

Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene

Hyphenated techniques liquid chromatography-mass spectrometry: basic methodology and applications

Mario Cindrić^{1*}, Ana Marković², Anita Horvatić¹

¹Institut "Ruđer Bošković",
Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za sistemsku biomedicinu,
Zagreb

²Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek,
Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu

Primljeno: 20. 1. 2009.

Prihvaćeno: 13. 2. 2009.

Adresa za dopisivanje:

* **Dr. sc. Mario Cindrić**,
Institut "Ruđer Bošković",
Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za sistemsku biomedicinu,
Planinska 1, 10 000 Zagreb
e-mail: mcindric@irb.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

SAŽETAK. Tekućinska kromatografija (LC) osnovna je višenamjenska separacijska tehnika koja se primjenjuje u modernim biološkim znanostima i srodnim područjima molekularne biologije kao što su analitička ili preparativna kemija. Za razliku od mnogih drugih separacijskih tehnika koje nisu pogodne za razdvajanje termički nestabilnih molekula (npr. plinska kromatografija, GC) ili onih koje se ne mogu direktno spregnuti (npr. izoelektrično fokusiranje, IEF), tekućinska kromatografija može uspješno poslužiti za razdvajanje širokog raspona molekula kao što su polimeri, male molekule farmaceutika ili njihovih metabolita, kao i peptida i proteina. Oda-birom takve metode tekućinske kromatografije koja ne šteti analizi spektrometrijom masa (hlapljivi puferi, stabilan i nizak protok, upotreba polarnih organskih otapala), tekućinski kromatograf može se jednostavno spregnuti sa spektrometrom masa. Izvor iona, analizator (ili kombinacija više analizatora u istom instrumentu, tzv. tandemski spektrometrija masa) i detektor iona odabiru se u ovisnosti o vrstama analiza, a koje pak mogu biti jednostavne analize određenog iona ili kvalitativno substrukturne i kvantitativne analize kompleksnih smjesa. Da bi se olakšalo određivanje strukture ili kvantitativna analiza, u proteklom desetljeću su razvijene različite programske aplikacije i pretraživači baza podataka.

Ključne riječi: analizator masa, baze podataka, ionizacija, tandemski spektrometrija masa, tekućinska kromatografija

ABSTRACT. Liquid chromatography (LC) is a basic versatile separation technique widely used in modern life sciences especially in the fields closely related to molecular biology, namely in the analytical or preparative chemistry. Unlike many other separation techniques, which are unsuitable for thermally degradable molecules (e.g. gas chromatography, GC), or which are not feasible for on-line coupling (e.g. isoelectric focusing, IEF), liquid chromatography can efficiently separate a very wide range of large molecules like polymers, peptides and proteins as well as small molecules like drug or drug metabolites. Choosing the proper LC method that utilize mass spectrometry (MS) friendly conditions (volatile buffers, stable and low flow rate, polar organic solvents etc.), liquid chromatography system can be easily hyphenated to mass spectrometer. Ionization source, analyzer (or combination of more analyzers in one instrument, the so called tandem mass spectrometry) and ion detector are selected according to the analysis requirements that might range from simple one ion qualitative analysis to substructural qualitative, and quantitative analysis of complex mixtures. To facilitate elucidation of structure or quantitative analysis different software applications and data bases search engines were developed during the last decade.

Key words: analyzer, data base, ionization, liquid chromatography, tandem mass spectrometry

UVOD

Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa do prije dvadesetak godina bile su dvije potpuno odvojene tehnike. Sedamdesetih i osamdesetih godina, međutim, došlo je do povezivanja LC i MS na područjima mehanizama desorpcije, otparavanja i ionizacije analita u tekućoj fazi, ionizacije pri atmosferskom tlaku i povezivanja ionizatora i analizatora, što je predstavljalo ogroman iskorak u rutinskoj upotrebi tzv. vezanog sustava LC-MS¹⁻⁵.

Svrha je ovog rada odgovoriti na važna pitanja o tome što je tekućinska kromatografija i koja je njezina primjena, zatim prikazati osnove tekućinske kromatografije, te prikazati osnove spektrometrije masa, koje se tehnike koriste u spektrometriji masa, a komplementarne su tekućinskoj kromatografiji.

TEKUĆINSKI KROMATOGRAF

Tekućinski kromatograf sustav je u kojem se vrši analiza većinom polarnih analita razdvajanjem ciljanog analita na kromatografskoj koloni i detekcijom istog uz pomoć pogodne tehnike detekcije. Tekućinski kromatograf sastoji se od sustava za dobavu pokretne faze, injekcionog sustava, kućišta za kolonu te detektora.

Sustav za dobavu pokretne faze i crpni sustav sastoje se od spremnika pokretne faze (1-4 kanala), proporcionalnog ventila, odzračivača i sustava dobave helija, crpke (samostojeće, binarne ili kvarterne), regulacionog ventila na ulazu i izlazu iz crpke, sustava za ujednačavanje pulseva, ventila za ispiranje sustava, regulatora tlaka u sustavu, te dinamičke ili statičke miješalice.

Injekcioni sustav služi za unos uzorka, a sastoji se od injekcionog ventila (ručni ili automatski), automatskog uzorkivača (engl. *autosampler*) koji može biti termostatiran (Peltier 4 – 40 °C), zatim od injekcijske igle i graduirane injekcije ili crpke, te kapilare određenog volumena.

Kućište u kojem se nalazi kolona može biti termostatirano (Peltier ili grijač od 10 °C ispod sobne temperature do 80 °C) ili netermostatirano s mogućnošću detekcije propuštanja tekućine. Kolone nose oznake po vrsti nepokretne faze (C18, C8, C4, NH₂, Ph-NH₂, CN, grafitna, SiO₂, gel-propusna itd.). Detektori koji se koriste u tekućinskoj kromatografiji mogu biti UV/VIS – od jedne do četiri valne du-

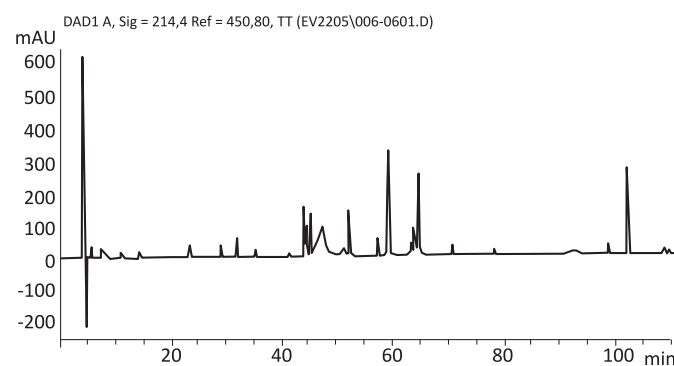
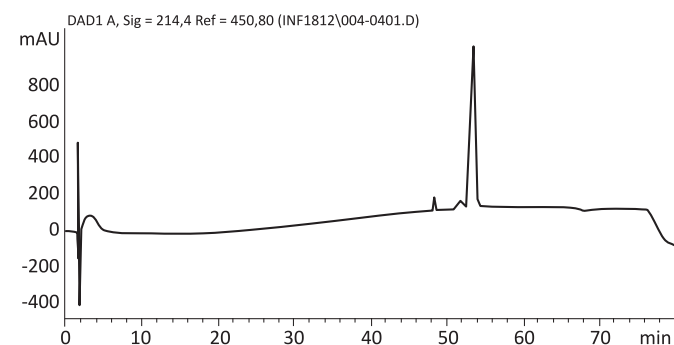
ljine ili multidiiodni (DAD, PDA itd.), fluorescentni, indeksa loma, raspršenja svjetla, elektrokemijski, amperometrijski, spektrometar masa itd.

OSNOVE TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE

Tekućinska kromatografija je analitička tehnika koja se koristi za separaciju otopljenih tvari^{6,7}. Tvari iz otopina u različitoj mjeri stupaju u interakciju s nepokretnom i tekućom pokretnom fazom radi razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi među fazama ili veličini tvari koje se razdvajaju, te imaju različita vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni.

Kromatogrami

Kromatogram je ispis bilo koje funkcije koncentracije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu ili volumenu eluiranja (slika 1a i 1b). Položaj kromatografskog pika na vremenskoj osi može služiti za identifikaciju sastojka, a iz površine ispod pika moguće je izračunati količinu svakog pojedinog sastojka.

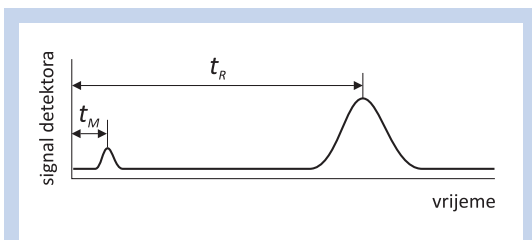


Slika 1. Kromatogrami granulocitnog faktora rasta (a) i triptičkih produkata eritropoetina (b) dobiveni uz pomoć detekcije UV/VIS (DAD)

Figure 1. Chromatograms of granulocyte colony stimulating factor (a) and erythropoietin tryptic peptides (b) obtained by UV/VIS (DAD) detector

Faktor zadržavanja k

Faktor zadržavanja pokazatelj je duljine zadržavanja spoja na koloni u odnosu na pretpostavku da nema interakcije s nepokretnom fazom. Definiran je kao $k = (t_R - t_M)/t_M$, pri čemu je t_R vrijeme zadržavanja analita, a t_M zadržano vrijeme pokretne faze. Odnos spomenutih vremena zadržavanja prikazan je na slici 2.



