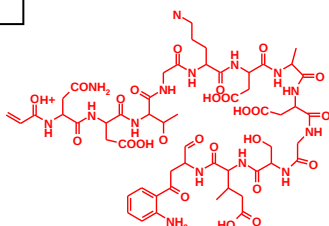
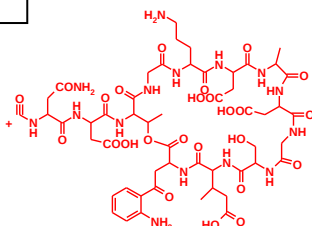
- persulfate and N- or C-terminal derivatization methods for detailed peptide structure determination, *Anal. Chem.* **85** (2013) 3940-3947.
74. R. L. Beardsley i J. P. Reilly, Optimization of guanidination procedures for MALDI mass mapping, *Anal. Chem.* **74** (2002) 1884-1890.
75. D. Asakawa i M. Takayama, Mass spectrometric characterization of phosphorylated peptides using MALDI in-source decay via redox reactions *J. Mass. Spectrom.* **47** (2012) 180–187.
76. D. Calligaris, C. Villard, L. Terras, D. Braguer, P. Verdier-Pinard i D. Lafitte D. MALDI in-source decay of high mass protein isoforms: application to alpha- and beta-tubulin variants. *Anal. Chem.* **82** (2010) 6176-6184.
77. M. Sakakura i M. Takayama M, In-source decay and fragmentation characteristics of peptides using 5-aminosalicylic acid as a matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **21** (2010) 979-988.
78. T. Kocher, A. Engstrom i R. A. Zubarev, Fragmentation of peptides in MALDI in-source decay mediated by hydrogen radicals, *Anal. Chem.* **77** (2005) 172-177.
79. S. Laugesen i P. Roepstorff, Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping and protein analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14** (2003) 992–1002.
80. X. Zhu i I. A. Papayannopoulos, Improvement in the detection of low concentration protein digests on a MALDI TOF/TOF workstation by reducing -cyano-4-hydroxycinnamic acid adduct ions, *J. Biomol. Tech.* **14** (2003) 298–307
81. L. A. Marzilli, T. R. Golden, R. J. Cotter i A. S. Woods, Peptide sequence information derived by pronase digestion and ammonium sulfate in-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11** (2000) 1000–1008.
82. J. M. Asara i J. Allison, Enhanced detection of phosphopeptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ammonium salts, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** (1999) 35–44.
83. J. Hardouin, Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* **26** (2007) 672-82.
84. D. Reiber, T. A. Grover, Thomas A. i R. Brown, Identifying proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source fragmentation data combined with database searching, *Anal. Chem.* **70** (1998) 673-683.
85. J. J. Lennon i K. A. Walsh, Direct sequence analysis of proteins by in-source fragmentation during delayed ion extraction. *Prot. Sci.* **6** (1997) 2446–2453.
86. M. Macht, M. Pelzing, P. Palloch, V. Sauerland i J. Volz, Mass spectrometric analysis of head-to-tail connected cyclic peptides. *Acta Biochim. Polon.* **48** (2001) 1109-1112.

87. B. Schilling, W. Wang, J. S. McMurray i K. F. Medzihradszky, Fragmentation and sequencing of cyclic peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** (1999) 2174–2179.
88. M. Takayama, In-source decay characteristics of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12** (2001) 420–427.
89. H. C. Chiu, Y. H. Hsu i P. J. Lin, Synthesis of pH-sensitive inulin hydrogels and characterization of their swelling properties. *J. Biomed. Mater. Res.* **61** (2002) 146–152.
90. T. Song, Q. Hao, C. H. Law, C. K. Siu i I. K. Chu, Novel C β -C γ bond cleavages of tryptophan-containing peptide radical cations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23** (2012) 264–273.
91. A. R. Dongre', J. L. Jones, A. Somogyi i V. H. Wysocki. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: evidence for the mobile proton model, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 8365–8374.
92. A. M. Delvolve, B. Colsch i A. S. Woods, Highlighting anatomical sub-structures in rat brain tissue using lipid imaging, *Anal. Methods* **3** (2011) 1729–1736.
93. L. Zhao, R. T. Almaraz, F. Xiang, J. L. Hedrick i A. H. Franza, Gas-phase scrambling of disulfide bonds during matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009** (20) 1603–1616.
94. H. H. Thoi, O. Ito, M. Iino i M. Matsuda, Studies of sulfonyl radicals. 4. Flash photolysis of aromatic sulfones, *J. Phys. Chem.* **82** (1978) 314–391.
95. M. Shirai i M. Tsunooka, Photoacid and photobase generators: chemistry and application to polymeric materials, *Prog. Polim. Sci.* **21** (1996) 1–45.
96. I. R. Could, C. Tung, N. J. Turro, R. S. Givens i B. Matuszewski, Mechanistic studies of the photodecomposition of arylmethyl sulfones in homogeneous and micellar solutions, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 1789–1793.
97. K. H. Haselmann, B. A Budnik, F. Kjeldsen, N. C. Polfer i R. A. Zubarev, Can the (M(.)-X) region in electron capture dissociation provide reliable information on amino acid composition of polypeptides?, *Eur. J. Mass Spectrom.* **8** (2002) 461–469.
98. S. Camara, B. C. Gilbert, R. J. Meier, M. van Duin i A. C. Whitwood, EPR studies of peroxide decomposition, radical formation and reactions relevant to cross-linking and grafting in polyolefins, *Polymer* **47** (2006) 4683–4693.

