

Razvoj multidimenzionalne kromatografije za razdvajanje peptida pomoću automatizirane mikroekstrakcije na čvrstoj fazi

Bilić, Nika

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:789331>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

Nika Bilić

**RAZVOJ MULTIDIMENZIONALNE
KROMATOGRFIJE ZA RAZDVAJANJE
PEPTIDA POMOČU AUTOMATIZIRANE
MIKROEKSTRAKCIJE NA ČVRSTOJ FAZI**

Rad je izrađen pod mentorstvom doc. dr. sc. Bojana Žunara (Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u Laboratoriju za bioanalitiku, Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod komentorstvom dr. sc. Marija Cindrića, znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju te uz pomoć dr. sc. Renate Bibe.

Diplomski rad je napravljen u okviru projekta QUA/QUA Protein: Kvantitativna i kvalitativna analiza proteina za potrebe biomedicine i biotehnoške industrije (KK.01.1.1.07.0023), kojeg je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj, voditelja dr. sc. Marija Cindrića.



ZAHVALA

Veliko hvala prvenstveno dugujem neposrednoj voditeljici dr. sc. Renati Bibi koja me usmjeravala u ovom procesu od početka do kraja. Hvala za svaki razgovor, savjet i pomoć pri izradi i pisanju ovog rada. Zauvijek ću cijeniti trud, vrijeme i strpljenje koje si uložila u mene.

Zahvaljujem se i dr. sc. Mariju Cindriću koji mi je pružio priliku i omogućio stjecanje vrijednog iskustva te što je velikodušno prihvatio ulogu mog komentora. Hvala Vam na prenesenom znanju te strpljenju i vremenu za sva moja pitanja.

Također se zahvaljujem svim članovima Laboratorija za bioanalitiku Instituta Ruđer Bošković koji su me poučavali i podupirali te doprinijeli vedroj radnoj atmosferi posljednje dvije godine.

Zahvalna sam i svim prijateljima i obitelji koji su me bodrili te proživljavali važne trenutke sa mnom kroz sve ove godine.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima bez kojih ne bih bila ovdje gdje jesam. Hvala vam na nesebičnoj podršci, riječima ohrabrenja i prihvaćanju svih mojih hirova!

I na kraju, zahvaljujem Daliju za svaki spas iz beznađa, beskrajnu potporu i ljubav.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

RAZVOJ MULTIDIMENZIONALNE KROMATOGRAFIJE ZA RAZDVAJANJE PEPTIDA POMOĆU AUTOMATIZIRANE MIKROEKSTRAKCIJE NA ČVRSTOJ FAZI

Nika Bilić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058128149

Sažetak: Multidimenzionalna tekućinska kromatografija (LC) spregnuta sa spektrometrijom masa (MS) ima ključnu ulogu u proteomskom pristupu odozdo-nagore zbog povećanja osjetljivosti metode smanjenja kompleksnosti uzorka. Mikroekstrakcija čvrstom fazom (μ SPE) je jednostavna i učinkovita metoda pripreme uzoraka za MS. Cilj ovog rada bio je ispitati ortogonalnost nekonzekutivnog sustava za multidimenzionalno frakcioniranje peptida BSA kako bi se utvrdilo koja kombinacija tehnika pokazuje najveću nezavisnost. Optimizirano je i ispitano frakcioniranje kombinacijom 6 metoda odjeljivanja na μ SPE uređaju s pozitivnim pritiskom: i) izmjenjivač kombiniranog načina jake anionske izmjene i izmjene obrnutih faza, ii) jaki kationski i iii) jaki anionski izmjenjivač, iv) hidrofilno-lipofilni izmjenjivač i izmjenjivač obrnutih faza pri v) niskom pH i vi) visokom pH. Šest nastalih frakcija je analizirano LC-MS sustavom, a sirovi podaci su obrađeni alatom za pretragu baza podataka. Rezultati su pokazali da za frakcioniranje peptida BSA najveću ortogonalnost daje kombinacija hidrofilno-lipofilnog izmjenjivača ili jakih ionskih izmjenjivača u prvoj dimenziji te jakih ionskih izmjenjivača u drugoj dimenziji.

Ključne riječi: multidimenzionalnost, mikroekstrakcija na čvrstoj fazi, ortogonalnost, nepokretne faze, spektrometrija masa

Rad sadrži: 53 stranice, 15 slika, 7 tablica, 79 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: doc. dr. sc. Bojan Žunar

Komentor: dr. sc. Mario Cindrić, znan. savj. (tr. zv.), IRB

Pomoć pri izradi: dr. sc. Renata Biba, viši asistent, IRB

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Renata Teparić (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Bojan Žunar (mentor)
3. dr. sc. Mario Cindrić, znan. savj. (tr. zv.), IRB (član)
4. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjenski član)

Datum obrane: 18. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

DEVELOPMENT OF MULTIDIMENSIONAL CHROMATOGRAPHY FOR SEPARATION OF PEPTIDES
USING AUTOMATED SOLID-PHASE MICROEXTRACTION

Nika Bilić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058128149

Abstract: Multidimensional liquid chromatography (LC) coupled with mass spectrometry (MS) is pivotal in the bottom-up proteomic approach for its enhanced sensitivity through the reduction of peptide complexity. Solid-phase microextraction (μ SPE) is a simple and efficient sample preparation method for MS. The aim of this study was to optimize and evaluate the orthogonality of offline multidimensional fractionation methods for BSA peptides to determine the combination of fractionation methods which provides the highest degree of independence, using a positive pressure μ SPE platform. The fractionation capabilities of 6 separation methods were examined: i) mixed-mode strong anion-exchange and reversed phase, ii) strong cation-exchange, iii) hydrophilic-lipophilic balance, iv) strong anion-exchange, and v) low pH and vi) high pH reverse phase. Six obtained fractions of each fractionation were analyzed on an LC-MS system, with raw data processed using a protein database search engine. The results showed that for BSA peptides, the highest orthogonality was achieved with a combination of hydrophilic-lipophilic balance or strong ion-exchange chromatography (IEC) in the first dimension and strong IEC in the second dimension.

Keywords: multidimensionality, solid phase microextraction, orthogonality, stationary phase, mass spectrometry

Thesis contains: 53 pages, 15 figures, 7 tables, 79 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Bojan Žunar, PhD, Associate professor

Co-mentor: Mario Cindrić, PhD, Scientific Adviser (with tenure), RBI

Technical support and assistance: Renata Biba, PhD, Postdoctoral Researcher, RBI

Reviewers:

1. Renata, Teparić, PhD, Full professor (president)
2. Bojan, Žunar, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Mario, Cindrić, PhD, Scientific Adviser (with tenure), RBI (member)
4. Igor, Slivac, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 18th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PROTEOMIKA	3
2.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI	4
2.2.1. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti.....	4
2.3. SPEKTROMETRIJA MASA	5
2.3.1. Ionski izvori.....	5
2.3.1.1. Ionizacija elektroraspršenjem	5
2.3.2. Analizatori masa.....	6
2.3.2.1. <i>Kvadropolni analizator masa</i>	7
2.3.2.2. <i>Analizator mase vremena leta</i>	7
2.3.3. Tandemna spektrometrija masa	8
2.3.4. MS ^E	9
2.3.5. Pretraga baze podataka.....	9
2.4. MIKROEKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI	10
2.4.1. Nepokretne faze.....	11
2.5. MULTIDIMENZIONALNOST	13
2.6. ORTOGONALNOST	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. KEMIKALIJE	16
3.2. MATERIJALI	16
3.3. INSTRUMENTI	16
3.4. PRIPRAVA UZORAKA	17
3.4.1. Priprava triptičkih peptida proteina BSA.....	17
3.4.2. Frakcioniranje peptida.....	17
3.5. ANALIZA PEPTIDA SPREGNUTIM SUSTAVOM nanoUPLC TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE SA SPEKTROMETROM MASA VISOKE RAZLUČIVOSTI	20
3.6. OBRADA PODATAKA	21
3.6.1. Analiza programom ProteinLynx Global Server	21
3.6.2. Obrada podataka za pojedine metode frakcioniranja.....	22
3.6.3. Izračun ortogonalnosti.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. KROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE FRAKCIJA PEPTIDA	25
4.2. ANALIZA POKRIVENOSTI PEPTIDNE SEKVENCE BSA	32
4.3. ANALIZA RASPODJELE FRAKCIONIRANIH PEPTIDA BSA NA NEPOKRETNIM	

FAZAMA MAX, SCX, HLB, QMA I C18 PRI pH 2,5 I pH 10	33
4.3.1. Utjecaj pl na raspodjelu peptida tijekom frakcioniranja na μ SPE	33
4.3.2. Utjecaj GRAVY indeksa na raspodjelu peptida tijekom frakcioniranja na μ SPE 35	
4.3.3. Utjecaj duljine peptida na raspodjelu peptida tijekom frakcioniranja na μ SPE.	37
4.3.4. Raspodjela intenziteta peptida tijekom frakcioniranja na μ SPE.....	38
4.4. ANALIZA ORTOGONALNOSTI.....	38
4.4.1. Ortogonalnost multidimenzionalnih sustava.....	39
4.5. ANALIZA KEMIJSKIH MODIFIKACIJA PEPTIDA U UVJETIMA VISOKOG I NISKOG pH	43
5. ZAKLJUČCI.....	45
6. LITERATURA.....	46

1. UVOD

Tijekom posljednja dva desetljeća, razvijana je proteomika koja se temelji na analizi vezanim sustavima tekućinskog kromatografa (engl. *Liquid Chromatography*, LC) i tandemne spektrometrije masa (engl. *Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS) kao alternativa dugotrajnim i zahtjevnim imunološkim metodama i metodama koje se zasnivaju na korištenju poliakrilamidnog gela poput denaturirajuće elektroforeze u poliakrilamidnom gelu (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) i dvodimenzionalne gel elektroforeze (engl. *Two Dimensional-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, 2D-PAGE). Poseban napredak postignut je u poboljšanju tijekom rada pristupa odozdo-nagore (engl. *bottom up*) u tzv. *shotgun* proteomici, koji se temelji na LC-MS/MS analizi peptida nastalih digestijom proteina (Doung i Lee, 2023). Pristup odozdo-nagore predstavlja moćan alat za identifikaciju i kvantifikaciju tisuća proteina iz složenih bioloških uzoraka i lizata (Dupree i sur., 2020). No, prevelike razlike u rasponu koncentracija proteina unutar složenih uzoraka nadilaze mogućnosti trenutačno korištenih jednodimenzionalnih analitičkih sustava, stoga separacija peptida prije MS/MS analize predstavlja veliki izazov (Yu i sur., 2023).

U cilju učinkovitije separacije peptida koja rezultira većom razlučivosti i pokrivenosti identificirane sekvence, pristupa se multidimenzionalnosti. Kombiniranjem dvaju ili više različitih metoda separacije peptida smanjuje se broj peptida koji zajedno eluiraju, pri čemu separacijsku moć multidimenzionalnog sustava predstavlja produkt pojedinačnih primijenjenih dimenzija (Giddings, 1984).

Postoje mnogi načini ostvarivanja multidimenzionalnosti koji se temelje na iskorištavanju različitih fizikalno-kemijskih svojstava peptida, 2D-PAGE (Goez i sur., 2018), kapilarne elektroforeze (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE) (Stroink i sur., 2005) i ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) (Wilson i sur., 2007), no multidimenzionalnost se najčešće ostvaruje povezanim LC sustavima kao što su spregnuti sustav jake kationske izmjene (engl. *Strong Cation Exchange*, SCX) i kromatografije obrnutih faza (engl. *Reversed Phase Liquid Chromatography*, RPLC) (Zhu i sur., 2017), spregnuti sustav kromatografije molekularnog isključivanja (engl. *Size-Exclusion Chromatography*, SEC) i RPLC (Bedani i sur., 2006) te spregnuti sustav RPLC pri niskom i RPLC pri visokom pH (Van den Hurk i sur., 2024). Cilj izbora separacijskih metoda unutar multidimenzionalnog sustava je postizanje razdvajanja što većeg broja komponenti komplementarnom selektivnošću pojedinačnih dimenzija, odnosno ostvarenje ortogonalnog

sustava.

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Microextraction*, μ SPE) je jednostavna preparativna tehnika koja koristi pozitivni pritisak (engl. *Positive Pressure*, PP) za kondicioniranje i ekvibraciju nepokretne faze te eluciju male količine uzorka (Jalili i sur., 2019) te je dosad uglavnom korištena za pročišćavanje i koncentriranje peptida (Fischer i sur., 2021; Xu i sur., 2021; Zhao i sur., 2015).

U ovom radu PP- μ SPE tehnika je korištena za ostvarivanje automatiziranog nekonzekutivnog sustava za multidimenzionalno frakcioniranje triptičkih peptida albumina iz seruma goveda (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA). Glavni cilj ovog rada bio je optimizirati protokole za frakcioniranje peptida pomoću PP- μ SPE na pet nepokretnih faza koje se međusobno razlikuju po fizikalno-kemijskim svojstvima: izmjenjivača kombiniranog načina jake anionske izmjene i izmjene obrnutih faza (engl. *Mixed Mode Anion Exchange*, MAX), SCX i jakog anionskog izmjenjivača (engl. *Quaternary Methylammonium Exchange*, QMA), nepokretne faze hidrofilne-lipofilne izmjene (engl. *Hydrophilic-Lipophilic Balance*, HLB) i RP pri uvjetima niskog i visokog pH. Peptidi u pojedinačnim frakcijama potom su bili identificirani spregnutim sustavom RPLC-MS/MS te analizirani na temelju intenziteta, duljine, izoelektrične točke (engl. *Isoelectric Point*, pI) i GRAVY (engl. *Grand Average of Hydropathicity*) indeksa, a izračunata je i ukupna pokrivenost identificirane sekvence proteina za svaku metodu frakcioniranja. Na kraju je bila izračunata geometrijska ortogonalnost svih kombiniranih sustava s ciljem utvrđivanja kombinacije tehnika koje pokazuju najveću nezavisnost. Uz to, s obzirom da se pH-ovisna RP kromatografija u literaturi često navodi kao optimalna metoda odjeljivanja peptida za MS (Yeung i sur., 2020), ispitan je i utjecaj pH vrijednosti na udio različitih kemijskih modifikacija peptida BSA nastalih prilikom ovih metoda frakcioniranja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROTEOMIKA

Proteini ili bjelančevine su makromolekule koje se nalaze u svim živim organizmima i od prvredne su važnosti za sve funkcije žive stance. U građu proteina ulazi dvadeset različitih osnovnih jedinica, aminokiselina, koje se međusobno povezuju peptidnim vezama te tako tvore kraće lance, peptide, i duže lance, proteine (Lodish i sur., 2016). Pojam proteom prvi put je definiran kako bi opisao skup proteina koji su kodirani genomom organizma (Wilkins i sur., 1996), a danas se opisuje kao skup svih eksprimiranih proteina neke stanice, tkiva, organa ili organizma (Dupree i sur., 2020). Znanstvena grana koja proučava proteom naziva se proteomika, a bavi se strukturnim opisom proteina i njihovih kompleksa, uključujući njihove izoforme, modifikacije te interakcije među proteinima kao i interakcije proteina s raznim reagensima (Tyers i Mann, 2003). Cilj proteomike obuhvaća identifikaciju i kvantifikaciju svih proteina nekog proteoma te opis njihove ekspresije, stanične lokalizacije, interakcija i PTM-ova. Ubrzan napredak proteomike potaknut je razvojem novih tehnologija separacije peptida i proteina, analize spektrometrijom masa i bioinformatičkom analizom podataka (Zhang i sur., 2013).

Kvalitativnom analizom proteina određuje se primarni slijed aminokiselina koje ga čine čime je moguće odrediti gen koji za njega kodira i u konačnici identificirati organizam u kojemu je eksprimiran analizirani protein, a osim toga moguće je odrediti mutacije i napraviti provjeru strukture i čistoće proteina dobivenih genetskim inženjerstvom. Iako je proteomika uglavnom usmjerena na kvalitativnu analizu, postaje jasno kako sama identifikacija i struktura proteina nisu dovoljne za razrješavanje mnogih bioloških pitanja. Promjene koncentracije proteina su odraz bioloških procesa i njihovih promjena, stoga metode kvantifikacije proteina i PTM-ova predstavljaju sastavni dio proteomike (Zhang i sur., 2013). Unatoč mnogim kvantitativnim metodama i tehnikama, proteomika se uvelike zasniva ili na samoj spektrometriji masa ili na vezanim sustavima tekućinskog kromatografa i spektrometra masa te danas predstavlja glavni pristup identifikaciji i kvantifikaciji proteina i PTM-ova, na razini manjeg mjerila ili na razini cijelog proteoma (Cindrić i sur., 2009).

Proteinskoj analizi spektrometrijom masa pristupa se na dva načina: pristupom odozgor-nadolje (engl. *top down*) ili pristupom odozdo-nagore. Pristup odozgor-nadolje je rjeđe korišten pristup u proteomici, a temelji se na analizi cjelovitih proteina. Od velike je koristi pri analizi pojedinačnih proteina ili jednostavnih smjesa od biološkog interesa te pri identifikaciji dijelova proteina s PTM-ovima (Catherman i sur., 2014). Tipičan tijek rada pristupom odozdo-nagore sastoji se od digestije proteina od interesa, analize vezanim sustavom tekućinskog kromatografa i spektrometra mase te obradom podataka u cilju

identifikacije peptida, odnosno proteina. Ovaj pristup koristi se za identifikaciju i kvantifikaciju proteina, karakterizaciju PTM-ova i analizu kompleksnih proteinskih smjesa poput staničnih lizata (Galić i Cindrić, 2008).

2.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Tekućinska kromatografija je tehnika koja se temelji na raspodjeli analita između pokretne i nepokretne faze, koje se međusobno ne miješaju (Rouessac i Rouessac, 2007). Raspodjela analita između pokretne i nepokretne faze ovisi o njihovim interakcijama koje mogu nastati ionskom izmjenom, razdiobom među fazama, adsorpcijom ili uslijed razlike u veličini analita. Pokretna faza nosi analit kroz nepokretnu fazu te analit ulazi u interakcije s pokretnom i nepokretnom fazom različitim afinitetom (Redovniković, 2016). Molekula analita s najvećim afinitetom za nepokretnu fazu se posljednja eluira s kolone i posljedično ima najveće vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme, RT).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je jedan od najmoćnijih alata u analitičkoj kemiji. Može razdvojiti, identificirati i kvantificirati spojeve prisutne u gotovo svakom uzorku koji je topljiv u tekućini (Naushad i Khan, 2014). Karakteristike HPLC sustava su velika razlučivost i brzina odijeljivanja. S obzirom da postizanje veće razlučivosti razdvajanja ovisi o površini nepokretne faze, povećanjem površine nepokretne faze povećava se i otpor prolasku pokretne faze stoga je potrebno da se uzorak otopljen u tekućoj mobilnoj fazi propušta kroz kolonu visokim tlakom pomoću visokotlačne pumpe. HPLC sustav sastoji se od sustava za dobavu pokretne faze, injektivnog sustava, kućišta za kolonu i detektora (Redovniković, 2016). Rezultat analize HPLC sustavom je kromatogram koji predstavlja ispis bilo koje funkcije koncentracije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu ili volumenu eluiranja (Cindrić i sur., 2009).

2.2.1. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) je kolonski kromatografski sustav koji karakterizira upotreba čestica punila kolone veličine 1,7 μm čime se ostvaruje bolja razlučivost i kraće vrijeme analize u odnosu na HPLC. Također je smanjen volumen injektiranja uz povećanu osjetljivost (Naushad i Khan, 2014).

U ovom radu korišten je nanoUPLC sustav, pri čemu prefiks nano označava izvedbu instrumenta sa smanjenim volumenom injektiranja uzorka (od nekoliko nL do μL) i protokom pokretne faze u području jednakom ili manjem od mikrolitra. Vrsta kromatografije koja se provodila ovim sustavom je RPLC. RP analitička kolona u korištenom UPLC sustavu sastoji

se od silikagela ili polimera na koje su kovalentno vezani alkilni lanci. Najčešće korištene nepokretne faze su: oktadecilsilicijev dioksid (C18), oktilsilicijev dioksid (C8) i butilsilicijev dioksid (C4), a pokretnu fazu čini smjesa polarnog otapala i vode (Žuvela i sur., 2019). Svrha LC sustava spregnutog sa spektrometrom masa je smanjenje kompleksnosti smjese peptida koji ulaze u ionizacijski izvor spektrometra masa i poboljšanje osjetljivosti analize.