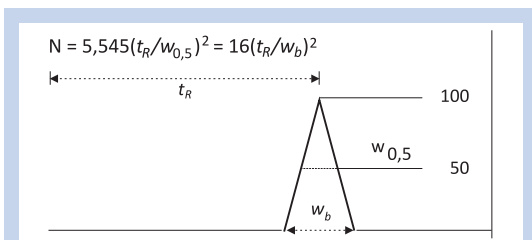
Slika 2. Odnos vremena zadržavanja analita, t_R , i vremena zadržavanja pokretne faze, t_M
Figure 2. Correlation between retention times of analyte, t_R and mobile phase, t_M

Faktor razdvajanja (separacijski faktor)

Separacijski faktor je mjera selektivnosti kromatografskog sustava za dva različita analita, a ovisi o interakciji spoja sa stacionarnom fazom. Moguće ga je definirati izrazom $\alpha_{A/B} = k_2/k_1 = t_{R2}/t_{R1}$, pri čemu je t_{R2} prilagođeno vrijeme zadržavanja analita 2, a t_{R1} prilagođeno vrijeme zadržavanja analita 1.

Broj teorijskih tavana N

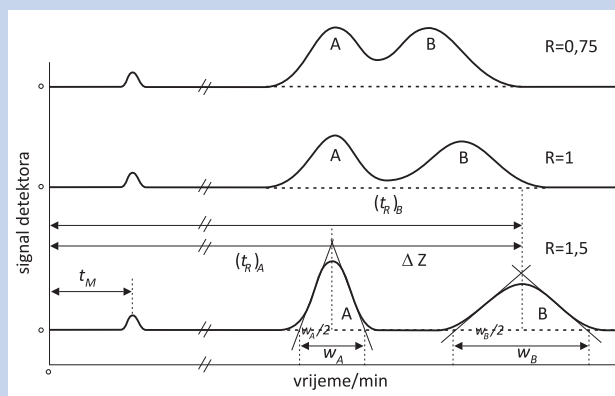
Broj teorijskih tavana predstavlja broj pseudoravnoteža ili faznih prijelaza postignut na određenoj koloni, a zadan je izrazom $N = 16(t_R/w_b)^2$, pri čemu je w_b širina pika u osnovici (slika 3). Djelotvornost kromatografske kolone povećava se povećanjem broja teorijskih tavana.



Slika 3. Način računanja broja teorijskih tavana N
Figure 3. Calculation of the number of theoretical plates N

Razlučivanje

Razlučivanje (slika 4) je mjera za efikasnost odjeljivanja dvaju spojeva, a ovisi o faktoru zadržavanja, faktoru razdvajanja i broju teorijskih tavana. Definirano je izrazima $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1})/(w_{b1} + w_{b2})$ ili $R = 0.25(N)^{1/2} [(\alpha - 1)/\alpha] [(k_2/k_1 + 1)]$.

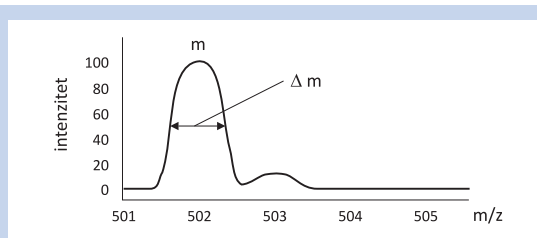


Slika 4. Primjeri različito razlučenih pikova i osnovnih veličina koje se koriste u izračunu N , R , α i k
Figure 4. Examples of badly and well resolved peaks and basic terms used for calculation of N , R , α and k

OSNOVE SPEKTROMETRIJE MASA⁸

Razlučivanje

Razlučivanje je mjera za djelotvornost odvajanja iona približno istih masa, a definira se kao $R = m/\Delta m$, pri čemu je R razlučivanje, m prosječna molekulska masa na vrhu masenog pika, a Δm raspon masa na polovici visine masenog pika. Razlika između m i Δm masenog pika prikazana je na slici 5.



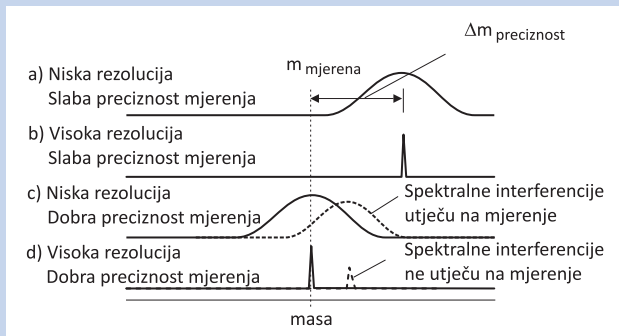
Slika 5. Prikaz m i Δm na primjeru masenog pika
Figure 5. Correlation between m and Δm of mass peak

Točnost mjerenja masa

Sposobnost spektrometra masa da odredi molekulska masu čim bliže točnoj masi (izotopna masa), obično mjerena u ppm-ima, naziva se točno mjerenje masa. U izrazu

$$\text{ppm} = 10^6 \Delta m_{\text{točna}} / m_{\text{mjerena}}$$

$\Delta m_{\text{točna}}$ predstavlja razliku između izračunate i izmjerene molekulske mase. Razlike u točno i netočno izmjerenim masama prikazane su na slici 6.



Slika 6. Primjeri a) i b) netočno izmjerenih masa kod analizatora niskog i visokog razlučivanja i c) i d) točno izmjerenih masa kod analizatora niskog i visokog razlučivanja

Figure 6. Examples of a), b) incorrectly and c), d) correctly measured masses obtained by low and high resolution analyzers

Područje mjerenja masa

Područje mjerenja masa definirano je kao raspon između gornje i donje granice m/z koji se može odrediti spektrometrom masa

$$\Delta m_{\text{područja}} = m_{\text{gornja granica}} - m_{\text{donja granica}}$$

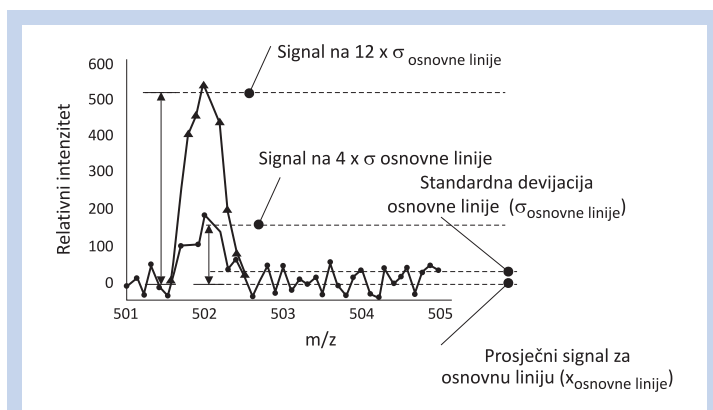
pri čemu je $m_{\text{gornja granica}}$ najveća moguća izmjerena masa, a $m_{\text{donja granica}}$ najmanja moguća izmjerena masa.

Osjetljivost

Mjera odziva detektora koja se dobiva analizom određene količine analita naziva se osjetljivost. Definirana je izrazom $S_{m/z} = A_{\text{masa-struja}} / (G m_{\text{uzorka}})$, gdje je $A_{\text{masa-struja}}$ površina ispod masenog pika mjerena u vremenu i izražena u kulonima, G visina odziva detektora iona, a m_{uzorka} masa analiziranog uzorka u μg .

Granica detekcije

Granica detekcije je najmanja moguća količina uzorka koju je moguće kvalitativno odrediti. Izmjereni napon signala za određeni analit, V_{mjereni} izražava se kao $V_{\text{mjereni}} > V_{\text{osnovne linije}} + 3\sigma_{\text{osnovne linije}}$, pri čemu je $V_{\text{osnovne linije}}$ uprosječni napon u nekom zadanom vremenu, a $\sigma_{\text{osnovne linije}}$ standardna devijacija napona osnovne linije u zadanom vremenu. Odnos odziva detektora i standardne devijacije napona osnovne linije prikazan je na slici 7.

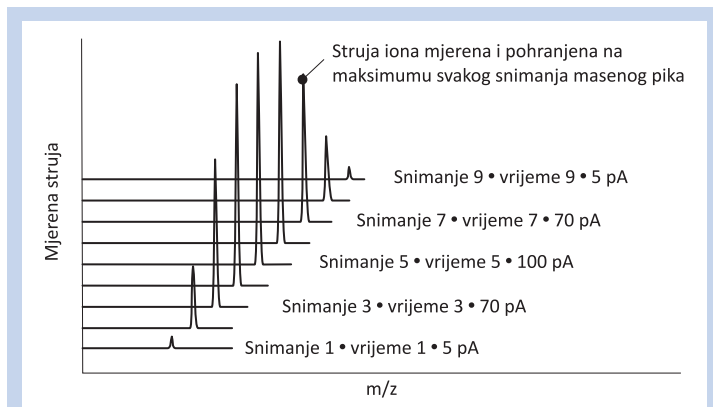


Slika 7. Odnos odziva detektora i standardne devijacije napona osnovne linije

Figure 7. Correlation between detector response and standard deviation of baseline

Brzina snimanja spektara (engl. scan speed)

Za optimalan izgled spektra poželjno je snimiti barem deset točaka unutar jednog masenog vrška. Brzina snimanja je mjera brzine snimanja zadanog raspona masa zadana u masenim jedinicama po sekundi $\Phi_{\text{snimanja}} = (dm/dt)$, gdje je dm zadano područje masa, a dt vrijeme potrebno za snimanje zadanog područja masa. Struja iona je mjerena i pohranjena na maksimumu svakog snimanja masenog vrška (slika 8).