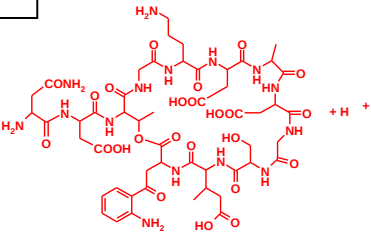
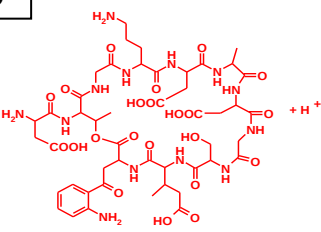
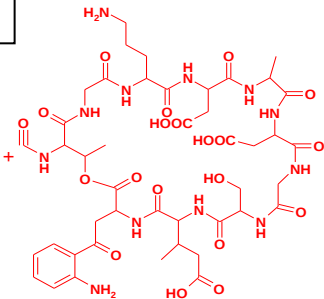
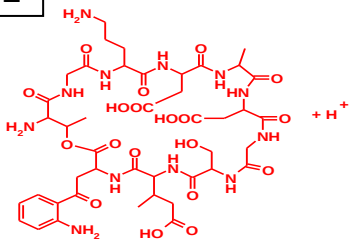
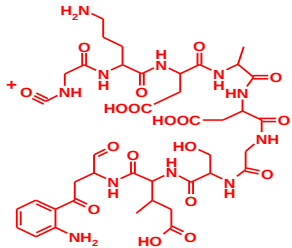
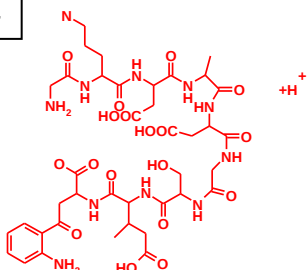
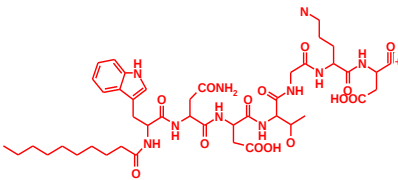
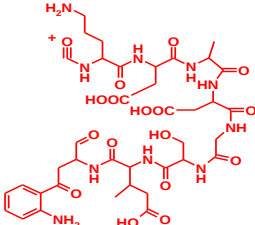
99. G.-Y. Shiue, J.-R. Chen, S.-H. Wu i C.-M. Shu, Thermal decomposition of various acid concentrations to synthesize triacetone triperoxide, Paper No.: 60-3024051, Presented at NATAS 2009, Lubbock, TX, USA (September 21–23, 2009).
100. K. Nozaki i Paul D. Bartlett, The Kinetics of decomposition of benzoyl peroxide in solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **68** (1946) 1686-1692.
101. L. Vieira Ferreira, I. Ferreira Machado, J. P. Da Silvaa i T. J. F. Branco, Surface photochemistry: benzophenone as a probe for the study of silica and reversed-phase silica surfaces, *Photochem. Photobiol. Sci.* **5** (2006) 665-666.
102. N. Tsusumi, T. Itohi i A. Ohsawa, Cleavage of S–S bond by nitric oxide (NO) in the presence of oxygen: A disproportionation reaction of two disulfides, *Chem. Pharm. Bull.* **48** (2000) 1524-1528.
103. J. Roeser, R. Bischoff, A. P. Bruins i H. P. Permentier, Oxidative protein labeling in mass-spectrometry-based proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.* **397** (2010) 3441–3455.

§ 9. DODATAK

Tablica D1. Strukture i teorijske mase iona produkata nastalih fragmentacijom daptomicina.