2.3. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa (engl. *Mass spectrometry*, MS) je instrumentalna analitička metoda koja se koristi za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju ioniziranih atoma i molekula u plinskoj fazi, ovisno o njihovom omjeru mase i naboja (m/z) (Watson i Sparkman, 2007). Analiza spektrometrom masa se sastoji od ionizacije molekula ionizacijskim izvorom, nakon čega se nastali ioni u analizatoru razdvajaju prema omjeru m/z te detektiraju pomoću detektora. Rezultat analize je spektar masa, grafički prikaz u kojem pojedini pik predstavlja specifičnu vrijednost m/z iona s pripadajućim intenzitetom. Signal najvećeg intenziteta naziva se baznim signalom te se njegov intenzitet nominalno smatra vrijednošću jedan, tj. relativne zastupljenosti od 100 posto. Intenzitet ostalih signala računa se u odnosu na bazni signal (Rouessac i Rouessac, 2007).

2.3.1. Ionski izvori

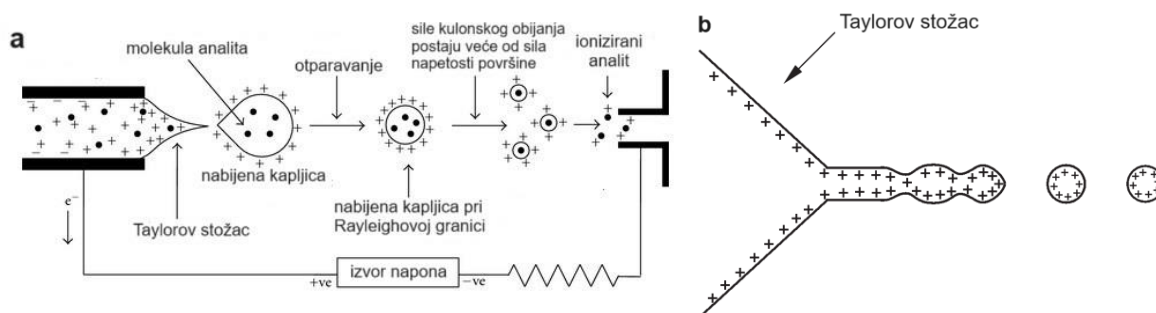
Kao što je već spomenuto, prvi korak analize spektrometrijom masa je ionizacija analita u ionizacijskom izvoru kako bi se stvorili ioni u plinskoj fazi. Prilikom ionizacije uzorak se podvrgava visokoj energiji snopa elektrona te pri tome može doći do fragmentacije na dva ili više fragmenata. Ukoliko molekule ne podlegnu fragmentaciji, u spektru su prikazane s najvećom vrijednosti m/z i nazivaju se molekulski ion (Ursić, 2017). Izvori ionizacije se mogu podijeliti na one u kojima se uzorak najprije prevodi u plinsko stanje i zatim ionizira poput kemijske ionizacije (engl. *Chemical Ionization*, CI) i ionizacije elektronima (engl. *Electron Impact*, EI) te na one u kojima se uzorak iz kondenzirane faze nesposredno prevodi u ione kao što su metode matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) i ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) (Galić, 2004). Izvori ionizacije također se razlikuju s obzirom na količinu energije koja se predaje molekuli te se njihova upotreba odabire prema fizikalno-kemijskim svojstvima analita.

2.3.1.1. Ionizacija elektroraspršenjem

Ionizacija elektroraspršenjem pripada u blage izvore ionizacije prema količini energije koja se predaje molekuli analita čime je fragmentacija minimalna. Jedinствeno svojstvo elektroraspršenja je i nastajanje višestruko nabijenih iona što omogućuje detekciju analita

velikih molekulskih masa čak i s analizatorima malih vrijednosti m/z (Wang i Cole, 1994). Jedan je od najzastupljenijih načina ionizacije u vezanom sustavu tekućinskog kromatografa i spektrometra masa jer omogućava ionizaciju analita neposredno iz otopine, analizu termički nestabilnih ili slabo hlapljivih spojeva (Galić, 2004) te je kompatibilan sa svim analizatorima (Cindrić i sur., 2009).

Ionizacija započinje ulaskom pokretne faze i analita u ionizator kroz kapilaru (iglu) koja je ujedno elektroda pod visokim naponom (2-5 kV) (Cindrić i sur., 2009). Pod utjecajem električnog polja dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini. Ionizacija može biti pozitivna ili negativna u ovisnosti o naponu i kolektorskoj elektrodi. Ukoliko je kapilara priključena na pozitivan kraj napona, kationi će se kretati prema katodi i akumulirati na površini tekućine. Zamjenom polariteta omogućeno je stvaranje negativno nabijenih iona. Na vršku igle formira se maglica koja se sastoji od kapljica otapala te nešto uparenog otapala. Kada jakost polja dosegne kritičnu vrijednost, formira se tzv. Taylorov stožac u kojem se kontinuirano proizvodi mlaz nabijenih kapljica koje putuju prema suprotnoj elektrodi (slika 1). Kolektorska elektroda privlači nabijene kapljice i dodatno ih ubrzava. Otparavanjem u struji dušika, pri temperaturi od 100 °C te uz električni potencijal kapljice se smanjuju (Cindrić i sur., 2009). Dvije su sile koje djeluju u suprotnom smjeru na kapljice. Jedna od njih je sila površinske napetosti koja djeluje na zadržavanje sferičnog oblika kapljice, dok je druga sila kulonskog odbijanja između naboja na površini koja utječe na nestanak nabijene kapljice oblika sfere (Banerjee i Mazumdar, 2012). Kada su te dvije sile jednake postignuta je Rayleighova granica stabilnosti. U trenutku kada se kapljice otparavanjem smanje toliko da se svi mogući ioni nalaze na površini kapljica, sile kulonskog odbijanja postanu veće od sila napetosti površine i analit kristalizira ili prelazi u plinsku fazu (Cindrić i sur., 2009). Nakon otparavanja kapljica, nastali kvazi-molekulski ioni u plinovitoj fazi uvode se u analizator masa inertnim plinom dušika.



Slika 1. a) Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem (prema Banerjee i Mazumdar, 2012) **b)** Nakon destabilizacije naboja na površini, meniskus se oblikuje u stožac pod utjecajem jakog električnog polja (prema Galić, 2004)

2.3.2. Analizatori masa

Analizator masa je dio spektrometra čiji se rad zasniva na upotrebi električnog i magnetskog polja za razdvajanje iona različitih vrijednosti m/z . Karakteristike analizatora masa čine gornja granica m/z , osjetljivost, razlučivanje i točnost mjerenja mase. Gornja granica m/z je najveća vrijednost m/z koja se može izmjeriti, a osjetljivost je mjera za odziv detektora dobivena analizom određenog analita. Razlučivost je sposobnost razdvajanja iona gotovo jednakih vrijednosti m/z , dok je točnost mjerenja mase sposobnost određivanja molekulske mase što bliže točnoj masi (Rouessac i Rouessac, 2007). U proteomici se najčešće upotrebljavaju analizatori koji analiziraju sve ione istovremeno, kao što su analizator vremena leta (engl. *Time Of Flight*, TOF), orbitrap, ionska stupica i Fourierova transformacija ionske ciklotronske rezonancije (engl. *Fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR) ili oni koji mogu propuštati ione različitih masa uzastopno tijekom vremena, poput kvadropolnog analizatora (engl. *Quadrupol*, Q) i ionske stupice (engl. *Ion Trap*, IT) (de Hoffmann i Stroobant, 2007).

2.3.2.1. Kvadropolni analizator masa

Kvadropolni analizator masa sastoji se od četiri paralelne elektrode pri čemu su dvije nasuprotne elektrode pozitivnog polariteta, a dvije negativnog polariteta. Na dijagonalno suprotne elektrode primjenjuje se istosmjerni ili izmjenični napon. Na taj način se formira oscilirajuće električno polje analizatora čime je omogućena selekcija specifičnih vrijednosti m/z (Cindrić i sur., 2009). Dinamika ovog procesa određena je brojnim faktorima, poput veličine negativnog polariteta elektroda, frekvencije izmjeničnog napona, ali i pozicijom, brzinom i omjerom mase i naboja iona. Ako je ion velike vrijednosti m/z ili je frekvencija izmjeničnog potencijala velika, zbog kratkog vremena tijekom kojeg će negativni potencijal imati zanemariv utjecaj na teške ione, djelovati će samo elektroda pozitivnog polariteta i ioni će biti usmjereni prema centralnoj osi instrumenta te će stići do detektora. Ukoliko je ion male vrijednosti m/z , njegova putanja će biti značajno narušena brzim izmjeničnim potencijalom pri čemu će ubrzati i udariti u elektrodu (Miller i Denton, 1986). Razlučivost kvadropolnog analizatora masa određena je omjerom istosmjernog i izmjeničnog napona.

Kvadropolnim analizatorom je moguće odabrati raspon vrijednosti m/z što se naziva i „skenirajućim“ načinom rada, kvantificirati uzorak „praćenjem odabranog iona“ (engl. *Selected Ion Monitoring*, SIM) te djelovati poput vodiča iona pri „širokopojasnom“ načinu rada (engl. *wide band pass mode*) (Volmer i Selno, 2005).

2.3.2.2. Analizator mase vremena leta

Princip rada TOF-a temelji se na razdvajanju iona s obzirom na njihovu brzinu putovanja, od trenutka ulaska u analizator do njihove detekcije. Kako bi se izmjerilo vrijeme

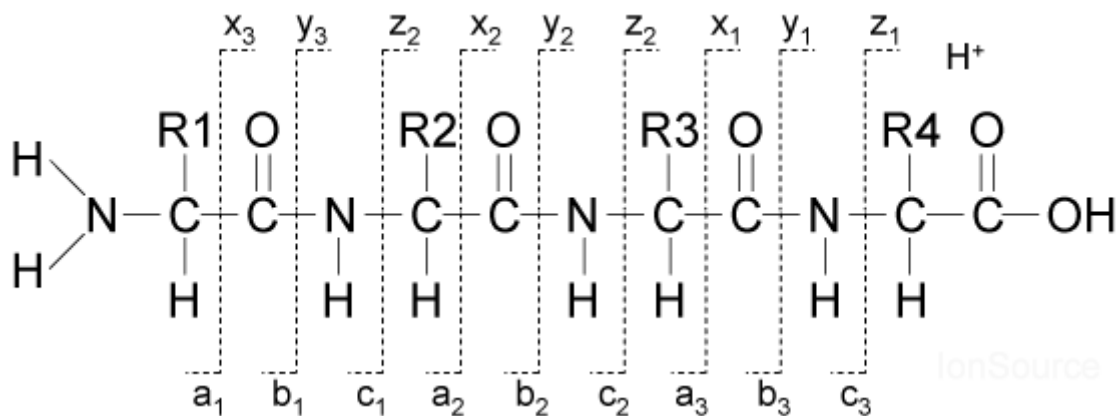
leta iona, na samom početku analizatora primjenjuje se pulsno električno polje koje ima ulogu sakupljanja i guranja iona u analizator u kratkim pulsevima. Svi ioni prelaze jednake udaljenosti, stoga njihovo vrijeme detekcije ovisi o brzini, odnosno vrijednosti m/z . Manji ioni imaju veću brzinu, dok veći ioni imaju manju brzinu. U cilju povećanja razlučivosti moguća je ugradnja ionskog ogledala (engl. *reflecton, ion mirror*) koje omogućuje reflektiranje iona unutar analizatora i time produženje vremena njihovog leta čime ioni istih masa, a različitih kinetičkih energija, dolaze do detektora u isto vrijeme (Cindrić i sur., 2009).

2.3.3. Tandemna spektrometrija masa

Kao što je prethodno spomenuto, pristup odozdo-nagore temelji se na digestiji proteina i analizi peptida. Peptide nastale cijepanjem proteazama kao što je tripsin i analizirane spektrometrijom masa moguće je dalje fragmentirati tehnikama tandemne spektrometrije masa (MS/MS) u cilju strukturne karakterizacije (McLafferty, 1981). Tandemnu spektrometriju masa omogućuju hibridni analizatori koji se sastoje od dva ili više, istih ili različitih tipova spregnutih analizatora masa.

Tandemni sustav koji se koristio u ovom radu sastoji se od kvadropola u kojem se odvijala kolizijom inducirana disocijacija (engl. *Collision Induced Dissociation, CID*) i TOF-a. Prvi analizator masa, kvadropol, služi za odabir i propuštanje iona određene vrijednosti m/z (iona prekursora) nakon čega se vrši fragmentacija pomoću kolizijske energije. Tako nastali fragmenti iona (ioni produkti) analiziraju se u drugom analizatoru masa, TOF-u.

CID je najčešće korištena tehnika fragmentacije pri kojoj se ioni prekursora sudaraju s inertnim plinom poput dušika, argona ili helija. Vrsta kolizije koja slijedi nakon kvadropola kao filtera iona prekursora, je niskoenergetska kolizija jer se ioni kroz kvadropol moraju sporo kretati kako bi bili pod utjecajem promjenjivog radiofrekventnog polja, čime se smanjuje gubitak iona prekursora i produkta (Mitchell Wells i McLuckey, 2005). Pri fragmentaciji dolazi do pucanja kovalentne veze na različitim mjestima peptida. Tako može nastati šest iona produkata označenih kao a_n , b_n , c_n , x_n , y_n i z_n , gdje indeks n predstavlja broj aminokiseline u fragmentnom ionu (slika 2.). Pri niskim energijama kolizije najprije dolazi do disocijacije peptidne veze stoga su najzastupljeniji ioni spektra MS/MS oni iz b i y serije (Galić i Cindrić, 2008).



Slika 2. Prikaz nastanka svih fragmentnih iona u CID-u, definiranih nomenklaturom u spektrometriji masa (prema https://www.ionsource.com/tutorial/DeNovo/full_anno.htm, pristupljeno 25. lipnja 2024.)

2.3.4. MS^E

Dvije su metode pristupa proteinskoj analizi spektrometrijom masa odozdo-nagore: podatkovno ovisna analiza (engl. *Data Dependent Acquisition*, DDA) i podatkovno neovisna analiza (engl. *Data Independent Acquisition*, DIA). U DDA metodi, svi peptidi ulaze u spektrometar masa, no samo peptidi najvišeg intenziteta prolaze kroz prvi analizator masa nakon čega slijedi njihova fragmentacija i analiza u drugom analizatoru masa. Na taj način, izbor prekursor iona vrši se na temelju intenziteta. U slučaju istovremenog eluiranja velikog broja različitih peptida dolazi do supresije iona (engl. *ion suppression*), što dovodi do gubitka dijela podataka o sekvenci peptida niskog intenziteta i smanjuje reproducibilnost metode (Hu i sur., 2016). Za razliku od DDA, DIA se naziva neovisnim prikupljanjem podataka jer je tandemna spektrometrija masa u ovom slučaju neovisna o sastavu i intenzitetu iona prekursora za njihovu fragmentaciju (Zhang i sur., 2020).

MS^E predstavlja podatkovno neovisno prikupljanje podataka pri kojemu energija tijekom kolizije naizmjenično prelazi iz stanja niže energije pri kojoj peptidi ostaju intaktni, u stanje povišene energije pri kojoj dolazi do fragmentacije svih propuštenih peptida. Na taj način, ioni prekursori se odvajaju u male raspone m/z u prvom radnom koraku MS^E analize te se fragmentiraju u drugom koraku, čime ne dolazi do gubitka podataka. Kofragmentacija peptida koji eluiraju zajedno i istog su raspona iona prekursora je uzrok kompleksnom spektru masa koji nastaje kao rezultat MS^E analize te je potrebna bioinformatička obrada podataka u kojoj odgovarajući algoritam pridružuje fragmentirane ione ionima prekursorima, uspoređujući njihova retencijska vremena (Li i sur., 2021).

2.3.5. Pretraga baze podataka

Kako bi se izvršila identifikacija peptida i proteina potrebno je usporediti mase iona

nastale MS/MS analizom s onima u bazi podataka. Podaci dobiveni MS^E analizom u ovom radu su analizirani pomoću algoritama alata ProteinLynx Global Server (PLGS). PLGS je komercijalno dostupni programski paket kojeg prodaje i razvija korporacija Waters (Milford, MA, SAD). Za obradu MS^E dokumenata PLGS program koristi algoritme *Apex3D* i *Pep3D*, a nakon obrade vrši se usporedba s bazom podataka algoritmom *Ion Accounting (IDENTITY^E)* (Law i Lim, 2013). Algoritmima se uklanjaju svi signali ispod praga intenziteta određenog od strane korisnika koji se smatraju šumom, vrši se dekonvolucija naboja kako bi se dodatno smanjio opseg podataka te se ioni produkti pridružuju ionima prekursorima s obzirom na njihove elucijske profile. Tijekom pretrage baze podataka, algoritam razmatra svaki par iona prekursora i iona produkta te ih pripaja podacima iz baze podataka pri tome razmatrajući samo peptide koji su potpuno pocijepani definiranom proteazom. Pronađeni peptidi se rangiraju prema modelima specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava i tako slažu u protein (Law i Lim, 2013). Upotrebom alata PLGS moguća je i identifikacija peptida s posttranslacijskim modifikacijama.

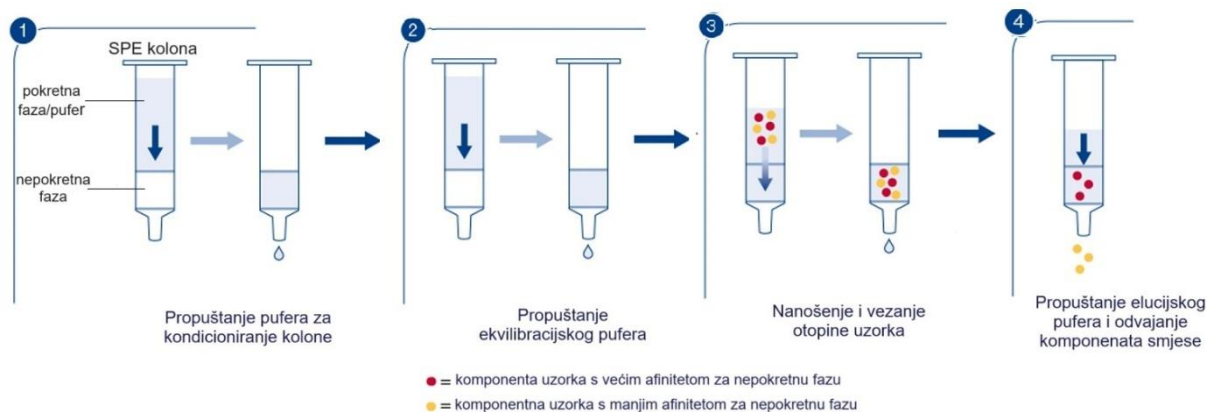
2.4. MIKROEKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI

SPE je metoda čiji je princip istovjetan tekućinskoj kromatografiji, a temelji se na jakoj reverzibilnoj interakciji između analita i površine nepokretne faze. Osmišljena je za brzu i selektivnu pripremu složenih uzoraka kod koje se analit otopljen ili suspendiran u tekućem uzorku odvaja od ostalih sastavnica uzorka na temelju njegovih fizikalno-kemijskih svojstava (Mornar i sur., 2022). Ova metoda najčešće se koristi za pročišćavanje analita uklanjanjem interferirajućih spojeva i koncentriranje spojeva u analitu s obzirom da je koncentracija i organskih i anorganskih spojeva u složenim matricama poput bioloških uzoraka niža od granice detekcije većine analitičkih instrumenata (Hashemi i sur., 2018). No, u ovom radu tehnika SPE je korištena za frakcioniranje smjese peptida pomoću pet različitih nepokretnih faza s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima čime su skupine strukturno sličnih peptida odvojene u frakcije.

S ciljem smanjenja količine analiziranog uzorka, korištenja velike količine organskih otapala i smanjenja operativnih koraka, konvencionalna ekstrakcija na čvrstoj fazi zamijenjena je μ SPE tehnikom. μ SPE se može odvijati u koloni, u igli ili u nastavku automatske pipete, a u ovom radu se provodila pomoću uređaja za automatiziranu mikroekstrakciju u kartušama mikrolitarskog volumena.

Tehnika mikroekstrakcije primijenjena u ovom radu je posredovana protokom koji je izazvan pozitivnim pritiskom. Kroz kartušu napunjenu čvrstom nepokretnom fazom propušta se pokretna faza određenim protokom. Neovisno o mjerilu u kojem se odvija, protokol ekstrakcije na čvrstoj fazi sastoji se od tri koraka: kondicioniranje, zadržavanje i eluiranje

(slika 3) (Redovniković, 2016). Kondicioniranje je korak pripreme nepokretne faze, reaktivnog sorbensa, za reproducibilnu interakciju s molekulama uzorka. Započinje propuštanjem pufera za kondicioniranje kroz nepokretnu fazu. To je otopina suprotnih svojstava od svojstava nepokretne faze, stoga se najčešće radi o polarnom otapalu, koje uklanja potencijalne interferirajuće tvari s površine sorbensa. Zatim slijedi propuštanje ekvilibracijskog pufera koji osigurava da je površina nepokretne faze usklađena za nanošenje uzorka, što znači da su molekule nepokretne faze u obliku povoljnom za interakcije s molekulama uzorka. Iz tog razloga se i analit otapa u ekvilibracijskom puferu. U koraku zadržavanja, uzorak se nanosi na kondicioniranu kolonu te se analizirane molekule vežu na površinu nepokretne faze različitim specifičnim interakcijama poput Van der Waalsovih sila, ionskih i vodikovih veza te hidrofobnih interakcija, dok ostale izlaze iz kolone s pokretnom fazom. Eluiranje se vrši pokretnom fazom koja narušava veze između uzorka i nepokretne faze čime analit prelazi u eluat (Redovniković, 2016). U ovom radu je korišteno šest elucijskih pufera kako bi se formiralo šest frakcija peptida za svaku ispitivanu metodu frakcioniranja.