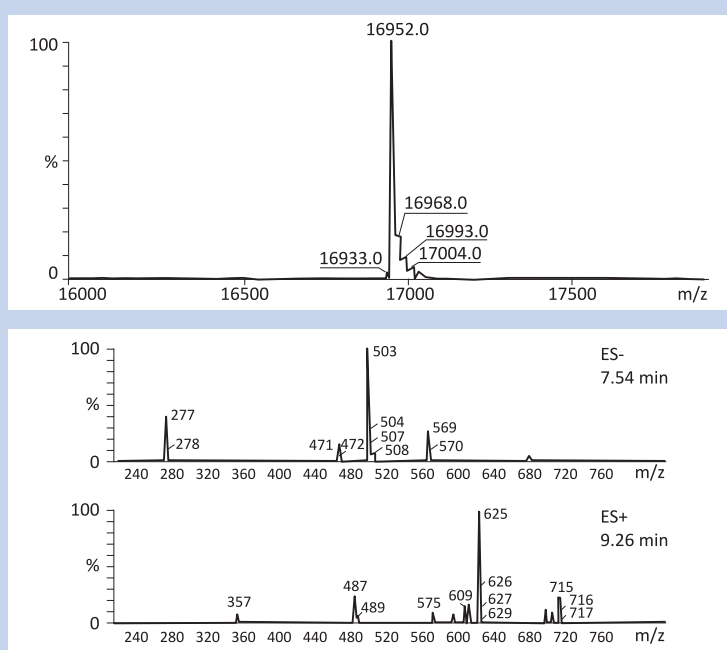
Slika 8. Struja iona mjerena i pohranjena na maksimumu svakog snimanja masenog pika

Figure 8. Ion current measured and stored at the maximum of each scan of mass peak

Kromatogrami i spektri

Ako uspoređujemo načine snimanja spektara masa, razlikujemo dva načina snimanja: kontinuirani i centroidni spektar. Kontinuirani spektar masa (slika 9a) prikazuje stvarnu spektrometrijsku širinu masenog vrška. Taj način snimanja spektara masa

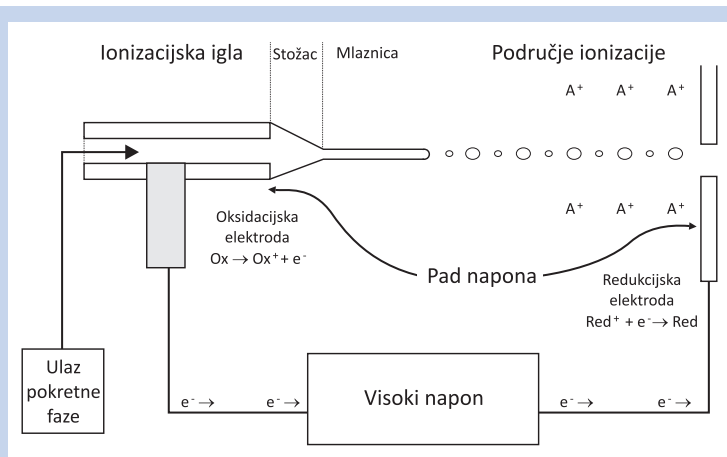
je po količini dobivenih podataka bogatiji, ali znatno više opterećuje memoriju računala. Centroidni spektar masa (slika 9b) prosječne mase masenih vršaka prikazuje kao stupce, bez stvarne širine i pogodan je za rutinske analize.



Slika 9. Kontinuirani (a) i centroidni (b) spektar masa
Figure 9. Continuum (a) and centroid (b) mass spectrum

NAČINI IONIZACIJE U VEZANOM SUSTAVU LC-MS

Tekućinski kromatograf i spektrometar masa povezani su međuspojem (engl. *Interface*) koji ima višestruku ulogu: otparavanje tekućine, ionizacije neutralnih molekula i uvođenje analita u analiza-



Slika 10. Procesi prijenosa naboja u tehnici ESI
Figure 10. Charge transfer processes during the ESI process

tor⁸. Međufazni prijelazi koji se događaju u međuspoju su otparavanje i desorpcija.

ESI (engl. Electrospray Ionization)

ESI je jedan od najzastupljenijih načina ionizacije u vezanom sustavu LC-MS koji je kompatibilan sa svim analizatorima. Radni protok mu je od 5 μ l do 1000 μ l u minuti, a kompatibilan je sa svim analizatorima (optimalan protok ovisi o konstrukciji instrumenta, ali ugrubo možemo reći da iznosi oko 50 μ l). Ionizacija može biti pozitivna i negativna (u ovisnosti o naponu na kapilari i kolektorskoj elektrodi), a ionizacija i nebulizacija se događaju pri atmosferskom tlaku. Optimalna temperatura ionizacije je iznad 100 °C i događa se u struji dušika. Ionizacija (slika 10) se odvija tako da pokretna faza i analit ulaze u ionizator kroz kapilaru (iglu), koja ujedno predstavlja elektrodu pod visokim naponom (2-5 kV). Na vršku igle se formira maglica sastavljena od niza kapljica otapala i nešto uparenog otapala. Kolektorska elektroda privlači tako nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. Kako otapalo otparava pod utjecajem struje dušika, temperature i električnog potencijala (ioni unutar otapala pokušavaju doći na površinu), tako se kapljice smanjuju. Nakon što se dovoljno smanje da se svi mogući ioni nalaze na površini kapljica, sile kulonskog odbijanja postaju veće od sila napetosti površine i kapljice se otparavaju ili se razbiju na manje kapljice. Analit kristalizira ili prelazi u plinsku fazu. Ioni analita u trenutku napuštanja površine nisu u potpunosti bez otapala, oko njih se, naime, stvara sfera uparenog otapala. Nakon otparavanja kapljica, otvor iza kojeg je visoki vakuum i analizator privlači tako formirane kvazimolekulske ione^{8,9}.

Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku APCI (engl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

APCI je vrlo zastupljena tehnika ionizacije, koja je kompatibilna sa svim analizatorima. Radni protok je od 0,5 ml do 2 ml u minuti. Može ionizirati i polarne i nepolarne molekule. Ionizacija se događa pri atmosferskom tlaku i može biti pozitivna i negativna. Optimalna temperatura ionizacije je oko 400 °C i događa se u struji dušika. Kao i kod ESI ionizacije, ionizacija APCI tehnikom događa se pod atmosferskim tlakom u struji dušika. Ionizacija se, za razliku od ESI ionizacije, događa u plinskoj fazi, a uzrokuje ju prijenos naboja među ioni-

ma, gdje je inicijator ionizacije izbijajuća igla (2 – 5 kV) na samom ulazu pokretne faze i analita u ionizator. Kaskadnim prijenosom naboja od N_2^+ , O_2^+ i NO^+ stvara se hidratni proton $H_3O^+(H_2O)_n$ koji kao vrlo reaktivni ion vrši prijenos protona i naboja na molekulu analita. Kod negativne ionizacije izbijajuća igla emitira elektrone koji u sudaru s neutralnim česticama mogu formirati ione O^{2-} ili O^- . Najveći izvor negativnih iona u APCI ionizaciji su superoksidni anion O_2^- i odgovarajući hidrati i klusteri $O_2^- [H_2O]_n$ i $O_2^- [O_2]_n$. Nakon formiranja primarnih iona molekule analita mogu se ionizirati prijenosom naboja ili protona^{8,10,11}.

PB (engl. Particle Beam)

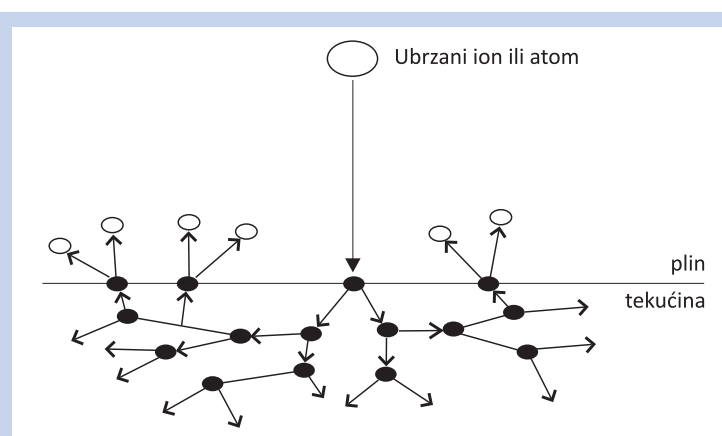
PB je način ionizacije koji uklanja pokretnu fazu prije ionizacije. Ionizator se sastoji od generatora aerosola, desolvacijske komore i momentum separatora.

Generator aerosola raspršuje mobilnu fazu i analit u sitne kapljice, a desolvacijska komora pomaže naglo otparavanje potpomognuto visokom temperaturom. Momentum separator kroz niz sitnih otvora uvodi analit iz atmosferskog tlaka u vakuum analizatora. Načini ionizacije mogu biti EI, CI ili FAB. Ovaj je način izuzetno pogodan za analizu molekula manjih od 1.000 amu. Radni protok mu je od 0,1 ml do 1,5 ml u minuti, a radi samo sa kvadrupolnim i sektorskim analizatorima. Plin nosilac je helij, upravo stoga što taj plin ima veću toplinsku vodljivost. U slučaju PB isti izvor ionizacije, analizator i detektor, mogu se koristiti za analize LC i GC⁸.

CFFAB

(engl. Continuos Flow Fast Atom Bombardment)

CFFAB je tehnika ionizacije koja otapalo s kolone uvodi direktno u područje visokog vakuuma, a radi isključivo sa sektorskim analizatorima koji imaju radni protok od 0,5 ml do 10 ml u minuti. Sredstvo ionizacije su pri tome atomi Xe, Ar ili Cs dodatno usmjereni i akcelerirani (8 keV) prema molekulama analita koji se pak nalazi u matrici (nitrobenzilni alkohol, glicerol ili tioglicerol). Pokretna faza, analit i matrica, na ulazu u ionizator razmazuju se u tanki sloj, pokretna faza otparava, a matrica i analit su izloženi udaru akceleriranih atoma (slika 11). Mehanizam ionizacije je desorpcija, a ionizacija može biti pozitivna i negativna. Ova je ionizacija poznata kao LSIMS (engl. *Liquid Secondary Ionization Mass Spectrometry*)⁹.