Struktura	Teorijska masa	Struktura	Teorijska masa
1 	1620,7176 $M+H^+$	2 	1505,6755 Interni fragment
3 	1491,6598 x-ion	4 	1489,6440 Interni fragment
5 	1466,5818 y-ion	6 	1449,5553 z-ion
7 	1336,5288 Interni fragment	8 	1306,4829 x-ion

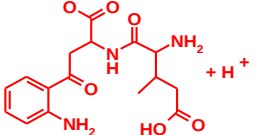
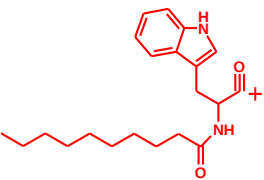
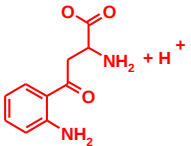
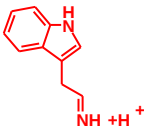
Tablica D1. Nastavak s prethodne stranice.

Struktura	Teorijska masa	Struktura	Teorijska masa
9 	1280,5026 Interni fragment	10 	1166,4595 y-ion
11 	1077,4130 x-ion	12 	1051,4326 y-ion
13 	979,3799 x-ion	14 	968,39558 y-ion
15 	957,4676 b-ion	16 	921,3584 x-ion

Tablica D1. Nastavak s prethodne stranice.

Struktura	Teorijska masa	Struktura	Teorijska masa
17	911,37412 y-ion	18	807,2791 x-ion
19	803,3166 b-ion	20	692,2522 b-ion
21	617,2525 b-ion	22	496,2038 y-ion
23	439,1823 y-ion	24	421,1718 b-ion

Tablica D1. Nastavak s prethodne stranice.

Struktura	Teorijska masa	Struktura	Teorijska masa
25 	352,1503 y-ion	26 	341,2235 b-ion
27 	209,1823 y-ion	28 	159,0922 Imonijev ion

§ 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24.06.1982. g. u Zagrebu. Osnovnu školu Nikole Hribara završila sam u Velikoj Gorici. Nakon završene Klasične gimnazije u Zagrebu 2000. godine upisujem studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2005. stekla sam zvanje diplomiranog inženjera kemije izradivši diplomski rad „Dobivanje rekombinativnih proteina suvremenim ekspresijskim sustavima: primjer kvaščeve seril-tRNA-sintetaze” pod vodstvom akademkinje prof.dr.sc. Ivane Weygand-Đurašević. Tijekom studija sam na temelju uspjeha primala stipendiju grada Velike Gorice.

Godine 2005. zapošljavam se u Plivi-Istraživanje i razvoj u Laboratoriju za tekućinsku kromatografiju i spektrometriju masa baveći se razvojem i validacijom metoda za analizu malih molekula i proteina. Godine 2007. upisujem Doktorski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu.

Od 2009. radim kao znanstvena novakinja na Institutu „Ruđer Bošković” u Laboratoriju za sistemsku biomedicinu. U znanstveno-istraživačkom radu koristim proteomski pristup koji uključuje elektroforetske metode, tekućinsku kromatografiju i spektrometriju masa u kombinaciji s pretraživanjem proteinskih baza podataka za analizu bioloških uzoraka različitih modela. Na međunarodnom natjecanju Alltechovih mladih znanstvenika 2012. g. osvojila sam 2. mjesto u Istočnoj Europi za napisani znanstveni rad. Dobitnica sam stipendije L’Oreal Adria i hrvatskog povjerenstva za UNESCO “Za žene u znanosti 2014”.

Govorim engleski i njemački jezik te posjedujem vozačku dozvolu B kategorije. Članica sam Hrvatskog kemijskog društva.

Znanstvene publikacije:

Znanstveni radovi u časopisima (7)

1. A. Horvatić, I. Dodig, T. Vuletić, D. Pavoković, Z. Hameršak, A. Butorac, M. Cindrić, Comparison between enhanced MALDI in-source decay by ammonium persulfate and N- or C-terminal derivatization methods for detailed peptide structure determination. *Anal. Chem.* **85** (2013) 3940-3947.
2. P. Peharec Štefanić, A. Smolko, A. Horvatić, M. Cindrić, M. Krsnik-Rasol, B. Balen, Protein and glycoprotein patterns related to morphogenesis in horseradish tissue culture. *Croat. Chem. Acta* **86** (2013) 27-37.
3. N. Šaban, V. Stepanić, S. Vučinić, A. Horvatić, M. Cindrić, I. Perković, B. Zorc, N. Oršolić, M. Mintas, K. Pavelić, S. Kraljević Pavelić, Antitumor mechanisms of amino acid hydroxyurea derivatives in the metastatic colon cancer model. *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 23654-23671.
4. S. Vučinić, Z. Vrbanac, M. Belić, I. Šmit, D. Stanin, A. Horvatić, Proteomics as a methodology for the characterization of potential new markers of stress elicited by

strenuous exercise in sporting dogs – a preliminary study. *Vet. Clin. Patol.* **42** (2013) 123-124.