Slika 3. Shematski prikaz protokola za ekstrakciju na čvrstoj fazi.

Prvi korak je propuštanje pufera za kondicioniranje μ SPE kolone, nakon čega slijedi njena ekvilibracija. U sljedećem koraku na kolonu se nanosi otopina uzorka, a zatim slijedi elucija elucijskim puferom prilikom čega dolazi do otpuštanja komponente uzorka sa slabijim interakcijama ili s manjim brojem interakcija s nepokretnom fazom pri čemu se formira eluat (prema <https://www.mn-net.com/chromatography/solid-phase-extraction-spe-information/>, pristupljeno 23. lipnja 2024.)

2.4.1. Nepokretne faze

Najčešće korištene vrste nepokretnih faza u SPE metodi su modificirani silikagel, polimeri, nepokretne faze s višestrukim mehanizmima te nove selektivne i inovativne nepokretne faze poput polimera s molekulskim otiskom, nanomaterijala, materijala ograničenog pristupa i imunoafinitetnih nosača (Mornar i sur., 2020). U ovom radu korištene su nepokretne faze modificiranog silikagela, polimeri i nepokretna faza s višestrukim mehanizmima (tablica 1).

Modificirani silikagel sastoji se od različitih funkcionalnih skupina vezanih na silanolne

skupine prisutne na površini silikagela. Na silanolne skupine najčešće su vezane hidrofobne alkilne ili arilne funkcionalne skupine (C1, C2, C4, C8, C18), a koriste se za RP-SPE. Princip RP temelji se na Van der Waalsovima silama i hidrofobnim interakcijama peptida i nepokretne faze čime se slabo polarni ili nepolarni peptidi izdvajaju iz uzorka peptida prema polarnosti. Elucija se vrši gradijentnim povećanjem koncentracije polarnog otapala (Mornar i sur., 2020).

Silikagel može biti modificiran i funkcionalnim skupinama za kationsku ili anionsku izmjenu kao što je u slučaju korištene nepokretne faze SCX. Ionska izmjena temelji se na činjenici da se peptidi razlikuju prema naboju, stoga se mogu vezati na suprotno nabijenu nepokretnu fazu ionskim vezama. Elucija peptida može se vršiti promjenom pH ili povećanjem koncentracije soli (Žunar, 2022). Promjenom pH elucijskog pufera dolazi do promjene naboja peptida s obzirom na njegovu izoelektričnu točku (pI) i ne može se više vezati na nepokretnu fazu. Povećanjem koncentracije soli ioni soli konkuriraju peptidima za vezanje na funkcionalne skupine te se peptidi eluiraju od peptida s manjim sveukupnim nabojem do onih s većim sveukupnim nabojem (Gussakovsky i sur., 2017).

Polimerne nepokretne faze, poput QMA i HLB nepokretnih faza, ne sadrže zaostale slobodne silanolne skupine, stabilnije su u pH području od 1 do 14 te imaju kapacitet za veće volumene uzorka (Mornar i sur., 2020). Struktura QMA nepokretne faze sastoji se od silikagela na kojeg je vezan polimer akrilamid-akrilne kiseline. Polimer akrilamid-akrilne kiseline je polielektrolit, tj. polimer čije ponavljajuće jedinice nose ionsku i/ili ionizabilnu grupu (Đolantić, 2018). Takva struktura doprinosi strukturi ionskog izmjenjivača te zajedno s kvaternim metilamonijem čini jaki anionski izmjenjivač. S peptidima ostvaruje kation- π veze. To su nekovalentne interakcije između anorganskog kationa ili kationskog dijela organske molekule i π elektrona alkena, alkina ili aromatika koje se formiraju između metilamonija i aminokiselina peptida koje sadrže aromatske ogranke kao što su fenilalanin (Phe), tirozin (Tyr) i triptofan (Trp) (Orabi i Lamoureux, 2018). Najčešće korišten polimer polimernih nepokretnih faza je hidrofobna smola stiren-divinilbenzen kopolimer (PS-DVB). Struktura HLB nepokretne faze građena je od N-vinilpirolidon-DVB kopolimera (NVP-DVB). Hidrofilni N-vinilpirolidon omogućava zadržavanje vlažnosti polimera te ekstrakciju polarnih peptida stvarajući vodikove veze (Sionkowska, 2003), a lipofilni divinilbenzen omogućava zadržavanje nepolarnih peptida π - π interakcijama velikim brojem aktivnih aromatskih mjesta u svojoj strukturi.

Iz tog razloga, NVP-DVB kopolimer može se koristiti i kao nepokretna faza s višestrukim mehanizmima kao što je MAX nepokretna faza. Nepokretne faze s višestrukim mehanizmima uvedene su s ciljem bolje selektivnosti ekstrakcijskog postupka, a njihov princip temelji se na interakcijama funkcionalnih skupina čvrste faze i analita koje se odvijaju preko dva ili više mehanizama (Zhang i sur., 2016). MAX nepokretna faza sastoji se od spoja s amino skupinom koja s peptidima ostvaruje ionske veze te NVP-DVB kopolimera koji ima ulogu u RP izmjeni.

Elucija peptida vezanih na NVP-DVB kopolimer vrši se gradijentnim povećanjem koncentracije polarnog otapala (Mornar i sur., 2020).

Tablica 1. Nepokretne faze za frakcioniranje smjese peptida BSA metodom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi korištene u ovom radu.

Nepokretna faza	Tip izmjene	Struktura
MAX	kombinirani način jake anionske izmjene i izmjene obrnutih faza	N-vinilpirolidon-DVB polimer vezan s $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{C}_4\text{H}_9$
SCX	jaka kationska izmjena	modificirani silikagel vezan s benzenesulfonskom kiselinom
HLB	hidrofilna-lipofilna izmjena	N-vinilpirolidon-DVB kopolimer
QMA	jaka anionska izmjena	diol-silikagel vezan s polimerom akrilamid-akrilne kiseline vezan s $\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Cl}^-$
RP	izmjena obrnutih faza	modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama

*MAX- engl. *Mixed Mode Anion Exchange*, SCX- engl. *Strong Cation Exchange*, HLB- engl. *Hydrophilic-Lypophilic Balance*, QMA- engl. *Quaternary Methylammonium Exchange*, RP- engl. *Reversed Phase*

2.5. MULTIDIMENZIONALNOST

Kao što je već spomenuto, pristup odozdo-nagore najčešće je korišten pristup pri identifikaciji i kvantifikaciji proteina. No, kompleksne proteinske smjese mogu sadržavati od stotine tisuća do nekoliko milijuna peptida (Issaq i sur., 2005). Time se povećava broj peptida vrlo sličnih omjera m/z koji su prisutni u različitim koncentracijama. Iako je vezani sustav nanoUPLC i tandemne spektrometrije masa moćan analitički alat, ionska supresija i velik broj peptida koji zajedno eluiraju sprječavaju detekciju peptida prisutnih u niskim koncentracijama te posljedično i identifikaciju proteina (Di Palma i sur., 2012).

Mnogi znanstvenici su pokušali osmisliti metodu separacije, frakcioniranja i detekcije koja će imati dovoljnu razlučivost za razdvajanje velikog broja peptida te biti dovoljno osjetljiva za detekciju peptida niske koncentracije. No, zasad ne postoji separacijska metoda koja može otkriti sve komponente u jednoj analitičkoj dimenziji (Yu i sur., 2023). Stoga je uvođenje

multidimenzionalnih tehnika od velike važnosti za karakterizaciju kompleksnih proteina i proteoma s ciljem identifikacije tisuće peptida pristupom odozdo-nagore (Manadas i sur., 2010). Koncept multidimenzionalnosti prvi je formulirao Giddings 1984. godine kada je pokazao da se povezujući dva separacijska sustava koja se međusobno razlikuju po mehanizmima razdvajanja, razlučivost dobivenog 2D sustava uvećava u odnosu na razlučivost pojedinog sustava (Giddings, 1984). Ovaj princip opisan je kapacitetom pika (engl. *peak capacity, P*) koji se definira kao maksimalan broj komponenata koje mogu teoretski biti razdvojene na nepokretnoj fazi u vremenu gradijenta (Gilar i sur., 2005a). Teoretski govoreći, kapacitet pika multidimenzionalnog sustava je umnožak kapaciteta pikova pojedinih dimenzija. Stoga, multidimenzionalnost predstavlja kombiniranje dviju (2D) ili više komplementarnih separacijskih metoda s ciljem smanjenja broja peptida koji zajedno eluiraju kako bi se postigao što veći kapacitet pika.

Postoje mnoge separacijske metode koje se međusobno mogu povezivati u multidimenzionalne sustave, poput kromatografskih metoda – SEC, kromatografija obrnutih faza, kromatografija ionske izmjene (engl. *Ion-Exchange Chromatography, IEC*) i elektroforetskih metoda - SDS-PAGE i izoelektričnog fokusiranja (engl. *Isoelectric Focusing, IF*) (Issaq i sur., 2005). Razdvajanje peptida ovim metodama temelji se na razlikama u njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima u koje spadaju duljina, pI, polarnost i naboj. Duljina peptida ovisi o broju aminokiselinskih ostataka od kojih je građen. pI predstavlja pH vrijednost pri kojoj sveukupan naboj peptida iznosi 0. Kao mjera hidrofobnosti, tj. hidrofilnosti peptida, koristi se GRAVY indeks (Kyte i Doolittle, 1982) pri čemu pozitivna vrijednost upućuje na hidrofobnost peptida, a negativna vrijednost na njegovu hidrofilnost.

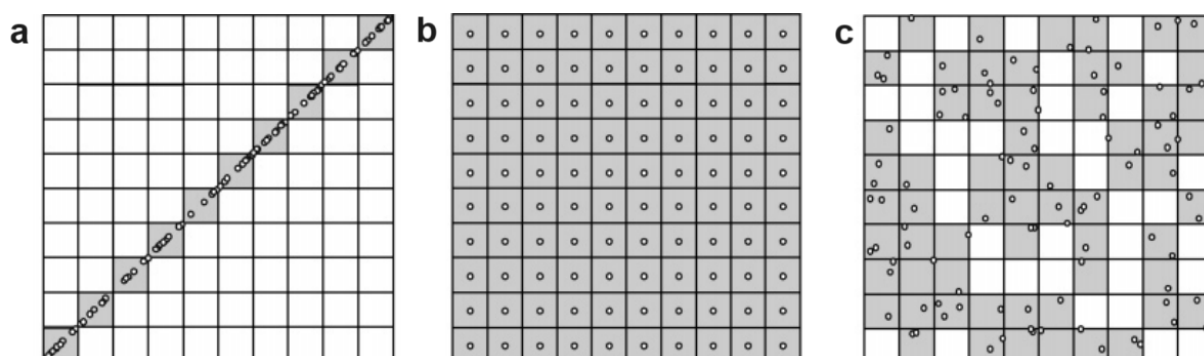
Također je moguća izvedba konsektivnih i nekonsektivnih multidimenzionalnih sustava. Konsektivni sustavi uključuju izravan prijenos eluata prve dimenzije u drugu dimenziju, bez prekida protoka, dok se nekonsektivni sustavi temelje na prikupljanju frakcije u prvoj dimenziji i analize frakcije slijedećom dimenzijom (Di Palma i sur., 2012). Iako su prednosti konsektivnog sustava skraćeno vrijeme analize, mala vjerojatnost gubitka uzorka i mogućnost automatizacije, nekonsektivne sustave karakterizira veća prilagodljivost, primjerice ukoliko je pokretne faze prve i druge dimenzije separacije teško uskladiti. Nekonsektivni sustavi na taj način omogućuju veći broj različitih kombinacija separacijskih metoda zbog čega se i češće koriste (Di Palma i sur. 2012).

U ovom radu ispitan je nekonsektivni multidimenzionalni sustav u kojem je prvu dimenziju predstavljalo frakcioniranje μ SPE metodom na jednoj nepokretnoj fazi, drugu dimenziju frakcioniranje μ SPE metodom na drugoj nepokretnoj fazi, a dodatna dimenzija je postignuta RP kromatografijom nanoUPLC sustava koja je prethodila MS analizi.

2.6. ORTOGONALNOST

Ortogonalnost multidimenzionalnih sustava označava neovisnost separacija u jednoj dimenziji o separaciji u drugoj dimenziji. Iako bi, kao što je već spomenuto, razlučivanje multidimenzionalnog sustava trebalo biti produkt svih dimenzija separacije, u stvarnosti to nije slučaj. Ako selektivnost metoda separacije nije potpuno ortogonalna, P koji je moguće postići je niži od očekivanog (Gilar i sur., 2005a).

Gilar i suradnici osmislili su geometrijski pristup izračunu ortogonalnosti multidimenzionalnih sustava (slika 4). U cilju izračuna ortogonalnosti, konstruiran je graf ovisnosti normaliziranih retencijskih vremena peptida razdvojenih jednom separacijskom metodom o normaliziranim retencijskim vremenima peptida razdvojenih drugom separacijskom metodom. Točke unutar grafa predstavljaju peptide zajedničke separacijama na objema nepokretnim fazama kromatografske metode. Formiranje polja vrši se na način da se konstruiraju pravci paralelni koordinatnim osima koji prolaze kroz jedinične točke. Polja se smatraju ispunjenima ako sadrže minimalno jednu točku (peptid), a prisutnost dviju ili više točaka unutar polja označava peptide koji zajedno eluiraju. U konstruiranoj mreži (sustavu) ortogonalnost predstavlja ukupnu popunjenost polja te se izražava u postotku (%).



Slika 4. Geometrijski pristup ortogonalnosti (prema Gilar i sur., 2005a)

Konstruirana je mreža hipotetske separacije 100 istih peptida na dvije nepokretne faze čime je formirana mreža sačinjena od 100 polja. **a)** Prikazan je linearni sustav s 0% ortogonalnosti. **b)** Prikazana je hipotetska maksimalna ortogonalnost, odnosno apsolutno uređeni sustav. **c)** Prikazan je potpuno nasumičan sustav. Popunjenost polja iznosi 63% čineći sustav idealnim, sa 100% ortogonalnosti.

Mnogi znanstvenici koriste koeficijent determinacije (R^2) grafa normaliziranih retencijskih vremena kao kriterij ortogonalnosti. U rasponu od 0 do 1, niska vrijednost R^2 označava ortogonalnost, dok vrijednost R^2 koja je jednaka 1 predstavlja neortogonalan, linearan sustav. Iako je ovaj pristup rašireniji u primjeni, pokazano je kako ne postoji povezanost između izračuna ortogonalnosti pomoću koeficijenta determinacije i geometrijskog pristupa te je izračun geometrijskim pristupom točniji (Yeung i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije: BSA ($\geq 98\%$, pH 7, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), tris-2-karboksietil fosfin (TCEP, Merck, Darmstadt, Njemačka), tripsin izoliran iz svinjske gušterače (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), amonijev bikarbonat (NH_4HCO_3 , $\geq 99\%$, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), metanol (MeOH, Merck, Darmstadt, Njemačka), acetonitril (ACN, Merck, Darmstadt, Njemačka), trifluoroctena kiselina ($\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), amonijev format (NH_4HCO_2 , $\geq 99\%$, Honeywell, Charlotte, NC, SAD), mravlja kiselina (HCOOH, 98-100 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska), amonijev acetat ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COOH}$, Merck, Darmstadt, Njemačka), amonijev hidroksid (NH_4OH , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), Milli-Q voda (18 M Ω /cm, Merck, Darmstadt, Njemačka), leucin enkefalin ($>98\%$, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), izopropanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$, Merck, Darmstadt, Njemačka).

3.2. MATERIJALI

AssayMAP kartuše bez punila zapremnine 5 μL (Agilent, St.Clara, CA, SAD), Oasis[®] MAX (80 Å, 30 μm do 60 μm , Waters, Milford, MA, SAD), Bondesil-SCX nepokretna faza (40 μm , Agilent, St. Clara, CA, SAD), Oasis[®] HLB nepokretna faza (80 Å, 30 μm do 60 μm , Waters, Milford, MA, SAD), Sep-Pak AcellPlus QMA nepokretna faza (300 Å, 37 μm do 55 μm , Waters, Milford, MA, SAD), Septra[™] C18-E nepokretna faza (65 Å, 50 μm , Phenomenex, Torrance, CA, SAD), nanoAcquity UPLC 2G-V/M *symmetry* C18 kolonska klopka (100 Å, 5 μm , 180 μm 20 mm), nanoAcquity UPLC BEH C18 analitička kolona (130 Å, 7 μm , promjera 100 μm x 100 mm, Waters, Milford, MA, SAD), LCGC 12 x 32 mm vijale s insertom (Waters, Milford, MA, SAD).

3.3. INSTRUMENTI

Instrumenti korišteni prilikom izrade eksperimenta: Explorer EX224/AD analitička vaga (Ohaus, Parsippany, NJ, SAD), Sonorex ultrazvučna kupelj (Bandelin, Berlin, Njemačka), vorteks mješač MS 3 *Basic* (IKA, Königswinter, Njemačka), SevenEasy pH metar (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska), centrifuga 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), vakuum centrifuga *Concentrator plus* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), termomikser (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), AssayMAP Bravo *Protein Sample Prep Platform* (Agilent, St. Clara, CA, SAD), sustav tehnika tekućinske kromatografije i spektrometrije masa nanoAcquity UPLC- nanoESI-QTOF SYNAPT G2-Si (Waters, Milford, MA, SAD)

opremljen programskim alatom „MassLynx“ verzije 4.1. SCN902 (Waters, Milford, MA, SAD).

3.4. PRIPRAVA UZORAKA

3.4.1. Priprava triptičkih peptida proteina BSA

Uzorak nativnog liofiliziranog BSA koncentracije 1 mg/mL pripremljen je otapanjem u 800 μ L 50 mM NH_4HCO_3 , pH 7,8, i denaturiran dodatkom 200 μ L otopine TCEP koncentracije 5 mg/mL, također pripremljene otapanjem u NH_4HCO_3 . Otopina je ostavljena na inkubaciji na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Nakon denaturacije, pripremljena je otopina tripsina koncentracije 1 mg/mL otapanjem u 50 mM NH_4HCO_3 te je 2 μ L otopine dodano u otopinu proteina. Uzorak je stavljen na prekonocnu inkubaciju na termomikseru na 37 °C pri 350 okretaja po minuti. Otopina triptičkih peptida proteina BSA je zatim alikvotirana po 10 μ L u plastične tubice od 1,5 mL koje su zatim stavljene na sušenje na vakuum centrifugu i potom čuvane na -80 °C. Masa peptida je iznosila 10 μ g po uzorku.

3.4.2. Frakcioniranje peptida

Frakcioniranje peptida BSA napravljeno je pomoću uređaja AssayMAP Bravo *Protein Sample Prep Platform* automatiziranom mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi, koristeći kartuše pripremljene u laboratoriju. Ovisno o metodi frakcioniranja, nepokretne faze (MAX, SCX, HLB, QMA ili RP) su prebačene u prazne kartuše volumena 5 μ L i komprimirane zrakom pod pritiskom od 2,5 bara. Sastav odgovarajućih pufera za kondicioniranje, ekvibraciju i eluciju kolone za svaku od korištenih nepokretnih faza prikazan je u tablici 2. Navedeni su puferi pripremljeni otapanjem i razrjeđivanjem odgovarajućih kemikalija u MQ vodi te namještanjem pH vrijednosti koristeći pH-metar, a zatim su prebačeni u mikrotitarske pločice na pripadajućim pozicijama na uređaju AssayMAP Bravo. Otopina triptičkih peptida BSA pripremljena je otapanjem u 120 μ L odgovarajućeg ekvibracijskog pufera nakon čega je vorteksirana i centrifugirana 30 s na 5000 rpm i sobnoj temperaturi te prebačena na pripadajuću poziciju na uređaju. Protokol za frakcioniranje na uređaju AssayMAP Bravo bio je jednak za sve ispitivane metode frakcioniranja, a sastojao se od kondicioniranja nepokretne faze sa 100 μ L odgovarajućeg pufera pri brzini protoka od 300 μ L/min nakon čega je uslijedilo propuštanje 100 μ L odgovarajućeg ekvibracijskog pufera kroz napunjenu kartušu brzinom protoka od 100 μ L/min. Zatim je na nepokretnu fazu nanoseno 100 μ L uzorka triptičkih peptida BSA brzinom protoka od 10 μ L/min te isprano sa 100 μ L ekvibracijskog pufera. Peptidi pojedinačnih frakcija su s kolone ispirani uporabom 6 odgovarajućih elucijskih pufera koji su propušteni kroz kartušu pri brzini protoka od 10

$\mu\text{L}/\text{min}$ te je pritom sakupljeno 25 μL pojedinačne frakcije BSA. Frakcije su zatim osušene u vakuum centrifugi i čuvane na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do MS analize.