Slika 11. Udar akceleriranog atoma ili iona u molekule eluenta i trenutna površinska ionizacija istih

Figure 11. Fast atom or ion bombardment of effluent molecules and their current surface ionization

ANALIZATORI MASA U VEZANOM SUSTAVU LC-MS

Analizator je dio spektrometra masa koji razdvaja ione različitog omjera mase i naboja. Različiti analizatori zahtijevaju različite ionizacijske izvore i različite detektore iona (tablica 1).

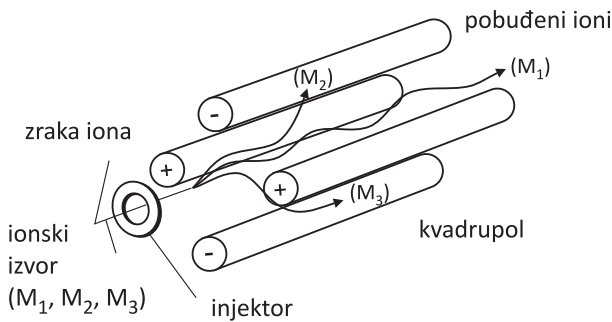
Tablica 1. Podjela analizatora masa po vrstama, ionskom izvoru i načinu razdvajanja iona

Table 1. Classification of mass analyzers according to type, ion source and ion separation

Analizator masa	Ionski izvor	Način razdvajanja iona
Kvadrupol	Kontinuirani	Električno polje i propusni filtar
Stupica iona	Pulsni	Napon i rf polje
Vremena leta	Pulsni	Vrijeme leta
Sektor	Kontinuirani	Magnetsko polje
Fourier Transform	Pulsni	Frekvencija

Kvadrupol

Kvadrupol (slika 12) je jedan od najzastupljenijih analizatora, a sastoji se od četiri elektrode koje su dijagonalno električki povezane; jedan par pri tome ima pozitivni, a drugi negativni polaritet. Dodatno su ti parovi još spojeni s radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje koji je za 180 stupnjeva izvan faze. Ioni koji ulaze u analizator imaju različite vrijednosti m/z i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju, a mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule.



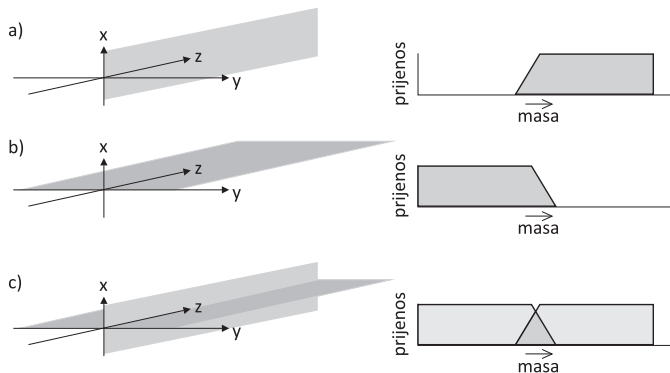
Slika 12. Presjek kvadrupola

Figure 12. Quadrupol

Kvadrupolni analizator može maksimalno razdvojiti ione čija razlika u masi nije veća od 0,5 amu. Ako se kvadrupol koristi kao jedini analizator, gornja granica područja mjerenja masa je oko 4000 amu.

XZ-filtar lakših iona

Kako bi bilo jasnije kako kvadrupol radi, potrebno je obratiti pažnju na pozitivni par elektroda i pretpostaviti kako se u analizatoru nalazi pozitivni ion. U odsutnosti istosmjernog potencijala ioni teže k sredini procjepa između elektroda za vrijeme pozitivne polovice izmjeničnog ciklusa i k elektrodama za vrijeme negativnog izmjeničnog ciklusa. Ako za vrijeme negativnog izmjeničnog ciklusa ion udari u elektrodu, bit će neutraliziran (slika 13).



Slika 13. Gibanje iona u kvadrupolu pod utjecajem rf polja, te xz i yz filtar iona

Figure 13. Ion trajectories in quadrupol rf field, and xz and yz ion filter

S obzirom na to da gibanja iona jednakih E_k ovise proporcionalno drugom korijenu njihovih masa, ako je ion dovoljno težak, frekvencija izmjeničnog potencijala može biti velika, a ion neće značajnije osjetiti izmjenični potencijal i bit će pod utjecajem

istosmjernog potencijala. Ako je ion lakši, a izmjenični potencijal premalen, ion će se sudariti s elektrodom za vrijeme negativnog izmjeničnog ciklusa. Negativni par elektroda bez izmjeničnog potencijala privući će sve pozitivne ione i neutralizirati ih. Za lakše ione taj učinak može se izbjeći povoljnom primjenom izmjeničnog potencijala koji može utjecati na njihovu putanju.

YZ-filtar težih iona

Negativni par elektroda je pod stalnim naponom negativnog istosmjernog potencijala. U odsutnosti izmjeničnog potencijala svi pozitivni ioni bit će privučeni negativnim elektrodama. Ako je ion dovoljno lagan, na njega će djelovati izmjenični potencijal koji će ga držati u stabilnoj putanji podalje od elektroda^{8,9,12}.

Fourier-transformirana spektrometrija masa – FTMS (engl. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry – FT ICR MS)

Osnovna načela ionsko-ciklotronske rezonancije

Ovom metodom može se odrediti omjer m/q (mase i naboja) pomoću eksperimentalno mjerljive orbitalno ciklotronske frekvencije iona ω_c . Princip pobude i detekcije koji se danas većinom primjenjuje kod svih instrumenata FT ICR poznat je već dugi niz godina i datira iz 1970. godine. Osnova metoda rada kod ove metoda je pobuda iona do ICR orbitalnog promjera koji je samo nekoliko milimetara manji od detekcijskih elektroda čiji je zadatak detekcija izmjeničnog napona inducirano koherentnim gibanjem iona nakon isključenja pobude. To u osnovi konstrukcije instrumenata FT ICR znači da FTMS ćelija služi kao ionski izvor, analizator masa i detektor. U ICR ćeliji na ion mase m i naboja q koji se giba brzinom v u uniformnom magnetskom ($B = B_0 j$) i električnom (E) polju djeluje Lorentzova sila

$$m \frac{d^2 r}{dt^2} = m \frac{dv}{dt} = qE + qv \times B \quad (1)$$

gdje je r vektor položaja iona u vremenu t , prema konvenciji se smjer konstantnog magnetskog polja B_0 podudara s osi z koordinatnog sustava. U odsutnosti električnog polja ($E = 0$) sila je neovisna o položaju iona. Ion koji se giba u ravnini okomitoj na smjer magnetskog polja bit će zakrenut u kružnu putanju magnetskom silom koja je oko-

mita na smjer magnetskog polja i na vektor brzine, dok će gibanje duž osi z ostati neograničeno, budući da u tom smjeru ne djeluje nikakva sila. Tako za ion frekvencije v_c jednadžba (1) prelazi u jednadžbu koja opisuje kutnu orbitalno ciklotronsku frekvenciju iona,

$$\omega_c = 2\pi v_c = \frac{v}{r} = \frac{qB_0}{m} \quad (2).$$

Iz ove druge jednadžbe može se zaključiti da određene m/q vrijednosti ne ovise o početnoj brzini iona. Budući da statično magnetsko polje pretvara m/q u frekvenciju, a kako ICR frekvencije jednostruko nabijenih iona od 10 u do 10.000 u u magnetskom polju jakosti 3T (veća jakost polja pridonosi boljoj rezoluciji spektara) pokrivaju radiofrekventno područje od 5 MHz do 5 kHz, unutar kojeg je moguće odrediti frekvenciju s velikom točnošću, ICR daje mogućnost izuzetno točnog mjerenja mase (≤ 1 ppb u idealnim uvjetima) pri visokom razlučivanju (10^6 za $m/q \approx 900$). Osim odnosa $\omega_c = m/q$, može se izračunati iznos orbitalnog polumjera

$$r = \frac{mv_{xy}}{qB_0} \quad (3a)$$

ili

$$kT = \frac{m\langle v_{xy}^2 \rangle}{2} \Rightarrow r = \frac{1}{qB_0} \sqrt{2mkT} \quad (3b)$$

za ion kojem je prosječna x-y translacijska energija u ravnoteži s okolinom na temperaturi T . Ova jednadžba ima posebnu primjenu u računanju energija vezanja nekovalentnih kompleksa kod proteina, gdje se iz ove jednadžbe primjenom elektromagnetskog polja koje uzrokuje disocijaciju nekovalentnog kompleksa može izračunati ukupna energija vezanja u nekovalentnom kompleksu. Brzina i translacijska energija iona pobuđenog na veći orbitalni polumjer ICR dane su izrazima:

$$v_{xy} = \frac{qB_0 r}{m} \quad (4a)$$

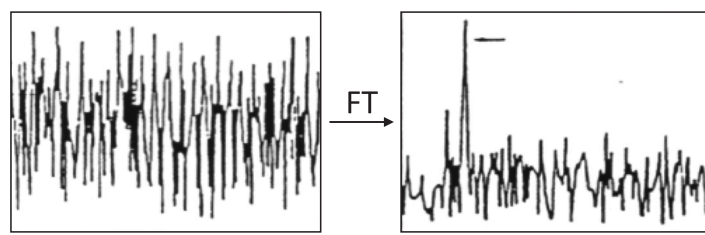
$$E_k = \frac{mv_{xy}^2}{2} = \frac{q^2 B_0^2 r^2}{2m} \quad (4b)$$