5. D. Pavoković, D. Poljuha, A. Horvatić, N. Ljubešić, D. Hagège, M. Krsnik-Rasol, Morphological and proteomic analyses of sugar beet cultures and identifying putative markers for cell differentiation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **108** (2012) 111-119.

6. R. Pavišić, I. Dodig, A. Horvatić, L. Mijić, M. Sedić, M. Rajić Linarić, I. Gruić Sovulj, T. Preočanin, M. Bukvić Krajačić, M. Cindrić, Differences between reversible (self-association) and irreversible aggregation of rHuG-CSF in carbohydrate and polyol formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **76** (2010) 357-365.

7. R. Pavišić, K. Hock, I. Mijić, A. Horvatić, M. Gecan, M. Sedić, M. Bukvić Krajačić, M. Cindrić, Recombinant human granulocyte colony stimulating factor pre-screening and screening of stabilizing carbohydrates and polyols. *Int. J. Pharm.* **387** (2010) 110-119.

Ostali znanstveni radovi (4)

1. N. Zdolec, V. Dobranić, A. Horvatić, S. Vučinić. Selection and application of autochthonous functional starter cultures in traditional Croatian fermented sausages. *Int. Food Res. J.* **20** (2013) 1-6.

2. M. Cindrić, M. Sedić, A. Horvatić, I. Dodig, Određivanje aminokiselinske sekvencije farmaceutskih peptida MALDI-TOF tandemnom spektrometrijom masa, Rad Hazu 508, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti - HAZU (ur.), Zagreb : Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti - HAZU, 2010. Str. 45-57.

3. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina: glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka*, **45** (2009) 218-232.

4. A. Horvatić, M. Cindrić, Analiza farmaceutskih peptida spektrometrijom masa, *Medicina: glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka*, **45** (2009) 258-263.

Priopćenja na znanstvenim skupovima (8)

1. S. Vučinić, A. Horvatić, M. Bujak, K. Mišković, M. Cindrić, M. Baus Lončar, Proteomic profiling of intestinal proteins in TFF2 mice, *Periodicum Biologorum*, Zagreb, 2012 (poster).

2. A. Horvatić, M. Cindrić, Analysis of illicit herbal dietary supplements: Does a herb need a backup? 6th Summer Course for Mass Spectrometry in Biotechnology and Biomedicine, Dubrovnik, 2012 (poster).

3. A. Horvatić, E. Gjurčević, D. Stanin, S. Vučinić, Proteome profiling of deformed vertebrae in aquarium fish black neon tetra, *Hyphesobricon herbertaxelrodi* L. 6th

Summer Course for Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, 2012 (poster).

4. F. Martinković, S. Vučinić, A. Horvatić, Proteomic approach for comparison of in vitro cultured trypanosomatids *Crithidia luciliae* and *Leishmania infantum*, European Multicolloquium Of Parasitology XI, Cluj-Napoca, Romania, 25 – 29 July 2012 (predavanje, koautor).

5. D. Poljuha, D. Pavoković, A. Horvatić, N. Ljubešić, D. Hagège, M. Krsnik-Rasol, Morphology, ultrastructure and extracellular proteome of sugarbeet tissue lines related to cell differentiation, Proceedings of 10th Multinational Congress on Microscopy, Urbino, Italy, 2011. (predavanje, koautor).

6. A. Horvatić, I. Dodig, A. Marković, V. Bačun-Družina, A. Butorac, D. Pavoković, M. Krsnik-Rasol, M. Cindrić, Protein identification by MALDI MS/MS using de novo sequencing of derivatized tryptic peptides, 4th Summer School of Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, Dubrovnik, 2010 (poster).

7. D. Pavoković, A. Horvatić, M. Cindrić, M. Krsnik-Rasol, Comparative proteomic analysis of the secreted proteins of sugar beet cell lines, 5th Slovenian Symposium on Plant Biology with International Participation, 2010 (poster).

8. A. Nestić, S. Vodopija Mandić, T. Madić, Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje sadržaja topiramata u pokusima ispitivanja brzine oslobađanja aktivne tvari iz Topiramat tableta, XX. Jubilarni hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 2007 (poster).

Patenti (2)

1. M. Cindrić, S. Kraljević Pavelić, A. Horvatić, Anita; I. Dodig, Mass spectrometry - protein identification, US 2011/0212531 A1

2. M. Cindrić, S. Kraljević Pavelić, A. Horvatić, I. Dodig, Metoda identifikacije proteina spektrometrijom masa, 2011, HR P20100044 A2.