Tablica 2. Sastav pufera za kondicioniranje, ekvibraciju i eluciju pufera korištenih u protokolu za frakcioniranje triptičkih peptida BSA na MAX, SCX, HLB, QMA i RP (pri pH 2,5 i 10,0) nepokretnim fazama

	MAX	SCX	HLB	QMA	RP pH 2,5	RP pH 10,0
Pufer za kondicioniranje	MeOH	400 mM NH ₄ HCO ₂ u 1 % (v/v) HCOOH i 25 % (v/v) ACN	MeOH	400 mM NH ₄ HCO ₂ u 1 % (v/v) NH ₄ OH i 25 % (v/v) ACN	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 2,5 u 50 % (v/v) ACN	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 10,0 u 50 % (v/v) ACN
Ekvibracijski pufer	MQ	1 % (v/v) HCOOH u 25 % (v/v) ACN	1 % (v/v) HCOOH	1 % (v/v) NH ₄ OH	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 2,5	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 10,0
Elucijski pufer 1	3 % (v/v) ACN u 97 % (v/v) 1 % TFA	40 mM NH ₄ HCO ₂ pH 3,5 u 25 % (v/v) ACN	5 % ACN (v/v) u 95 % (v/v) 1 % HCOOH	20 mM NH ₄ CH ₃ COOH u 25 % (v/v) MeOH	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 2,5 u 15 % (v/v) ACN	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 10,0 u 5 % (v/v) ACN
Elucijski pufer 2	9 % (v/v) ACN u 91 % (v/v) 1 % TFA	40 mM NH ₄ HCO ₂ pH 4,0 u 25 % (v/v) ACN	10 % ACN (v/v) u 90 % (v/v) 1 % HCOOH	40 mM NH ₄ CH ₃ COOH u 25 % (v/v) MeOH	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 2,5 u 20 % (v/v) ACN	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 10,0 u 8 % (v/v) ACN
Elucijski pufer 3	13 % (v/v) ACN u 87 % (v/v) 1 % TFA	40 mM NH ₄ CH ₃ COOH pH 4,5 u 25 % (v/v) ACN	15 % ACN (v/v) u 85 % (v/v) 1 % HCOOH	80 mM NH ₄ CH ₃ COOH u 25 % (v/v) MeOH	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 2,5 u 25 % (v/v) ACN	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 10,0 u 10 % (v/v) ACN
Elucijski pufer 4	20 % (v/v) ACN u 80 % (v/v) 2 % TFA	40 mM NH ₄ CH ₃ COOH pH 5,0 u 25 % (v/v) ACN	20 % (v/v) ACN u 80 % (v/v) 1 % HCOOH	150 mM NH ₄ CH ₃ COOH u 25 % (v/v) MeOH	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 2,5 u 30 % (v/v) ACN	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 10,0 u 15 % (v/v) ACN
Elucijski pufer 5	30 % ACN (v/v) u 70 % (v/v) 2 % TFA	40 mM NH ₄ CH ₃ COOH pH 6,0 u 25 % (v/v) ACN	30 % (v/v) ACN u 70 % (v/v) 1 % HCOOH	200 mM NH ₄ CH ₃ COOH u 25 % (v/v) MeOH	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 2,5 u 35 % (v/v) ACN	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 10,0 u 20 % (v/v) ACN
Elucijski pufer 6	50 % ACN (v/v) u 50 % (v/v) 3 % TFA	100 mM NH ₄ OH pH 9,5 u 25 % (v/v) ACN	40 % (v/v) ACN u 60 % (v/v) 1 % HCOOH	40 mM NH ₄ HCO ₂ pH 3,5 u 25 % (v/v) MeOH	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 2,5 u 45 % (v/v) ACN	20 mM NH ₄ HCO ₂ pH 10,0 u 25 % (v/v) ACN

*MeOH- metanol, MQ - Mili-Q voda, ACN- acetonitril, TFA- trifluorocetna kiselina, NH₄HCO₂- amonijev format, NH₄CH₃COOH- amonijev acetat, NH₄OH- amonijev hidroksid, HCOOH- mravlja kiselina

3.5. ANALIZA PEPTIDA SPREGNUTIM SUSTAVOM nanoUPLC TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE SA SPEKTROMETROM MASA VISOKE RAZLUČIVOSTI

Posušene frakcije peptida bile su otopljene u 25 μL 0,1 % (v/v) HCOOH nakon čega su vorteksirane, centrifugirane 15 s na 5000 rpm pri sobnoj temperaturi i prebačene u vijale s insertom za MS analizu. Peptidi pojedinih frakcija razdvojeni su kromatografijom obrnutih faza na nanoAcquity UPLC sustavu koristeći nanoAcquity UPLC 2G-V/M symmetry C18 kolonsku klopku (100 Å, 5 μm , 180 μm 20 mm) i nanoAcquity UPLC BEH C18 analitičku kolonu (130 Å, 7 μm , promjera 100 μm x 100 mm) pri čemu je temperatura kolone iznosila 40 °C. Volumen injektiranja je iznosio 0,6 μL za sve frakcije. Kao pokretna faza A korištena je vodena otopina 0,1 % (v/v) HCOOH, dok je pokretna faza B bila vodena otopina 0,1 % (v/v) HCOOH u 95 % (v/v) ACN. Izokratni dotok pokretne faze A u kolonsku klopku proveden je pri brzini protoka od 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ tijekom prve 2 minute. Uzorci su potom eluirani gradijentnom metodom pri brzini protoka od 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ u ukupnom trajanju od 32 minute (tablica 3). Otopina modifikatora 1 mM etil metanoata u izopropanolu je uvedena iz Synapt kanala A pomoću „T“ povezača pri brzini protoka od 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Tablica 3. Uvjeti gradijenta miješanja pokretnih faza A (0,1 % (v/v) HCOOH) i B (0,1 % (v/v) HCOOH u 95% (v/v) ACN) na analitičkoj koloni za razdvajanje triptičkih peptida u frakcijama BSA kromatografijom obrnutih faza

Vrijeme / min	Brzina protoka / μL min ⁻¹	Pokretna faza A / %	Pokretna faza B / %
0,00	1,00	80,0 %	20,0 %
3,00	1,00	80,0 %	20,0 %
24,0	1,00	45,0 %	55,0 %
27,0	1,00	1,00 %	99,0 %
29,0	1,00	80,0 %	20,0 %
32,0	1,00	80,0 %	20,0 %

NanoUPLC sustav spregnut je s nanoESI-qTOF Synapt G2-Si spektrometrom masa, a parametri instrumenta su namješteni koristeći „MassLynx“ *software*. Akvizicijski način rada za MS i MS^E podešen je na pozitivnu polarnost i rezolucijski način rada analizatora. Postavljeni parametri su bili sljedeći: protok plina dušika iznosio je 1,2 bar pri temperaturi izvora od 80 °C, a napon kapilare namješten je na 4,3 kV. Napon konusa postavljen je na 40 kV za MS i MS^E, a vrijeme spektralne akvizicije iznosilo je 1 s u području masa između 50 i 3000 Da. Kolizijska energija tijekom MS^E analize je podešena na 4 eV za funkciju niske energije, dok je u uvjetima visoke energije bila linearno podizana od 20 eV na 45 eV. Radi

korigiranja točnosti masa, tijekom analize je pušten stalan protok otopine 1 ng/μL leucin enkefalina pripremljenog u izopropanolu i 0,1 % (v/v) mravljoj kiselini. Brzina protoka leucin enkefalina je iznosila 0,4 μL/min.

3.6. OBRADA PODATAKA

3.6.1. Analiza programom ProteinLynx Global Server

MS^E spektri pojedinih frakcija dobiveni nanoUPLC-ESI-qTOF uređajem obrađeni su „MassLynx“ programskim alatom i analizirani koristeći program ProteinLynx Global Server (PLGS) verzije 3.0.1 (Waters, Milford, MA, SAD) prema parametrima prikazanim u tablici 4. Kao rezultat PLGS obrade podataka dobivena je lista identificiranih triptičkih peptida te njihovih retencijskih vremena, intenziteta te uspjeh pogotka i kemijskih modifikacija peptida u obliku Excel (Microsoft, Redmond, WA, SAD) dokumenta za svaku od analiziranih frakcija razdvojenih na svakoj od nepokretnih faza.

Tablica 4. Parametri korišteni za procesiranje dobivenih podataka pomoću ProteinLynx Global Server

Databank	Uniprot Bovine albumin UP000009136
Peptide Tolerance	Automatic
Fragment Tolerance	Automatic
Min Fragment Ion Matches per Peptide	3
Min Fragment Ion Matches per Protein	7
Min Peptide Matches per Protein	2
Maximum Protein Mass	25000 Da
Primary Digest Reagent	Trypsin
Secondary Digest Reagent	None
Missed Cleavages	2
Fixed Modifier Reagents	Carbamidomethyl C
Variable Modifier Reagents	Deamination N Deamidation Q Dehydration ST Oxidation M
False Discovery Rate	4 %
Monoisotopic or Average	Monoisotopic
Peptide Charge	1+
Instrument Type	ESI-QUAD-TOF
ProteinLynx-processing parameters	
Chromatographic Peak Width	Automatic

Tablica 4. Parametri korišteni za procesiranje dobivenih podataka pomoću ProteinLynx Global Server – *nastavak*

MS TOF Resolution	Automatic
Lock Mass for Charge 1	556.2771 Da/e
Lock Mass Window	0.25 Da
Low Energy Threshold	135.0 counts
Elevated Energy Threshold	30.0 counts
Intensity Treshold	750.0 counts

3.6.2. Obrada podataka za pojedine metode frakcioniranja

Dobiveni podaci iz PLGS-a analizirani su pojedinačno za svaku od metoda frakcioniranja peptida. Prvo je bila određena i prikazana raspodjela triptičkih peptida u svakoj od frakcija u odnosu na njihov ukupni intenzitet. Zatim je bila provedena redukcija broja peptidnih sekvenci s obzirom na njihov intenzitet u pojedinačnoj frakciji, na način da je peptid dodijeljen onoj frakciji u kojoj ima najveći intenzitet. Nadalje, za svaku peptidnu sekvencu iz tablice, izračunati su teoretska izoelektrična točka (pI), GRAVY indeks i duljina sekvence pomoću ProtParam programskog alata (Expasy, Swiss Bioinformatics Resource Portal). S obzirom da je ovo nekonzekutivna metoda analize, izmjerena retencijska vremena pojedinačnih frakcija je bilo potrebno prilagoditi njihovom vremenskom redosljedju analize radi jasnijeg grafičkog prikaza rezultata. Iz tog razloga, peptidi frakcije 1 prikazani su pomoću njihovih stvarnih retencijskih vremena, dok su retencijska vremena svake sljedeće frakcije uvećana za 32 minute, koliko traje analiza spektrometrijom masa. Pokrivenost sekvence peptida u pojedinoj frakciji je izračunata pomoću Excela na način da su duljine peptida pronađenih pomoću PLGS alata unutar frakcije podijeljene s duljinom ukupne proteinske sekvence, a njihov je zbroj dao ukupnu pokrivenost sekvence za pojedinu metodu frakcioniranja. Učestalost kemijskih modifikacija peptida pri frakcioniranju na C18 koloni u uvjetima niske i visoke pH vrijednosti izračunata je u Excelu.

3.6.3. Izračun ortogonalnosti

Prije izračuna ortogonalnosti različitih metoda frakcioniranja, provedena je normalizacija retencijskih vremena peptida pronađenih u svakoj frakciji prema formuli iz rada Gilara i suradnika (2005a):

$$RT_{i(norm)} = \frac{RT_i - RT_{min}}{RT_{max} - RT_{min}}$$

pri čemu RT_{min} predstavlja retencijsko vrijeme peptida koji je prvi eluirao s nepokretne faze, dok RT_{max} predstavlja retencijsko vrijeme peptida koji je eluirao posljednji. RT_i predstavlja

retencijsko vrijeme peptida prilagođeno nekonzekutivnoj metodi, a $RT_{i(norm)}$ normalizirano retencijsko vrijeme peptida. Iz istog rada je korištena i formula za izračun ortogonalnosti dviju metoda frakcioniranja:

$$O = \frac{\sum polja - \sqrt{P_{max}}}{0,63 P_{max}}$$

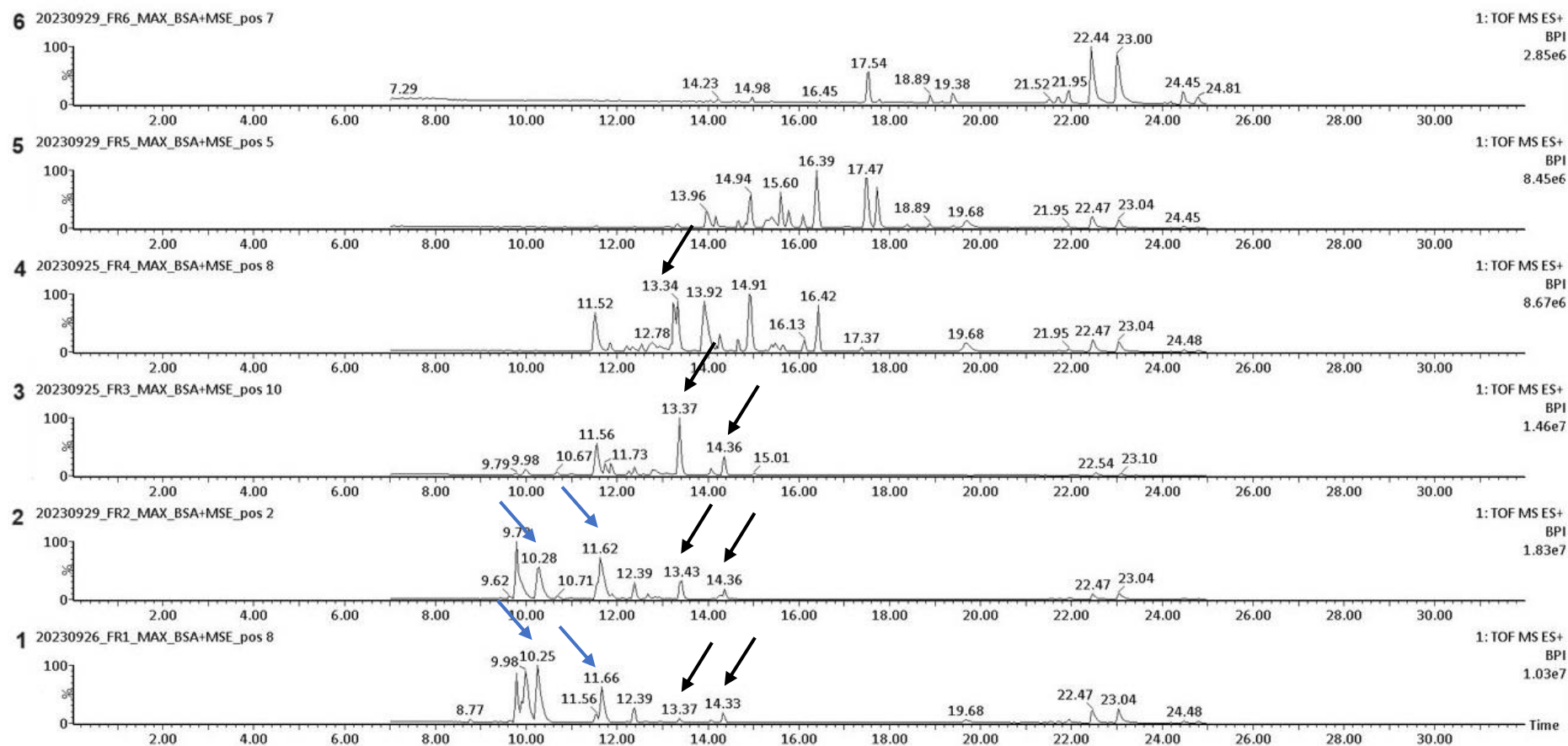
P_{max} predstavlja ukupan broj polja nastalih konstrukcijom grafa ovisnosti normaliziranih retencijskih vremena peptida frakcioniranih na jednoj nepokretnoj fazi o normaliziranim retencijskim vremenima peptida frakcioniranih na drugoj nepokretnoj fazi, dok $\sum polja$ označava zbroj svih polja koja sadrže minimalno jednu točku.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je optimizacija nekonsekutivnih metoda frakcioniranja triptičkih peptida BSA pomoću μ SPE na pet različitih nepokretnih faza i ukupno 6 različitih metoda razdvajanja peptida. Optimizacija je provedena s ciljem dobivanja normalne raspodjele peptida u pojedinim frakcijama odabranih metoda kako bi se ispitale daljnje mogućnosti multidimenzionalnog pristupa kromatografiji peptida kao preparativnoj tehnici koja prethodi njihovoj analizi putem spektrometrije masa. Podaci dobiveni analizom MS^E spektra dobivenih frakcija putem PLGS alata korišteni su za konstrukciju grafova ovisnosti prilagođenih retencijskih vremena peptida razdvojenih na pojedinoj nepokretnoj fazi o njihovoj duljini, pI, GRAVY indeksu i intenzitetu, s ciljem utvrđivanja mehanizma raspodjele peptida po frakcijama. Uz to, za svaku je frakciju određena pokrivenost peptidne sekvence, a napravljena je i usporedba ukupne pokrivenosti sekvence proteina BSA s i bez frakcioniranja. Konstruirani su i grafovi ovisnosti normaliziranih retencijskih vremena peptida razdvojenih na jednoj nepokretnoj fazi o normaliziranim retencijskim vremenima peptida razdvojenih na drugoj nepokretnoj fazi te je provedena analiza ortogonalnosti prema navedenim formulama kako bi se utvrdila kombinacija najnezavisnijih nepokretnih faza koje bi se mogle koristiti u multidimenzionalnom pristupu kromatografiji peptida. Na kraju je provedena i analiza udjela različitih kemijskih modifikacija peptida BSA nastalih tijekom frakcioniranja peptida na RP nepokretnoj fazi pri niskoj (2,5) i visokoj (10,0) vrijednosti pH kako bi se ispitala uspješnost ove često korištene kombinacije u dvodimenzionalnoj kromatografiji.