Tako jednostavnim računom možemo dobiti ICR polumjer jednostruko nabijenog iona na sobnoj temperaturi $m = 100$ u u magnetskom polju indukcije 3T od $\approx 0,08$ mm, a nakon pobude na

$r = 1$ cm imat će brzinu od $2,89 \cdot 10^4$ ms⁻¹, odnosno translacijsku energiju od ≈ 434 eV. Orbitalno gibanje ICR samo po sebi ne može proizvesti mjerljivi električni signal zato što kružne putanje iona nisu u fazi, pa se na elektrodama poništavaju. Ovaj problem riješen je pomicanjem "paketa" iona s osi z u prostorno koherentne putanje. Prostorna koherentnost postiže se primjenom oscilirajućeg (rezonantnog fazno-koherentnog električnog polja $\omega = \omega_0$), stoga kao krajnji rezultat dobivamo gibanje iona u Arhimedovoj spirali. Za ione koji rotiraju u putanjama ICR ubrzavanjem dolazi do linearnog porasta radijusa putanja, te ion apsorbira energiju u vremenu dt . Za dobivanje jasnijeg prikaza apsorpcije energije iona u magnetskom polju jakosti 3T pri djelovanju konstantnog rf polja amplitude 1 V cm⁻¹ kroz 1 ms, njegov konačni polumjer ICR iznositi će 1,67 cm (5). Kako orbitalni polumjer pobuđenog iona ne ovisi o m/q vrijednosti, svi ioni u određenom području m/q mogu se pobuditi na isti polumjer ICR primjenom konstantnog rf polja kroz jednako dugo vrijeme (T_{exc}). Konačni polumjer ICR iona podvrgnutog nerezonantnoj pobudi ($\omega \neq \omega_0$) neće se povećavati, već će prisilno titrati.

Fourierova transformacija

Fourierova transformacija pretvara složeni oblik signala u valnoj formi (t -domena) u frekvencijski oblik (v -domena) koji je razumljiviji korisniku instrumenta (slika 14).



Slika 14. Spektar (v -domena) dobiven Fourierovom transformacijom signala t -domene sadrži niskofrekventni sinusoidni val skriven u šumu

Figure 14. Spectrum (v -domain) obtained by Fourier transform of t -domain signal consists of low-frequency sinusoidal wave hidden in noise

Izvršimo li nad funkcijom $f()$ neku eksplicitnu operaciju T , dobit ćemo funkciju $T\{f()\} \equiv F()$, stoga kažemo kako je $F()$ transformacija funkcije $f()$, a kontinuirana Fourierova transformacija je integralni operator s eksponencijalnom jezgrom:

$$F(s) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) \exp(-i2\pi sx) dx \quad (5)$$

gdje je s transformirana varijabla. Zamijenimo li kompleksnu funkciju $f(x)$ nekom koja ovisi o kontinuiranoj realnoj varijabli x , s n funkcijskih vrijednosti (općenito kompleksnih, ali najčešće realnih) indeksiranih cijelim brojevima (τ) od 0 do $n-1$, dobit ćemo tzv. diskretnu FT.

$$F(v) = \frac{1}{n} \sum_{\tau=0}^{n-1} f(\tau) \exp(-i2\pi v\tau/n) \quad (6)$$

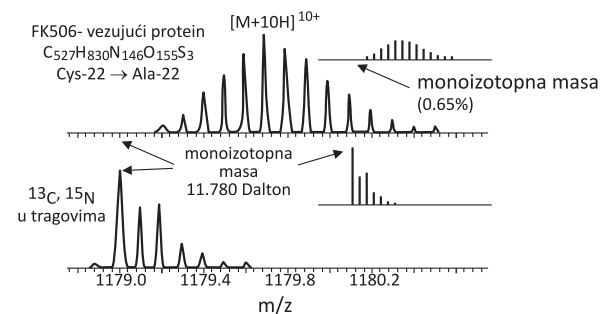
Eksperimentalni podaci su diskretne vrijednosti, pa je i FT diskretan. Osnovna prednost spektrometrije FT u odnosu na ostale spektrometrije je istovremena detekcija cijelog spektra. Također je moguće primijeniti uklanjanje šuma i filtriranje spektra, te povećati rezoluciju smanjenjem širine signala ili uzimanjem u izračun većeg broja točaka po signalu. Loša strana ove spektrometrije je činjenica da je Fourierova analiza prikladna samo za linearne sustave (odziv mora biti linearan po budi na svakoj frekvenciji), pa svaka nelinearnost povećava mogućnost pojave artefakata u spektru.

Pobuda SWIFT i višestruka spektrometrija masa MSⁿ

U idealnom slučaju beskonačnih pobudnih elektroda, amplituda signala ICR linearno je razmjerna amplitudi pobudne funkcije. Od 1980. nadalje poznata je nova klasa pobudnih funkcija poznata kao SWIFT (engl. *Stored Wave Inverse Fourier Transform*). Pobuda SWIFT definira se specificiranjem optimalnog diskretnog spektra u v -domeni koji se diskretnom IFT pretvara u pobudnu funkciju t -domene. Pohranjeni podaci t -domene prolaskom kroz digitalno/analogni-D/A pretvarač daju analognu valnu funkciju koja se potom koristi kao pobuda. FTMS uz primijenjeni SWIFT gotovo je idealna metoda za višestruki MS (MSⁿ). Nakon izdvajanja određenog prekursor-iona (M^+) i izbacivanja svih ostalih iona iz ćelije, M^+ se pobuđuje na veći ICR orbitalni polumjer, odnosno veću translacijsku energiju. Potom se u ćeliju dovodi inertni plin koji u sudaru sa M^+ proizvodi produkt ione koji se ponovno mogu selektirati i pobuditi na ICR putanje, te ponovno fragmentirati.

Praktična primjena spektrometrije masa Fourier-transform u analizi proteina

S obzirom na to da se kod sustava FTMS najčešće upotrebljava tehnika elektroraspršenja za ionizaciju analita, kod proteinskih analiza mora se obratiti pozornost na nekoliko specifičnosti vezanih uz ovakvu vrstu analiza. Tipičan proteinski spektar masa dobiven elektroraspršenjem izgleda kao niz pravilno poredanih vrškova koji simetrično rastu do nekog maksimuma i tada ponovno padaju. Razlog takvog izgleda spektra prvenstveno leži u tome što se protein tijekom ionizacije višestruko ionizira (prima više od jednog protona), ugrubo jedan proton po kDa. Konačni proteinski spektar masa u sebi sadrži cijeli niz višestruko nabijenih iona proteina od kojih pak svaki ponovno sadrži simetrično poredani niz vrškova koji rastu do maksimuma i ponovno padaju (slika 15).



Slika 15. Spektar masa FT ICR dobiven elektroraspršenjem (9,4 T) mutanta veznog proteina (C22A) FK506. Gornji dio slike prikazuje spektar masa prirodno zastupljene izotopske distribucije (~99,63% ¹²C; ~98,89 ¹⁴N). Donji dio slike prikazuje spektar masa istog proteina koji je biotehnoški proizveden uz upotrebu hranjive podloge koja je sadržavala 99,95% ¹²C i 99,99% ¹⁴N.

Figure 15. FT ICR MS spectrum obtained by electrospray (9.4 T) of mutant binding protein (C22A) FK506. Upper part shows mass spectrum of normal isotopic distribution (~99.63% ¹²C; ~98.89 ¹⁴N). In lower part mass spectrum of protein produced biotechnologically by using medium containing 99.95% ¹²C and 99.99% ¹⁴N is shown.

U ovom slučaju radi se o razlici u izotopskoj zastupljenosti pojedinog višestruko nabijenog iona. Ako je rezolucija dovoljno velika, tada će svaki izotopski vršak biti razlučen bolje od 1 u, te će vrijediti pravilo $m/q = 1/q$. Dakle, naboj višestruko nabijenog iona, odnosno broj vezanih protona na molekulu proteina možemo izračunati kao recipročnu vrijednost razlike susjednih vrškova u spektru masa višestruko nabijenog iona. Ovo

svojstvo vrijedi jedino kod analiza FTMS, jer jedino FTMS spektri masa imaju dovoljno veliku rezoluciju.

Drugi problem koji nastaje u ovakvim spektrima masa izrazito visokog razlučivanja jest da, iako omjer m/q izmjerimo s pogreškom manjom od 1 ppm, i dalje pogreška u izračunu može biti veća od 1 Da (valja imati na umu da nisu svi ugljici ^{12}C , svi dušici ^{14}N , svi kisici ^{16}O , svi sumpori ^{32}S itd.). Ipak, čim je rezolucija i preciznost mjerenja mase veća, time je i opis nekog proteinskog sustava realniji, odnosno prirodniji, za razliku od, primjerice, spektara masa dobivenih ostalim tehnikama MS, koje kod ovako velikih masa daju prikaz samo jednog višestruko nabijenog iona prosječne mase. Ako uspijemo izmjeriti masu proteina s pogreškom manjom od 1 Da, možemo također uočiti sve moguće translacijske modifikacije kod proteina ili sve degradacijske promjene koje mogu nastati čuvanjem ili izolacijom proteina (-S-S- veza je za 2 Da manja od 2 -SH, deamidacija -NH₂ je za 1 Da manje mase od -OH itd.).