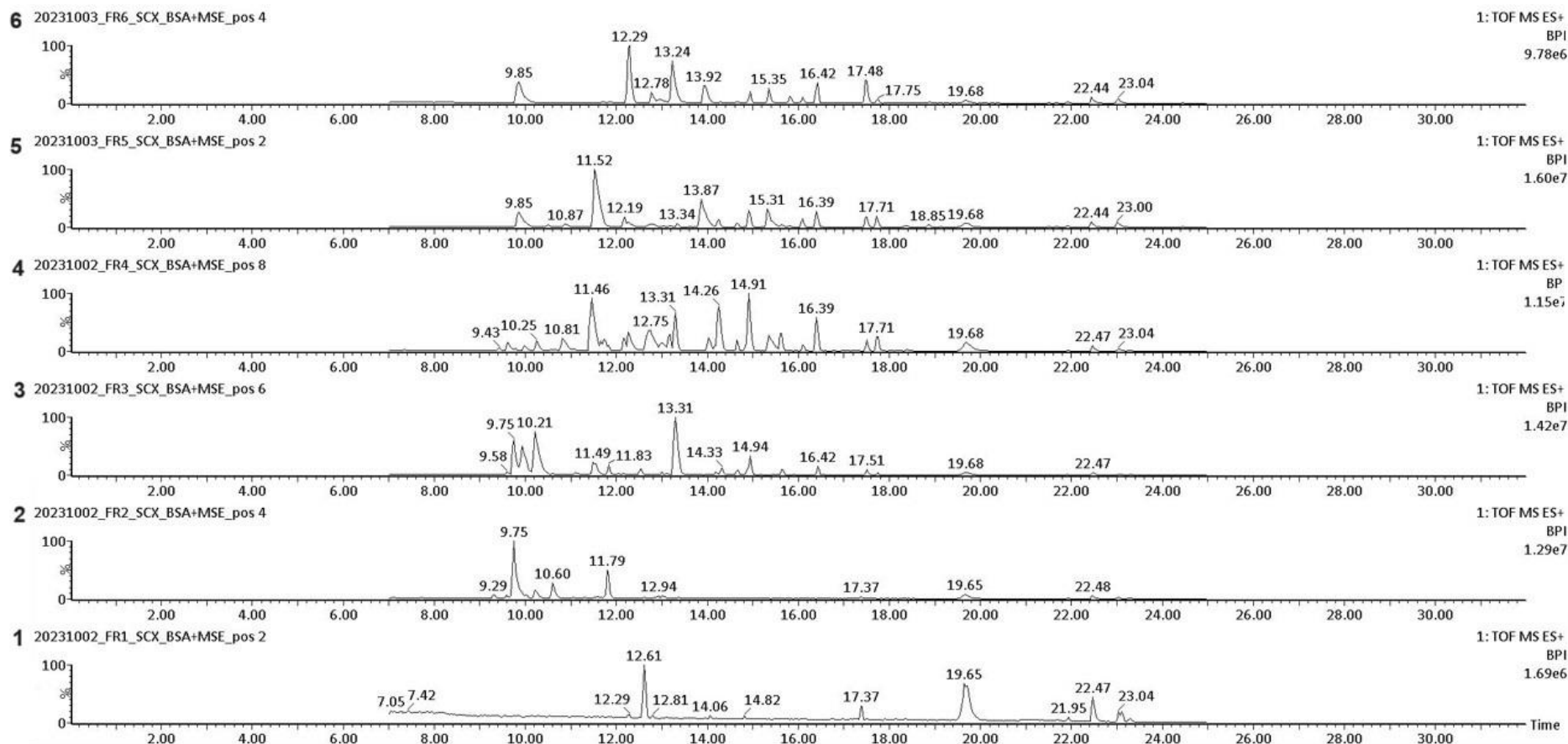
4.1. KROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE FRAKCIJA PEPTIDA

U cilju optimizacije nekonsekutivne metode frakcioniranja ispitivani su protokoli frakcioniranja primjenom različitih koncentracija i pH vrijednosti pufera za kondicioniranje, ekvibraciju i eluciju za svaku od nepokretnih faza. Zbog vremena trajanja analize, uobičajen broj postignutih frakcija trebao bi biti manji od 10 (Gilar i sur., 2005b), stoga je prvi uvjet optimizacije u ovom radu bio postići frakcioniranje u 6 frakcija. Drugi uvjet predstavljalo je postizanje normalne raspodjele peptida u dobivenim frakcijama koje bi omogućilo kasniju spregu više tehnika frakcioniranja u multidimenzionalnom pristupu. Pokazatelj zadovoljenih uvjeta bila je prisutnost peptida u svim dobivenim frakcijama s detekcijom najveće količine peptida najvećih intenziteta u srednjim frakcijama, dok su prva i posljednja frakcija sadržavale manji broj peptida. Na slikama 5-10 prikazano je uspješno frakcioniranje triptičkih peptida BSA u 6 frakcija za svaku od ispitivanih metoda frakcioniranja. Na slici 5, koja prikazuje raspodjelu peptida nakon frakcioniranja na MAX nepokretnoj fazi, vidljivo je kako se isti peptidi mogu naći u više frakcija, ali s različitim intenzitetom. Primjerice, peptidi s retencijskim vremenima od 10,25 i 11,66 minuta (plave strelice) su značajno većeg intenziteta u frakciji 1 nego u frakciji 2, dok je za peptide retencijskih vremena od 13,37 i 14,33 minuta (crne strelice) moguće pratiti porast intenziteta kroz frakcije 1, 2 i 3 što upućuje na eluciju peptida u različitim frakcijama. Ovaj trend je moguće primijetiti u svakom kromatogramu frakcija na slici 5, ali i većinom u svim drugim kromatogramima frakcija razdvojenih na ostalim nepokretnim fazama. Ipak, zaostajanje peptida u različitim frakcijama korištenjem nekonsekutivne metode ne stvara značajne probleme u analizi podataka jer je bila provedena redukcija broja peptidnih sekvenci s obzirom na njihov intenzitet u pojedinačnoj frakciji, na način da je peptid dodijeljen onoj frakciji u kojoj ima najveći intenzitet.

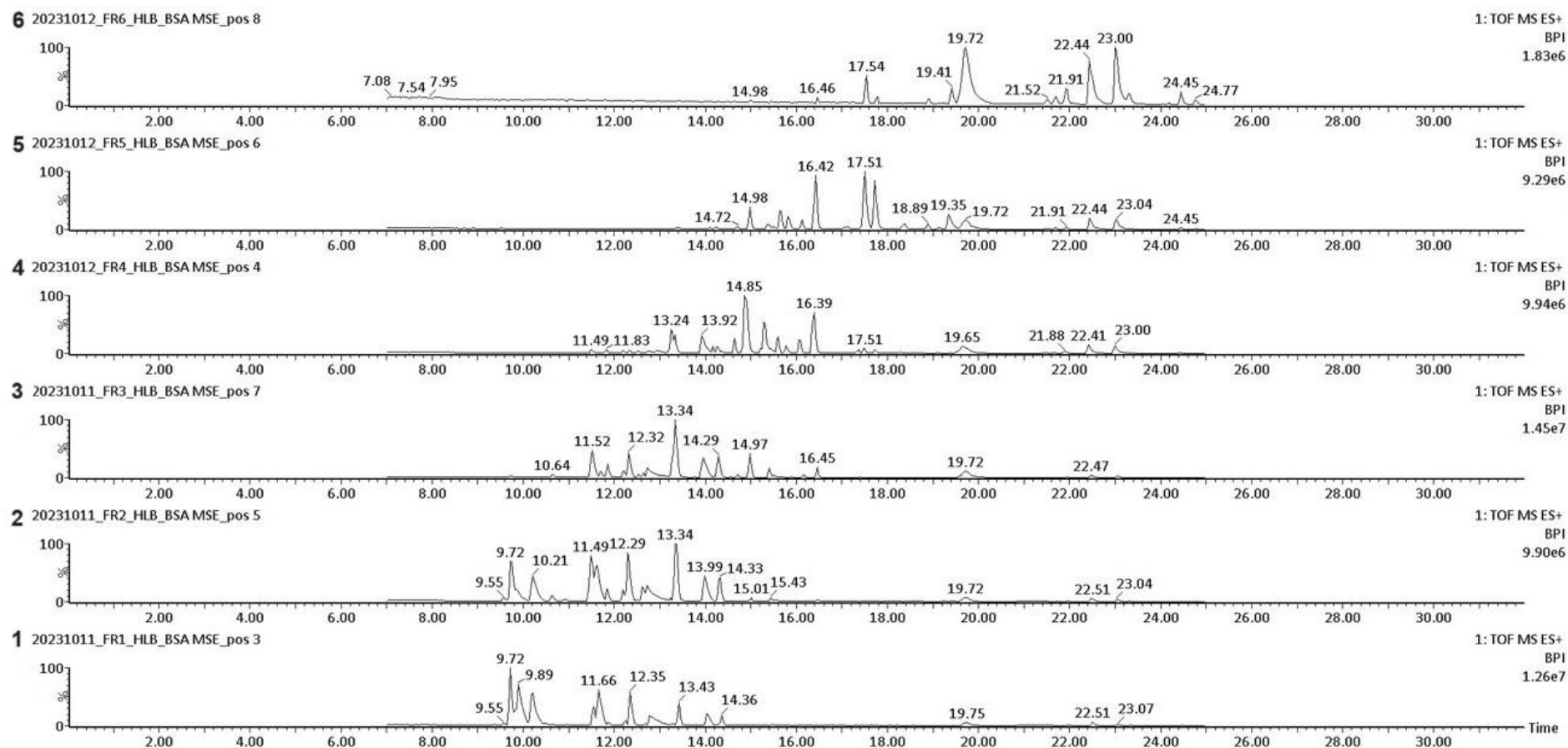


Slika 5. Base Peak Intensity (BPI) BSA triptičkih peptida razdvojenih na MAX nepokretnoj fazi

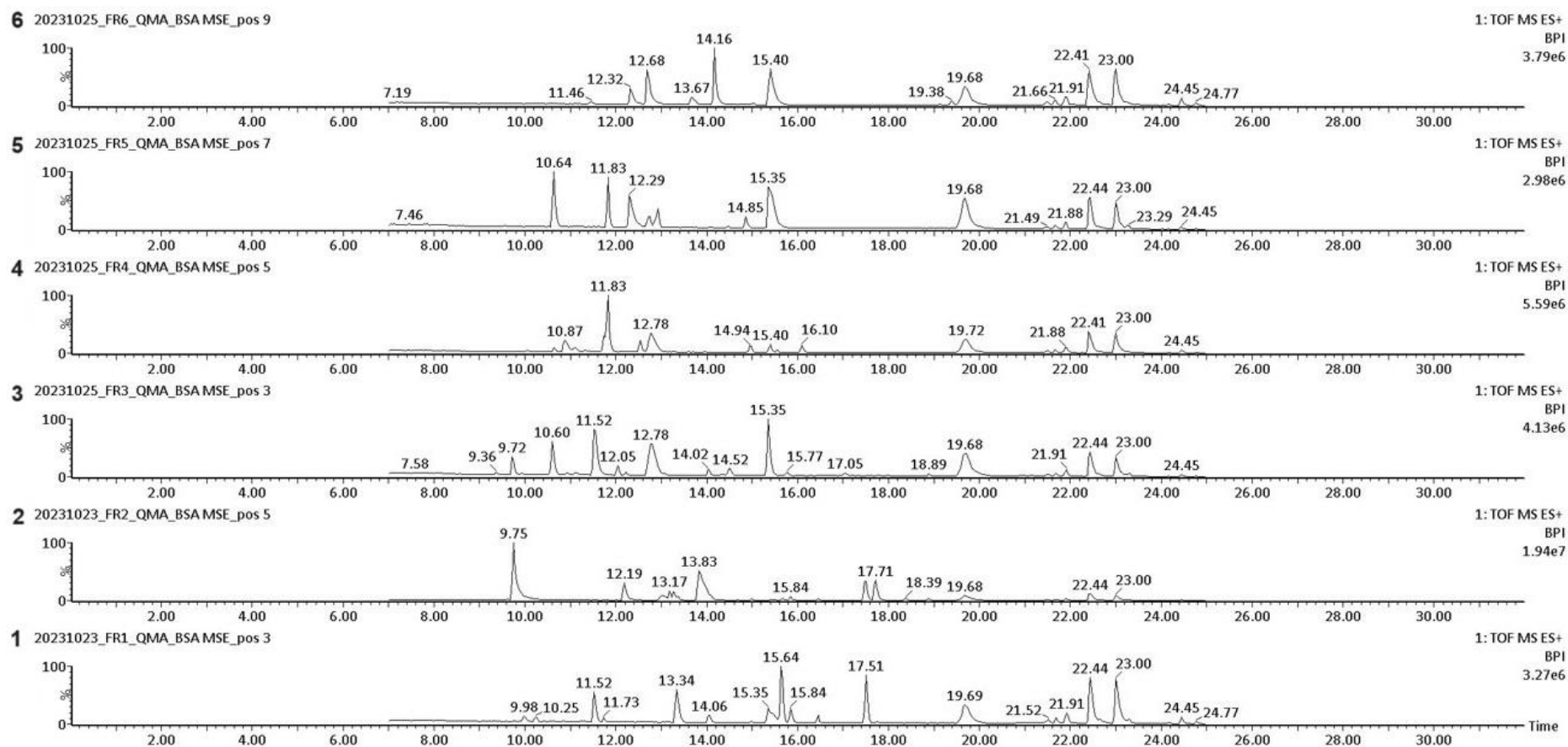
Odozdo nagore kromatogrami: frakcija 1, frakcija 2, frakcija 3, frakcija 4, frakcija 5 i frakcija 6. Plave strelice ukazuju na pikove retencijskih vremena 10,25 i 11,66 minuta, čiji se intenzitet smanjuje uspoređujući frakciju 1 i frakciju 2. Crne strelice ukazuju na pikove retencijskih vremena 13,37 i 14,33 čiji se intenzitet povećava kroz frakcije 1, 2 i 3.



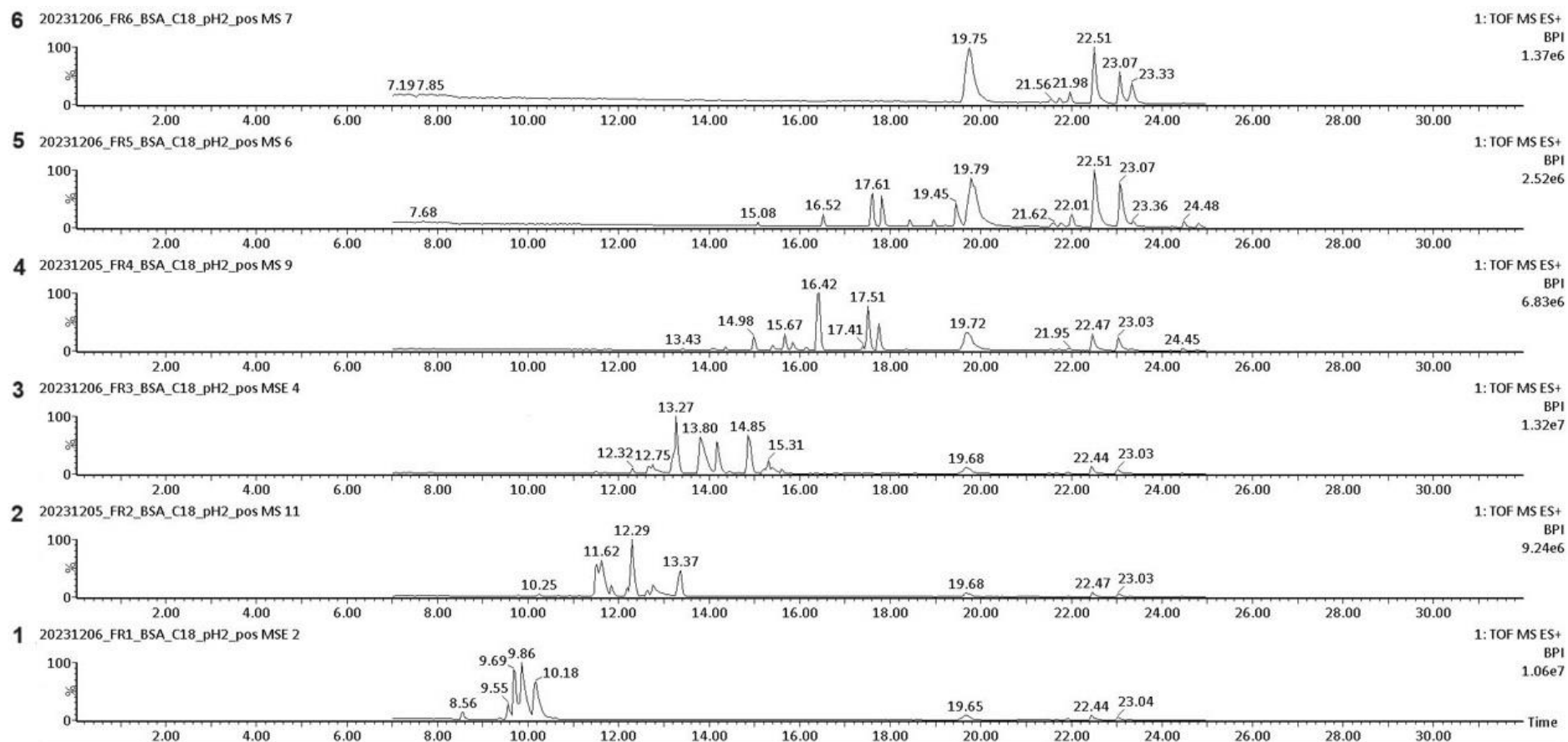
Slika 6. Base Peak Intensity (BPI) BSA triptičkih peptida razdvojenih na SCX nepokretnoj fazi
 Odozdo nagore kromatogrami: frakcija 1, frakcija 2, frakcija 3, frakcija 4, frakcija 5 i frakcija 6.



Slika 7. Base Peak Intensity (BPI) kromatogrami BSA triptičkih peptida razdvojenih na HLB nepokretnoj fazi
 Odozdo nagore kromatogrami: frakcija 1, frakcija 2, frakcija 3, frakcija 4, frakcija 5 i frakcija 6.

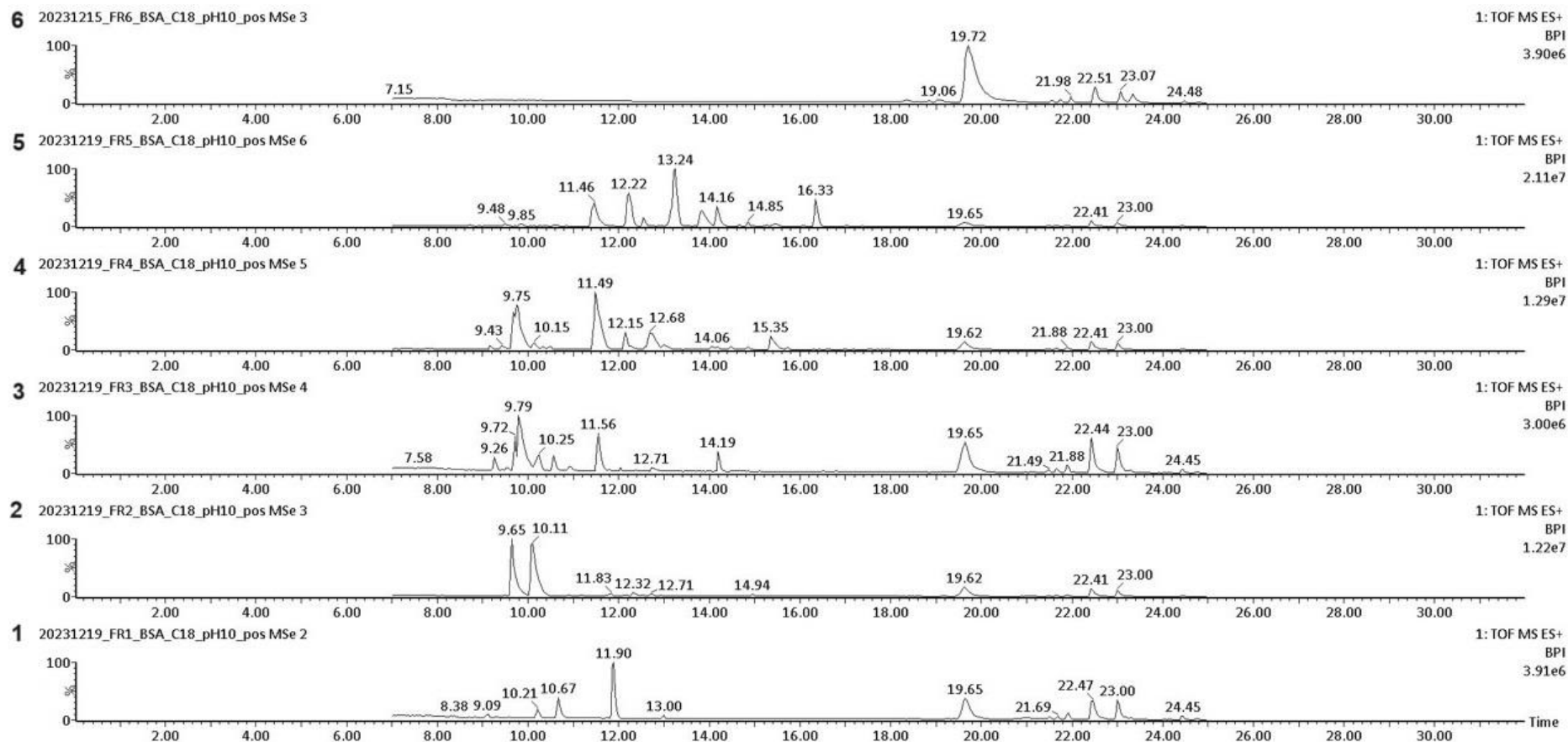


Slika 8. Base Peak Intensity (BPI) kromatogrami BSA triptičkih peptida razdvojenih na QMA nepokretnoj fazi
 Odozdo nagore kromatogrami: frakcija 1, frakcija 2, frakcija 3, frakcija 4, frakcija 5 i frakcija 6.



Slika 9. Base Peak Intensity (BPI) kromatogrami BSA triptičkih peptida razdvojenih na C18 nepokretnoj fazi pri pH 2,5

Odozdo nagore kromatogrami: frakcija 1, frakcija 2, frakcija 3, frakcija 4, frakcija 5 i frakcija 6.



Slika 10. Base Peak Intensity (BPI) kromatogrami BSA triptičkih peptida razdvojenih na C18 nepokretnoj fazi pri pH 10,0
 Odozdo nagore kromatogrami: frakcija 1, frakcija 2, frakcija 3, frakcija 4, frakcija 5 i frakcija 6.

4.2. ANALIZA POKRIVENOSTI PEPTIDNE SEKVENCE BSA

S obzirom da frakcioniranje peptida značajno smanjuje kompleksnost uzorka koji se potom analizira na spektrometru masa (Boichenko i sur., 2013), jedan od ciljeva ovoga rada bio je usporediti utjecaj načina frakcioniranja peptida na ukupnu pokrivenost sekvence BSA te pokazati da ukupna pokrivenost sekvence BSA nakon frakcioniranja značajno raste u usporedbi s nefrakcioniranim uzorkom. Rezultati su pokazali da se ukupna pokrivenost sekvence BSA ne razlikuje značajno između različitih metoda frakcioniranja (od 79,7 % do 83,4 %) te da su frakcije 3, 4 i 5 kod svih ispitivanih metoda imale najveće pojedinačne vrijednosti pokrivenosti sekvence što ukazuje da su one ujedno i najbogatije peptidima (tablica 5). Pokrivenost sekvence nefrakcioniranog uzorka BSA dobivena u prethodnim istraživanjima iznosila je 81,7 % što ne ukazuje na značajnu razliku u odnosu na frakcionirani uzorak BSA, neovisno o korištenoj metodi. Ovaj podatak ukazuje na potrebu za multidimenzionalnim pristupom separaciji peptida. Naime, analizom frakcija dobivenih separacijom na jednoj nepokretnoj fazi te njihovim daljnjim razdvajanjem na različitoj nepokretnoj fazi, konsekvativnim sustavom, rezultiralo bi značajnijim stvarnim povećanjem *P* vrijednosti i posljedično povećanjem pokrivenosti sekvence.

Tablica 5. Ukupna pokrivenost sekvence i pokrivenost sekvence pojedinih frakcija triptičkih peptida BSA razdvojenih na MAX, SCX, HLB, QMA nepokretnim fazama te C18 nepokretnoj fazi pri pH 2,5 i pH 10,0 dobivena uz pomoć PLGS alata

	Ukupna pokrivenost sekvence	Pokrivenost sekvence frakcije 1	Pokrivenost sekvence frakcije 2	Pokrivenost sekvence frakcije 3	Pokrivenost sekvence frakcije 4	Pokrivenost sekvence frakcije 5	Pokrivenost sekvence frakcije 6
MAX	81,4 %	5,8 %	24,1 %	22,1 %	22,2 %	37,1 %	3,5 %
SCX	81,4 %	4,4 %	7,2 %	26,9 %	45,6 %	43,3 %	9,9 %
HLB	83,6 %	19,9 %	29,7 %	21,6 %	33,6 %	21,6 %	0,0 %
QMA	79,7 %	17,3 %	42,7 %	22,7 %	22,7 %	18,5 %	18,5 %
C18 pH 2,5	83,2 %	19,6 %	34,6 %	34,8 %	20,3 %	10,0 %	0,0 %
C18 pH 10,0	83,4 %	15,0 %	9,9 %	15,0 %	56,5 %	37,6 %	0,0 %

4.3. ANALIZA RASPODJELE FRAKCIONIRANIH PEPTIDA BSA NA NEPOKRETNIM FAZAMA MAX, SCX, HLB, QMA I C18 PRI pH 2,5 I pH 10

Teorijski podaci o vrijednostima pI, GRAVY indeksu i duljini peptida koji su dobiveni uz pomoć ProtParam alata, zajedno uz podatke o intenzitetu pikova detektiranih peptida dobivenih MS^E analizom, korišteni su za analizu raspodjele peptida po različitim frakcijama na ispitivanim MAX, SCX, HLB, QMA nepokretnim fazama te C18 nepokretnoj fazi pri pH 2,5 i pH 10,0 korištenim pri μ SPE. U tu svrhu izrađeni su grafovi ovisnosti retencijskih vremena pojedinih peptida prilagođenih nekonzekutivnoj metodi o pI, GRAVY indeksu, duljini i intenzitetu za svaku ispitivanu metodu odjeljivanja.

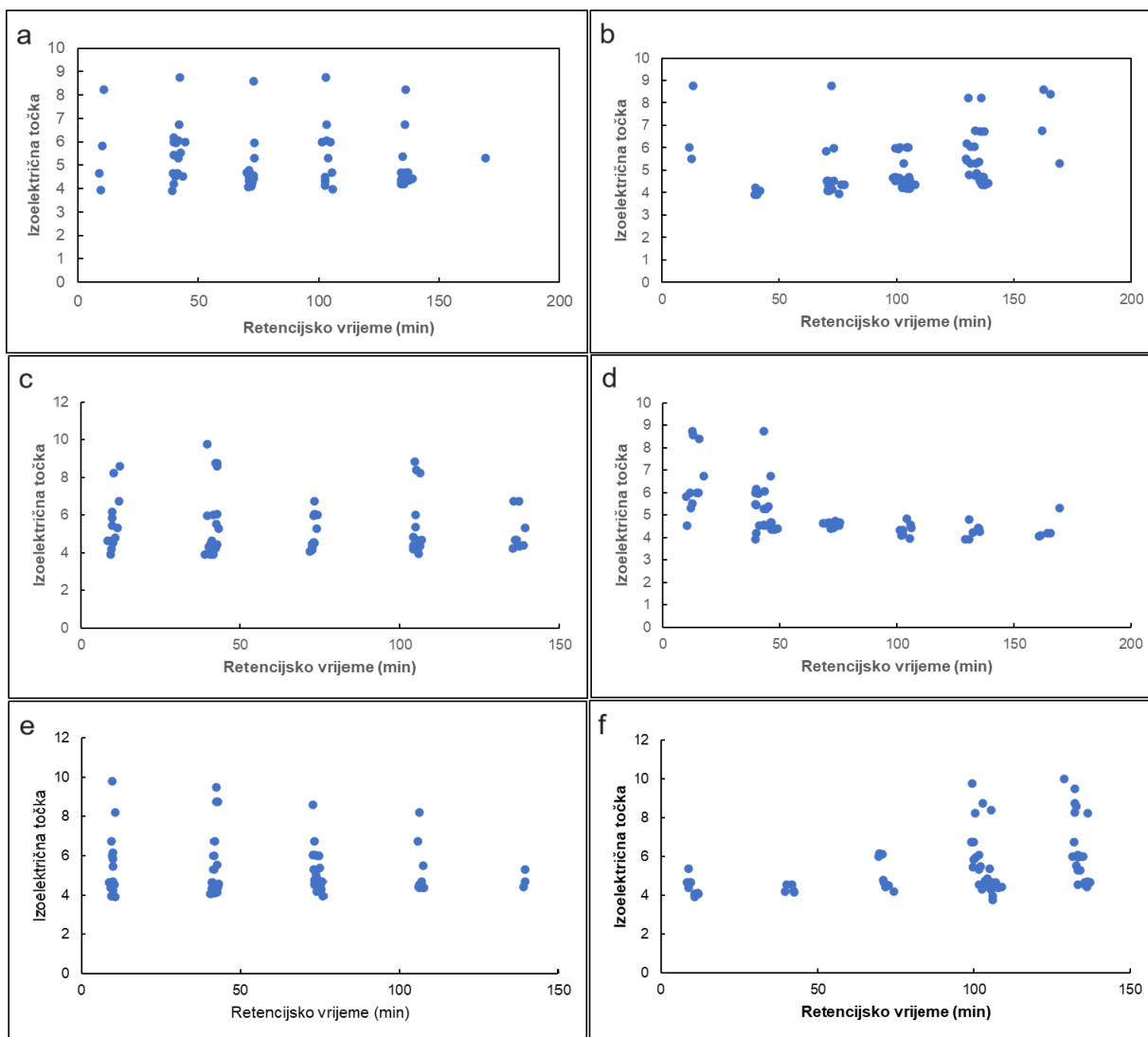
4.3.1. Utjecaj pI na raspodjelu peptida tijekom frakcioniranja na μ SPE

pI predstavlja pH vrijednost pri kojoj je jednak broj negativno i pozitivno nabijenih aminokiselinskih ostataka peptida (IUPAC, 2019). Kada je pH otopine u kojoj se peptid nalazi manji od pI peptida, tada je ukupan naboj peptida pozitivan, dok je u slučaju nižeg pH otopine od pI peptida ukupan naboj peptida negativan (Berg i sur., 2013). Prema tome, očekivano je da će pI pokazati značajan utjecaj na raspodjelu peptida prilikom frakcioniranja na nepokretnim fazama ionske izmjene, MAX, SCX i QMA, s obzirom da je kriterij razdvajanja peptida u navedenim metodama njihov sveukupan naboj (Larive i sur., 1999) koji je u korelaciji s njihovom pI.

Sukladno navedenom, razdvajanje peptida na SCX nepokretnoj fazi pokazalo je izrazitu ovisnost o pI peptida, pri čemu je vidljivo kako s povećanjem pH elucijske otopine eluiraju peptidi sa sve višom pI vrijednosti (slika 11c). S druge strane, isto nije zabilježeno kod drugih metoda ionske izmjene. Naime, iako QMA nepokretna faza predstavlja jaki anionski izmjenjivač, slika 11d upućuje na eluciju kationa i slabo vezanih aniona raznih vrijednosti pI u prve dvije frakcije te razdvajanje peptida sličnih pI vrijednosti u ostale četiri frakcije. Navedeno se može objasniti sastavom elucijskih pufera koji su bili korišteni u ovoj metodi, gdje se umjesto pH vrijednosti otopine za otpuštanje peptida s nepokretne faze koristilo povećanje koncentracije soli. Raspodjela peptida neovisna o njihovom pI vidljiva je i kod MAX nepokretne faze (slika 11a), što je moguće objasniti strukturom nepokretne faze pojašnjene u poglavlju 2.4.1. S obzirom da je MAX nepokretna faza kombinirane jake anionske izmjene i izmjene obrnutih faza, vidljivo je da je na raspodjelu peptida u frakcijama manje utjecao njihov pI, što ukazuje na veći značaj RP dijela. Razdvajanje peptida na SCX nepokretnoj fazi u odnosu na pI ne pokazuje očekivanu raspodjelu uzimajući u obzir kako je elucija vršena promjenom pH. U skladu s dosad navedenim te podacima iz tablice 2., očekivano je da se u prvoj frakciji nalaze peptidi s pI nižom od 3,5, u frakciji 2 peptidi s pI

nižom od 4 itd. No, iako raspodjela na slici 11b nije u skladu s očekivanim, vidljivo je kako s povećanjem pH elucijske otopine eluiraju peptidi sa sve višom pl.

Kod HLB nepokretne faze nije zabilježena ovisnost raspodjele peptida o pl (slika 11c). S druge strane, ističe se komplementarnost grafičkih prikaza frakcioniranja peptida na RP nepokretnoj fazi pri niskim (slika 11e) i visokim pH (slika 11f) uvjetima. Pri pH vrijednosti 2,5 karboksilna grupa peptida nije ionizirana (COOH), a amino skupina je protonirana (NH₃⁺) (Berg i sur., 2013) što smanjuje sveukupan naboj peptida i povećava njegovu hidrofobnost (Lodish i sur., 2016) povećavajući vjerojatnost njegove interakcije s hidrofobnom nepokretnom fazom pri kromatografiji obrnutih faza. U uvjetima pH vrijednosti 10,0, i karboksilna (COO⁻) i amino skupina peptida su deprotonirane (NH₂). Time se povećava sveukupan naboj peptida i smanjuje njegova hidrofobnost čineći vjerojatnost vezanja peptida za hidrofobnu nepokretnu fazu manjom (Berg i sur., 2013). Na slici 11e je vidljivo kako se najprije eluiraju peptidi izoelektričnih točaka većih od 4 s obzirom da su to peptidi koji pri pH 2,5 imaju veći sveukupni naboj, odnosno manje su hidrofobni, a s odmakom frakcija eluiraju se peptidi s manjim pozitivnim nabojem, tj. hidrofobniji peptidi. Komplementarno, na slici 11f je prikazano razdvajanje peptida od većeg sveukupnog naboja i manje hidrofobnosti prema manjem sveukupnom naboju i većoj hidrofobnosti na C18 nepokretnoj fazi pri pH 10,0.



Slika 11. Grafički prikaz utjecaja izoelektrične točke na raspodjelu peptida na **a) MAX, b) SCX, c) HLB, d) QMA** nepokretnoj fazi, **e) RP** nepokretnoj fazi pri pH 2,5 i **f) RP** nepokretnoj fazi pri pH 10,0

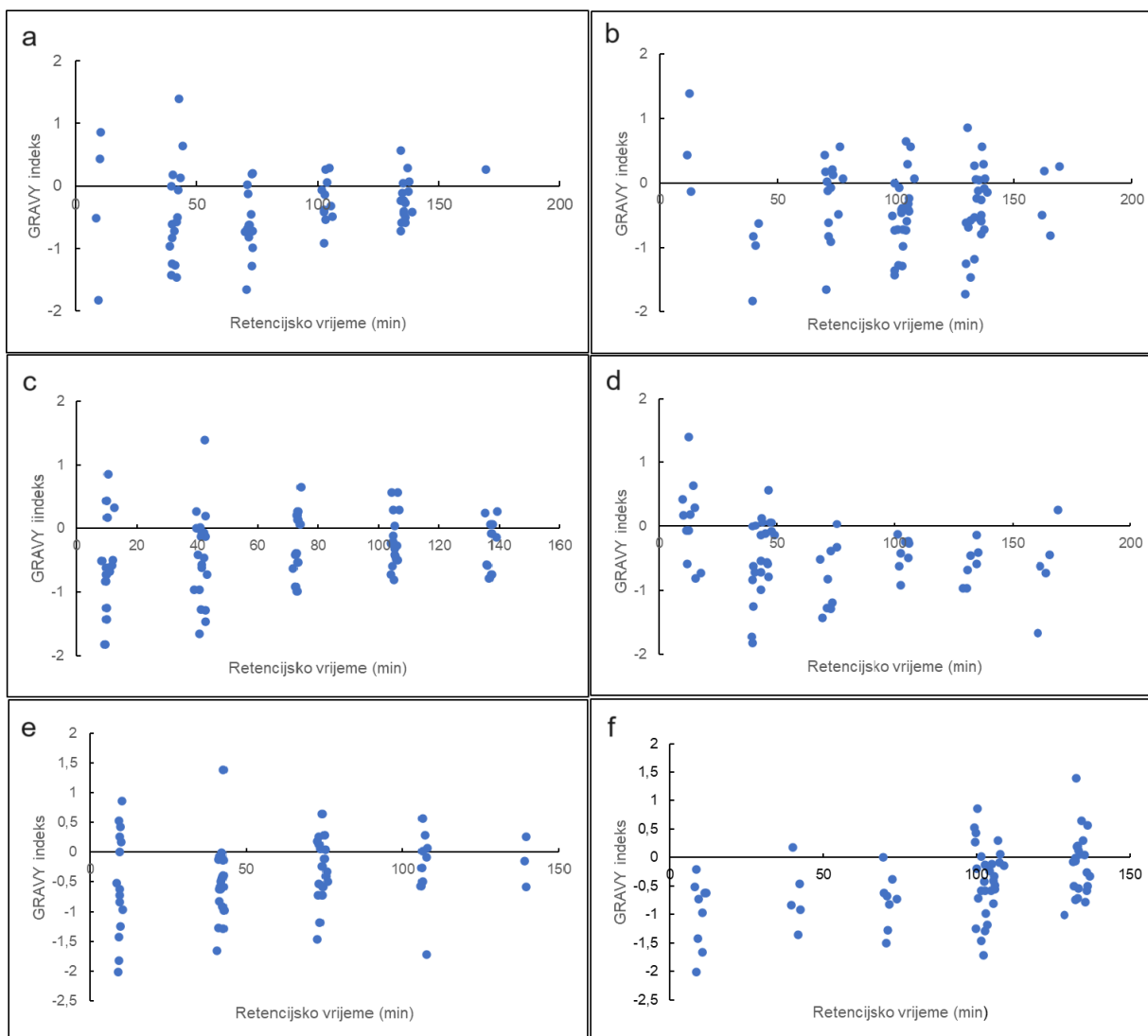
4.3.2. Utjecaj GRAVY indeksa na raspodjelu peptida tijekom frakcioniranja na μ SPE

GRAVY indeks ukazuje na hidrofobnost, tj. hidrofilnost peptida. Na slici 12 vidljivo je kako je većina analiziranih peptida BSA hidrofilna s GRAVY indeksom manjim od 0, što je u skladu s očekivanim jer GRAVY indeks cijelog BSA proteina iznosi -0,429 (ProtParam). Najjači utjecaj GRAVY indeksa na raspodjelu peptida pri frakcioniranju očekivan je za C18 nepokretnu fazu gdje se peptidi razdvajaju na temelju hidrofobnosti (Tanaka i sur., 1993) te HLB nepokretnu fazu čiji se princip separacije zasniva na hidrofobnosti i hidrofilnosti (Waters, 1998).

Slike 12e i 12f prikazuju rast broja hidrofobnih peptida, s GRAVY indeksom većim od 0, s povećanjem broja frakcija, čime su potvrđeni očekivani rezultati. Pri raspodjeli peptida frakcioniranih na HLB koloni u odnosu na GRAVY indeks (slika 12c) vidljivo je smanjenje

sveukupnog broja peptida s porastom broja frakcija što je također u skladu s očekivanim svojstvima kolone. Elucija peptida vezanih za nepokretne faze RP i HLB vršila se povećanjem koncentracije acetonitrila, odnosno polarnog otapala, čime se ometaju hidrofobne interakcije između peptida i nepokretne faze (Berg i sur., 2013).

Također je važno spomenuti značajnu ovisnost raspodjele peptida BSA na MAX nepokretnoj fazi u odnosu na GRAVY indeks. Slika 12a prikazuje promjenu u hidrofobnosti peptida s odmakom frakcija što dodatno upućuje na potvrdu strukture MAX nepokretne faze kao sorbensa s višestrukim mehanizmima. Ovom raspodjelom pokazano je kako ionske interakcije ostvarene s peptidima nisu dominantne interakcije koje MAX nepokretna faza ostvaruje.

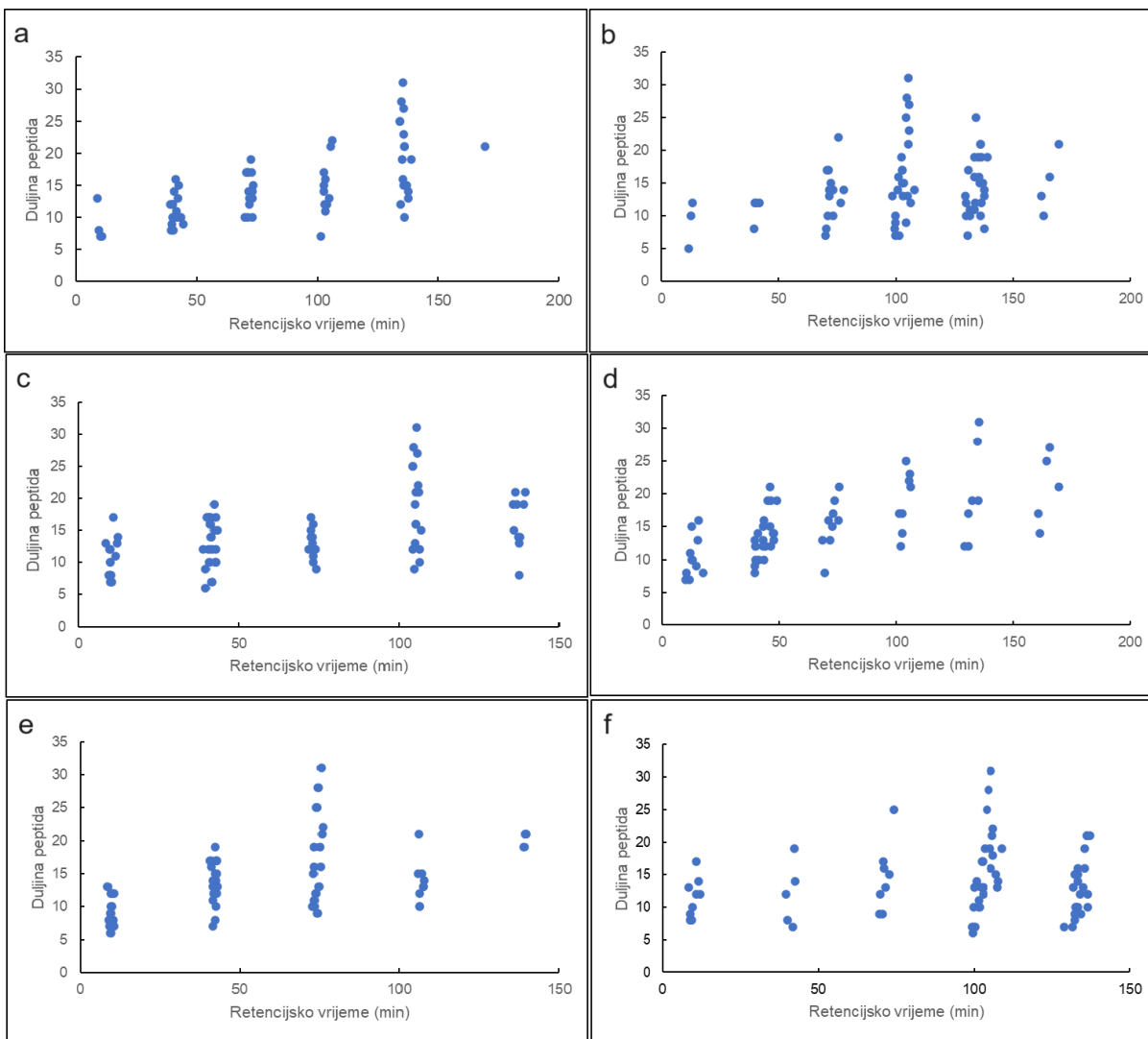


Slika 12. Grafički prikaz utjecaja GRAVY indeksa na raspodjelu peptida na **a) MAX, b) SCX, c) HLB, d) QMA** nepokretnoj fazi, **e) RP** nepokretnoj fazi pri pH 2,5 i **f) RP** nepokretnoj fazi pri pH 10,0

4.3.3. Utjecaj duljine peptida na raspodjelu peptida tijekom frakcioniranja na μ SPE

Iako je poznato da kompozicija aminokiselinskih ostataka peptida ima najveći utjecaj na retencijsko vrijeme peptida, pokazano je da i duljina peptida doprinosi zadržavanju na nepokretnoj fazi (Badgett i sur., 2018). Dokazano je da se retencijsko vrijeme peptida povećava s duljinom peptida pri ionskoj izmjeni (Burke i sur., 1989), izmjeni obrnutih faza (Mant i sur., 1988) te pri izmjeni koja se temelji na hidrofилnim interakcijama (Badgett i sur., 2018).