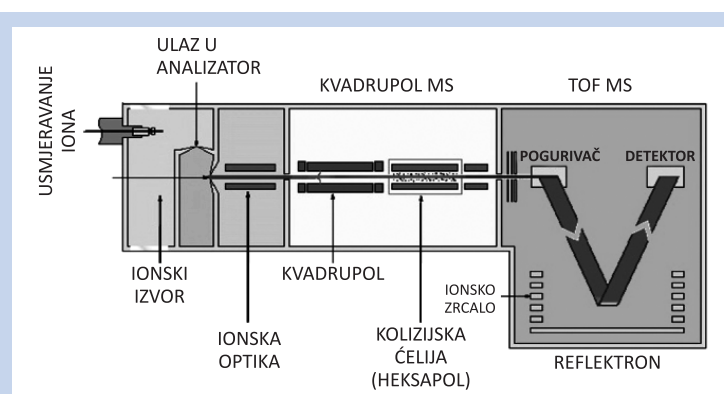
Analizator vremena leta TOF (engl. Time of flight)

Princip rada analizatora vremena leta temelji se na pravilu da brzina iona ovisi o masi iona. Svi ioni koji ulaze u analizator imaju različitu brzinu koja ovisi o njihovoj masi; manji ioni veću brzinu, a veći ioni manju brzinu. Separacija iona vrši se u odnosu na brzinu iona koji dolaze na detektor u različitim vremenima. Ioni mogu ući aksijalno ili ortogonalno u analizator, engl. *pusher*, on ih sakuplja u određenom vremenu, te zatim istovremeno otpušta, a u trenutku otpuštanja uključuje se mjerenje vremena leta do detektora. Vrijeme leta iona od *pushera* do detektora je između 5-100 μs .

Analizatori TOF (slika 16) mogu imati ugrađeno ionsko ogledalo (engl. *reflectron*, *ion mirror*), koje omogućava da ioni istih masa, a različitih E_k , dođu do istovremeno detektora. Analizatori TOF često se hibridiziraju s kvadrupolnim analizatorima, što im daje mogućnost analiza MS/MS¹³.

Jednadžbe kojima se može opisati način mjerenja mase u TOF-u:

$$\frac{mv^2}{2} = qV \quad q = ze \quad t = \frac{d}{v} \quad \frac{m}{z} = t^2 \frac{(2Ve)}{d^2}$$



Slika 16. Presjek hibridnog analizatora MS/MS⁸

Figure 16. Hybrid MS/MS⁸ analyzer

pri čemu je m masa iona, v brzina iona, V_e napon, q naboj iona, z ionski broj, e elementarni naboj, d duljina cijevi i t vrijeme leta. Ako pretpostavimo da su napon i duljina cijevi konstantni, m/z ovisi jedino o vremenu leta iona. Da bi se moglo izmjeriti vrijeme leta iona, mora se na samom početku analizatora primijeniti pulсно električno polje koje ima ulogu sakupljanja i guranja iona u analizator u kratkim pulsevima. Rezolucija TOF instrumenata ne prelazi 20.000, na što najveći utjecaj imaju vrijeme formiranja iona, prostorna raspodjela i raspodjela po E_k ^{8,13}.

Sektor

Postoje dvije vrste sektorskih analizatora, jedan s magnetnim (B) i drugi s električnim (E) poljem, a moguća je i njihova kombinacija. Za magnetno polje vrijedi jednadžba

$$mv = zeBr_m$$

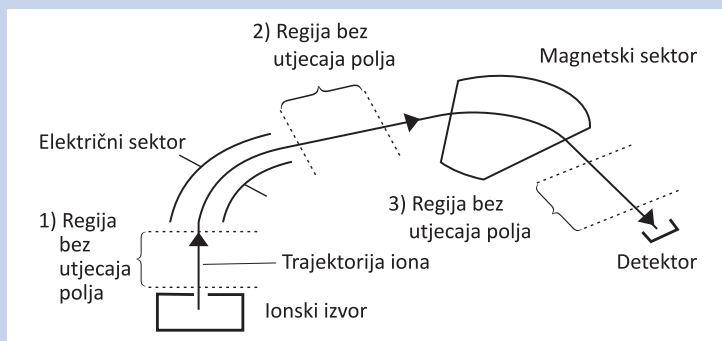
u kojoj je m masa iona, v brzina iona, ze naboj iona, q naboj iona, a r_m radijus analizatora. Za električno polje vrijedi jednadžba

$$\frac{mv^2}{r_e} = \frac{zeV_e}{d}$$

pri čemu je m masa iona, V_e potencijal primijenjen na zakrivljenim pločama, ze naboj iona, d udaljenost između ploča i r_e radijus puta ulaska iona u električno polje.

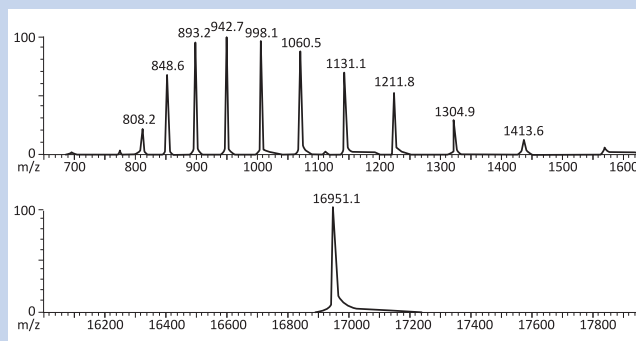
Kod dvostruko fokusirajućih sektora (slika 17) primjenjuje se i električno i magnetno polje, a ovisno o izvedbi moguće su rezolucije od 10.000 do 100.000 i gornja granica masa od 100.000 amu¹².

$$16951.4 \text{ amu} = 11(1542.04 \text{ amu} - 1)$$



Slika 17. Presjek dvostruko fokusirajućeg sektorskog analizatora

Figure 17. Double focusing sector analyzer



Slika 18. Maseni spektar mioglobina izoliranog iz konjskog srca

Figure 18. Mass spectrum of horse heart myoglobin

PRIMJENA

ODREĐIVANJE MOLEKULSKE MASE PROTEINA

Postoji izravan pristup koji uključuje upotrebu instrumenata MALDI-TOF ili LC-FAB-MS (kao rezultat analize masa dobivaju se jednostruko, dvostruko ili trostruko nabijeni ioni) i neizravan pristup koji uključuje upotrebu instrumenata ESI-MS (kao rezultat analize masa dobivaju se višestruko nabijeni ioni).

Izračun masa i naboja korištenjem spektra masa^{8,9}

Izračun točne molekulske mase analita pomoću višestruko nabijenih iona definiran je izrazom:

$$M = n(m_n - m_H)$$

pri čemu je M molekulska masa, m_H masa protona (1.00782 amu), n naboj višestruko nabijenog iona i m_n izmjerena masa višestruko nabijenog iona.

Naboj pojedinog iona određen je jednadžbom:

$$i = \frac{m_{i+1} - m_H}{m_i - m_{i+1}}$$

pri čemu je i naboj pojedinog iona, m_{i+1} izmjerena masa iona naboja većeg za 1 i m_i izmjerena masa iona kojem želimo odrediti naboj.

Na primjeru mioglobina izoliranog iz konjskog srca (slika 18) prikazan je primjer izračuna točne molekulske mase:

$$16951.4 \text{ amu} = 11(1542.04 \text{ amu} - 1)$$

Primjer izračuna naboja pojedinog iona (s jedanaest protona) mioglobina izoliranog iz konjskog srca:

$$10.99 = \frac{1413.59 \text{ amu} - 1 \text{ amu}}{1542.04 \text{ amu} - 1413.59 \text{ amu}}$$

Izmjerene vrijednost m/z , kao i izračunate vrijednosti naboja pojedinog iona te točne molekulske mase mioglobina navedene su u tablici 2.

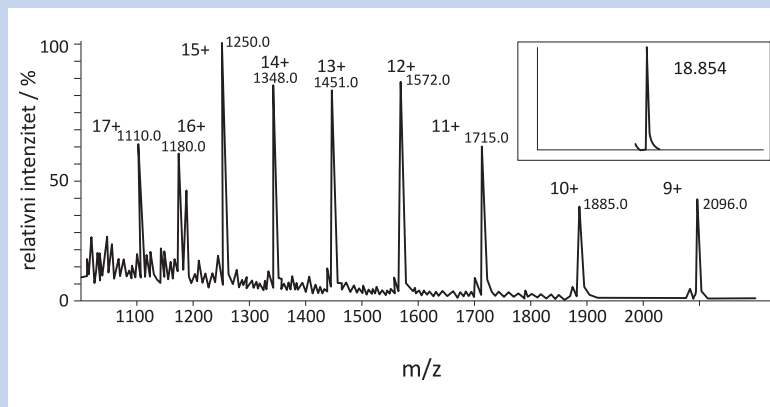
Tablica 2. Određivanje broja naboja i molekulske mase mioglobina

Table 2. Determination of myoglobin charge state and its molecular weight

Omjer mase i naboja m/z	Broj naboja n	Molekulska masa RMM
1524,04	11	16951,40
1413,59	12	16950,95
1304,93	13	16950,94
1211,80	14	16951,11
1131,12	15	16951,62
1060,46	16	16951,26
998,11	17	16950,67
942,75	18	16951,30
893,15	19	16951,71
848,47	20	16951,25
808,21	21	16951,14
771,49	22	16950,72
Srednja vrijednost		16951,09
St. dev.		±0,30

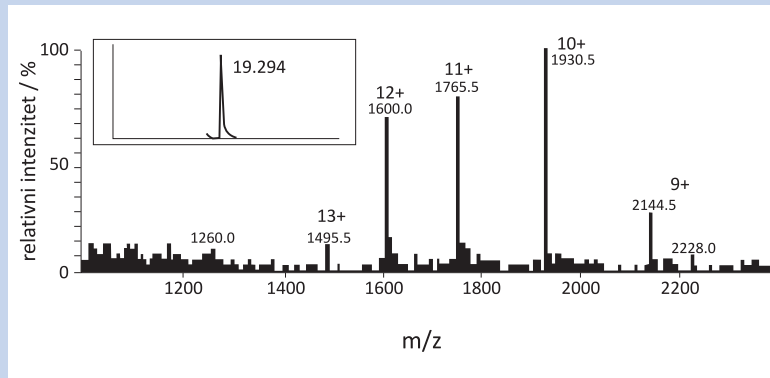
Određivanje molekulske mase proteina tehnikom LC-ESI-MS

LC-ESI-MS je često upotrebljavana tehnika u istraživanju nekovalentnih kompleksa. Dobivene spektre masa kompleksa potrebno je usporediti sa spektrom masa samog proteina (slika 19). Zbog svoje blage ionizacije ESI je prikladan za proučavanje nekovalentnih veza protein-ligand (slika 20), protein-ligand-inhibitor (slika 21) ili protein-protein interakcija (slika 22)¹⁴.