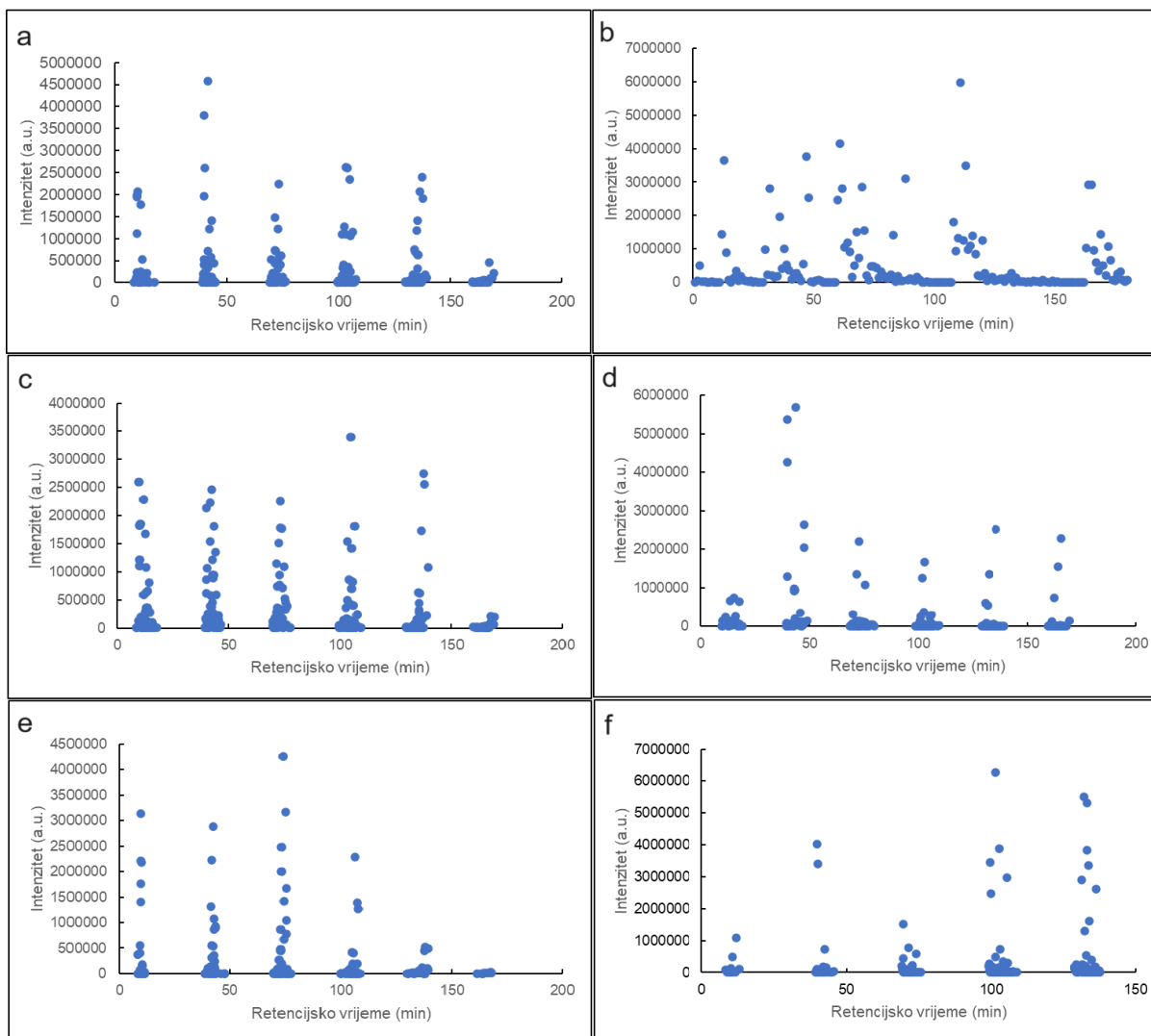
Iz rezultata prikazanih na slici 13 moguće je primijetiti da s porastom broja frakcije raste i duljina peptida što je u skladu s očekivanim rezultatima. Najduži peptid identificiran PLGS alatom je dugačak 31 aminokiselinu, dok dužina najkraćeg peptida iznosi 5 aminokiselinskih ostataka.



Slika 13. Grafički prikaz utjecaja duljine peptida na njihovu raspodjelu na **a) MAX, b) SCX, c) HLB, d) QMA** nepokretnoj fazi, **e) RP** nepokretnoj fazi pri pH 2,5 i **f) RP** nepokretnoj fazi pri pH 10,0

4.3.4. Raspodjela intenziteta peptida tijekom frakcioniranja na μ SPE

Rezultati prikazani slikom 14 ukazuju na potvrdu rezultata prikazanih na slikama 5-10 te u tablici 5. Optimizacijom protokola za frakcioniranje postignuta je ciljana i normalno distribuirana raspodjela peptida po frakcijama. Pikovi kromatograma najvećeg intenziteta nalaze se unutar srednjih frakcija, frakcija 3, 4 i 5, prema čemu se može zaključiti da su to ujedno i frakcije najbogatije peptidima.



Slika 14. Grafički prikaz utjecaja intenziteta peptida razdvojenih na **a) MAX, b) SCX, c) HLB, d) QMA** nepokretnoj fazi, **e) RP** nepokretnoj fazi pri pH 2,5 i **f) RP** nepokretnoj fazi pri pH 10,0

4.4. ANALIZA ORTOGONALNOSTI

Glavni cilj ovog rada bio je ispitati ortogonalnost nekonzekutivne metode razdvajanja frakcija μ SPE i predložiti kombinaciju dviju nepokretnih faza s najvećom ortogonalnosti. Kriterij za ortogonalnost predložen je u radu Gilara i sur. (2005a). Za izračun ortogonalnosti bilo je potrebno konstruirati grafove ovisnosti normaliziranog retencijskog vremena peptida

razdvojenih na jednoj nepokretnoj fazi o normaliziranom retencijskom vremenu peptida razdvojenih na drugoj nepokretnoj fazi (slika 15). Ukupan broj polja (P_{max}) je 36, što predstavlja umnožak maksimalnih P vrijednosti obiju dimenzija obzirom da se frakcioniranje vrši u 6 frakcija. $\sum polja$ pridodaje se broj polja koja sadrže minimalno jednu točku.

4.4.1. Ortogonalnost multidimenzionalnih sustava

Cilj ovog rada bio je ostvariti ortogonalan multidimenzionalni sustav, odnosno sustav u kojem se peptidi razdvajaju na temelju dva ili više različita fizikalno-kemijska svojstva u dvama neovisnim dimenzijama (Hildmann i Hoffmann, 2024). U svrhu validacije predložene metode linearnosti i reproducibilnosti metode mjerenja, prvo je napravljen izračun ortogonalnosti dvije replike BSA peptida na HLB nepokretnoj fazi. Rezultat je pokazao mjeru ortogonalnosti od 0 % te time potvrdio linearnost i reproducibilnost metode (slika 15p).

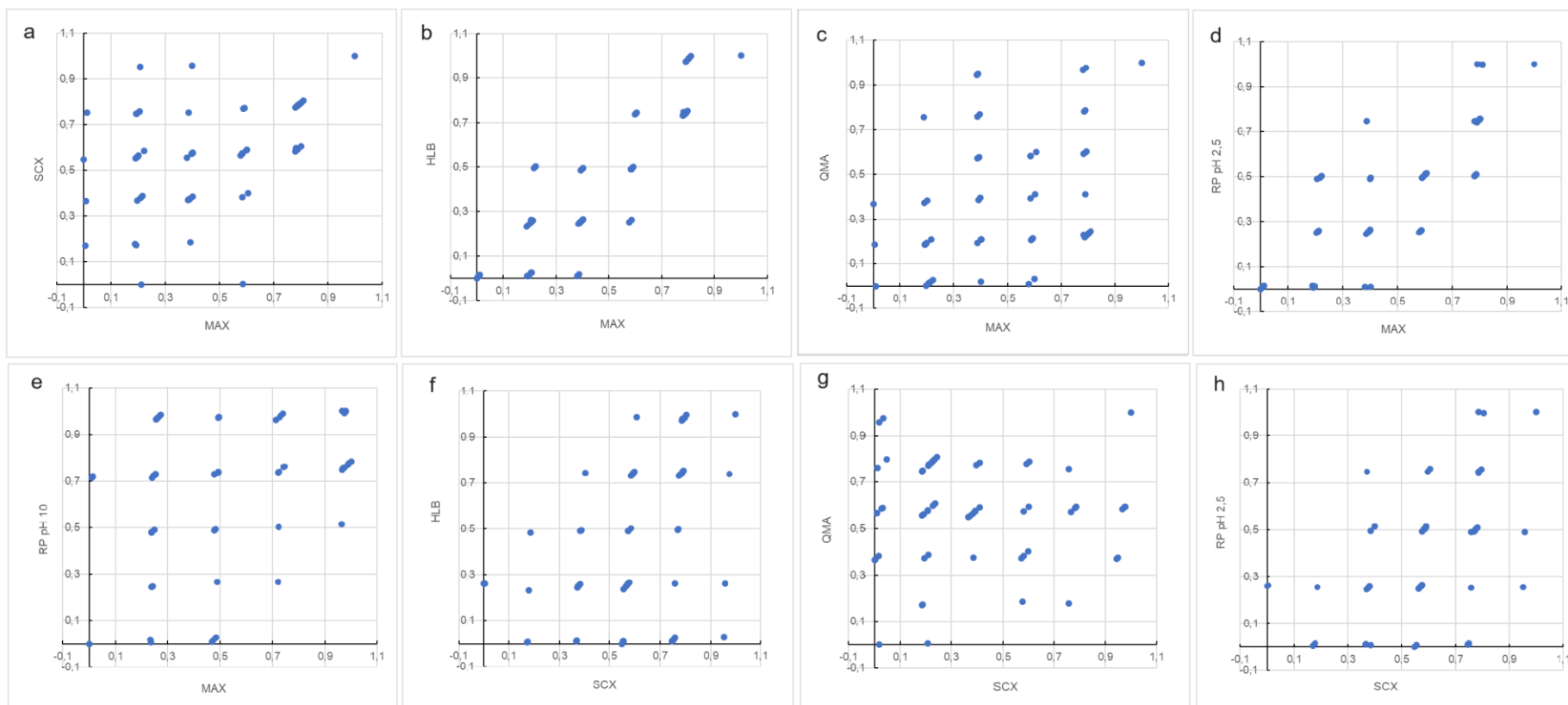
Tablica 6 prikazuje izračunate vrijednosti ortogonalnosti za sve kombinacije metoda frakcioniranja peptida ispitanih u ovom istraživanju. Rezultati su pokazali da je najveća mjera ortogonalnosti (79,36 %) postignuta u metodi u kojoj je kao prva dimenzija za razdvajanje peptida korištena QMA nepokretna faza, dok je drugu dimenziju predstavljalo razdvajanje peptida na HLB nepokretnoj fazi. No, potrebno je uzeti u obzir i kombinacije koje slijede QMA-HLB (slika 15j), poput QMA-RP pH 2,5 (74,96 %, slika 15m), SCX-QMA (74,96 %, slika 15g), SCX-HLB (74,96 %, slika 15f) i MAX-QMA (74,96 %, slika 15c). Uspoređujući grafičke prikaze ortogonalnosti navedenih kombinacija metoda, moguće je primijetiti kako se njihova $\sum polja$ razlikuje samo za vrijednost 1. Prema tome, zaključak koji proizlazi je da je prema ovome radu optimalna kombinacija za postizanje ortogonalnosti ona pri kojoj je prva dimenzija separacija peptida pomoću hidrofilne-lipofilne izmjene ili jakog ionskog izmjenjivača sa separacijom peptida na jakom ionskom izmjenjivaču u drugoj dimenziji.

Ortogonalnost metoda HLB i jakog ionskog izmjenjivača moguće je objasniti pomoću komplementarnosti svih fizikalno-kemijskih svojstava koja su povezana u ovom sustavu. HLB nepokretna faza vrši izmjenu obrnutih faza uz ostvarivanje hidrofilnih interakcija (Waters, 2014) što u kombinaciji s ionskom izmjenom doprinosi multidimenzionalnosti sustava. Budući da neki od radova ukazuju na komplementarnost RP (Mitulovic i sur., 2004) i kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) (Zhou i sur., 2015) s jakim ionskim izmjenjivačem ovaj rezultat je očekivan.

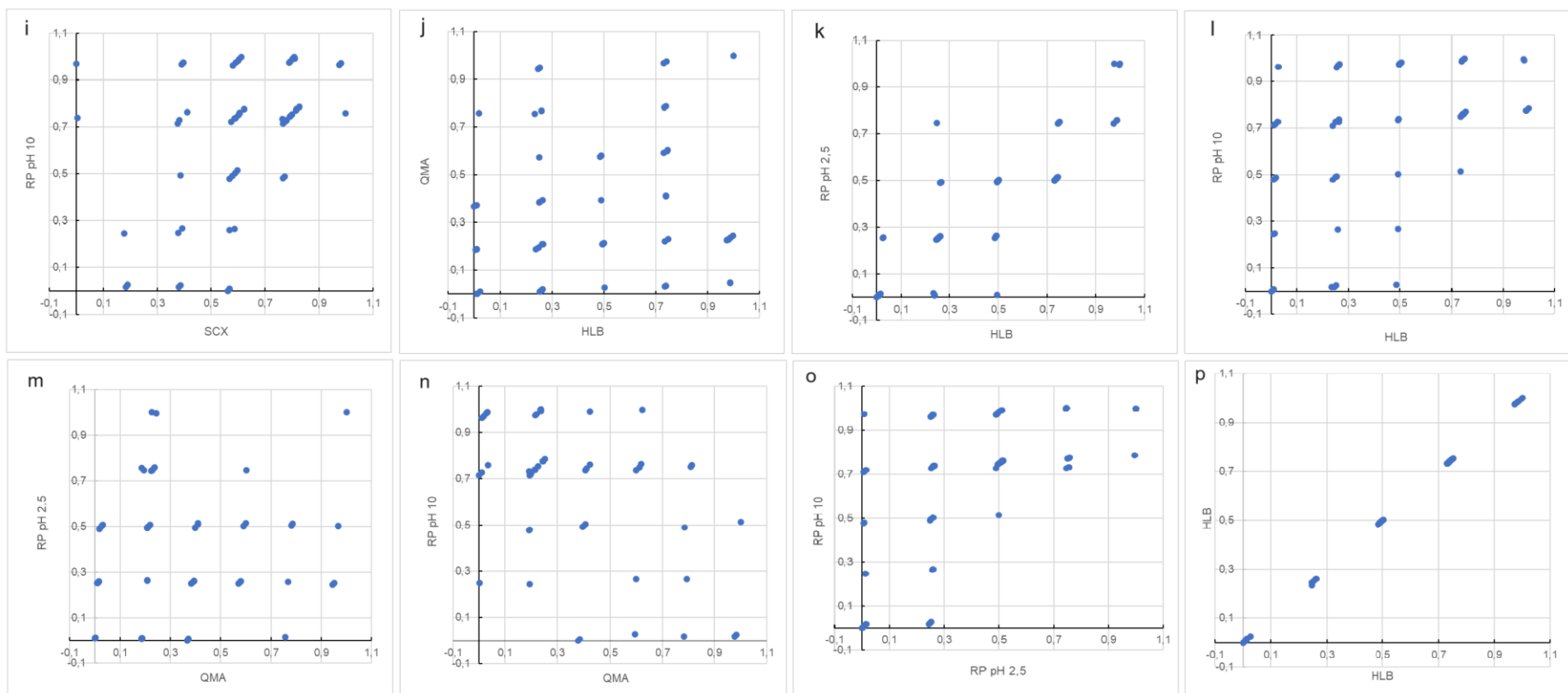
MAX nepokretna faza je prema rezultatima prikazanim u poglavlju 4.3. i u skladu s kemijskom strukturom (Fontanals i sur., 2010) potvrđena kao nepokretna faza s višestrukim mehanizmima separacije. Iz tog razloga moguće je objasniti visoku vrijednost

ortogonalnosti sustava MAX-QMA iako se radi o kombinaciji nepokretnih faza jake anionske izmjene, tj. istog principa razdvajanja.

Ortogonalnost sustava QMA-RP pH 2,5 u skladu je s poznatim rezultatima (Yeung i sur., 2020) kao i rezultat sustava SCX-QMA uzimajući u obzir komplementarnost anionske i kationske izmjene (Dai i sur., 2007).



Slika 15. Grafički prikazi ortogonalnosti peptida za multidimenzionalne sustave: **a)** MAX-SCX, **b)** MAX-HLB, **c)** MAX-QMA, **d)** MAX-RP pH 2,5, **e)** MAX-RP pH 10,0, **f)** SCX-HLB, **g)** SCX-QMA, **h)** SCX-RP pH 2,5, **i)** SCX-RP pH 10,0, **j)** HLB-QMA, **k)** HLB-RP pH 2,5, **l)** HLB-RP pH 10, **m)** QMA-RP pH 2,5, **n)** QMA-RP pH 10,0, **o)** RP pH 2,5-RP pH 10,0, **p)** HLB-HLB



Slika 15. Grafički prikazi ortogonalnosti peptida za multidimenzionalne sustave: **a)** MAX-SCX, **b)** MAX-HLB, **c)** MAX-QMA, **d)** MAX-RP pH 2,5, **e)** MAX-RP pH 10,0, **f)** SCX-HLB, **g)** SCX-QMA, **h)** SCX-RP pH 2,5, **i)** SCX-RP pH 10,0, **j)** HLB-QMA, **k)** HLB-RP pH 2,5, **l)** HLB-RP pH 10,0, **m)** QMA-RP pH 2,5, **n)** QMA-RP pH 10,0, **o)** RP pH 2,5-RP pH 10,0, **o)** HLB-HLB - *nastavak*

Tablica 6. Izračun ortogonalnosti za ispitane multidimenzionalne sustave

	MAX	SCX	QMA	HLB	RP pH 2,5
MAX	0 %				
SCX	70,55 %	0 %			
QMA	74,96 %	74,96%	0 %		
HLB	39,68 %	74,96%	79,36%	0 %	
RP pH 2,5	44,09 %	70,55%	74,96%	30,86%	0 %
RP pH 10,0	57,32 %	61,73%	66,14%	61,73%	61,73%

4.5. ANALIZA KEMIJSKIH MODIFIKACIJA PEPTIDA U UVJETIMA VISOKOG I NISKOG pH

Unatoč dosadašnjim radovima koji sugeriraju da je dvodimenzionalna kombinacija separacije peptida pomoću RP izmjene pri uvjetima niske i visoke vrijednosti pH uspješnija u odnosu na druge dvodimenzionalne metode (Yeung i sur., 2020; Wang i sur., 2018; Gilar i sur., 2005b), u ovom radu ta kombinacija se pokazala prosječnom, rezultirajući mjerom ortogonalnosti od 61,73 % za triptičke BSA peptide (tablica 6). Iako bi navedena metoda možda pokazala veću ortogonalnost kod smjese peptida većeg raspona GRAVY indeksa od peptida BSA, treba uzeti u obzir i druge varijable vezane za ponašanje peptida u uvjetima niske i visoke pH vrijednosti. Naime, uporabom pufera amonijeva formata pri pH 10,0, primijećen je značajan nastanak precipitata koji su stvarali probleme u kasnijim analizama na nanoUPLC koloni vezanoj za MS. Poznato je da promjena pH vrijednosti otopine u kojoj se peptid nalazi može utjecati na njegovu konformaciju, posebice tercijarnu strukturu, a razina konformacijske promjene peptida usko je povezana s kiselosti ili bazičnosti otopine (O'Brien i sur., 2011). Disulfidni mostovi su kovalentne veze koje se formiraju između aminokiselina cisteina (Cys) i doprinose tercijarnoj strukturi peptida. Konstanta disocijacije (pK_a) tiolne skupine (-SH) slobodnog cisteina iznosi 8,3 (Berg i sur., 2013), stoga pri uvjetima pH vrijednosti 10,0 dolazi do deprotonacije i nastanka tiolatnog aniona (S-) koji vrši nukleofilni napad na tiolnu skupinu te se formira disulfidni most (Lodish i sur., 2016). Povezivanjem peptida disulfidnim mostovima između istih i različitih lanaca dolazi do stvaranja precipitata što posljedično dovodi do nestabilnog tlaka i začepijavanja LC-MS sustava.