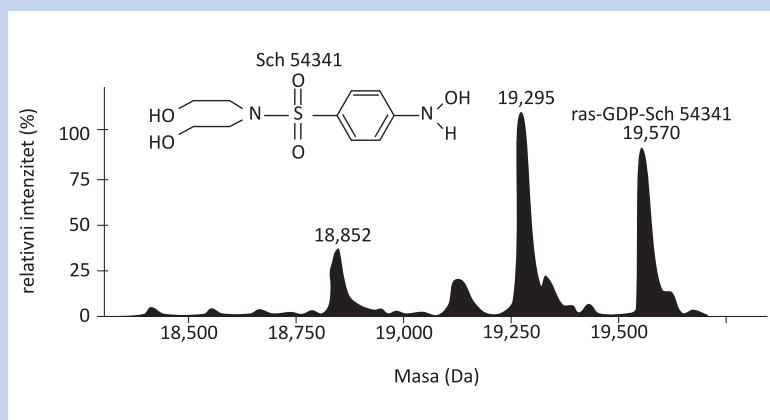
Slika 19. Spektar masa proteina apo-ras i dekonvoluirani spektar masa

Figure 19. Mass spectrum of apo-ras protein and deconvoluted mass spectrum



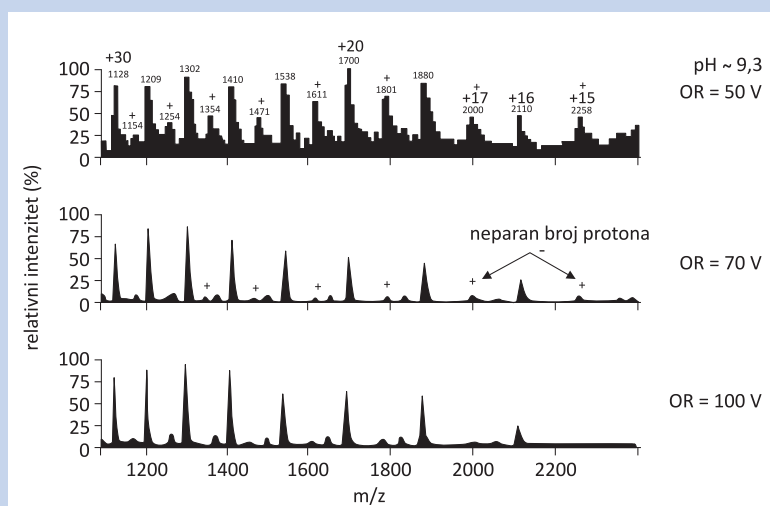
Slika 20. Spektar masa ras-GDP i dekonvoluirani spektar masa

Figure 20. Mass spectrum of ras-GDP and deconvoluted mass spectrum



Slika 21. Dekonvoluirani spektar masa ras-GDP-SCH54341

Figure 21. Deconvoluted mass spectrum of ras-GDP-SCH54341

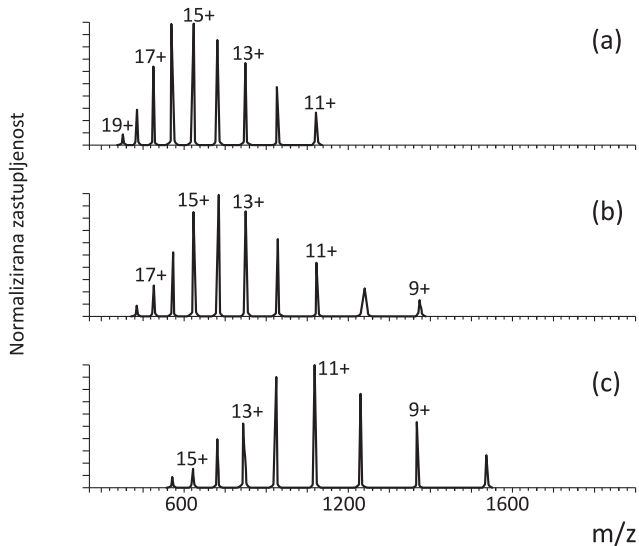


Slika 22. Dekonvoluirani spektar masa γ -IFN dimera s tri primijenjena napona od 50 V, 70 V i 100 V

Figure 22. Deconvoluted MS spectrum of γ -IFN dimer obtained with voltage of 50 V, 70 V and 100 V

Utjecaj otapala na raspodjelu višestruko nabijenih iona u ESI spektru masa

Često se postavlja pitanje kako utjecati na raspodjelu višestruko nabijenih iona proteina ako je gornja granica određivanja m/z niska (npr. 2.000 amu). Naime, najveći utjecaj na raspodjelu višestruko nabijenih iona proteina ima izbor otapala, odnosno njegova fizikalno kemijska svojstva (pH, točka vrelišta, polarnost itd.). Ako se udio vode kao otapala smanji, a poveća udio metanola, ace-



Slika 23. ESI spektar masa citokroma c (10^{-5} mol/dm³ 47%/50%/3%-voda/otapalo/octena kiselina s dodatkom (a) 0,01%, (b) 0,03%, (c) 0,2% dietilamina kojem je GB = 920 kJ/mol

Figure 23. ESI MS spectrum of cytochrome c (10^{-5} mol/dm³ 47%/50%/3%-water/diluent/acetic acid with addition of (a) 0.01%, (b) 0.03%, (c) 0.2% diethylamine; GB = 920 kJ/mol

tonitrila ili izopropanola, raspodjela višestruko nabijenih iona se pomiče k manje protoniranim ionima. Ako se u otopinu proteina doda dietilamin (<0.4%), također se raspodjela višestruko nabijenih iona pomiče k manje protoniranim ionima, uslijed prijenosa protona s višestruko nabijenih iona na dietilamin, ali je taj učinak puno izraženiji nego kod promjene otapala (slika 23). Instrumentalno se na raspodjelu višestruko nabijenih iona može utjecati smanjenjem ili povećanjem broja sudara unutar ionizatora. Denaturirani proteini imaju pomak raspodjela višestruko nabijenih iona k više protoniranim ionima, za razliku od onih gdje je tercijska struktura uvelike očuvana. Proton akceptori u proteinu su Arg, Lys, His i N-terminus.

Maksimalan broj protona u ionu proteina može se odrediti izračunom ukupne bazičnosti svih bazičnih mjesta u proteinu u plinovitom stanju¹⁵:

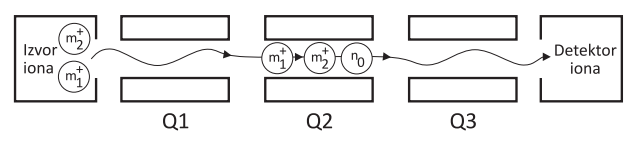
$$GB^{app} \approx GB_{unutarnja} - \sum_{i=1}^n \frac{q^2}{(4\pi\epsilon_0)\epsilon_r r_{i,t}}$$

gdje je $GB_{unutarnja}$ bazičnost plina u ESI-ju (otapalo i plin nosilac), q naboj iona, ϵ_0 permitivnost vakuumu, ϵ_r efektivna dielektrična polarizabilnost, a $r_{i,t}$ = udaljenost bazičnog mjesta u ionu od i -tog susjednog naboja.

Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS)

LC-MS/MS predstavlja dodatnu mogućnost analize iona u vremenu ili prostoru, s ciljem da se unaprijed separacija ili izazove dodatna fragmentacija s pomoću koje možemo kvalitetnije odrediti strukturu analiziranog iona.

Spektrometre masa s analizatorom MS/MS možemo podijeliti u tri skupine: spektrometri masa s jednim analizatorom, kod kojih je teorijski moguća analiza do MS^n (FTMS ili stupica iona), spektrometri masa s više analizatora (trostruki kvadrupol, skraćeniqa QQQ, engl. *triple quadrupol*, slika 24), analiza moguća do MS^2 , spektrometri masa s više analizatora (trostruki kvadrupol, skraćeniqa QQQ, engl. *triple quadrupol*), mogućnost analiza do MS^2 , te spektrometri masa s dva analizatora, između kojih se nalazi kolizijska ćelija (tzv. hibridni spektrometri masa npr. Q-TOF), kod kojih je moguća analiza do MS^{28} .

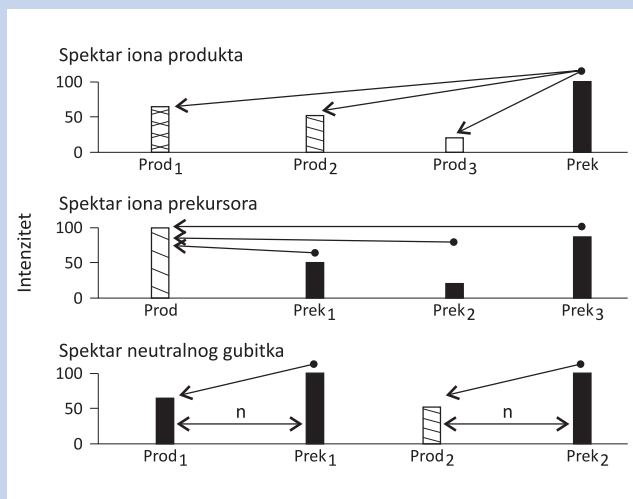


Slika 24. Shematski prikaz trostrukog kvadrupola

Figure 24. Triple quadrupole

Hibridni spektrometar masa

U slijedu produkcije iona (engl. *product ion mode*) po redoslijedu nastajanja razlikujemo ion prekursor (engl. *precursor ion*) iz kojega mogu nastati ioni produkti (engl. *product ion*) ili neutralne molekule zvane neutralnim gubitkom (engl. *neutral loss*). Njihovi međusobni odnosi shematski su prikazani na slici 25. U prvom koraku analize (MS)¹



Slika 25. Odnosi između iona produkata, iona prekursora i neutralnog gubitka

Figure 25. Correlation between product ion, precursor ion and neutral loss

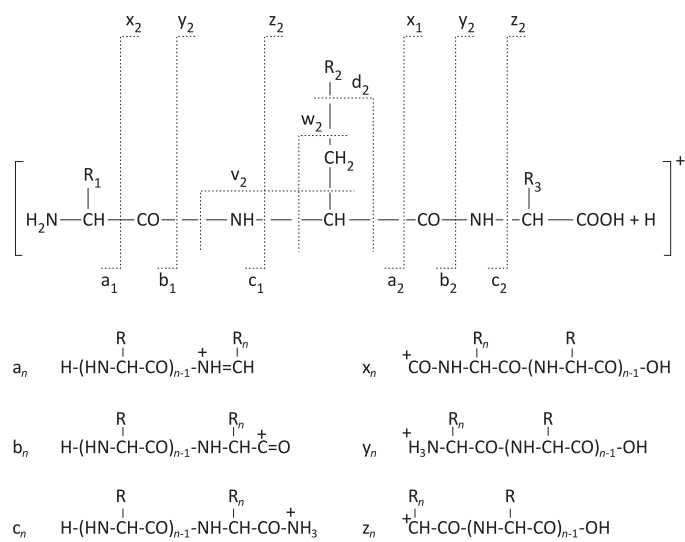
ioni određene molekulske mase (ioni prekursori) izoliraju se i uvode u kolizijsku ćeliju u kojoj se fragmentacija postiže sudarom s atomima argona. Nakon sudara s molekulama plina nastaju fragmenti iona prekursora odnosno ioni produkti koji se analiziraju u drugom analizatoru (MS)², te na kraju detektiraju.

Spektralne baze podataka proteina i peptida

Spektralne baze podataka služe kao sredstvo identifikacije određenog proteina s danom vjerojatnošću da je identificirani protein onaj pravi. ESI-MS/MS baza podataka u kojoj su triptički produkti identificirani (njihova masa i mase fragmenata su određene) može uvelike olakšati identifikaciju nepoznatog proteina. Proteini se mogu razdvojiti iz smjese uz pomoć 1-D ili 2-D gela (gel-elektroforeza) te se odsoliti, pa pocijepati tripsinom, odnosno, ako je dovoljno čist može se odmah pocijepati tripsinom, a produkti se mogu razdvojiti uz pomoć kromatografije obrnutih faza. Na ovaj način mogu se neposredno određivati i sastavi smjesa proteina. Za cijepanje aminokiselinske sekvence proteina najčešće se koristi tripsin koji cijepa proteinski lanac na mjestima gdje se nalaze lizin i arginin. Baza podataka sadrži sve moguće teorijski nastale peptide triptičkim cijepanjem ili molekulske ione peptida gdje su proteinski standardi visoke čistoće pocijepani tripsinom i potom analizirani¹⁶.

Određivanje aminokiselinskog slijeda peptida

Određivanje aminokiselinskog slijeda moguće je kod peptida čija masa ne prelazi 2.500 amu, a u tu se svrhu također koristi MS/MS način analize¹⁷. Baza podataka i algoritam za analizu iona označava slovom b ione prepoznate gledano s N-terminusa i slovom y gledano s C-terminusa (slika 26¹⁸).



Slika 26. Fragmenti proteinskih iona¹⁸

Figure 26. Protein ion fragmentation¹⁸

SwissProt (<http://www.expasy.org>) jedna je od najvećih baza podataka peptida i proteina koja se može koristiti kod identifikacije proteina ili određivanja aminokiselinskog slijeda proteina¹⁷.

ZAKLJUČCI

Spektrometrija masa kao tehnika ima niz različitih primjena bez kojih su današnja istraživanja na području proteina nezamisliva. Proteomika se uvelike zasniva ili na samoj spektrometriji masa ili na vezanim sustavima tekućinskog kromatografa (u posljednje dvije godine i kapilarna elektroforeza) i spektrometra masa. Vezani sustavi se sve češće primjenjuju u raznim analizama, a u okviru vezanih sustava, hibridni spektrometri masa daju novu dimenziju kvalitativnim i kvantitativnim analizama. Spektralne baze podataka uvelike olakšavaju utvrđivanje *de novo* strukture peptida i mogu jednoznačno identificirati protein preko triptičkih produkata i njihovih fragmenata u načinu analize MS/MS. S obzirom na veliki broj

proizvođača spektrometara masa i tekućinskih kromatografa, prilikom odabira opreme potrebno je selektivno odabrati instrument namijenjen za ciljano skupinu analiza.

ZAHVALA

Ovaj rad nastao je uz financijsku potporu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa 098-0982464-2393 i projekta Fonda za zapošljavanje i razvoj RH 14V09809.

LITERATURA

- Baldwin MA, McLafferty FW. Liquid chromatography-mass spectrometry interface. I. The direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer. *Org Mass Spectrom* 1973;7:1111 and 1353.
- Iribarne JV, Thomson BA. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys* 1974;64:2287.
- Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers *Anal Chem* 1985;57:675.
- Scott RPW, Scott CG, Munroe M, Hess J. Interface for on-line liquid chromatography-mass spectroscopy analysis. *J Chrom* 1974;99:395.
- Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegerle KD, Horning MG, Stillwell RN. New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. *J Chrom Sci* 1974;12:725.
- Cerjan-Stefanović Š, Drevenkar V, Jurišić B, Medić-Šarić B, Petrović M, Nikola Šegudović N et al. *Kromatografsko nazivlje*. Zagreb: HINUS, Sekcija za kromatografiju HKDI, 1999.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ. *Osnove analitičke kemije*. 1st edition. Zagreb: Školska knjiga, 1999:644-69.
- Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S. A Global View of LC-MS. Pittsburg Pennsylvania, USA: Global View Publishing, 1997.
- Micromass. *Back to basics. v. 01*. Manchester UK: Micromass, 2001.
- Carroll DI, Dzidic I, Horning EC, Stillwell RN. Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. *Appl Spectrosc Rev* 1981;17:337-406.
- Johnston RAW, Rose ME. *Mass spectrometry for chemists and biochemists*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1994.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principles of instrumental analysis*. Orlando, USA: Saunders College Publishing, 1998.
- Pat S, Adams F, Innfante HG, Lemiere F. *LC-GC* 2001;12:24.
- Pramanik BN, Bartner PL, Mirza UA, Liu YH, Ganguly AK. Electrospray ionization **mass spectrometry** for the study of non-covalent complexes: an emerging technology. *J Am Soc Mass Spectrom* 1998;33:911-20.
- Iavarone AT, Evan JC, Williams ER. Effects of solvent on the maximum charge state and charge state distribution of protein ions produced by electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000;11:976-85.
- Bordoli R, Carruthers R, Cotrell J, Hoyers J, Hughes C, Kapp E et al. Automated protein identification using ESI-MS-MS, 47th ASMS, Dallas, Texas, USA, 1999.
- Siudzak G. *Mass Spectrometry for Biotechnology*. San Diego, California USA: Academic Press, 1997.
- Galić N, Cindrić M. Analiza protrina spektrometrijom masa. *Kem Ind* 2008;57:231-43.

POPIS KRATICA

APCI	Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku engl. <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
CI	Kemijska ionizacija engl. <i>Chemical ionization</i>
CFFAB	Udar ubrzanim ionima uz neprekinuti tok engl. <i>Continuous Flow Fast Atom Bombardment</i>
DAD	Detektor s nizom dioda engl. <i>Diode array detector</i>
EI	Ionizacija elektronima engl. <i>Electron ionization</i>
ESI	Elektroaspršenje engl. <i>Electrospray</i>
FAB	Udar ubrzanim atomima engl. <i>Fast atom bombardment</i>
FT ICR	Analizator ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju engl. <i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
GC	Plinska kromatografija engl. <i>Gas chromatography</i>
LC	Tekućinska kromatografija engl. <i>Liquid chromatography</i>
LSIMS	Spektrometrija masa tekućinskom sekundarnom ionizacijom engl. <i>Liquid Secondary Ionization Mass Spectrometry</i>
MALDI	Matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem engl. <i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MS	Spektrometrija masa engl. <i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	Tandemna spektrometrija masa engl. <i>Tandem mass spectrometry</i>
PB	Zraka čestica engl. <i>Particle Beam</i>
PDA	Fotodiodni detektor engl. <i>Photodiode array</i>
SWIFT	Inverzna Fourierova transformacija s pohranom vala engl. <i>Stored Wave Inverse Fourier Transform</i>
Q-TOF	Hibrid kvadrupola i analizatora koji mjeri vrijeme leta engl. <i>Hybrid quadrupole-time of flight</i>
QQQ	Trostruki kvadrupol engl. <i>Triple quadrupole</i>
TOF	Analizator koji mjeri vrijeme leta engl. <i>Time-of-flight</i>
UV/VIS	Ultraljubičasto/vidljivo engl. <i>Ultraviolet/visible</i>