Aminokiseline su podložne kemijskim reakcijama pri promjenama čimbenika okoline peptida poput temperature, pH i redoks potencijala (Holtz i sur., 2021; Cloos i Christgau, 2002). Stoga je, uz ispitivanje uspješnosti frakcioniranja peptida RP metodom pri uvjetima niskog (2,5) i visokog (10,0) pH, u ovom radu provedena i analiza udjela kemijskih modifikacija detektiranih peptida BSA. Iako se rezultat udjela dehidracije serina (S) i

treonina (T) pri visokom i niskom pH ne razlikuje u značajnoj mjeri (tablica 7), ipak je zabilježeno malo povećanje pri visokom pH, što je u skladu sa zabilježenim nastankom dehidroalanina u bazičnim uvjetima (Nakayoshi i sur., 2019). Veća zastupljenost amidacije C terminalnog kraja peptida pri pH 2,5 u odnosu na pH 10,0 je očekivana obzirom da je amidacija zastupljenija u kiselim uvjetima (Bateman i sur., 1985). Na kraju, iako se deamidacija asparagina (N) i glutamina (Q) i oksidacija metionina (M) mogu odvijati pri kiselim i bazičnim uvjetima (Bischoff i Schületer, 2012; Scheter i sur., 1975), ukupan udio kemijskih modifikacija peptida je veći pri pH 10,0. Razlog tome mogla bi biti veća stabilnost peptida BSA u kiseljoj okolini što je potvrđeno teoretskom pl vrijednosti nativnog proteina BSA koja iznosi 5,82 (ProtParam).

Tablica 7. Udio kemijskih modifikacija peptida BSA nakon frakcioniranja na RP koloni pri pH vrijednostima od 2,5 i 10,0

Kemijska modifikacija	% pri pH 2,5	% pri pH 10,0
Deamidacija N	28,21	27,27
Oksidacija M	5,13	4,04
Dehidracija ST	43,59	44,44
Deamidacija Q	7,69	15,15
Amidacija C-TERM	15,38	9,09
Ukupno	34,67	47,60

*Za analizu udjela kemijskih modifikacija peptida korišten je PLGS programski alat.

5. ZAKLJUČCI

1. μ SPE tehnikom uspješno je uspostavljen nekonsekutivni multidimenzionalni kromatografski sustav za razdvajanje triptičkih peptida BSA. Optimizirani su protokoli za frakcioniranje peptida na pet nepokretnih faza u 6 različitih protokola te se μ SPE pokazala kao jednostavna, brza i reproducibilna tehnika za frakcioniranje peptida.
2. Frakcioniranje triptičkih peptida BSA prije MS^E analize nije značajno povećalo ukupno pokrivenost sekvence proteina BSA u odnosu na analizu nefrakcioniranih peptida. U tu svrhu trebalo bi se ispitati uspješnost multidimenzionalnog pristupa frakcioniranju gdje bi konsekutivni sustav mogao dovesti do značajnijeg povećanja pokrivenosti sekvence.
3. Prema geometrijskom pristupom ortogonalnosti u multidimenzionalnim sustavima kromatografije, u ovom se radu pokazalo da se najveća nezavisnost razdvajanja peptida BSA postiže spregom HLB nepokretne fazi ili jakog ionskog izmjenjivača u prvoj dimenziji s jakim ionskim izmjenjivačem u drugoj dimenziji.
4. Kombinirani sustav razdvajanja peptida BSA na RP nepokretnoj fazi u uvjetima niskog i visokog pH nije se pokazao značajno uspješnijim od ostalih ispitivanih metoda. Uz to, pokazalo se da pri visokoj pH vrijednosti dolazi do značajnijeg povećanja udjela kemijskih modifikacija peptida kao i stvaranja precipitata koji stvaraju poteškoće pri analizi na nanoUPLC sustavu.

6. LITERATURA

Badgett MJ, Boyes B, Orlando R (2018) Peptide retention prediction using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1537**, 58–65. DOI:10.1016/j.chroma.2017.12.055

Banerjee, S i Mazumdar S (2012) Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem* **2012**, 7. DOI: 10.1155/2012/282574

Bateman RC Jr, Youngblood WW, Busby WH Jr, Kizer JS (1985) Nonenzymatic Peptide α -Amidation. *The American Society of Biological Chemists* **260**(16), 9090. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)39333-X

Bedani F, Kok WT, Janssen H-G (2006) A theoretical basis for parameter selection and instrument design in comprehensive size-exclusion chromatography×liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1133**(1-2), 126–134. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.08.048

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013) Biokemija, 1. izd (hrv), Školska knjiga, Zagreb, str. 23.

Bischoff R i Schlüter H (2012) Amino acids: Chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. *J Proteomics* **75**(8), 2286. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.01.041

Boichenko AP, Govorukhina N, van der Zee AGJ, Bischoff R (2013) Multidimensional separation of tryptic peptides from human serum proteins using reversed-phase, strong cation exchange, weak anion exchange, and fused-core fluorinated stationary phases. *J Sep Sci* **36**(21-22), 3463. DOI: 10.1002/jssc.201300750

Burke TW, Mant CT, Black JA, Hodges RS (1989) Strong cation-exchange high-performance liquid chromatography of peptides. *J Chromatogr A* **476**, 377–389. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)93883-x

Catherman AD, Skinner OS, Kelleher NL (2014) Top Down proteomics: Facts and perspectives. *Biochem Bioph Res Co* **445**(4), 684. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.041

Cindrić M, Marković A, Horvatić A (2009) Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* **45**(3), 219-231.

Cloos PAC i Christgau S (2002) Non-enzymatic covalent modifications of proteins: mechanisms, physiological consequences and clinical applications. *Matrix Biol* **21**(1). DOI: 10.1016/S0945-053X(01)00188-3

Dai J, Jin W-H, Sheng Q-H, Shieh C-H, Wu J-R, Zeng R (2007) Protein Phosphorylation and Expression Profiling by Yin-Yang Multidimensional Liquid Chromatography (Yin-Yang MDLC) Mass Spectrometry. *J Proteome Res* **6**(1), 250. DOI: 10.1021/pr0604155

de Hoffmann E i Stroobant V (2007) Mass spectrometry: Principles and Applications, 3. izd, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, str. 85.

Di Palma S, Hennrich ML, Heck AJR, Mohammed S (2012) Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. *J Proteomics* **75**(13), 3792–3793. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.04.033

Duong V-A i Lee H (2023) Bottom-Up Proteomics: Advancements in Sample Preparation. *Int J Mol Sci* **24**(6), 5350. DOI: 10.3390/ijms24065350

Dupree EJ, Jayathirtha M, Yorkey H, Mihasan M, Petre BA, Darie CC (2020) A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of this Field. *Proteomes* **8**(3), 14, 2-3. DOI: 10.3390/proteomes8030014

Đolangić A (2018) Polielektroliti: svojstva i primjena (završni rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Fischer E, Cachon R, Cayot N (2021) Effects of extraction pH on the volatile compounds from pea protein isolate: Semi-Quantification method using HS-SPME-GC-MS. *Food Rev Int* **150**. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110760

Fontanals N, Marcé RM, Borrull F, Cormack PAG (2010) Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents: dual-phase materials that improve selectivity and capacity. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **29**(7), 770–771. DOI: 10.1016/j.trac.2010.03.015

Galić N (2004) Elektroraspršenje – ionizacija u masenoj spektrometriji. *Kem Ind* **53**(3), 117–123.

Galić N i Cindrić M (2008) Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kem Ind* **57**(5), 233-237.

Giddings JC (1984) Two-dimensional separations: concept and promise. *Anal Chem* **56**(12), 1259A. DOI: 10.1021/ac00276a003

Gilar M, Olivova P, Daly AE, Gebler JC (2005a) Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal Chem* **77**(19), 6426–6434. DOI: 10.1021/ac050923i

Gilar M, Olivova P, Daly AE, Gebler JC (2005b) Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *J Sep Sci* **28**(14), 1701-1703. DOI: 10.1002/jssc.200500116

Goez MM, Torres-Madroñero MC, Röthlisberger S, Delgado-Trejos E (2018) Preprocessing of 2-Dimensional Gel Electrophoresis Images Applied to Proteomic Analysis: A Review. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **16**(1), 63–72. DOI: 10.1016/j.gpb.2017.10.001

Gussakovsky D, Neustaeter H, Spicer V, Krokhin OV (2017) Sequence-Specific Model for Peptide Retention Time Prediction in Strong Cation Exchange Chromatography. *Anal Chem* **89**(21), 11799. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03436

Hashemi B, Zohrabi P, Shamsipur M (2018) Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. *Talanta* **187**, 337. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.05.053

Hildmann S i Hoffmann T (2024) Characterisation of atmospheric organic aerosols with one- and multidimensional liquid chromatography and mass spectrometry: State of the art and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **175**, 2. DOI: 10.1016/j.trac.2024.117698

Holtz A, Basisty N, Schilling B (2021) Quantification and Identification of Post-Translational Modifications Using Modern Proteomics Approaches. U: Marcus K, Eisenacher M i Sitek B

(ured.) Quantitative Methods in Proteomics. Methods in Molecular Biology, 2. izd., Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY. DOI: 10.1007/978-1-0716-1024-4

Hu A, Noble WS, Wolf-Yadlin A (2016) Technical advances in proteomics: new developments in data-independent acquisition. *F1000Research* **5**, 3. DOI: 10.12688/f1000research.7042.1

Issaq H, Chan K, Janini G, Conrads T, Veenstra T (2005) Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis. *J Chromatogr B* **817**(1), 35–47. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.07.042

IUPAC Compendium of Chemical Terminology isoelectric point (2019). International Union of Pure and Applied Chemistry. DOI: 10.1351/goldbook.I03275. Pristupljeno 23. lipnja 2024.

Jalili V, Barkhordari A, Ghiasvand A (2019) A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. *Microchem J* **104319**. DOI: 10.1016/j.microc.2019.104319

Kyte J i Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**(1), 121. DOI: 10.1016/0022-2836(82)90515-0

Larive CK, Lunte SM, Zhong M, Perkins MD, Wilson GS, Gokulrangan G, Williams T, Afroz F, Scöneich C, Derricks TS, Middaugh R, Bogdanowich-Knipp S (1999) Separation and Analysis of Peptides and Proteins. *Anal Chem* **71**(12), 391R. DOI: 10.1021/a1990013o

Law KP i Lim YP (2013) Recent advances in mass spectrometry: data independent analysis and hyper reaction monitoring. *Expert Rev Proteomic* **10**, 553–556. DOI: 10.1586/14789450.2013.858022

Li J, Smith LS, Zhu H-J (2021) Data-independent acquisition (DIA): An emerging proteomics technology for analysis of drug-metabolizing enzymes and transporters. *Drug Discov Today: Technol*, 2. DOI: 10.1016/j.ddtec.2021.06.006

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Martin KC (2016) Molecular Cell Biology, 8. izd, W. H. Freeman and Company, New York, NY, str. 44.-73.

Manadas B, Mendes VM, English J, Dunn MJ (2010) Peptide fractionation in proteomics approaches. *Expert Rev Proteomics* **7**(5), 655. DOI: 10.1586/EPR.10.46

Mant CT, Lorne Burke TW, Black JA, Hodges RS (1988) Effect of peptide chain length on peptide retention behaviour in reversed-phase chromatography. *J Chromatogr A* **458**, 193–205. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)90564-8

McLafferty F (1981) Tandem mass spectrometry. *Science* **214**(4518), 286. DOI: 10.1126/science.7280693

Miller PE i Denton MB (1986) The quadrupole mass filter: Basic operating concepts. *J Chem Educ* **63**(7), 617. DOI: 10.1021/ed063p617

Mitchell Wells J i McLuckey SA (2005) Collision-Induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins. *Biol Mass Spectrom* **402**, 148–185. DOI: 10.1016/s0076-6879(05)02005-7

Mitulović G, Stingl C, Smoluch M, Swart R, Chervet J-P, Steinmacher I, Gerner C, Mechtler K (2004) Automated, on-line two-dimensional nano liquid chromatography tandem mass spectrometry for rapid analysis of complex protein digests. *Proteomics* **4**(9), 2555-2556. DOI: 10.1002/pmic.200300806

Mornar A, Marinac-Anđić I, Amidžić Klarić D, Kovačić J (2022) Mikroekstrakcija čvrstom fazom – inovativni pristup u bioanalitičkim istraživanjima. *Kem Ind* **71**(9-10), 639. DOI: 10.15255/KUI.2022.003

Mornar A, Nigović B, Amdžić Klairć D, Jeličić M-L, Brusač E (2020) Ekstrakcija čvrstom fazom primjena u bioanalitici. *Farmaceutski glasnik* **76**, 355-361.

Nakayoshi T, Kato K, Kurimoto E, Oda A (2019) Possible Mechanisms of Nonenzymatic Formation of Dehydroalanine-Residue Catalyzed by Dihydrogen Phosphate Ion. *J Phys Chem B* **123**, 3148. DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b10386

Naushad M, Khan MR (2014) History and Introduction of UPLC/MS U: Naushad M, Khan MR i Alothaman ZA (ured.) Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry: Evaluation and Applications in Food Analysis, CRC Press, Boca Raton, str. 1.

O'Brien EP, Brooks BR, Thirumalai D (2011) Effects of pH on Proteins: Predictions for Ensemble and Single-Molecule Pulling Experiments. *J Am Chem Soc* **134**(2), 979. DOI: 10.1021/ja206557y

Orabi EA i Lamoureux G (2018) Cation- π Interactions between Quaternary Ammonium Ions and Amino Acid Aromatic Groups in Aqueous Solution. *J Phys Chem B* **122**(8), 2251. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b11983

Redovniković IR (2016) HPLC niskomolekulskih spojeva (interna skripta). Dostupno na: https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/6148447/mod_resource/content/0/HPLC_skripta_IRR.pdf.

Pristupljeno: 23. lipnja 2024.

Rouessac F i Rouessac A (2007) Chemical Analysis, Modern Instrumental Methods and Techniques, 2. izd., 7, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, str. 4-389.

Shechter Y, Burstein Y, Patchornik A (1975) Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry* **14**(20), 4499. DOI: 10.1021/bi00691a025

Sionkowska A (2003) Interaction of collagen and poly(vinyl pyrrolidone) in blends. *Eur Polym J* **39**(11), 2135. DOI: 10.1016/s0014-3057(03)00161-7

Stroink T, Ortiz M, Bult A, Lingeman H, Dejong G, Underberg W (2005) On-line multidimensional liquid chromatography and capillary electrophoresis systems for peptides and proteins. *J Chromatogr B* **817**(1), 51. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.11.057

Tanaka N, Kimata K, Hosoya K, Miyanishi H, Araki T (1993) Stationary phase effects in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* **656**(1-2). DOI: 10.1016/0021-9673(93)80805-I

Tyers M i Mann M (2003) From genomics to proteomics. *Nature* **422**, 193. DOI: 10.1038/nature01510

Ursić I (2017) Prednosti tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti u razvoju stabilitetno-indikativne metode za kontrolu kakvoće nepafenaka (završni specijalistički rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

van den Hurk RS, Lagerwaard B, Terlouw NJ, Sun M, Tieleman JJ, Versteegen AX, Samanipour S, Pirok BWJ, Gargano AFG (2024) Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry for Complex Protein Digest Analysis Using Parallel Gradients. *Anal Chem* **96**(22), 9294-9301. DOI: 10.1021/acs.analchem.4c02172

Volmer DA i Selno L (2005) Tutorial: Mass analyzers : an overview of several designs and their applications, Part I. *Spectroscopy* **20**(11).

Zhang F, Ge W, Ruan G, Cai X, Guo T (2020) Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry-based Proteomics and Software Tools: A Glimpse in 2020. *Proteomics*, 1900276. DOI: 10.1002/pmic.201900276

Zhang L, Dai Q, Qiao X, Yu C, Qin X, Yan H (2016) Mixed-mode chromatographic stationary phases: Recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **82**, 146. DOI: 10.1016/j.trac.2016.05.011

Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek M-C, Yates JR (2013) Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews* **113**(4), 2343. doi:10.1021/cr3003533

Zhao Y, Gong X, Si X, Wei Z, Yang C, Zhang S, Zhang X (2015) Coupling a solid phase microextraction (SPME) probe with ambient MS for rapid enrichment and detection of phosphopeptides in biological samples. *The Analyst* **140**(8), 2599–2602. DOI: 10.1039/c4an02156h

Zhou Y, Meng Z i Edman-Woolcott M (2015) Multidimensional Separation Using HILIC and SCX Pre-fractionation for RP LC-MS/MS Platform with Automated Exclusion List-based MS Data Acquisition with Increased Protein Quantification. *J Proteomics Bioinform* **8**(11), 260. DOI: 10.4172/jpb.1000378

Zhu M-Z, Li N, Wang Y-T, Liu N, Guo M-Q, Sun B-q, Zhou H, Liu L, Wu J-L (2017) Acid/Salt/pH Gradient Improved Resolution and Sensitivity in Proteomics Study Using 2D SCX-RP LC–MS. *J Proteome Res* **16**, 3470–3475. DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00443

Žunar B (2022) Biokemijska analitika (interna skripta), str. 37. Dostupno na: <https://moodle.srce.hr/2022->

2023/pluginfile.php/7892372/mod_resource/content/7/Zunar_Script2023_published.pdf

Pristupljeno 23. lipnja 2024.

Žuvela P, Skoczylas M, Jay Liu J, Bączek T, Kaliszan R, Wong MW, Buszewski B (2019) Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chem Rev* **119**(6). DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00246

Wang G i Cole RB (1994) Disparity between solution-phase equilibria and charge state distributions in positive-ion electrospray mass spectrometry. *Org Mass Spectrom* **29**(8), 419. DOI: 10.1002/oms.1210290805

Wang Z, Ma H, Smith K, Wu S (2018) Two-dimensional separation using high-pH and low-pH reversed phase liquid chromatography for top-down proteomics. *Int J Mass Spectrom* **427**, 43–51. DOI: 10.1016/j.ijms.2017.09.001

Waters (1998) Solid-Phase Extraction with Oasis HLB Sorbent: Simple Procedures for Superior Sample Preparation, https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/my_oas98.pdf. Pristupljeno 23. lipnja 2024.

Waters (2014) Care and Use Manual: Oasis HLB Cartridges and 96-Well Plates, <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf>. Pristupljeno 23. lipnja 2024

Watson JT i Sparkman OD (2007) Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Application and Strategies for Data Interpretation, 4. izd, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, str. 4.

Wilkins MR, Sanchez J-C, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1996) Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnol Genet Eng* **13**(1), 20. DOI: 10.1080/02648725.1996.10647923

Wilson SR, Jankowski M, Pepaj M, Mihailova A, Boix F, Vivo Truyols G, Lundanes, Greibrokk T (2007) 2D LC Separation and Determination of Bradykinin in Rat Muscle Tissue Dialysate with On-Line SPE-HILIC-SPE-RP-MS. *Chromatographia* **66**(7-8), 469–474. DOI: 10.1365/s10337-007-0341-4

Xu L, Hu Z-S, Duan R, Wang X, Yang Y-S, Dong L-Y, Wang X-H (2021) Advances and applications of in-tube solid-phase microextraction for analysis of proteins. *J Chromatogr A* **1640**, 461962. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.461962

Yeung D, Mizero B, Gussakovsky D, Klaassen N, Lao Y, Spicer V, Krokhin OV (2020) Separation orthogonality in liquid chromatography-mass spectrometry for proteomic applications: comparison of 16 different two-dimensional combinations. *Anal Chem* **92**, 3909-3911. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05407

Yu H, Tai Q, Yang C, Gao M, Zhang X (2023) Technological development of multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry in proteome research. *J Chromatogr A* **1700**. DOI: 10.1016/j.chroma.2023.464048

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Nika Bilić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis