

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra analytické chemie

**Optimalizace složení mobilních fází pro analýzu peptidů  
vícemodální chromatografií**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Juraj Lenčo Ph.D.

**V Hradci králové 2020-2021**

**Tužil Ondřej**

## Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci králové dne .....

Podpis .....

## Poděkování

Chtěl bych poděkovat vedoucímu této diplomové práce PharmDr. Juraji Lenčovi, Ph.D. za ochotu a cenné rady poskytnuté během vypracování této diplomové práce. Poděkování patří i celé katedře analytické chemie za ochotu při seznamování s chodem katedry

## Abstrakt

**Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova**

**Katedra Analytické chemie**

**Kandidát:** Ondřej Tužil

**Školitel:** PharmDr. Juraj Lenčo Ph.D.

**Název diplomové práce:** Optimalizace složení mobilních fází pro analýzu peptidů vícemodální chromatografií

Při bottom-up proteomických analýzách prováděných pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí se mobilní fáze okyseluje slabými kyselinami, které intenzitu analytů při detekci netlumí v takové míře jako běžně používané kyseliny pro separace bez hmotnostní detekce. Takovým aditivem mobilní fáze je kyselina mravenčí, která je nejběžněji používaná v koncentraci 0,1 % (v/v). Tato práce byla zaměřena na hledání nejnižší možné koncentrace kyseliny mravenčí, která by v kombinaci s vícemodální stacionární fází kolony ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub> od firmy Waters stále zajišťovala účinnou separaci peptidů, přičemž by se zároveň mělo dosáhnout zvýšení odezvy v hmotnostním spektrometru. Nejprve byly provedeny separace standardů peptidů na kapalinové chromatografii s UV detekcí s klesajícím množstvím kyseliny mravenčí v mobilní fázi. Bylo zjištěno, že pro vyhovující parametry separace peptidů je možné použít výrazně nižší koncentrace kyseliny mravenčí. Tři nejnižší koncentrační hladiny byly použity k analýzám s hmotnostní detekcí, kde byl skutečně pozorován nárůst intenzity píků peptidů. Dvě koncentrační hladiny kyseliny mravenčí v mobilní fázi byly poté otestovány také při bottom-up analýze tryptických peptidů z lyzátu bakterie *F. turalensis*. Nejvyšší počet identifikovaných peptidů byl získán při použití 0,02% kyseliny mravenčí v mobilní fázi. V porovnání se standardní koncentrací 0,10 % bylo identifikováno o 11,9 % více peptidů.

**Klíčová slova:** peptidy, mobilní fáze, kyselina mravenčí, LC/MS, CSH, intenzita

## Abstract

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University**

**Department of Analytical Chemistry**

**Candidate:** Ondřej Tužil

**Supervisor:** PharmDr. Juraj Lenčo Ph.D.

**Title:** Optimization of mobile phase composition for analysis of peptides in mixed-mode chromatography

In bottom-up proteomic analyzes performed by liquid chromatography with mass detection, the mobile phase is acidified with weak acids, which do not suppress the intensity of the analytes in the detection to the same extent as commonly used acids for separations without mass detection. Such a mobile phase additive is formic acid, which is most commonly used at a concentration of 0.1 % (v / v). This work was focused on finding the lowest possible concentration of formic acid, which in combination with the multimodal stationary phase of the ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub> column from Waters would still ensure efficient separation of peptides, while increasing the response in the mass spectrometer. First, separations of peptide standards were performed by liquid chromatography with UV detection with decreasing amounts of formic acid in the mobile phase. It has been found that significantly lower concentrations of formic acid can be used for satisfactory peptide separation parameters. The three lowest concentration levels were used for mass detection analyzes, where an increase in the intensity of the peptide peaks was observed. Two concentration levels of formic acid in the mobile phase were then also tested in a bottom-up analysis of tryptic peptides from a *F. turalensis* lysate. The highest number of identified peptides was obtained using 0.02% formic acid in the mobile phase. Compared to the standard concentration of 0.10 %, 11.9 % more peptides were identified.

**Key words:** peptides, mobile phase, formic acid, LC / MS, CSH, intensity

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Cíl práce: .....	9
3	Teoretická část .....	10
3.1	Proteiny .....	10
3.1.1	Struktura proteinů .....	10
3.2	Přístupy k analýze proteinů .....	10
3.3	Kapalinová chromatografie .....	12
3.4	Instrumentace kapalinové chromatografie .....	13
3.4.1	Zásobníky mobilních fází .....	13
3.4.2	Odplyňovač .....	13
3.4.3	Čerpadla .....	13
3.4.4	Dávkovací ventil .....	14
3.4.5	Kolonový termostat .....	14
3.4.6	Chromatografická kolona .....	14
3.4.7	Detektor .....	15
3.5	Kapalinová chromatografie při analýze peptidů a proteinů .....	16
3.5.1	Ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	17
3.6	Chromatografie na obrácených fázích (RPLC) .....	17
3.7	Vícemodální chromatografie .....	17
3.8	Stacionární fáze při chromatografické analýze peptidů a proteinů .....	18
3.8.1	Velikost částic stacionární fáze .....	19
3.8.2	Rozměry kolony .....	20
3.8.3	Mobilní fáze .....	21
3.9	Hmotnostní spektrometrie (MS) .....	22
3.9.1	Iontový zdroj .....	22
3.9.2	Hmotnostní analyzátor .....	24
3.9.3	Fragmentace peptidů .....	26
4	Praktická část .....	28
4.1	Materiál .....	28
4.1.1	Použité chemikálie .....	28
4.1.2	Použité přístroje .....	29
4.1.3	Použité kolony a předkolony .....	29
4.1.4	Použité kapiláry kolona-deketor .....	29
4.1.5	Použitý software .....	29

4.2	Experimentální část .....	29
4.2.1	Příprava směsí iRT a Alberta peptidů .....	29
4.2.1	Příprava komplexního vzorku peptidů z lyzátu bakterie <i>F. turalensis</i> .....	30
4.2.2	Příprava mobilních fází pro LC/UV analýzy.....	32
4.2.3	Příprava mobilních fází pro analýzy LC/MS.....	32
4.2.4	Ověření vlivu organického modifikátoru na separaci iRT a Alberta peptidů při LC/UV.....	33
4.2.5	Testování změny intenzity píků iRT peptidů při LC/MS analýze pro vybrané koncentrace organických modifikátorů.....	34
4.2.6	Analýza tryptických peptidů z celobuněčného lyzátu <i>F. turalensis</i> .....	35
5	Výsledky a diskuse.....	38
5.1	Vliv FA na separaci standardů peptidů při LC/UV.....	38
5.2	Analýza iRT peptidů pomocí LC/MS při vybraných koncentračních hladinách FA .....	47
5.3	Analýza tryptických peptidů z lyzátu <i>F. turalensis</i> .....	51
6	Závěr.....	53
7	Seznam zkratk: .....	54
8	Zdroje: .....	56

# 1 Úvod

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí je považována za standard při analýze peptidů a charakterizaci proteinů. Díky vývoji nových stacionárních fází s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  se dosahuje větší účinnosti při separaci. Výkonnější hmotnostní spektrometry poskytují vyšší citlivost a rozlišení. Ačkoliv pokrok v technologii je obdivuhodný a žádoucí, nastavení vhodného složení mobilní fáze je stále klíčové. Při separacích peptidů kapalinovou chromatografií se používají mobilní fáze s nízkým obsahem organické kyseliny, například kyselina mravenčí (FA, z angl. Formic Acid), kyselina trifluoroctová (TFA, z angl. Trifluoroacetic Acid) nebo kyselina octová (AcA, z angl. Acetic Acid). Tyto kyseliny předávají proton funkčním skupinám peptidů. Zároveň mohou s peptidy vytvořit iontový pár, což se projeví zvýšením retence na základě primárně hydrofobních interakcí s běžnými  $\text{C}_{18}$  stacionárními fázemi a potlačením sekundárních interakcí, jako je interakce s volnými silanoly. Z těchto kyselin nejvíce sekundárním interakcím, které zhoršují kvalitu separace, zamezuje TFA. Bohužel při hmotnostní detekci TFA zároveň nejvíce snižuje ionizaci analytu a tím i jeho intenzitu [1][2].

Se zaměřením na tyto skutečnosti jsou vyvíjeny specializované stacionární fáze např. hybridní fáze s pozitivně nabitým povrchem, CSH™ (z angl. Charged Surface Hybrid) od společnosti Waters. Tato technologie stacionární fáze disponuje klasickým ligandem, například  $\text{C}_{18}$ , a navíc vloženými skupinami na hybridním nosiči. Tyto vložené skupiny mají kladný náboj při doporučeném rozmezí pH. Dle práce o separaci peptidů na této koloně (Matthew A. Lauber *Anal. Chem.* 2013, 85, 6936–6944) vyšlo najevo, že separace na koloně s touto technologií dosahují srovnatelných výsledků pro FA a TFA. [3].

Na základě tohoto poznatku byly provedeny na koloně CSH  $\text{C}_{18}$  od firmy Waters analýzy peptidů, za účelem zjištění míry vlivu kyseliny mravenčí na tvar píku a intenzitě signálu při detekci hmotnostním spektrometrem (MS, z angl. Mass Spectrometry)



## 2 Cíl práce:

Cílem této práce je ověřit hypotézu, že při použití stacionární fáze CSH je možné použití nižších koncentrací kyseliny mravenčí jako aditiva za současného udržení dobrých tvarů píků peptidů. Předpokládáme, že snížení množství kyseliny by mohlo mít vliv na intenzitu signálu při detekci hmotnostním spektrometrem. Práce zahrnovala několik dílčích cílů.

- Připravit vzorky standardů peptidů a zjistit změny při separaci na CSH C<sub>18</sub> koloně za postupně se snižující koncentrace FA, při analýze kapalinovou chromatografií s UV detekcí (LC/UV, z angl. Liquid Chromatography-Ultraviolet)
- Zjistit intenzity signálů standardů při analýze kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (LC/MS, z angl. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry) a zjistit dostatečné koncentrace FA pro kvalitní separace.
- Zpracovat vzorek celobuněčného lyzátu bakterie *F. tularensis* pro bottom-up LC/MS proteomickou analýzu.
- Vyhodnotit LC/MS data a porovnat počet identifikovaných peptidů mezi analýzami při použití rozdílných koncentrací kyseliny mravenčí v mobilní fázi.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Proteiny

Proteiny jsou základní a nepostradatelnou stavební jednotkou živých organismů. V těchto organismech mají mnoho funkcí, například strukturní, transportní a metabolickou. Jsou to velmi složité makromolekuly složené z dlouhých řetězců aminokyselin. Jejich přesná charakterizace a identifikace je klíčová pro pochopení fyziologických a patologických funkcí organismů. Vědní obor proteomika se zabývá studiem proteinů produkovaných určitou buňkou, tkání nebo organismem.

Proteomika nezkoumá pouze strukturu proteinů, ale i jejich chování a interakce v určitém prostředí. Tyto makromolekuly jsou však velmi různorodé a charakterizace proteinů a dějů s nimi spojených je velmi náročná [4].

#### 3.1.1 Struktura proteinů

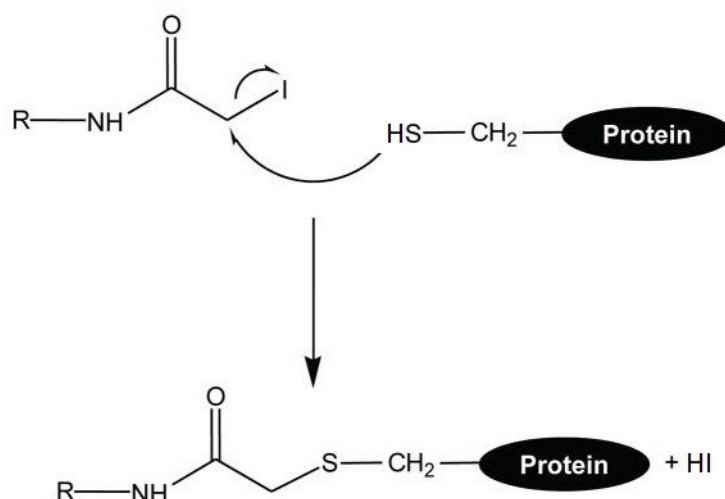
Základní součást a primární struktura proteinů je tvořena aminokyselinami. Existuje 23 přirozeně se vyskytujících aminokyselin a 20 z nich jsou proteinogenní [5][6]. Další tři jsou podstatné zejména pro bakterie. Spojením aminokyseliny vznikají peptidy se základní kostrou peptidové vazby a postranními řetězci. Rozdíly v těchto postranních řetězcích dávají jednotlivým řetězcům jiné vlastnosti. Složení a sekvence aminokyselin udává vlastnosti proteinu jako jsou molekulová hmotnost, náboj, polarita, acidobazicitu a izoelektrický bod.

Strukturní vlastnosti proteinu jsou pak doplněné posttranslačními modifikacemi, které jsou neméně důležité pro správnou funkci proteinu. Na rozdíl od syntézy nového proteinu, vznik některých posttranslačních modifikací trvá jen krátkou dobu, a proto díky nim může organismus rychle reagovat na změnu vnitřních nebo vnějších podmínek. Významné posttranslační modifikace jsou například fosforylace, glykosylace, acetylace, nitrace, ubikvitinace, sumoylace nebo methylace.

### 3.2 Přístupy k analýze proteinů

Při analýze proteinů se uplatňují dva základní přístupy „bottom-up“ a „top-down“. Bottom-up zkoumá protein od jeho menších částí pomocí neštěpení řetězce např.

proteázami. Takovou proteázou může být například modifikovaný trypsin. Tento enzym štěpí proteinový řetězec za C1 uhlíkem lysinu a argininu, tedy na spojení s další aminokyselinou [7]. Naštěpením proteinu trypsinem vzniknou menší oligopeptidové až polypeptidové řetězce, které se následně charakterizují dalšími analytickými metodami, zejména LC/MS. Aby se daly analyzovat úseky, které byly v proteinech spojeny disulfidickými můstky, tyto vazby se v proteinech nejprve redukuje pomocí tris(2-karboxyethyl) fosfinem (TCEP, z angl. (tris(2-carboxyethyl)phosphin) nebo dithiothreiolem [8][9]. Pro zamezení tvorby nových disulfidických můstků z volných thiolových skupin se používají derivatizační činidla jako jsou iodoacetamid (IAM, z angl. Iodoacetamide)s, N-ethylmaleimid nebo kyselina jodoctová [10]. Tato činidla reagují s volnými thiolovými skupinami a znemožní tak jejich opětovné spojení (obrázek č. 1).



**Obrázek č. 1.** Reakce IAM s thiolovou skupinou převzato a upraveno [10]

Top-down přístup spočívá pouze v extrakci proteinů z biologického materiálu a přímé analýze bez přechozího štěpení na menší části. Vyextrahované proteiny jsou obvykle separovány pomocí kapalinové chromatografie. Fragmentace proteinu probíhá až v hmotnostním spektrometru. Oba přístupy mají své klady a zápory. Bottom-up je lépe prozkoumaná a hojněji používaná, peptidy jsou lépe rozpustné ve více druzích rozpouštědel a jejich separace a fragmentace je účinnější. Spektra jsou snadno interpretovatelná [11]. Top-down přístup je vhodný pro studium jednotlivých forem

jednoho proteinu. Při analýze proteomu zaostává za bottom-up přístupem z pohledu celkového pokrytí a citlivosti [12].

Před finální analýzou vzorku je většinou potřeba nejprve provést úpravu. Je nutné oddělit takové látky, které by mohly interferovat s analytem nebo kontaminovat analytický přístroj. Takovými látkami mohou být soli, kovy nebo jiné chemikálie použité při přípravě vzorku nebo další přítomné látky z biologického vzorku. Výběr extrakční techniky závisí na charakteru analytu a požadované čistotě. Mezi nejběžnější metody precipitace proteinů, gelová filtrace, ultrafiltrace, mikroextrakce a extrakce na tuhé fázi. Jednotlivé metody je možné kombinovat. Nejčastěji používanou extrakční metodou v proteomice představuje extrakce na tuhé fázi (SPE, z angl. Solid-Phase Extraction).

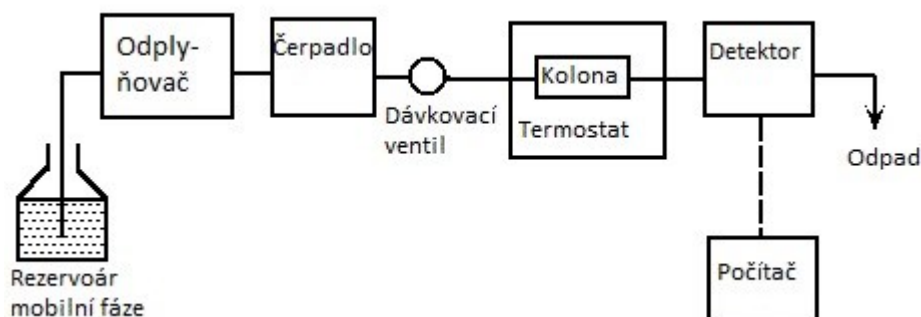
SPE spočívá v zachycení nečistot nebo analytu na pevné vrstvě materiálu, nejčastěji C<sub>18</sub> modifikovaném silikagelu. Metoda se stává ze 4 částí. Nejprve se provede aktivace polymeru methanolem nebo pomocí acetonitrilu (ACN). Poté se prostředí upraví rozpouštědlem podobným vzorku (pro peptidy např. voda s nízkou koncentrací organické kyseliny). Následuje nanesení samotného vzorku. Peptidy mají afinitu k C<sub>18</sub> fázi a zachytí se na ni. Dále se provede promytí pevné fáze a odstranění matrice vzorku. Tento krok je nutné realizovat s co možná nejmenší elucí analytu pro zajištění dobré výtěžnosti extrakce. V poslední části se eluují látky zachycené na sorbentu rozpouštědlem s vysokou eluční silou, opět nejčastěji ACN.

### **3.3 Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie je separační technika, dnes už přítomná ve většině analytických laboratoří. Slouží k separaci, identifikaci a kvantifikaci jednotlivých komponent ze směsi. Princip metody je založen na opakované distribuci látek mezi stacionární a mobilní fází na základě svých rozdílných fyzikálně chemických vlastností. Stacionární fáze je sorbent ukotvený v koloně, na kterém se daný analyt zadržuje. Kolonou, vyplněnou stacionární fází, proudí fáze mobilní. To je kapalina o určitých vlastnostech, která uvolňuje zadržované analyty z kolony. Vyšší afinita ke stacionární fázi zajistí delší retenci, naopak u analytu s nízkou afinitou k stacionární fázi bude doba potřebná pro průchod skrz kolonu kratší.

### 3.4 Instrumentace kapalinové chromatografie

Základními částmi každého kapalinového chromatografu je zásobník na mobilní fázi, čerpadlo, dávkovací ventil, kolona, detektor a zařízení pro zpracování dat.



**Obrázek č. 2.** HPLC instrumentace (převzato a upraveno z [13])

#### 3.4.1 Zásobníky mobilních fází

Zásobníky mobilních fází jsou nádoby různých velikostí, vyrobené z inertních materiálů. Často jsou skleněné s tmavou barvou pro omezení degradace roztoku. Uzávěry zabraňují evaporaci a kontaminaci roztoků. Skrz uzavěry jsou vloženy hadičky s filtry, přes které proudí mobilní fáze do čerpadla [14].

#### 3.4.2 Odplyňovač

Mobilní fáze obsahuje rozpuštěné plyny, nejčastěji kyslík a dusík. Tyto plyny se mohou uvolnit při mísení a následně narušit konstantní průtokovou rychlost a tlak v systému. Nejčastěji používaným typem odplyňovače je evakuovaný prostor s vinutím, které má polopropustnou membránu. Rozpuštěné plyny prochází skrze membránu na základě rozdílů tlaků uvnitř vinutí a evakuovaném prostoru [15].

#### 3.4.3 Čerpadla

Moderní systémy kapalinové chromatografie obsahují jedno nebo častěji dvě vysokotlaká čerpadla, která zajišťují průtok mobilní fáze a vzorku. Běžné rozmezí čerpadel v analytických přístrojích se pohybuje mezi 0,050-5 ml/min. Správné a neměnné rychlosti průtoku jsou klíčové pro reprodukovatelnost výsledků analýz.

Volba čerpadel je důležitá i z pohledu typu eluce. Pro gradientové eluce je vhodné použít vysokotlaký systém, kde k mísení mobilních fází dochází až za pumpou. Při tomto uspořádání je redukován mrtvý objem. Mrtvý objem představuje množství kapaliny mezi místem mísení a čelem kolony. Větší mrtvý objem zvyšuje prodlevu mezi dosažením změny gradientu v centru mísení a na koloně. Také prodlužuje časový úsek metody pro ekvilibraci kolony [15]

#### 3.4.4 Dávkovací ventil

Šesticestný dvoupolohový ventil propojuje čerpadla s kolonou. Při dávkování vzorku v, automatickém dávkovači, dojde k nasátí vzorku z vialky do duté jehly. Její obsah je vpraven do dávkovací smyčky. Následně dojde k otočení ventilu a mobilní fáze z čerpadel proudí přes smyčku se vzorkem, který unáší do kolony.

#### 3.4.5 Kolonový termostat

Tato část slouží k nastavení konstantní teploty kolony v průběhu analýzy. Udržení konstantní teploty je důležité z hlediska reprodukovatelnosti výsledků. Vyšší teplota má vliv na snížení retence a následné zrychlení analýzy. Redukuje se také viskozita mobilní fáze. To se projeví snížením zpětného tlaku, což umožní použití delších kolon s menšími částicemi pro vyšší účinnost separace. Naopak příliš vysoká teplota může mít nežádoucí vliv na zkoumané analyty nebo kolonu a působit jejich degradaci. Při analýze peptidů a proteinů má změna teploty vliv na selektivitu. Vyšší teploty mají za následek i zvýšení kapacity píku a zrychlení difúze analytu. Změnou teploty je tedy možné optimalizovat průběh separace [16][17][18].

#### 3.4.6 Chromatografická kolona

Kolona je základní a nejdůležitější součástí kapalinové chromatografie. Zde probíhá samotná separace. Jelikož kolonou proudí kapalina o vysokém tlaku, je nutné, aby byla mechanicky i chemicky odolná. Nejčastěji jsou chromatografické kolony vyrobeny z nerezové oceli. Chromatografické kolony je možné vyrobit i laboratorně, avšak toho se využívá pouze minimálně. Kolony jsou charakterizovány například takto: C<sub>18</sub>; 4,6 × 250 mm; 5 μm; 100 Å. C<sub>18</sub> nám říká, že kolona má substrát náplně modifikovaný oktedecylovou skupinou. Dále zde vyčteme rozměry kolony, 4,6 mm odpovídá vnitřnímu

průměru kolony a 250 mm pak její délce [19]. Poslední údaj nám dává informaci o velikosti pórů. To je důležité při separaci proteinů, jelikož velké proteiny nemohou vstoupit do malých pórů a interagovaly by tak pouze s vnějším povrchem stacionární fáze [16][20]. Pro prodloužení životnosti kolon se často používá takzvaná předkolona. Je naplněna stejným sorbentem, pouze je podstatně kratší. Slouží k zachycení nečistot nebo látek, které se na kolonu váží ireverzibilně.

### 3.4.7 Detektor

Volba detektoru použitého při analýze závisí na vlastnostech a specifitě analytu, požadované citlivosti a účelu analýzy. Pro kvantitativní analýzy vzorků o známých analytech je možné si vystačit s obyčejným UV/VIS (z angl. Ultraviolet-Visible) detektorem. Pro identifikaci neznámých látek a zjištění jejich struktury je nutné použít hmotnostní spektrometrii.

#### Spektrofotometrický detektor

Detektor funguje na principu záření procházející skrz celou detektoru. Pokud jí prochází látka absorbující toto záření díky vlastnostem svých vazeb, dojde k poklesu transmitance. Zdroj, např. deuteriová lampa pro UV a wolframová lampa navíc pro VIS, produkuje záření, které je podrobena difrakci optickou mřížkou nebo hranolem a následně vyselektováno filtrem. Obvyklá vlnová délka UV detekce užívaná pro peptidy je 214 nm. Při této vlnové délce dochází k absorpci energie elektrony peptidové vazby. Absorpce probíhá i při nižších vlnových délkách kolem 190 nm, avšak zde už dochází k rušivému vlivu mobilní fáze. Naopak při vlnové délce 280 nm. dominuje absorpce postranními aromatickými částmi tryptofanu, tyrosinu a v menší míře fenylalaninu [21].

Obměnou tohoto způsobu je detektor diodového pole (PDA). Záření nejprve projde detekční celou a až poté difrakčním prvkem, který ho rozdělí na jednotlivé vlnové délky. Ty jsou pak detekovány množstvím fotodiod, které konvertují intenzitu záření jednotlivých délek na elektrický signál [22]. Možnost detekce v celém spektru najednou dává více informací o samotné látce i případných příměsích. Také je možné porovnávat získaná spektra s knihovnami spekter pro jednotlivé látky.

### 3.5 Kapalinová chromatografie při analýze peptidů a proteinů

Analýza peptidů a proteinů je v porovnání s malými molekulami citlivější na zvolené podmínky. Jsou to především nestabilní vazby vyskytující se v peptidech a proteinech, u kterých je potřeba zamezit degradaci.

Správně provedená separace poskytuje mnoho informací o vzorku. Mohou to být údaje o čistotě při výrobě nebo kontrole léčiv. Tato analýza také pomáhá identifikovat a kvantifikovat biologické vzorky, tím přispívá i k lepšímu pochopení biologických procesů.

Existují dva typy analýz z hlediska složení mobilní fáze. Isokratická eluce, u které složení mobilní fáze zůstává zachováno. A gradientová eluce, kde se složení mobilní fáze mění různými příspěvky z dvou a více zásobníků. Isokratická eluce je vhodná při analýze vzorku, který není příliš heterogenní a není potřeba změny elučních podmínek pro zkrácení analýz. Gradientová eluce je naopak vhodná u komplexních vzorků, jelikož je možné změnit eluční sílu v průběhu analýzy a významně tak zkrátit časy analýz. Pro analýzu peptidů a proteinů se v převážné většině případů využívá gradientová eluce [16].

Na základě vlastností analytu a hledaných informací, je možné zvolit z různých modů, kterými kapalinová chromatografie disponuje. Nejvíce je využívána chromatografie na obrácených fázích (RP, z angl. Reversed Phases), která využívá hydrofobních interakcí stacionární fáze a analytů. Dále je využívána hydrofilní interakční chromatografie (HILIC, z angl. Hydrophilic Interaction Chromatography). Principem této metody je uplatnění hydrofilních interakcí analytů s utvořenou vodnou vrstvou na polární stacionární fázi. Ionově výměnná chromatografie (IEC, z angl. Ion Exchange Chromatography) uplatňuje interakce nábojů přítomných na peptidech či proteinech a změnu jejich retence v závislosti na pH mobilní fáze. Molekulová vylučovací chromatografie (SEC, z angl. Size Exclusion Chromatography) rozděluje proteiny na základě jejich velikosti.

Kombinací jednotlivých modů je možné provést komplexní analýzu vzorku proteinů. Pomocí SEC je možné zjistit rozložení velikosti proteinů ve vzorku. Po enzymatickém štěpení se pomocí RP provede peptidové mapování a zjistíme podrobnější informace o jednotlivých peptidech. Dále se můžeme zaměřit na posttranslační modifikace a pomocí *N*-glykosidázy F odštěpit *N*-vázané glykany. Tyto odštěpené glykany je pak možné podrobit analýze pomocí HILIC, pro zjištění typu glykanů a jejich zastoupení [23].



### 3.5.1 Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC, z angl. Ultra High-Performance Liquid Chromatography) je dedikovaný systém kapalinové chromatografie, který může operovat s částicemi stacionární fáze menšími než 2  $\mu\text{m}$ . Tyto částice generují vyšší zpětný tlak, a proto musí být schopen pracovat i při tlacích kolem 100 MPa. Použitím částic o menším průměru roste účinnost separace a je možné použít větší průtokové rychlosti bez znetelné újmy na účinnosti. Kolony s částicemi pod 2  $\mu\text{m}$  mají nejčastěji vnitřní průměr 2,1 mm. Schopnost zvládat vyšší tlaky není jedinou podmínkou UHPLC systému. Také by měl mít malé mimokolonové objemy, vyšší frekvenci sběru dat, výkonné a stabilní čerpadla a co možná nejmenší zpoždění gradientu. Při správném použití je možné dosáhnout větší účinnosti, menší spotřeby rozpouštědel a podstatně rychlejší separace oproti HPLC systému [11][19][24].

### 3.6 Chromatografie na obrácených fázích (RPLC)

RPLC je dnes nejvíce využívaný typ chromatografických analýz, 80 % analýz na kapalinovém chromatografu je prováděno právě na RP. Oproti separaci na normálních fázích spočívá v prohození polarity stacionární a mobilní fáze. Stacionární fáze je tedy nepolární a mobilní fáze polární. Nejčastěji se jako stacionární fáze používají alkylové řetězce  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_8$  navázané na silikagel nebo hybridní sorbent. Analyty interagují se stacionární fází na základě slabých interakcí disperzních sil v oblasti rozmezí fází. V menší míře probíhají i sekundární interakce s povrchem nosiče stacionární fáze, jako je například interakce s volnými silanolovými skupinami [25]. Mobilní fáze je nejčastěji směs vodných roztoků s acetonitrilem o definovaném pH. Eluční síla klesá s rostoucí polaritou mobilní fáze [23].

Nespornou výhodou RPLC je široké rozmezí molekulových velikostí a polarity, kde lze tuto metodu využít. Další výhodou je rychlé ustálení rovnováhy na koloně, což má za následek snadnější použití gradientové eluce a rychlejší vývoj metody [23].

### 3.7 Vícemodální chromatografie

Tento mód chromatografie je specifický z důvodu více významných separačních mechanismů. U stacionárních fází vícemodální chromatografie se uplatňuje především

iontová síla mobilní fáze, která ovlivňuje výměnu iontu, a pH mobilní fáze, jenž mění ionizaci analytu a stacionární fáze. Významné jsou také hydrofobní interakce a interakce vodíkovými můstky. [19]

Vícemodální stacionární fáze může mít hydrofobní ligandy s vloženými nabitými skupinami. Druh a rozložení nábojů má pak přímý vliv na selektivitu separace. Změnou pH mobilní fáze ovlivní nejenom disociaci analytu, ale i stacionární fáze. Díky uplatnění více separačních mechanismů najednou, může být vícemodální chromatografie využita pro analýzu komplexních směsí látek různé polariry včetně látek neutrálních [19]. Příkladem může být stacionární fáze s ligandem N-(10-undekanoyl)-3-aminochinuklidinem připojeným na částice silikagelu s thiolovou skupinou. Tato stacionární fáze využívá hydrofobních interakcí jako RP a zároveň je schopna fungovat jako slabý anex [26]. Aplikací vícemodální chromatografie při separaci proteinů a peptidů je možné dosáhnout unikátní selektivity. Oproti separacím na RP má výhodnější použití pro polární a nabitě látky, které jsou na RP špatně zadržovány [28][29]

Ačkoliv to nebylo primárním úmyslem výrobce, dalším příkladem stacionární fáze pro vícemodální chromatografii jsou stacionární fáze s CSH technologií od firmy Waters. Mezi hydrofobní ligandy na hybridním sorbentu (silikagel propojený methylenovými můstky) je vloženo malé množství silně bazických skupin, které získají při kyselém pH mobilní fáze kladný náboj. Tento pozitivní náboj odpuzuje stejně nabitě peptidy od povrchu stacionární fáze a výrazně tak redukuje vliv volných silanolových skupin na jejich separaci. Vložením náboje na stacionární fázi má příznivý vliv na kapacitu kolony a symetrii píků pro bazické analyty včetně peptidů [27].

### **3.8 Stacionární fáze při chromatografické analýze peptidů a proteinů**

Stacionární fáze má především interagovat s analytem a oddělit ho od ostatních látek, chemické vlastnosti jsou tak hlavním parametrem při jejím výběru. Nejrozšířenější stacionární fází je stále modifikovaný silikagel s chemicky vázanou oktadecylovou skupinou (C<sub>18</sub>), používají se také kratší uhlovodíkové zbytky, C<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>. Tyto kratší uhlovodíky jsou vhodné především pro proteiny. Interakce probíhá na základě hydrofobních vlastností. Pro chemicky vázanou difenylovou skupinou pak převládá interakce s  $\pi$  elektrony aromatických jader fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Pokud je retence látek

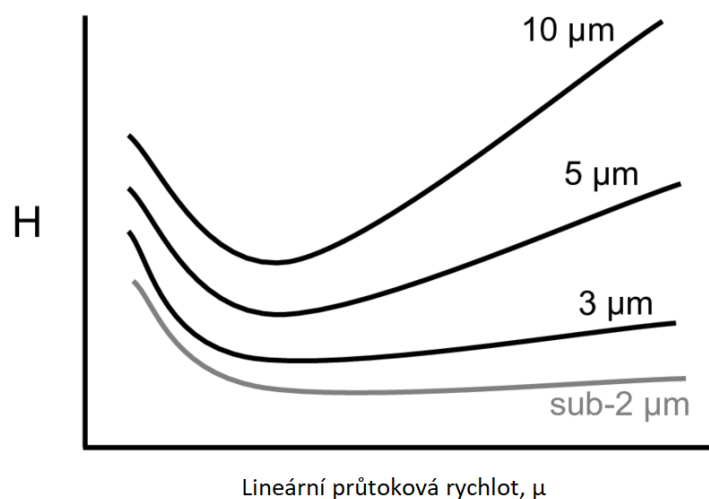
kvůli jejich polární povaze nedostatečná, je možné použít stacionární fáze s vloženou polární skupinou [30][31]. Porovnání jednotlivých stacionárních fází lze najít v literatuře [19].

Při výběru stacionární fáze je nutné brát ohled i na ostatní parametry analýzy, a zamezit tak poškození kolony. Jedná se například o maximální tlak, rozmezí pH a teplotu. Pro klasické silikagelové sorbenty je doporučené rozmezí pH 2-7. Při pH menší než 2 začíná docházet ke kyselé hydrolyze kovalentně vázaných organických ligandů. Při pH vyšším než 7 se výrazně zvyšuje rozpustnost silikagelu [39]. Tyto vlastnosti mohou být pozměněny mnoha modifikacemi. Například ukotvením ligandu přes více silanolových skupin, sterickým stíněním objemným substituentem, endkapováním volných silanolových skupin nebo integrací methylových či ethylových můstků mezi SiO<sub>2</sub> skupiny (tzv. hybridní fáze). Další možností je zvolit zcela jiný typ sorbentu, například plně polymerní, grafitový nebo z oxidu zirkoničitého [19][32][33].

Problematika volných silanolových skupin spočívá v jejich negativním náboji při vyšším pH. To se projevuje u bazických analytů, které nesou kladný náboj chvostováním píku z důvodu iontových interakcí. Tento efekt se dá omezit stíněním volných silanolů objemným substituentem v ligandu nebo endkapováním (chemická reakce silanolu např. s trimethylchlorsilanem) [3][32].

### 3.8.1 Velikost částic stacionární fáze

Velikost částic je důležitým faktorem z hlediska účinnosti separace. Pro standardní kulovité, nejčastěji plně porézní nebo povrchově porézní částice, můžeme dle van Deemterovy křivky (obrázek č 3.) pozorovat změnu výškového ekvivalentu teoretického patra (HETP, z angl. Height Equivalent to a Theoretical Plate) v závislosti na lineární průtokové rychlosti pro různě velké částice. HETP se pro menší částice snižuje, lze tedy dosáhnout vyšší účinnosti separace. Zároveň pro částice s menším průměrem, zvýšení lineární průtokové rychlosti neovlivní tak významně účinnost a je možné dosáhnout rychlejších analýz [38].



**Obrázek č. 3.** Van Deemterova křivka pro různé velikosti částic. (Převzato z [34])

### 3.8.2 Rozměry kolony

Vnitřní průměr (i.d., z angl. internal diameter) kolony je důležitý především z hlediska citlivosti. Kolony s menším i.d. mají větší relativní citlivost. Snižuje se také spotřeba rozpouštědel a množství použitého vzorku. Naopak nevýhodou je nutnost kvalitnějšího systému schopného udržet požadovanou rychlost průtoku bez fluktuací a disponujícího menšími mimokolonovými příspěvky. I malé změny v těchto parametrech se výrazně projeví na separaci. Použití kolony s menším i.d. má pak významný vliv na robustnost metody [35].

Velmi malých i.d. využívá technika nano-LC (nano-kapalinová chromatografie). Tato technika využívá kolony o vnitřním průměru 0,1 mm a menším. S průměrem kolony klesá i průtok mobilní fáze, který je řádově ve stovkách nanolitřů za minutu. Vysoká citlivost a nízká spotřeba vzorku a mobilní fáze činí z nano-LC velmi často používanou techniku v oblasti proteomické analýzy [36][37].

Ovlivnění kvality separace je možné i změnou délky kolony. Delší kolona představuje větší množství míst pro ustalování rovnováhy, tedy větší počet teoretických pater. Avšak s rostoucí délkou kolony, roste i generovaný zpětný tlak a délka analýzy. Vhodné rozměry kolony je tedy nutné vybírat s ohledem na požadovanou účinnost, rychlost separace a limity systému [35].

### 3.8.3 Mobilní fáze

Mobilní fáze odpovídá za zajištění rozpustnosti analytu a také za jeho postupné uvolňování z kolony. Často jsou používány směsi více rozpouštědel. Tyto směsi musí být velmi dobře mísitelné. To je obzvláště důležité u gradientové eluce, kde se poměr jednotlivých rozpouštědel mobilní fáze mění v čase [38]. S touto změnou složení roste i eluční síla mobilní fáze, tím se zajistí eluce analytu. Při separaci peptidů je základem mobilní fáze stále čistá voda. Její polární vlastnosti nemají dostatečnou eluční sílu pro uvolnění peptidů, a proto se kombinuje s organickou složkou. Tou bývá nejčastěji ACN. Má nízkou viskozitu, tudíž generuje nízký zpětný tlak. Neabsorbuje UV záření při nízkých vlnových délkách a je nejlépe prozkoumanou organickou složkou. Výhodou je také jeho těkavost, jde snadno odstranit ze vzorku. Možné je použití také methanolu nebo ethanolu. Propan-2-ol díky své vysoké viskozitě je účelné přidat pouze v malé míře (do 5 %). Jeho použití je výhodné pro hydrofóbnější analyty. Rychlost změny složení mobilní fáze má vliv na rozlišení peptidů, obecně platí že pomalejší změny gradientu v dlouhých metodách vedou k vyšší kapacitě píků. Avšak toto pravidlo neplatí absolutně, proto je nutné změny rozlišení na rychlosti gradientu vyzkoušet experimentálně [16].

Retence amfoterní látek, kterými jsou například peptidy, je velmi závislá na pH prostředí. Rozhoduje o tom, jestli a jaký náboj bude analyt mít. Přítomnost náboje na analytu snižuje retenci při RPLC. Při použití látky ovlivňující pH je také potřeba dbát na kompatibilitu jednotlivých částí systému s touto látkou. Například běžně používané fosfátové pufrý jsou zcela nevhodné pro LC/MS z důvodu jejich netěkavost [38]. Pro separaci peptidů se nejčastěji využívá kyselé pH mobilní fáze. Při tomto pH je většina aminoskupin protonovaná a karboxylové skupiny zůstávají nedisociovány. Organická kyselina pak může utvořit s peptidem iontový pár a umocnit tak hydrofobní interakce se stacionární fází. Nízké pH mobilní fáze také omezuje náboj na volných silanolových skupinách. Pro analýzu peptidů pomocí RPLC se používají modifikátory pH, které okyselují mobilní fázi a utváří iontové páry s kladně nabitými peptidy, čímž zlepšují separaci. Nejčastěji se používá kyselina trifluoroctová (TFA) v koncentraci 0,1 %. Nevýhodou silných iontově párových činidel je potlačení ionizace analytu při MS detekci. Pro optimální separaci a následnou detekci pomocí MS je tedy nutné vybrat nejvhodnější

modifikátor pH mobilní fáze v optimální koncentraci [3][16]. Pro analýzu s MS detekcí se pak typicky využívá kyselina mravenčí [38].

### 3.9 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika využívající převodu látek na ionty, které jsou selektovány a detekovány na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji (dále jen  $m/z$ ). Mezi hlavní údaje získané o dotčené látce patří: molekulová hmotnost, elementární složení, zastoupení izotopů a případně struktura.

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí:

1. Iontový zdroj – zajišťuje ionizaci analytu a jeho převod do plynné fáze
2. Hmotnostní analyzátor – odděluje jednotlivé ionty od sebe na základě jejich poměru  $m/z$
3. Detektor – snímá ionty z analyzátoru a určuje jejich relativní intenzitu tzn. intenzitu vůči ostatním detekovaným iontům

Pro spojení MS a HPLC systému je nutné zajistit, aby mobilní fáze a analyty byly kompatibilní a převoditelné do plynné fáze. Zcela nevhodné jsou pak například mobilní fáze obsahující fosforečnanový pufr, který by zanášel systém.

#### 3.9.1 Iontový zdroj

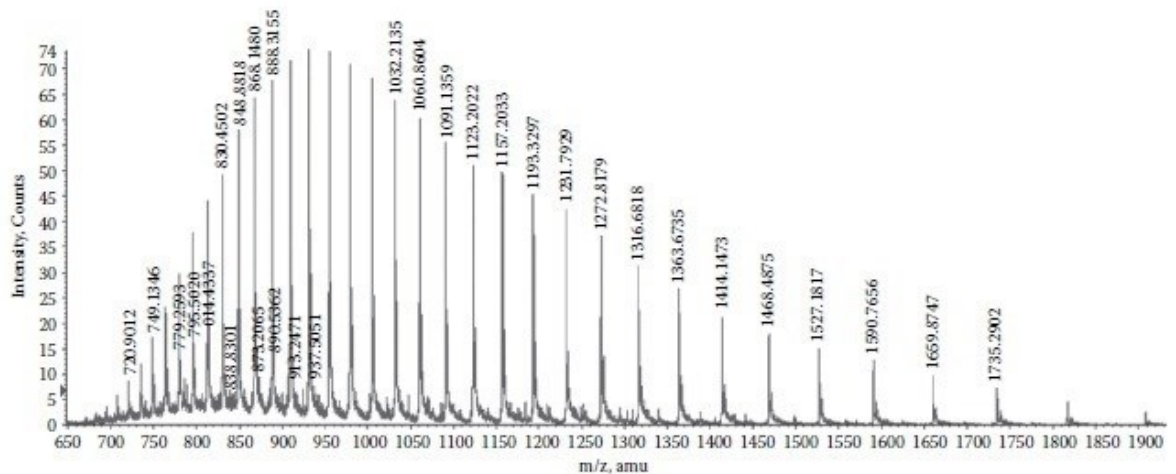
Volba iontového zdroje použitého pro ionizaci analytu závisí na vlastnostech analytu a cíli analýzy. Pro systémy HPLC/MS jsou nejčastější způsoby ionizace, ionizace elektrosprejem (ESI, z angl. Electrospray Ionization), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, z angl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, z angl. Atmospheric Pressure Photoionization). Volba určitého zdroje se řídí primárně polaritou a molekulovou hmotností analytu. ESI vyniká pro polární a objemné molekuly, což této metodě zaručuje majoritní použití pro analýzu biomolekul. APPI je naopak vhodná pro látky nepolární až středně polární, které se pomocí ESI neionizují. APCI je taktéž určen pro nepolární až středně polární, ale jeho vlastností je větší fragmentace ionizovaných molekul. Dále se pro analýzu proteinů a peptidů používá ionizace laserem za účasti matrice (MALDI,

z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization), avšak toto spojení probíhá především v tzv. off-line režimu, kde analyt po separaci kapalinovou chromatografií musí být nejprve upraven a smíchán s matricí za tvorby kokystalů, než může proběhnout jeho ionizace.

## ESI

Ionizace elektrosprejem je dnes nejvíce využívaný způsob ionizace vhodný pro makromolekuly. Principem tohoto ionizačního zdroje je vedení mobilní fáze s analytem dutou jehlou, na kterou je přivedeno stejnosměrné napětí. Napětí na jehle je běžně kolem 2-5 kV. Při opouštění hrotu jehly dojde pomocí zmlžovacího plynu k tvorbě malých kapiček mobilní fáze s analytem a velkým množstvím náboje na povrchu. Sušící plyn a vysoká teplota uvnitř iontového zdroje přispívá k odpařování mobilní fáze a tím se zvyšuje hustota náboje na povrchu kapky. Při dosažení kritické hranice dojde k tzv. Coloumbovské explozi a tvorbě několikanásobně nabitým molekulám analytu typu  $[M+nH]^{n+}$  nebo  $[M-nH]^{n-}$  dle volby pozitivního či negativního módu. Tyto molekuly jsou poté fokusovány dál do hmotnostního analyzátoru [40]. Jako sušící a zmlžovací plyny je nejčastěji využíván dusík. Průběh ionizace lze ovlivnit změnou napětí na sprejovací jehle, průtokem mobilní fáze a jejím složením, průtokem a teplotou zmlžovacího a sušícího plynu.

Při analýze s ionizací elektrosprejem dochází k vícenásobnému nabití analytu, to má za následek zmenšení poměru  $m/z$  a vznik možnosti zaznamenat ionty pocházející z objemných makromolekul. V záznamu pak můžeme pozorovat charakteristickou obálku (obrázek č. 4). Rozdíl nábojů mezi sousedícími píky je 1. Píky s menším nábojem mají větší  $m/z$ . Pomocí rozdílu  $m/z$  mezi jednotlivými sousedícími píky lze vypočítat celkovou molekulovou hmotnost molekuly.



**Obrázek č. 4.** Rozložení m/z při analýze proteinu hmotnostním spektrometrem (převzato z [40])

## MALDI

MALDI je měkká ionizační technika vhodná pro velké biologické molekuly podobně jako ESI. Podstatou této metody je laserová ionizace matrice s analytem. Matrice, nejčastěji deriváty kyseliny benzoové, spolu s analytem tvoří kokrystaly, které jsou následně ozářeny laserem. Materiál matrice absorbuje energii, směs je odpařena a dojde k ionizaci analytu skrz interakce se zplyněnou matricí. Při ionizaci vznikají převážně jednou nabité ionty s velkým poměrem m/z a z tohoto důvodu je nejčastěji využívána ve spojení s analyzátozem doby lety (TOF, z angl. Time of Flight) Tato metoda má vysokou citlivost a rozlišení. Naopak nevýhodou je pouze obtížné online propojení s extrakčními technikami. MALDI ionizace je dnes velmi často využívána pro identifikaci mikrobiologických vzorků [40][41][42].

### 3.9.2 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor je hlavní částí hmotnostního spektrometru. Ionty přicházející z iontového zdroje jsou v hmotnostním analyzátoru selektovány na základě m/z a postupně uvolňovány k detekci. Vybrané ionty mohou být selektovány a dále fragmentovány. To se děje při tandemové hmotnostní spektrometrii (dále jen MS<sup>2</sup>). Nejdůležitějšími parametry hmotnostního analyzátoru jsou přesnost, rozlišení, citlivost, hmotnostní rozsah, lineární dynamické rozmezí, rychlost sběru dat, možnost provedení MS<sup>2</sup> a cena [19][43].



## Analyzátor doby letu

Analyzátor doby letu ať už samotný nebo v hybridním spojení Q-Q-TOF (kvadrupól-kvadrupól-TOF) funguje na základě měření doby letu urychleného iontu po předem definované vzdálenosti v evakuované trubici. Akcelerace iontu je zajištěna elektrickým polem. Iont s menší hodnotou  $m/z$  bude urychlen více, a proto bude jeho doba letu kratší. Zdokonalením tohoto typu analyzátoru (především zvýšením rozlišení), bylo skutečně zavedením reflektoru. To je oblast elektrického pole, které je schopné otočit ionty na své dráze a zkorigovat různé kinetické energie iontů se stejným  $m/z$ . Primárně je tento analyzátor spojován s ionizační technikou MALDI, a to z důvodu nutnosti pulzního urychlování iontů, ale kombinací různých typů analyzátoru je možné zajistit rozdělení iontů na pulzy. Výhodou TOF analyzátorů je především rychlost sběru dat a nejvyšší hmotnostní rozmezí [43][44][45].

## Iontová past (IT, z angl. Ion trap)

3D iontová past a lineární iontová past fungují na základě zadržování iontů pomocí elektrického pole vytvořeného elektrodami. Změnou napětí dojde k postupnému vypuzování iontů do detektoru dle jejich  $m/z$ . Jelikož je možné ionty zde zadržet, nabízí se příležitost provést vícenásobnou fragmentaci ( $MS^n$ ). Iontové pasti mají nízké rozlišení a přesnost, ale disponují vysokou citlivostí. Největší výhodou především lineární iontové pasti je široké použití pro fragmentaci iontů a na rozdíl od 3D IT disponuje i výrazně vyšší kapacitou [41][43].

## Kvadrupól (Q, z angl. Quadrupole)

Skládá se ze čtyř kovových tyčí, na které je přivedeno vysokofrekvenční střídavé napětí. Zároveň na dvě sobě protilehlé tyče je vloženo stejnosměrné kladné napětí a na zbylé dvě protilehlé tyče záporné stejnosměrné napětí. Pro nastavené hodnoty napětí stejnosměrného a amplitudy střídavého napětí může kvadrupólem oscilovat a podélně procházet pouze iont o určité  $m/z$ , ostatní ionty kvadrupól axiálně opustí nebo ztratí náboj při kontaktu s některou s jeho tyčí. Změnou těchto parametrů se získá sken určitého rozmezí nebo hodnot  $m/z$ . Kvadrupól je běžný a dostupný analyzátor často používaný v kombinaci s jinými druhy nebo jako tzv. trojitý kvadrupól (QqQ). QqQ jsou

tři spojené kvadrupólové analyzátoři hojně využívané pro kvantifikaci. První část slouží k selekci iontu, ve druhé probíhá fragmentace a třetí analyzuje tyto fragmenty [40][41].

Iontová cyklotronová rezonance s Furierovou transformací (FT-ICR, z angl. Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance)

Cela ICR je umístěna v silném magnetickém poli. Ionty vpuštěné do cely rotují kolem středu magnetického pole. Frekvence této rotace indukuje proud v detekčních deskách a ten je Furierovou transformací převeden na hmotnostní spektrum. ICR má největší rozlišovací schopnost ze všech analyzátorů a je vhodný také pro  $MS^n$  analýzy. Nevýhodou je pomalý sběr dat a velmi vysoké náklady na pořízení a provoz [40][41].

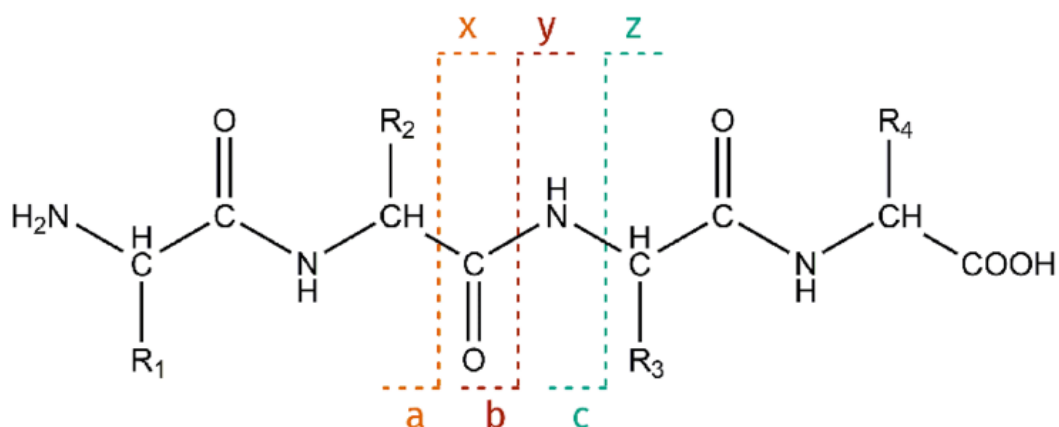
Harmonická orbitální past (orbitrap)

Orbitrap je tvořen vřetenovitou středovou a vnější elektrodou, na které je vloženo napětí. Ionty přicházející v pulzech ze zakřivené iontové pasti a oscilují kolem středové elektrody. Frekvence pohybu iontu indukuje proud na vnějších elektrodách. Tento proud je opět možné Furierovou transformací převést na hmotnosti spektrum. Orbitrap disponuje velmi dobrou rozlišovací schopností, přesností a rychlejším sběrem dat než ICR, navíc využívá elektrostatické pole místo magnetického, což má za následek výrazně menší pořizovací a provozní náklady [40][41][43][46]. V současné době patří hmotnostní spektrometry s orbitrapem k nejvíce používaným přístrojům v oblasti analýzy proteinů a peptidů.

### 3.9.3 Fragmentace peptidů

Pro získání  $MS^2$  spekter je nutné provést fragmentaci prekurzorů dříve detekovaných při běžném MS skenu. Tento proces probíhá nejčastěji v kvadrupólu, iontové pasti nebo samostatné fragmentační cele, která konstrukcí připomíná kvadrupól. K vlastní fragmentaci dochází dodáním energie například srážkou s nenabitými atomy nebo molekulami, absorpcí energie záření, nebo záchytem elektronu. Volba typu a energie fragmentace závisí na velikosti peptidu a počtu jeho nábojů. Nejběžnějšími typy fragmentace jsou kolizně indukovaná disociace (CID, z angl. Collision-Induced Dissociation). Při CID se urychlené látky srazí s atomy nebo molekulami plynů (He, Ar,  $N_2$ ). Srážka vyvolá rozpad látek na fragmenty. Dalším typem fragmentace je

vysokoenergetická disociace v C-pasti (HCD, z angl. High-energy C-trap Dissociation), která je obměnou CID. Fragmentace zde probíhá v samostatné zakřivné cele. Disociace spojená s přenosem elektronu (ETD, z angl. Electron Transfer Dissociation) je dalším typem fragmentace. Při ETD dochází k přenosu elektronu, pocházejícím z látky s volným radikálem, na analyt. Při CID a HCD vznikají nejvíce fragmenty typu b- a y-, to znamená rozdělení peptidu v peptidové vazbě. Při ETD převažují fragmenty c- a z-, tedy fragmentace za amidovou skupinou [47][48].



**Obrázek č. 5.** Označení typů fragmentů peptidů (převzato z [49])

## Hmotnostní spektrum

Při analýze jednoho analytu nezávisle na čase je na ose x hmotnostního spektra hodnota  $m/z$  a relativní intenzita iontů o určitém  $m/z$  tvoří osu y. Při spojení LC/MS dostaneme záznam, který je tvořen celkovým počtem iontů detekovaných v daném okamžiku. V každém skenovacím cyklu je pak obsaženo hmotnostní spektrum s intenzitami iontů. Při každé analýze je získáno velké množství dat. Data jsou pak zpracovávána pomocí různých softwarů s přihlédnutím na povahu a cíle analýzy.

## 4 Praktická část

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Použité chemikálie

Voda (pro LC/UV) – Ultračistá voda z přístroje Milli-Q (Merck KGaA, Německo)

Voda (pro LC/MS) – LC-MS Grade (Merck KGaA, Německo)

Acetonitril– LC-MS Grade (VWR International, USA a Honeywell, USA)

Trifluoroctová kyselina –  $\geq 99\%$  LC-MS Ultra (Honeywell, USA)

Kyselina mravenčí – 98-100 % for LC-MS (Merck KGaA, Německo)

Ethylacetát -  $\geq 99,7\%$  for LC-MS (Honeywell, USA)

Jodacetamid -  $\geq 99\%$  (NMR) (Sigma-Aldrich, USA)

Tetraethylamonium bikarbonátový pufr (TEAB) - 1.0 M, pH  $8.5 \pm 0.1$  (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrochlorid tris(2-karboxyethyl)fosfinu -  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrochlorid L-cysteinu – bezvodý -  $\geq 99.0\%$  (RT) (Sigma-Aldrich, USA)

Benzonáza -  $\geq 250$  units/ $\mu\text{L}$ ,  $\geq 90\%$  (SDS-PAGE) (Sigma-Aldrich, USA)

SOLu-Trypsin dimethylovaný - Proteomics Grade (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrochlorid guanidinu - 8 M, pH 8.5 (Sigma-Aldrich, USA)

InfinityLab deactivator additive (Agilent Technologies, USA)

Sada iRT a Alberta peptidů (Shanghai Royobiotech Co., Čína)

#### 4.1.2 Použité přístroje

UHPLC systém Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, USA)

UHPLC systém Vanquish Horizon spojný s Q Exactive HF-X (Thermo Scientific, USA), systém využívá dusík jako zmlžovací, sušící, protiproudový a kolizní plyn.

#### 4.1.3 Použité kolony a předkolony

ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub>, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 150 mm (Waters, USA)

ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub>, 130Å, 1.7 µm, 1 mm × 150 mm (Waters, USA)

ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub> VanGuard, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 5 mm (Waters, USA)

#### 4.1.4 Použité kapiláry kolona-deketer

SST Capillary Viper 100 µm × 250 mm (Thermo Scientific, USA) u LC/UV

nanoViper 50 µm × 150 mm Thermo Scientific, USA) u LC/MS

#### 4.1.5 Použitý software

Chromeleon™ Chromatography Data System verze 7.3 (Thermo Scientific)

Skyline verze 21.1 (MacCoss Lab Software, Washington University)

FragPipe verze 16.0 (Nesvilab, University of Michigan, Medical School)

### 4.2 Experimentální část

#### 4.2.1 Příprava směsí iRT a Alberta peptidů

Pro zhodnocení vlivu množství modifikátoru ovlivňujícího pH mobilní fáze na separaci peptidů byly zvoleny iRT a Alberta směsi peptidů. Koncentrace peptidů byla zvolena tak, aby se jejich intenzity při detekci příliš nelišily. Vzorek byl připraven z roztoků peptidů Dr. J. Lenča. Výsledná směs iRT peptidů obsahovala 5 peptidů a bylo připraveno 800 µl této směsi dle tabulky č. 1. Výsledná směs Alberta peptidů obsahovala 4 peptidy a bylo připraveno 600 µl této směsi dle tabulky č. 2. Obě směsi byly převedeny do HPLC vialek, promíchány a mezi analýzami byly uchovávány zmražené.

**Tabulka č. 1.** Příprava směsi iRT peptidů

Peptid	Sekvence	Koncentrace	Množství v $\mu$ l
1a	GAGSSEPVTGLDAK	87pmol/ $\mu$ l	20
2a	YILAGVENSK	112pmol/ $\mu$ l	10
3a	TPVITGAPYEYR	84pmol/ $\mu$ l	10
4a	ADVTPADFSEWSK	86pmol/ $\mu$ l	10
5a	GTFIIDPAAVIR	99pmol/ $\mu$ l	20
Voda			720

**Tabulka č. 2.** Příprava směsi Alberta peptidů

Peptid	Sekvence	Koncentrace (pmol/ $\mu$ l)	Množství ( $\mu$ l)
1b	acetyl-GGGLGGAGGLKG	104	15
2b	acetyl-KYGLGGAGGLKG	89	10
3b	acetyl-GGAVKALKGLKG	106	15
4b	acetyl-KYALKALKGLKG	89	20
Voda			540

#### 4.2.2 Příprava komplexního vzorku peptidů z lyzátu bakterie *F. turalensis*

Příprava reakčních roztoků

Jako vzorek pro přípravu tryptických peptidů byl vybrán celobuněčný lyzát živého vakcinačního kmene bakterie *F. turalensis*. Pro přípravu vzorku bylo nutné připravit roztoky TCEP, IAM a cysteinu. Tyto chemikálie byly dostupné v pevné formě, jejich rozpouštění proběhlo v den použití.

Pro přípravu roztoku redukčního činidla TCEP ve vodě o koncentraci 50 mM bylo naváženo 5,32 mg substance o čistotě  $\geq 98\%$  a rozpuštěno v 371  $\mu$ l vody.

Pro přípravu roztoku IAM ve vodě o koncentraci 150 mM bylo naváženo 6,37 mg substance o čistotě  $\geq 99\%$  a rozpuštěno v 230  $\mu$ l vody.

Pro přípravu roztoku cysteinu ve vodě o koncentraci 200 mM bylo naváženo 5,85 mg substance o čistotě  $\geq 99\%$  a rozpuštěno v 186  $\mu$ l vody.

## Příprava tryptických peptidů z lyzátu bakterie *F.turalensis*

Vzorek byl připraven z lyzátu vakcinačního kmene *F. turalensis* o koncentraci 7,7 µg/µl v 1% roztoku deoxycholátu sodného od Dr. J. Lenča.

Z roztátého lyzátu bylo odebráno 130 µl do mikrozkušavky. Byl přidán 1 µl benzonázy ( $\geq 250$  units/µL,  $\geq 90$  %) pro rozštěpení nukleových kyselin. Došlo k promísení a následně inkubaci po dobu 30 minut při 37 °C. Následně bylo upraveno pH přidáním 50 µl 1M pufru TEAB o pH 8,5. Přidáním 33,3 µl 50 mM roztoku TCEP, promícháním a následnou inkubací po dobu 60 minut při 37 °C bylo dosaženo redukce disulfidových můstků. Volné thiolové skupiny byly zablokovány reakcí s 37,0 µl 150 mM roztoku IAM po dobu 30 minut za tmy a pokojové teploty. Pro zreagování zbylého IAM bylo přidáno 41,2 µl 200 mM roztoku cysteinu a opět inkubováno ve tmě po dobu 30 minut. Pro samotné štěpní bylo přidáno množství roztoku modifikovaného trypsinu odpovídající 20 µg enzymu. Inkubace s enzymem probíhala 16 hodin v thermomixeru při 38 °C a 1200 rpm. Po inkubaci byl vysrážen přítomný deoxycholát přidáním 20 µl 10% roztoku TFA. Následně byla provedena extrakce kapalina-kapalina přidáním 200 µl 8M guanidin hydrochloridu a 500 µl ethylacetátu. Byla odstraněna vrchní vrstva ethylacetátu a následně bylo opět přidáno stejné množství. Tento krok byl opakován 3x, dohromady tak byly použity 2 ml ethylacetátu. Zbylá vrstva ethylacetátu byla odpařena na vakuové centrifuze. Dále proběhla SPE pomocí kitu Pierce Peptide Desalting Spin columns. Byly použity dvě kolony. Aktivace kolon proběhla přidáním 300 µl ACN do každé a odstředěním při 5000 g po dobu 1 minuty. Tento krok se opakoval. Ekvilibrace kolon byla provedena přidáním 300 µl 0,1% TFA a následným odstředěním při 3000 g po dobu 1 minuty. Tento krok se opět opakoval. Následně došlo k přidání 300 µl vzorku a jeho odstředění při 3000 g po dobu 5 minut. Dále byly kolony promyty 300 µl 0,1% TFA a odstředěny při 3000 g po dobu 5 minut. Tento krok se opakoval 3x. Eluce peptidů proběhla přidávkem 300 µl 50% ACN při 3000 g po dobu 2 minut. Krok se opakoval ještě jednou. ACN byl následně odpařen a peptidy byly rekonstituovány do 0,5 ml 0,1% TFA. Pro rozpuštění peptidů byla provedena inkubace v thermomixeru při 1400 rpm a 20 °C a ultrasonikace ve vodní lázni. Vzorek o koncentraci 2 µg/µl digestu *F. tularensis* byl nakonec převeden do HPLC vialky.

#### 4.2.3 Příprava mobilních fází pro LC/UV analýzy

- Mobilní fáze A: voda (z Milli-Q) + 0,10 % (0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01 a 0,00 %) FA

K přípravě 250 ml roztoku mobilní fáze, o snižujících se koncentracích FA, bylo přidáno do odměrné baňky s objemem 250 ml 250  $\mu$ l (respektive 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25 a 0  $\mu$ l) FA a doplněno vodou po rysku.

- Mobilní fáze B: ACN + 0,10 % (0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01 a 0,00 %) FA

K přípravě 100 ml roztoku mobilní fáze, o snižujících se koncentracích FA, bylo přidáno do odměrné baňky s objemem 100 ml 100  $\mu$ l (respektive 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 a 0  $\mu$ l) FA a doplněno acetonitrilem po rysku.

Roztoky mobilních fází byly připraveny vždy ve stejných odměrných baňkách po jejich vypláchnutí daným rozpouštědlem a vysušení.

Pro jednotlivé mobilní fáze A byla provedena potenciometrická měření pH (tabulka č. 3).

**Tabulka č. 3.** Hodnoty pH mobilních fází A při teplotě 25,7 °C

<b>Koncentrace FA (%)</b>	<b>pH</b>
0,10	2,58
0,09	2,61
0,08	2,64
0,07	2,68
0,06	2,72
0,05	2,76
0,04	2,83
0,03	2,88
0,02	3,01
0,01	3,20

#### 4.2.4 Příprava mobilních fází pro analýzy LC/MS

- Mobilní fáze A: voda (LC-MS Grade) + 0,10 % (0,05; 0,03 a 0,02 %) FA; mimo analýzy tryptických peptidů obsahovaly mobilní fáze také 0,1 % InfinityLab deactivator additive



K přípravě 250 ml roztoku mobilní fáze, o snižujících se koncentracích organického modifikátoru, bylo přidáno do odměrné baňky s objemem 250 ml 250  $\mu$ l (respektive 125, 75 a 50  $\mu$ l) FA. Vyjma analýz tryptických peptidů bylo přidáno 250  $\mu$ l InfinityLab deactivator additive k potlačení chalatačních vlastností některých peptidů. Následně došlo k doplnění vody po rysku.

- Mobilní fáze B: ACN + 0,10 % (0,05; 0,03 a 0,02 %) FA; mimo analýzy tryptických peptidů obsahovaly mobilní fáze také 0,1 % InfinityLab deactivator additive

K přípravě 100 ml roztoku mobilní fáze, o snižujících se koncentracích organického modifikátoru, bylo přidáno do odměrné baňky s objemem 100 ml 100  $\mu$ l (respektive 50, 30 a 20  $\mu$ l) FA. Vyjma analýz tryptických peptidů bylo přidáno 100  $\mu$ l InfinityLab deactivator additive. Následně došlo k doplnění acetonitrilem po rysku.

Roztoky mobilních fází byly připraveny vždy ve stejných odměrných baňkách po jejich vypláchnutí daným rozpouštědlem a vysušení.

#### 4.2.5 Ověření vlivu organického modifikátoru na separaci iRT a Alberta peptidů při LC/UV

Cílem této části bylo zjistit míru ovlivnění separace peptidů množstvím kyseliny mravenčí v mobilní fázi, zejména pak vliv na šířku a symetrii píků. Analýzy byly provedeny pomocí UHPLC systému Dionex UltiMate 3000. Analýzy byly provedeny s použitím kyseliny mravenčí o koncentracích 0,10; 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01 a 0,00 % v mobilní fázi. Po výměně mobilních fází bylo vždy provedeno promývání pump s odtokem do opadu po dobu 300 s. při průtoku 8 ml/min při podílu mobilních fází A a B 50:50. Následně byl upraven poměr a průtok mobilních fází do počátečních hodnot gradientu a proběhla ekvilibrace kolony po dobu 20 minut. Gradient použitý při separacích je znázorněn v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4.** Popis gradientu metody při separaci iRT a Alberta peptidů pomocí LC/UV

<b>Čas (min)</b>	<b>Průtok (ml/min)</b>	<b>B%</b>
0,0	0,250	1
12,0	0,250	45
13,2	0,250	45
13,6	0,250	1
28,0	0,250	1

Separace vzorků byly prováděny v pořadí: prázdný vzorek (mobilní fáze A), iRT peptidy, Alberta peptidy. Nástřiky vzorků byly 1, 4 a 3  $\mu$ l respektive. Každý vzorek byl analyzován třikrát, pro jednu koncentrační hladinu tak bylo provedeno devět nástřiků. Analýzy byly uskutečněny na 2.1 mm  $\times$  150 mm koloně ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub>, 130Å, 1.7  $\mu$ m, při teplotě kolonového prostoru 60 °C. Pro detekci byl použit UV detektor, nastavený na vlnovou délku 214 a 280 nm. Získaná data byly zpracována v programu Chromeleon.

#### 4.2.6 Testování změny intenzity píků iRT peptidů při LC/MS analýze pro vybrané koncentrace organických modifikátorů

Pro analýzy pomocí systému kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPLC systém Vanquish Horizon spojený s Q Exactive HF-X) byly vybrány pouze iRT peptidy, z důvodu absence změn ve chvostování Alberta peptidů při nižších koncentracích FA. Cílem těchto analýz bylo určení změn intenzit píků zapříčiněné sníženou koncentrací FA. Pro analýzy byly vybrány koncentrace 0,10; 0,05; 0,03 a 0,02 % FA v mobilních fázích. Jednotlivá měření dvou nejbližších koncentrací probíhala vždy v rámci jednoho dne bezprostředně po obě. Příprava systému na novou mobilní fázi probíhala stejně jako při LC/UV. Gradient metody v porovnání s LC/UV metodou byl stejný, pouze byla zkrácena doba pro ekvilibraci kolony (tabulka č. 5).

**Tabulka č. 5.** Popis gradientu metody při separaci iRT peptidů na LC/MS

Čas (min)	Průtok (ml/min)	B%
0,0	0,250	1
12,0	0,250	45
13,2	0,250	45
13,6	0,250	1
24,0	0,250	1

Separace vzorků byly prováděny v pořadí: prázdný vzorek (mobilní fáze A), iRT peptidy. Nástřiky vzorků byly 0,1 a 0,4  $\mu\text{l}$  respektive. Na každé koncentrační hladině byly provedeny tři nástřiky prázdného vzorku a pět nástřiků iRT peptidů. Analýzy byly uskutečněny na 2.1 mm  $\times$  150 mm koloně ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub>, 130Å, 1.7  $\mu\text{m}$  při teplotě kolonového prostoru 60 °C. Pro detekci byl použit hmotnostní spektrometr operující v pozitivním módu. Kapilára iontového zdroje HESI-II byla přehřátá na 275 °C a bylo na ni přivedeno napětí 3,5 kV. Zmlžovací plyn o průtoku 25 arbitrárních jednotek a sušící plyn přehřátý na 325 °C o průtoku 10 arbitrárních jednotek zajistili nebulizaci a odpaření mobilní fáze. Také byl přiváděn protiproud plynu o průtoku 2 arbitrárních jednotek pro minimalizaci kontaminace. Maximální povolený počet nábojů zachycených v orbitrapu při skenu byl 1 000 000 a maximální čas pro dosažení tohoto počtu nábojů činil 60 ms. Skenovací rozmezí pro MS spektra bylo 350-1500 m/z s rozlišením 60000 odečítaném při 200 m/z. Vyhodnocení dat probíhalo v programu Skyline [50].

#### 4.2.7 Analýza tryptických peptidů z celobuněčného lyzátu *F. turalensis*

Analýza tohoto vzorku proběhla na kapalinovém chromatografu spojeném s hmotnostní detekcí (UHPLC systém Vanquish Horizon spojený s Q Exactive HF-X). Byly provedeny dva experimenty. První experiment probíhal s mobilními fázemi s 0,1 % FA a 0,03 % FA a následně druhý s 0,1 % FA a 0,02 % FA. Pro každou koncentrační hladinu FA v experimentu byly provedeny 3 nástřiky vzorku o objemu 3  $\mu\text{l}$ , před kterými byly provedeny 3 nástřiky prázdného vzorku (mobilní fáze A o objemu 1  $\mu\text{l}$ ). Příprava systému na novou mobilní fázi probíhalo stejně jako v přechozích analýzách. Pro separace byla použita gradientová eluce s gradientem dle tabulky č. 6.

**Tabulka č. 6.** Popis gradientu analýzy tryptických peptidů z lyzátu bakterie *F. turalensis*

Čas (min)	Průtok (ml/min)	B%
0,00	0,050	0,5
30,00	0,050	42,5
30,25	0,050	80
32,50	0,050	80
33,00	0,050	0,5
60,00	0,050	0,5

Analýzy byly uskutečněny na 1.0 mm × 150 mm koloně ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub>, 130Å, s 1.7 μm s 2.1 mm × 5 mm předkolonou ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub> VanGuard, 130Å, 1.7 μm, při teplotě kolonového prostoru 60 °C. Pro detekci byl použit hmotnostní spektrometr operující v pozitivním módu. Kapilára iontového zdroje HESI-II byla předehřátá na 275 °C a bylo na ni přivedeno napětí 3,5 kV. Zmlžovací plyn o průtoku 25 arbitrárních jednotek a sušící plyn předehřátý na 325 °C o průtoku 10 arbitrárních jednotek zajistili nebulizaci a odpaření mobilní fáze. Také byl přiváděn protiproud plynu o průtoku 2 arbitrárních jednotek pro minimalizaci kontaminace. Skenovací rozmezí pro MS<sup>1</sup> spektra odpovídalo 350-1500 m/z s rozlišením 60000 odečítaném při 200 m/z. Maximální počet nábojů zachycených v orbitrapu při MS<sup>1</sup> skenu byl 3 000 000 a maximální čas pro dosažení tohoto počtu nábojů činil 110 ms. Pro analýzu a sběr fragmentačních spekter byl použit mód závislý na informacích. Vybrané prekurzory měly náboj 2<sup>+</sup> až 5<sup>+</sup> a jejich intenzita byla vyšší než 100 000. Izolační okno bylo 1,8 m/z s posunem o 0,3 m/z. K fragmentaci byla použita normalizovaná kolizní energie 27. MS<sup>2</sup> spektra byla zaznamenána v dynamickém rozmezí m/z při rozlišení 15 000. Maximální počet nábojů v analyzátoru byl 200 000 a maximální čas pro dosažení tohoto počtu nábojů činil 50 ms. Prekurzory byly vyloučeny z opětovné fragmentace po dobu 15 sekund. Maximální počet prekurzorů vybraných z jednoho MS skenu byl 15.

Získána data byla prohledávána algoritmem MSFragger integrovaným do programu FragPipe [51]. Pro identifikaci byly použity proteinové sekvence bakterie *F. turalensis* ve formátu FASTA stažené z databáze Uniprot (UP000076142). Rozmezí hmotnosti prekurzoru bylo nastaveno na ± 25 ppm. Rozmezí hmotnosti fragmentů bylo nastaveno na ± 20 ppm. Typ vzniklých produktových iontů byl nastaven na b- a y-, což jsou nejvíce zastoupené fragmenty u kolizně indukované disociace. Byl zapnut algoritmus

k odfiltrování izotopů a neutrálních ztrát. Štěpení proteinů bylo nastaveno na sekvenční specifitu trypsinu, který štěpí za lysinem a argininem, pokud po těchto aminokyselinách nenásleduje prolin. Bylo povoleno jedno vynechané štěpné místo. Rozmezí velikosti peptidů bylo nastaveno na 6 až 50 aminokyselin. Oxidace methioninu, tvorba pyroglutamátu na N konci a deamidace asparaginu byly nastaveny jako možné modifikace, přičemž byly povoleny maximálně 3 modifikace jednoho peptidu. Fixní modifikace cysteinu byla nastavena na karbamidomethylaci.

## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Vliv FA na separaci standardů peptidů při LC/UV

Tyto analýzy měly za úkol přinést výsledky o parametrech separace peptidů v odlišných koncentracích FA. Jako vzorky byly použity směsi iRT a Alberta peptidů. Pro počáteční analýzu byla použita standardní koncentrace 0,1 % FA s cílem zjistit, zdali použitá metoda separace zajistí dostatečnou selektivitu a obdobnou intenzitu pro jednotlivé peptidy.

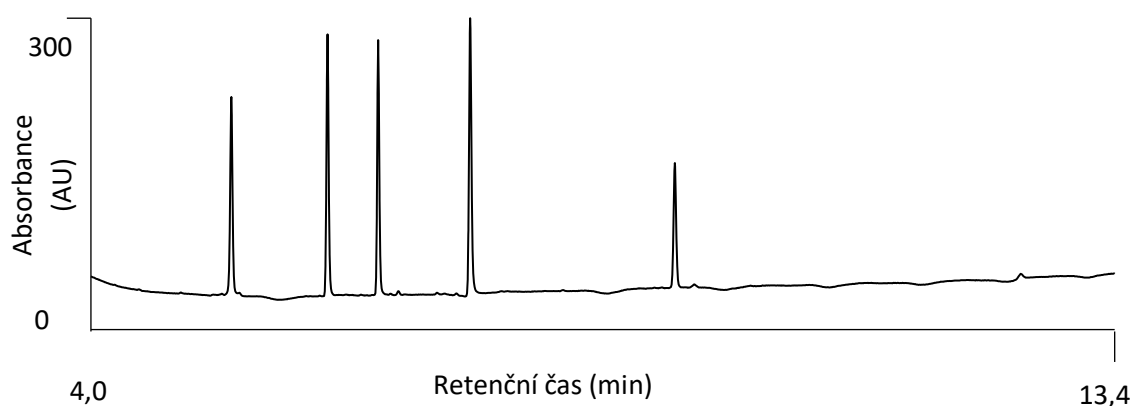
Jako klíčové parametry pro vyhodnocování analýz byly určeny šířka píku v polovině jeho výšky ( $W_{50\%}$ ) a chvostování píku (tailing factor). Tailing factor odpovídá vzorci  $W_{5\%}/(2 \cdot LW_{5\%})$ , tzn. šířka píku v 5 % jeho výšky dělena dvojnásobkem levé poloviny šířky píku v 5 % jeho výšky [19]. Tyto vlastnosti jsou důležité pro úzké a vysoké píky. Dále byla získána také data o retenčním čase a jednotlivých peptidů. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulkách č. 7 a 8.

Peptidy vybrané do jednotlivých sérií disponují odlišnými vlastnostmi na základě jejich složení. Důležitým aspektem z pohledu separace peptidů je kromě hydrofobicity i velikost náboje na peptidu. Tato vlastnost závisí na pH prostředí a typech aminokyselin přítomných v peptidu. Při pH odpovídajícímu izoelektrickému bodu peptidu jsou zastoupeny protonované a deprotonované skupiny stejnou měrou. Při pH nižším než je izoelektrický bod je kyselá karboxylová skupina pravděpodobně nedisociovaná, a naopak je vyšší pravděpodobnost protonace bazické amino skupiny. V takovém případě je tedy výsledný náboj kladný.

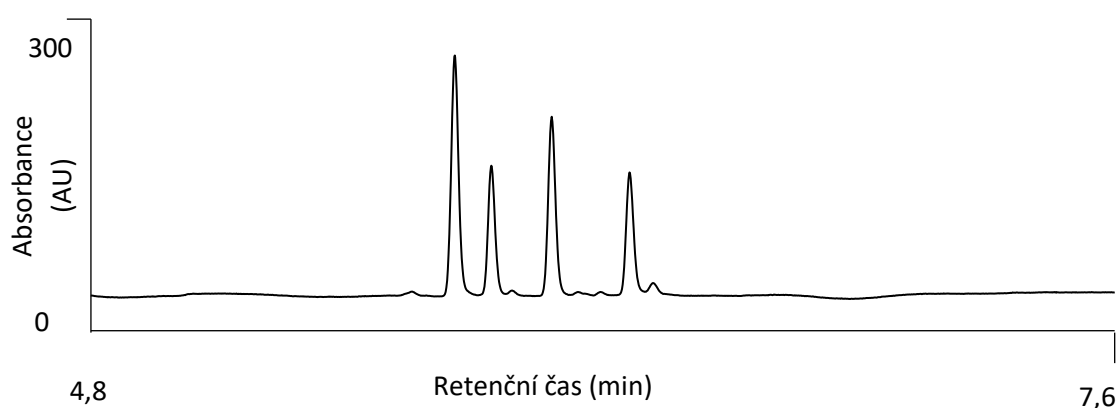
IRT peptidy obsahují vždy pouze jednu bazickou aminokyselinou, lysin nebo arginin. Tato bazická aminokyselina je vyvážena u peptidů 2a, 3a a 5a jednou kyselou aminoskupinou, glutamovou kyselinou nebo asparagovou kyselinou. U peptidů 1a a 4a jsou přítomny 2, a respektive 3 kyselé aminokyseliny. Směs Alberta peptidů je zaměřena na peptidy s bazickými aminokyselinami. Navíc je jejich méně bazická počáteční aminoskupina acetylována. To znamená že k jejich izoelektrickému bodu přispívají pouze silně bazické aminoskupiny lysinu. Peptid 1b disponuje pouze jednou aminokyselinou s nabitým postranním řetězcem (kladně nabitý lysin), ale jelikož jsou peptidy acetylovány na N-

konci, výsledná hodnota náboje je pouze mírně nad hodnotou 1, to je způsobeno vlivem volné karboxylové skupiny na C-konci. U peptidů 2b, 3b a 4b pak roste množství lysinu vždy o jednu aminokyselinu v tomto pořadí.

Při počáteční koncentraci 0,1 % FA byly vyhodnocované parametry píků srovnatelné nezávisle na povaze separovaných peptidů. Směs iRT peptidů byla eluována v pozdějších časech a dosáhla lepšího rozlišení píků (R1,2) v porovnání se Alberta směsí. Nejnižší hodnoty rozlišení byly mezi píky 1b a 2b ( $R_{1b,2b}=2,8$ ). Rozlišení v této koncentrační hladině FA bylo dostatečné. S vědomím, že běžná koncentrace FA přinesla uspokojivé výsledky bylo nyní možné pokračovat ve snižování jejího množství v mobilní fázi.



**Obrázek č. 6.** Chromatogram analýzy směsi iRT peptidů s mobilními fázemi s 0,10 % FA



**Obrázek č. 7.** Chromatogram analýzy směsi Alberta peptidů s mobilními fázemi s 0,10 % FA

**Tabulka č. 7.** Výsledky analýzy směsi iRT peptidů s mobilními fázemi s obsahem 0,10 %

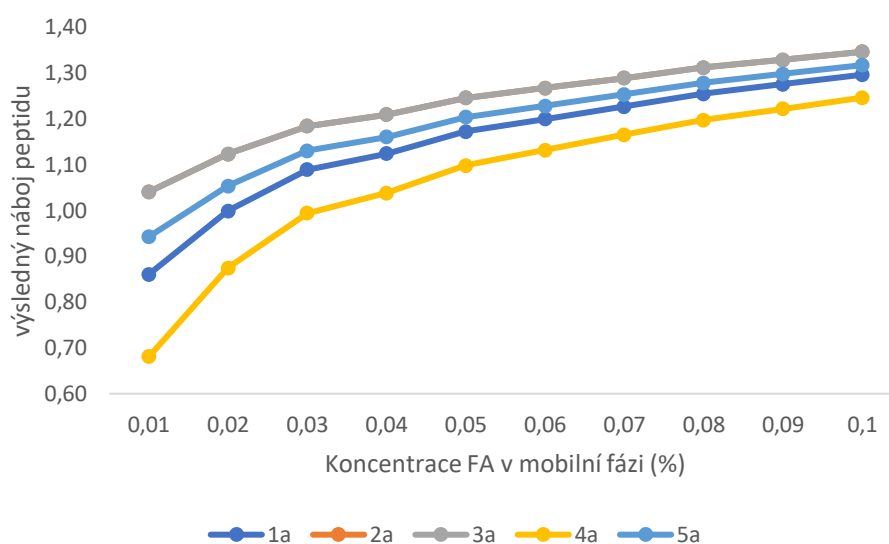
FA

Číslo píku	W <sub>50%</sub> (min)	Faktor chvostování	Retenční čas (min)
1a	0,023	1,01	5,26
2a	0,022	1,08	6,10
3a	0,021	1,12	6,58
4a	0,023	1,17	7,44
5a	0,026	1,03	9,26

**Tabulka č. 8.** Výsledky analýzy směsi Alberta peptidů s mobilními fázemi s obsahem

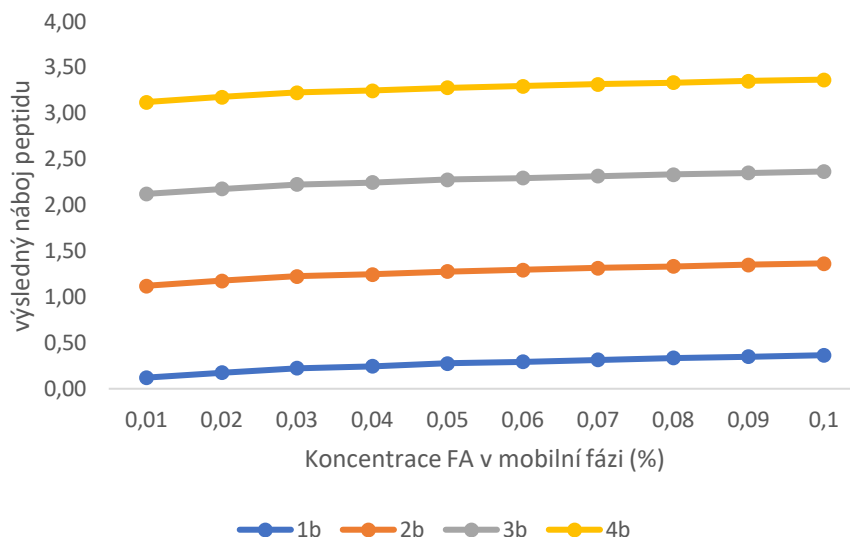
0,10 % FA

Číslo píku	W <sub>50%</sub> (min)	Faktor chvostování	Retenční čas (min)
1b	0,0223	1,06	5,75
2b	0,0205	1,13	5,87
3b	0,0219	1,09	6,00
4b	0,0222	1,20	6,27



**Obrázek č. 8.** Hodnoty výsledného náboje peptidu iRT peptidů v rozmezí pH mobilních fází. Koncentrace FA odpovídá pH mobilní fáze dle tabulky č. 3.





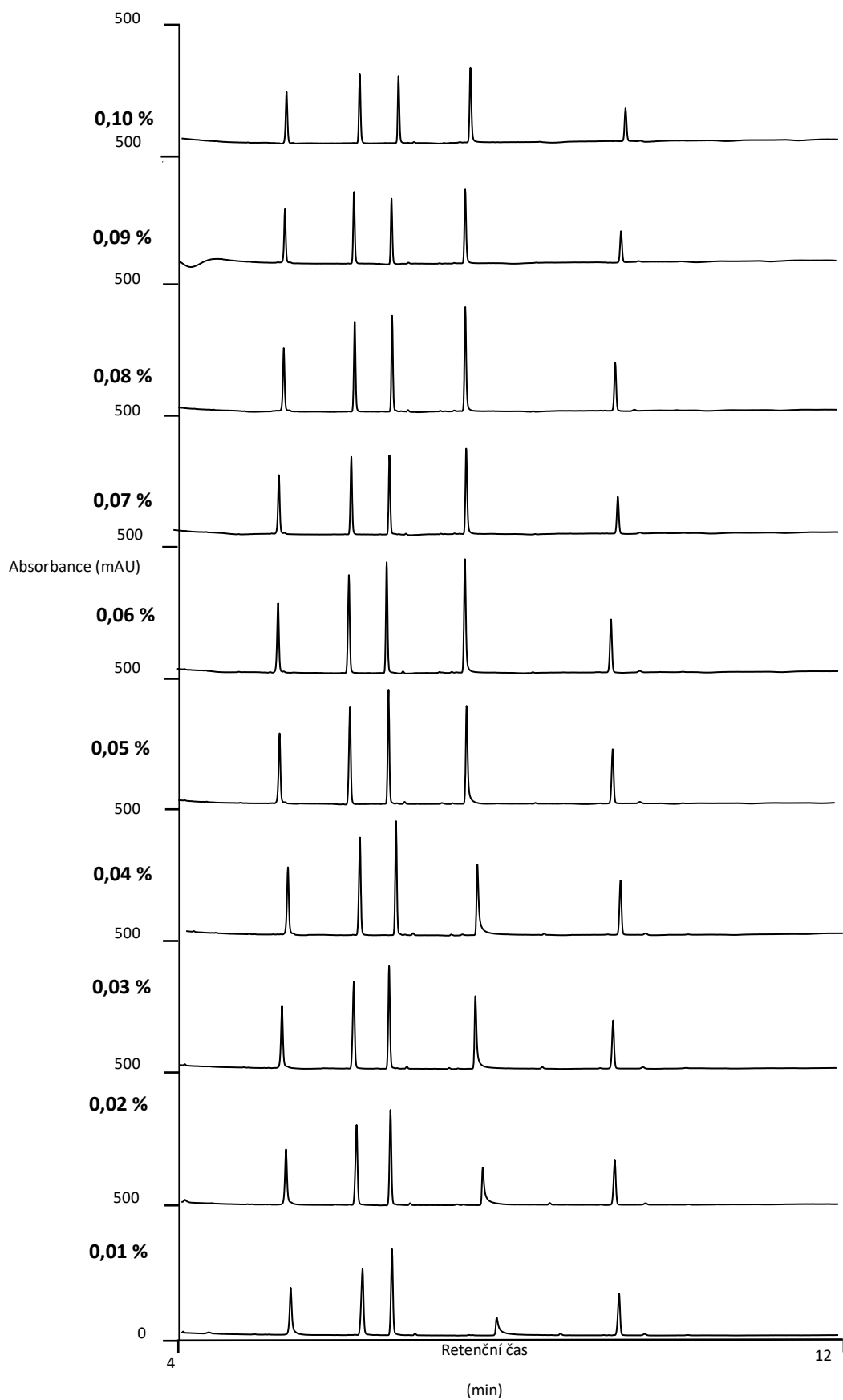
**Obrázek č. 9.** Hodnoty výsledného náboje peptidu **Alberta** peptidů v rozmezí pH mobilních fází. Koncentrace FA odpovídá pH mobilní fáze dle tabulky č. 3.

Hodnoty výsledného náboje použité obrázkách č. 8 a 9 byly získané dle rovnice  $Z = \sum_i N_i \frac{10^{pK_{ai}}}{10^{pH} + 10^{pK_{ai}}} - \sum_j N_j \frac{10^{pH}}{10^{pH} + 10^{pK_{aj}}}$ , kde Z odpovídá výslednému náboji peptidové sekvence.  $N_i$  představuje součet aminokyselin argininu, lysinu, histidinu a volného N-konce.  $pK_{ai}$  vyjadřuje hodnoty  $pK_a$  volného N-konce a aminoskupin argininu, lysinu a histidinu.  $N_j$  představuje součet glutamové kyseliny, asparagové kyseliny, tyrosinu, cysteinu a volného C-konce.  $pK_{aj}$  vyjadřuje hodnoty  $pK_a$  volného C-konce a aminoskupin glutamové kyseliny, asparagové kyseliny, tyrosinu a cysteinu. Hodnoty pH odpovídají hodnotám v tabulce č. 3. Použité  $pK_a$  hodnoty pro asparagovou kyselinu ( $pK_a = 3.86$ ), glutamovou kyselinu ( $pK_a = 4.25$ ), histidin ( $pK_a = 6.0$ ), lysin ( $pK_a = 10.53$ ), arginin ( $pK_a = 12.48$ ), tyrosin ( $pK_a = 10.07$ ), N-konec ( $pK_a = 9.69$ ) a C-konec ( $pK_a = 2.34$ ) pochází z [52], [53].

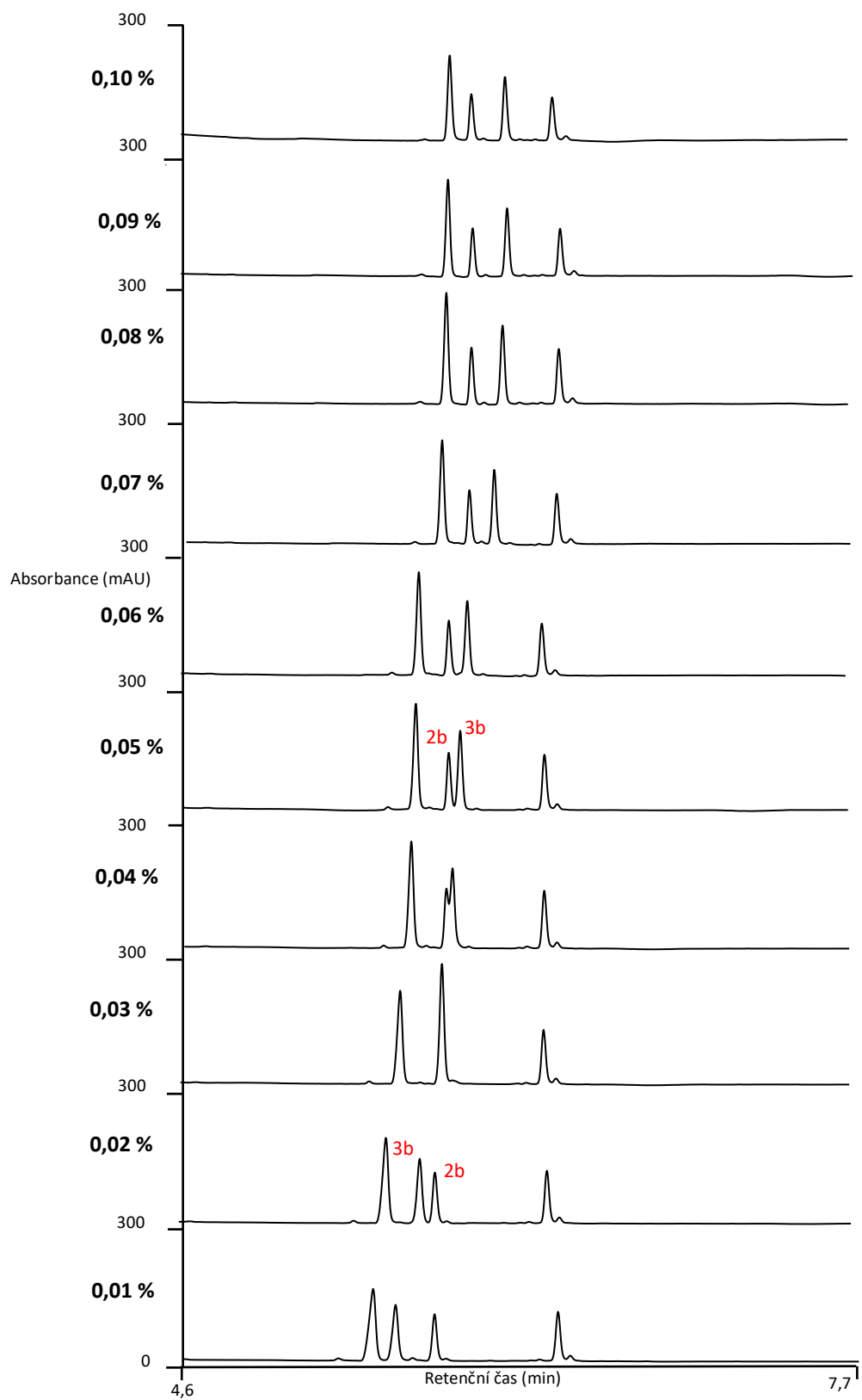
Změna výsledného náboje může mít vliv na retenci peptidů, zvláště při použití kolony s nabitým povrchem, kde jsou iontové interakce významnější než u typické  $C_{18}$  kolony.

Po provedení analýz se sníženým množstvím FA v mobilní fázi byla pozorována změna retenčních časů jednotlivých peptidů. Zatímco pro iRT směs byla změna retence obdobná napříč zastoupenými peptidy, u Alberta směsi docházelo k výrazným rozdílům mezi peptidy 2b a 3b. Důvodem může ztráta nebo zisk náboje vlivem nižšího pH. Se změnou náboje by se změnila i hydrofobicita peptidů a tím jejich retence. Změna retence

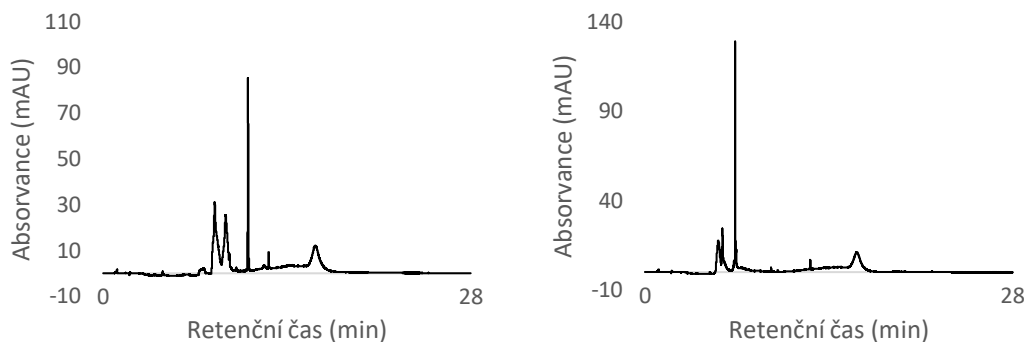
těchto peptidů zapříčinila koeluci píků těchto peptidů při koncentracích FA 0,05 – 0,03 %. Následně pak došlo k obrácení pořadí eluce těchto peptidů při koncentracích 0,02 a 0,01 % FA. Vlivem tohoto jevu nebylo možné určit všechny parametry píků pro tyto koncentrační hladiny. Separace bez použití FA dle očekávání nepřinesly dostatečné výsledky pro vyhodnocení všech peptidů.



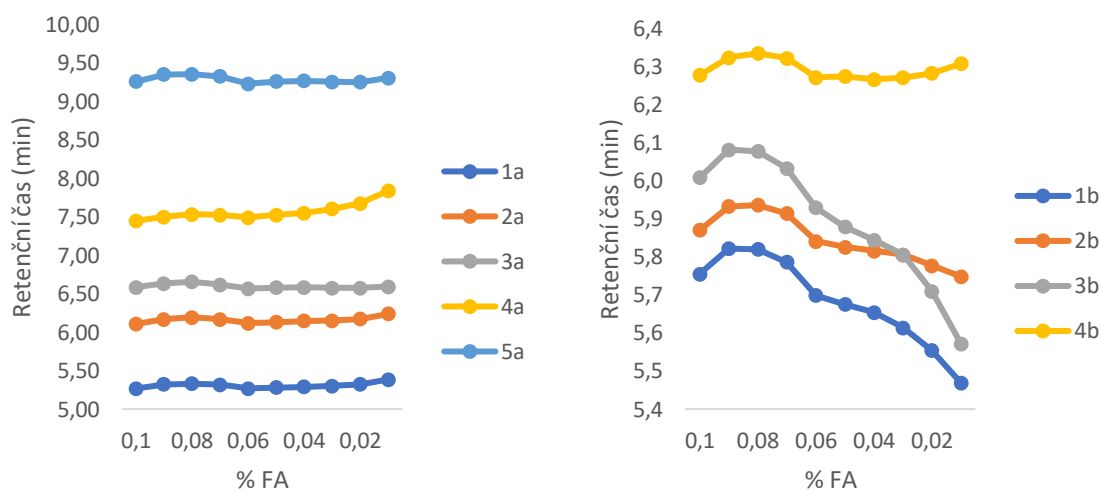
**Obrázek č. 10.** Chromatogramy analýz směsi iRTpeptidů s mobilními fázemi s obsahem 0,10  
– 0,01 % FA



**Obrázek č. 11.** Chromatogramy analýz směsi Alberta peptidů s mobilními fázemi s obsahem 0,10 – 0,01 % FA



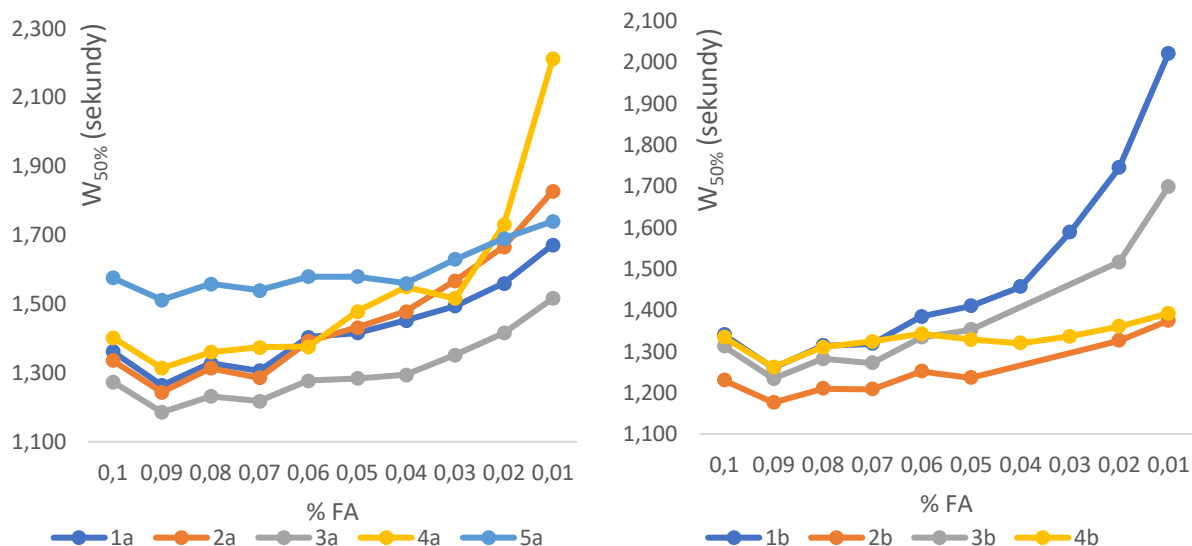
**Obrázek č. 12.** Chromatogramy analýz směsí iRT (vlevo) a Alberta peptidů (vpravo) s mobilními fázemi bez FA



**Obrázek č. 13.** Retenční časy peptidů iRT směsi (vlevo) a Alberta směsi (vpravo) pro separace s mobilními fázemi o koncentraci FA 0,10 – 0,01 % FA

Další vyhodnocovaným parametrem byla šířka píku v polovině jeho výšky. Změny tohoto parametru vypovídají o vlivu FA na kapacitu píku.

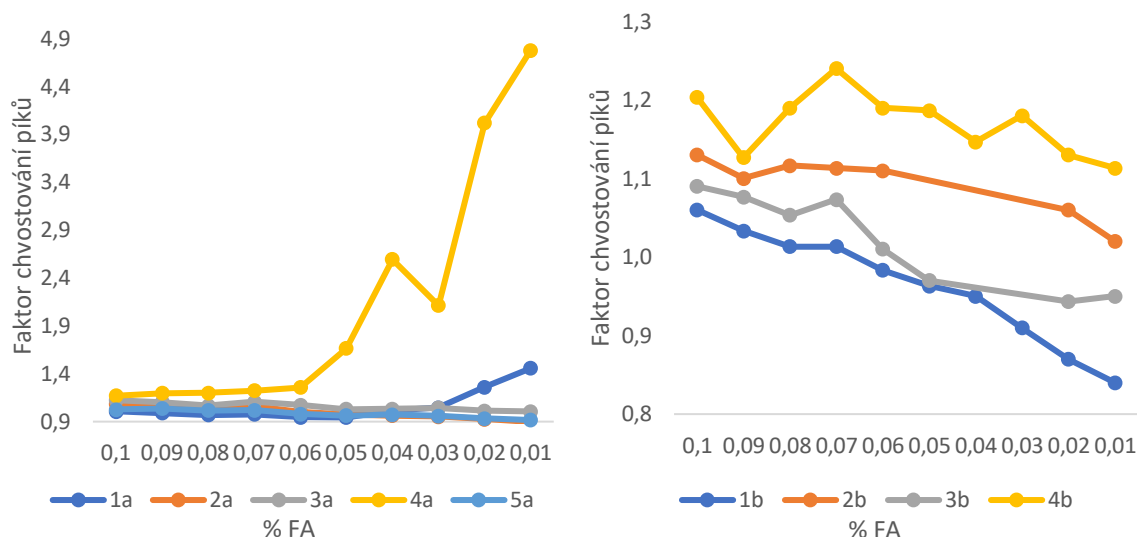
U obou směsí bylo možné pozorovat postupné rozšiřování píků s klesající koncentrací organického modifikátoru. Rozšíření bylo výrazné zejména pro pík 4a, způsobené pravděpodobně vlivem chelatace stop kovů na stacionární fázi kyselými aminokyselinami. Výrazné zvýšení hodnoty  $W_{50\%}$  bylo také pozorováno u píku peptidu 1b. Tento peptid byl nejméně hydrofilní, obsahoval pouze jeden lysin. Naproti tomu peptid 3b obsahující 3 lysiny má obdobný trend. Tyto dva peptidy se liší od dvou zbývajících nepřítomností aromatického jádra (zbývajících obsahují tyrosin). Tato vlastnost mohla být důvodem podobného chování u těchto dvou peptidů při analýze.



**Obrázek č. 14.** Šířka píků iRT peptidů (vlevo) a Alberta peptidů (vpravo) pro separace s mobilními fázemi o koncentraci FA 0,10 – 0,01 % FA. Chybějící hodnoty píků 2b a 3b, způsobené koelucí píků byla nahrazeny spojnicí hodnot na obou stranách.

Dalším hodnoceným parametrem bylo chvostování píků (tailing factor). Tento jev je častý při separacích látek s bazickými skupinami na běžných reverzních stacionárních fázích v kyselých podmínkách. Pro kolony s technologií nabitého povrchu bylo zjištěno zlepšení kapacity píků a snížila se důležitost použití silných iontově párových činidel jako je TFA [3]. Předpokládalo se, že pro snížené koncentrace FA bude faktor chvostování píků narůstat zejména u více bazických peptidů.

Naproti očekávání se zvýšené chvostování projevilo nejvíce u peptidů, které obsahovaly převahu aminokyselin se záporným nábojem, tedy kyselého povahy. Peptid 1a a zejména 4a vykazovaly výrazný nárůst chvostování v mobilních fázích s menším obsahem FA. Důvodem může být celkový náboj peptidu, který se v mobilní fázi s vyšším pH blíží k nule, u většiny ostatních peptidů pak v prostředí mobilní fáze vždy převažoval celkový kladný náboj. Podobné vlastnosti měl i peptid 1b, u kterého se zvýšené chvostování neobjevilo. Na rozdíl od peptidů 1a 4a neobsahoval aminokyseliny s kyselým postranním řetězcem, obsahoval pouze volnou karboxylovou skupinu na C-konci. Kyselé aminokyseliny mohou chelatovat stopy kovů na stacionární fázi a způsobovat tak chvostování píku. Alberta peptidy, u kterých převažují bazické vlastnosti se ukázaly být stabilní z pohledu tvaru píků. To poukazuje na výborný účinek CSH modifikace, jelikož právě separace bazických peptidů je na běžných RP problematická.



**Obrázek č. 15.** Faktor chvostování píků peptidů iRT směsi (vlevo) a Alberta směsi (vpravo) pro separace s mobilními fázemi o koncentraci FA 0,10 – 0,01 % FA. Chybějící hodnoty píků 2b a 3b, způsobené koelucí píků byly nahrazeny spojnicí hodnot na obou stranách.

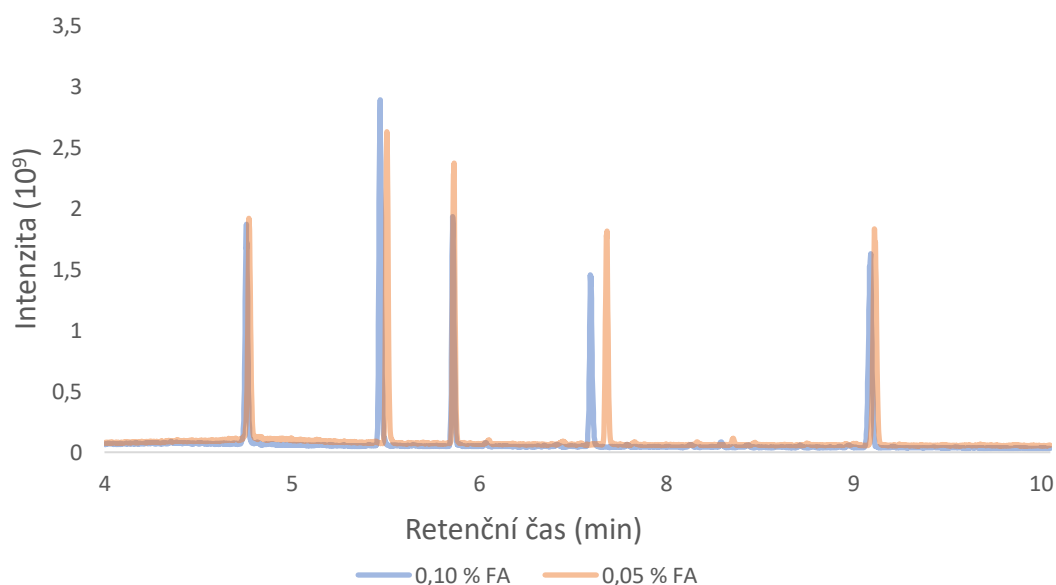
Pro další analýzy, nyní už za účelem zjistit vliv koncentrace FA na odezvu hmotnostního detektoru, byly vybrány následující koncentrace FA, 0,10 % jako výchozí množství použité i v článku (Matthew A. Lauber *Anal. Chem.* 2013, 85, 6936–6944) [3], dále 0,05; 0,03 a 0,02 % FA. Z důvodu málo výrazných změn v separaci Alberta peptidů byly testovány pouze iRT peptidy.

## 5.2 Analýza iRT peptidů pomocí LC/MS při vybraných koncentračních hladinách FA

Při analýzách peptidů pomocí LC/MS v pozitivním módu se pro zajištění separace při nízkém pH přidává do mobilních fází kyselina. Tyto kyseliny nastavují pH a mohou působit jako iontové párová činidla, což zvyšuje retenci analytu. Avšak při hmotnostní detekci dochází ke značnému potlačení ionizace analytu vlivem především silně iontově párových činidel, což následně snižuje citlivost detekce. Tento fenomén je dobře znám u TFA. Nicméně i FA se v mobilní fázi v určité míře disociuje a může tak tvořit iontové páry s peptidy. Použitím menšího množství této slabé kyseliny s určitými iontově párovými vlastnostmi může vést k vyšší citlivosti detekce.

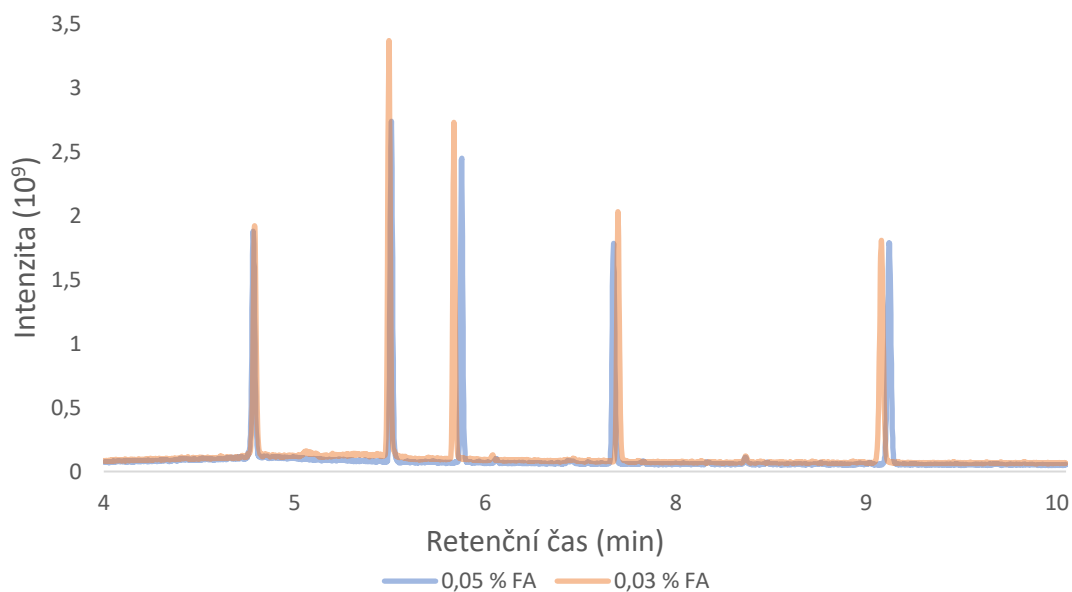
Pro analýzu na systému LC/MS byly vybrány mobilní fáze s koncentracemi kyseliny mravenčí o hodnotách 0,10; 0,05; 0,03 a 0,02 % FA. Jako výchozí byla opět zvolena hladina 0,10 % a sloužila tak jako kontrolní bod pro porovnávání nárůstu intenzit.

Měření vzorků při použití dvou po sobě jdoucích koncentrací FA byla prováděna vždy v jeden den a bezprostředně po sobě, aby se omezily změny intenzit vlivem vnějších podmínek. Výsledky analýz tak byly porovnávány primárně vůči sérii analýz provedených v ten samý den. Analýza s koncentrací 0,10 % FA byla hodnocena vůči analýze s 0,05 % FA, 0,05% analýza vůči 0,03% a 0,03% analýza vůči 0,02%. Porovnávacím parametrem byla intenzita, tedy výška píku. Tento parametr má vyšší vypovídající hodnotu než plocha pod křivkou. Plocha pod křivkou může u LC/MS narůstat i u píků s nižší intenzitou a nevhodným tvarem. Zároveň intenzita píku je parametrem, který se specifikuje v nastavení analýz v módu závislém na informacích.

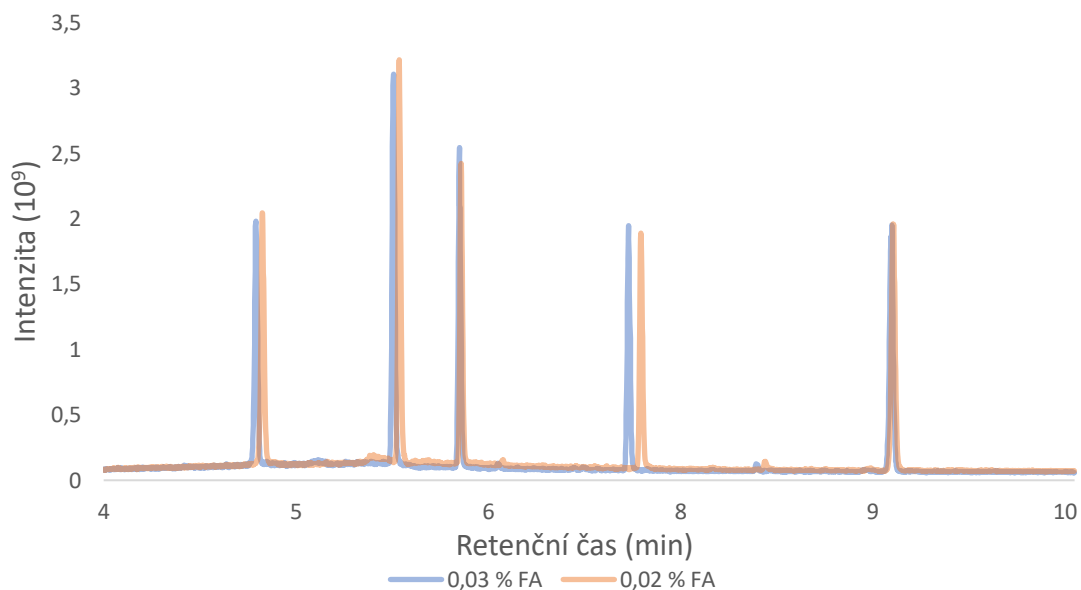


**Obrázek č. 16.** Celkový iontový proud iRT peptidů za použití 0,10 a 0,05 % FA v mobilní fázi při LC/MS analýze.





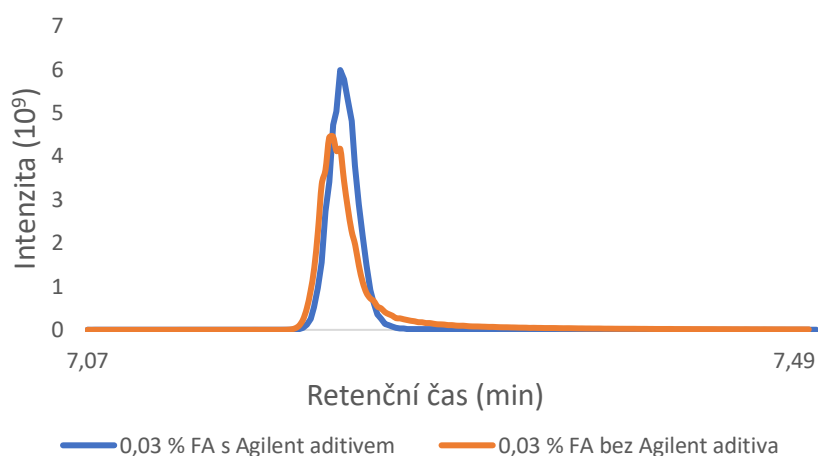
**Obrázek č. 17.** Celkový iontový proud iRT peptidů za použití 0,05 a 0,03 % FA v mobilní fázi při LC/MS analýze.



**Obrázek č. 18.** Celkový iontový proud iRT peptidů za použití 0,03 a 0,02 % FA v mobilní fázi při LC/MS analýze.

Měřená směs peptidů na systému LC/MS zaujímala podobný profil jako při měření v UV. Z důvodu přidavku aditiva (InfinityLab deactivator additive) se během analýzy neprojevovalo chvostování píků, které bylo pozorováno u některých iRT peptidů při LC/UV analýzách. Předpokládaným důvodem tohoto jevu byla deaktivace stop kovů na

stacionární fázi. Pro kontrolu byla provedena také srovnávací separace s 0,03 % FA a bez přítomnosti aditiva. V této analýze bylo opět pozorovatelné chvostování píku č. 4.



**Obrázek č. 19.** Záznam dvojnásobně nabitého iontu peptidu č. 4 při analýzách s použitím a bez použití aditiva (InfinityLab deactivator additive)

Předpokládaný nárůst intenzit peptidů se v provedených analýzách projevil, avšak výše nárůstu nebyla výrazná. Nejvyšší intenzity iontů byly získány s mobilními fázemi o koncentracích 0,03 a 0,02 % FA. Maxima nárůstu intenzit bylo dosaženo už při koncentraci 0,03 % FA a další snížení na 0,02 % FA nepřineslo výraznou změnu. Změny intenzit jednotlivých peptidů nebyly stejné a výrazně se lišily ve dvojicích experimentů. Tento jev byl nejméně výrazný u peptidu č. 2 a 4.

**Tabulka č. 9.** Změny intenzity peptidů pro dvojice analýz s rozdílným obsahem kyseliny mravenčí

	0,10 k 0,05 %	0,05 k 0,03 %	0,03 k 0,02 %
<b>Číslo píku</b>	<b>Změna intenzity (%)</b>	<b>Změna intenzity (%)</b>	<b>Změna intenzity (%)</b>
1	7,19	6,10	-0,62
2	-9,75	34,01	6,82
3	20,45	10,16	2,73
4	19,82	15,37	-7,17
5	8,42	6,98	-0,86
<b>průměr</b>	<b>9,23</b>	<b>14,52</b>	<b>0,18</b>

### 5.3 Analýza tryptických peptidů z lyzátu *F.turalensis*

Po získání výsledků změn intenzit z analýz na LC/MS bylo rozhodnuto ověřit, jestli se změny projeví i u komplexnějšího vzorku a jestli se tento efekt projeví vyšším počtem identifikovaných peptidů. Pro tento účel byl vybrán vzorek připravený z celobuněčného lyzátu živého vakcinačního kmene bakterie *F. turalensis*. Důvodem byla snadná kultivace tohoto kmene a snadná příprava lyzátu, jehož složení je dobře kompatibilní s následnou přípravou vzorků. V rámci této diplomové práce byl z předchozích projektů k dispozici dostatečné množství lyzátu. Pro analýzu tryptických peptidů byly vybrány koncentrace FA o hodnotách 0,03 a 0,02 %, jelikož poskytly nejvyšší nárůst intenzit v předchozím experimentu.

První analýza proběhla s nástřikovým objemem 5  $\mu$ l. Tento objem se ukázal být příliš vysoký, jelikož docházelo k přítomnosti analytu při analýzách prázdných vzorků, které byly provedeny vzápětí. Nástřikový objem byl proto snížen na 3  $\mu$ l a kolona byla před dalším kolem řádně promyta.

Byly provedeny 3 nástřiky vzorku u každé koncentrační hladiny. V pilotních experimentech se projevovali pravidelné změny tlaku v systému. Z tohoto důvodu byly získané výsledky z analýz pouze orientační. Po úpravě čerpadel proběhly experimenty opětovně za stejných podmínek. Tyto analýzy už probíhaly s minimálním kolísání tlaku systému. Pro účely této práce bylo hodnoceno pouze množství identifikovaných peptidů.

Získaná data byla porovnávána proti proteinové databázi bakterie *F. turalensis* pomocí algoritmu MSFragger. MSFragger je velice rychlý algoritmus, který lze na rozdíl od jiných programů použít i na klasickém osobním počítači [51]. Souhrnné informace získané touto analýzou jsou: množství identifikovaných peptidů, počet shod peptidových sekvencí, které identifikují daný peptid (PSMs, z angl. Peptide Sequence Matches) a počet identifikovaných proteinů [51].

Z dat získaných z MSFraggeru je mimo jiné vidět důležitost provádění experimentů na LC/MS za stejných podmínek a v krátkém časovém úseku. Rozdíl mezi počtem PSMs a identifikovaných peptidů je řádově v tisících pro mobilní fázi s 0,10 % FA. Jelikož cílem práce bylo zjistit rozdíly při identifikaci vlivem změny složení mobilní fáze, nebylo nutné brát na tyto změny ohled.

V obou dvojicích experimentů byl při analýze vzorku s nižším obsahem FA v mobilní fázi pozorován nárůst identifikovaných peptidů a shod peptidových sekvencí, které tyto peptidy identifikují. Z dvojice experimentu vyšla úspěšněji analýza s 0,02 % FA, kde nárůst v počtu identifikovaných peptidů byl přes 11 %. Pro koncentrace 0,03 % FA v mobilní fázi byl tento nárůst zhruba poloviční (tabulka č. 10. a 11.) Tento rozdíl neodpovídá změnám intenzity píků iRT peptidů, které byly srovnatelné pro dané koncentrační hladiny (tabulka č. 9.). Předchozí analýzy však sledovali pouze intenzitu malého množství peptidů, a proto se celkový vliv koncentrace FA na separaci a detekci nemusel plně projevit.

**Tabulka č. 10.** Výsledky získané algoritmem MSFragger z LC/MS analýz tryptických peptidů s mobilními fázemi 0,10 a 0,03 % FA.

Mobilní fáze	0,1 % FA	0,03 % FA	0,1 % FA	0,03 % FA
Č. analýzy	PSMs		Peptides	
1	16963	18333	12957	13759
2	17046	18083	13020	13668
3	17092	18045	13014	13607
<b>Průměr</b>	17034	18154	12997	13678
<b>% nárůst</b>	6,6		5,2	

**Tabulka č. 11.** Výsledky získané algoritmem MSFragger z LC/MS analýz tryptických peptidů s mobilními fázemi 0,10 a 0,02 % FA.

Mobilní fáze	0,1 % FA	0,02 % FA	0,1 % FA	0,02 % FA
Č. analýzy	PSMs		Peptides	
1	14360	16324	11176	12400
2	14201	16306	11099	12381
3	13976	16284	10942	12382
<b>Průměr</b>	14179	16305	11072	12388
<b>% nárůst</b>	15,0		11,9	

## 6 Závěr

Tato práce vycházela z poznatků o kolonách s technologií CSH, které dokazovaly, že přítomnost silného iontově párového činidla není nezbytná při separacích peptidů [3]. Zaměření experimentů bylo zacíleno na zjištění minimálního množství slabého iontově párového činidla, které je vhodné pro použití s hmotnostním spektrometrem, při dosažení co možná nejlepších výsledků separace a detekce.

Při separacích pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí bylo prokázáno, že běžně užívané koncentrace kyseliny mravenčí jsou s použitím CSH kolony nadbytečné a že stejných výsledků separace se dosahuje i s menší koncentrací kyseliny. To může vést k úspoře chemikálií při přípravě mobilních fází.

S vědomím, že přítomnost iontově párových činidel při detekci hmotnostním spektrometrem potlačuje intenzitu analytů, byly provedeny tytéž separace kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí za účelem zjistit míru ovlivnění citlivosti při použití různých koncentrací FA. Tyto analýzy potvrdily mírný nárůst intenzit peptidů, který byl nejvyšší při koncentracích 0,03 a 0,02 % kyseliny mravenčení v mobilních fázích.

Mobilní fáze s těmito koncentracemi kyseliny mravenčí byly poté použity při analýzách lyzátu bakterie naštěpeného trypsinem. U analýz s nižší koncentrací FA softwarová analýza našla více shod peptidových sekvencí než u kontrolního experimentu. Nejvyšší nárůst identifikovaných peptidů se projevil při snížení koncentrace kyseliny mravenčí z 0,10 na 0,02 % FA v mobilní fázi. Tento nárůst činil 11,9 %. Z pohledu identifikace peptidů při bottom-up analýze na koloně s CSH technologií byla stanovena optimální koncentrace FA v mobilní fázi na 0,02 %.

## 7 Seznam zkratk:

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (z angl. Atmospheric-pressure chemical ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (z angl. Atmospheric Pressure Photoionization)
CID	Kolizně indukovaná disociace (z angl. Collision-induced dissociation)
CSH	Hybridní stacionární fáze s nabitým povrchem (z angl. Charged Surface Hybrid)
ESI	Ionizace elektrosprejem (z angl. Electrospray Ionization)
ETD	Disociace spojená s přenosem elektronu (z angl. Electron Transfer Dissociation)
FA	Kyselina mravenčí (z angl. Formic Acid)
FT-ICT	Iontová cyklotronová rezonance s Furierovou transformací (z angl. Fourier-transform ion cyclotron resonance)
HCD	Vysokoenergetická disociace v C-pasti (z angl. High-energy C-trap Dissociation)
HETP	Výškový rkivalent teoretického patra (z angl. Height Equivalent to a Theoretical Plate)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. High-Performance Liquid Chromatography)
IAM	Jodacetamid (z angl. Iodoacetamide)
i.d	Vnitřní průměr (z angl. Internal diameter)
IEC	Iontově výměna chromatografie (z angl. Ion Exchange Chromatography)
IT	Iontová past (z angl. Ion Trap)

LC	Kapalinová chromatografie (z angl. Liquid Chromatography)
LC/MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí (z angl. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)
LC/UV	Kapalinová chromatografie s ultrafialovou detekcí (z angl. Liquid Chromatography – Ultraviolet)
MALDI	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (z angl. Matrix assisted Laser desorption ionization)
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
MS <sup>2</sup>	Tandemová hmotnostní spektrometrie
PSMs	Spektra peptidových sekvencí (Peptide Sequence Matches)
Q	Kvadrupól (z angl. Quadrupole)
RP	Reverzní fáze (z angl. Reversed Phase)
SEC	Molekulová vylučovací chromatografie (z angl. Size Exclusion Chromatography)
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin (z angl. Tris(2-carboxyethyl)phosphine)
TEAB	Tetraethylamonium bikarbonát
TFA	Kyselina trifluoroctová (z angl. Trifluoroacetic Acid)
TOF	Analyzátor doby letu (z angl. Time of Flight)
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. Ultra-High Performance Liquid Chromatography)

## 8 Zdroje:

[1] Nshanian M, Lakshmanan R, Chen H, Ogorzalek Loo RR, Loo JA. Enhancing Sensitivity of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Peptides and Proteins Using Supercharging Agents. *Int J Mass Spectrom.* 2018;427:157-164. doi:10.1016/j.ijms.2017.12.006

[2] Waters, Practical Approaches to Peptide Isolation - Method Development Considerations [Online] [Waters.com](https://www.waters.com/waters/en_US/Practical-Approaches-to-Peptide-Isolation---Method-Development-Considerations/nav.htm?cid=134929200&locale=en_US) [Citace z 31. 8. 2021] Dostupné z: [https://www.waters.com/waters/en\\_US/Practical-Approaches-to-Peptide-Isolation---Method-Development-Considerations/nav.htm?cid=134929200&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/Practical-Approaches-to-Peptide-Isolation---Method-Development-Considerations/nav.htm?cid=134929200&locale=en_US)

[3] Lauber MA, Koza SM, McCall SA, Alden BA, Iraneta PC, Fountain KJ. High-resolution peptide mapping separations with MS-friendly mobile phases and charge-surface-modified C18. *Anal Chem.* 2013 Jul 16;85(14):6936-44. DOI: 10.1021/ac401481z. Epub 2013 Jul 1. PMID: 23772755.

[4] From Proteins to Proteomics, Ralph A. Bradshaw and Alma L. Burlingame, *IUBMB Life*, 57(4/5): 267–272, April/May 2005 DOI: <https://doi.org/10.1080/15216540500091536>

[5] Features, roles and chiral analyses of proteinogenic amino acids, Navid J. Ayonm *AIMS Molecular Science*, 7(3): 229–268, DOI: 10.3934/molsci.2020011

[6] David R. Lide *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 84th Edition, 2003–2004, 1180, ISBN-13: 978-0849304842

[7] Andrei P. Drabovich, Maria P. Pavlou, Ihor Batruch, Eleftherios P. Diamandis *Proteomic and Mass Spectrometry Technologies for Biomarker Discovery*, Academic Press 203: 17-37, DOI:10.1016/B978-0-12-818607-7.00002-5

[8] Instruction of reduction reaction using TCEP (2. 6. 2012) [Online] [biosyn.com](https://www.biosyn.com/tew/instruction-of-reduction-reaction-using-tcep.aspx) [Citace z 5. 5. 2021] Dostupné z: <https://www.biosyn.com/tew/instruction-of-reduction-reaction-using-tcep.aspx>

[9] Nathan Kaplan Nathan Colowick *Methods in Enzymology Volume 47*, 1977, Pages 111-116, ISBN: 9780121819477



[10] Bradford G. Hill, Colin Reily, Joo-Yeun Oh, Michelle S. Johnson, Aimee Landar Methods for the determination and quantification of the reactive thiol proteome, Free Radic Biol Med. 2009 Sep 15; 47(6): 675–683, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.012.

[11] Serena Di Palma, Marco L. Hennrich, Albert J.R. Heck, Shabaz Mohammed, Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis, Journal of Proteomics, Volume 75, Issue 13, 2012, (3791-3813), DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.033>

[12] Catherman AD, Skinner OS, Kelleher NL. Top Down proteomics: facts and perspectives. Biochem Biophys Res Commun. 2014;445(4):683-693. doi:10.1016/j.bbrc.2014.02.041

[13] Shodex, Lesson 1: Introduction to HPLC [Online] [shodex.com](http://shodex.com) [Citace z 5. 4. 2020] Dostupné z: <https://www.shodex.com/en/kouza/a.html#!>

[14] W.R.LaCourse CHROMATOGRAPHY: LIQUID | Instrumentation, Encyclopedia of Separation Science 2000, 670-676 ISBN: 9780122267703

[15] AJUHA, Satinder a Michael DONG, ed. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. 1st ed. San Diego: Elsevier, 2005 ISBN: 9780080455181

[16] David Carr, A Guide to the Analysis and Purification of Proteins and Peptides by Reversed-Phase HPLC, [Online] [hplc.eu](http://hplc.eu) [Citace z 3. 5. 2021] Dostupné z: [https://www.hplc.eu/Downloads/ACE\\_Guide\\_Peptides.pdf](https://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_Peptides.pdf)

[17] W.S. Hancock, Rosanne C. Chloupek, J.J. Kirkland, L.R. Snyder, Temperature as a variable in reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of peptide and protein samples: I. Optimizing the separation of a growth hormone tryptic digest, Journal of Chromatography A, Volume 686, Issue 1, 1994, (31-43), ISSN 0021-9673, DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)00077-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)00077-8).

[18] Mauro De Pra, Frank Steiner, Column Temperature Control in Peptide Mapping, [Online] [thermofisher.com](http://thermofisher.com) [Citace z 6. 5. 2021] Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Reference-Materials/AR-71380-Column-Temperature-Control-Peptide-Mapping-AR71380-EN.pdf>

- [19] Nováková, Lucie, Douša, Michal, Moderní HPLC separace v teorii a praxi 1, 2013, ISBN: 978-80-260-4243-3
- [20] N. Kuriyama, N. Shoji, K. Taniguchi, M. Omote, M. Moriyama, Efficient peptide purification by HPLC – Effect of pore size, particle size and chemistry, [Online] [ymcamerica.com](http://ymcamerica.com) [Citace z 6. 5. 2021] Dostupné z: [https://www.ymcamerica.com/downloads/applications/YMC%20Pittcon2005%20poster\\_peptide.pdf](https://www.ymcamerica.com/downloads/applications/YMC%20Pittcon2005%20poster_peptide.pdf)
- [21] Saumya Prasad, Imon Mandal, Shubham Singh, Ashim Paul, Bhubaneswar Mandal, Ravindra Venkatramani and Rajaram Swaminathan, Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein, Chemical Science, 2017, 8, 5416-5433, DOI:10.1039/C7SC00880E
- [22] Hitachi, Principle and Feature of Various Detection Methods [Online] [hitachi-hightech.com](http://hitachi-hightech.com) [Citace z 12. 4. 2021] Dostupné z: <https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html>
- [23] P. Man, K. Bezouška, Současné trendy v analýze eukaryotických proteomů, glykomů a lipidomů, Chem. Listy 100, 1084–1095 (2006), ISSN 0366-6832
- [24] What is the Difference Between UHPLC and UPLC?, (4. 7. 2014) [Online] [chromatographytoday.com](http://chromatographytoday.com) [Citace z 29. 4. 2021] Dostupné z: <https://www.chromatographytoday.com/news/hplc-uhplc/31/breaking-news/what-is-the-difference-between-uhplc-and-uplc/30754>
- [25] Salvatore Fanali, Paul R. Haddad, Colin Poole, David K. Lloyd. Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. Elsevier; 2013, ISBN: 978-0124158078
- [26] Raquel Nogueira, Michael Lämmerhofer, Wolfgang Lindner, Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase, Journal of Chromatography A, Volume 1089, Issues 1–2, 2005, 158-169, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.093>.

- [27] Iraneta PC, Wyndham KD, McCabe DR, Walter TH. A review of Waters hybrid particle technology. Part 3. Charged surface hybrid (CSH) technology and its use in liquid chromatography. Waters white paper 2011, 720003929EN.
- [28] Y. Shen, X. Shao, K. O'Neill, J. S. Bradshaw, M. L Lee, Reversed-phase liquid chromatography of proteins and peptides using multimodal copolymer-encapsulated silica, *Journal of Chromatography A*, Volume 866, Issue 1, 2000, (1-14), ISSN 0021-9673, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01043-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01043-2)
- [29] Kelly Zhanga, Xiaodong Liu, Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 128 (2016) 73–88, ISSN 0731-7085, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.007>.
- [30] Rui Zhu, Lauren Zacharias, Kerry M. Wooding, Wenjing Peng, and Yehia Mechref, *Methods Enzymol.* 2017 ; 585: 397–429. doi:10.1016/bs.mie.2016.11.009.
- [31] Ascentis® Express RP-Amide HPLC Columns, [Online] [sigmaaldrich.com](http://sigmaaldrich.com) [Citace z 30. 4. 2021] Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/brochures/ascentis-express-rp-amide.html>
- [32] H.A. Claessens, M.A. van Straten, Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, Volume 1060, Issues 1–2, 2004, (23-41) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.098>
- [33] J. J. Kirkland, J. B. Adams, Jr, M. A. van Straten and H. A. Claessens, Bidentate Silane Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 1998, 70, 4344-4352, DOI: <https://doi.org/10.1021/ac971380i>
- [34] Ruth Verplaetse, Jan Tytgat, LC-MS/MS in forensic toxicology: what about matrix effects?, (2011). *TIAFT Bulletin.* 41. 8-16, ISSN: 1080-9945
- [35] Column Dimensions & Related HPLC Parameters, Flow Rate Reduction, Solvent Savings [Online] [waters.com](http://waters.com) [Citace z 2. 5. 2021] Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wpp207.pdf>

- [36] Maria Asensio-Ramos, Chiara Fanali, Giovanni D'Orazio, Salvatore Fanali, Chapter 27 - Nano-liquid chromatography, Editor(s): Salvatore Fanali, Paul R. Haddad, Colin F. Poole, Marja-Liisa Riekkola, Liquid Chromatography (Second Edition), Elsevier, 2017, (637-695), ISBN 9780128053935, DOI:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00027-0>
- [27] Juraj Lenčo, Marie Vajrychová, Kristýna Pimková, Magdaléna Prokšová, Markéta Benková, Jana Klimentová, Vojtěch Tambor, and Ondřej Soukup, Analytical Chemistry, 2018 90 (8), 5381-5389, DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00525
- [38] Serban Moldoveanu; VICTOR DAVID. Essentials in Modern HPLC Separations. Waltham, MA: Elsevier, 2013. ISBN: 9780123850133
- [39] Yuanzhong Yang, Reinhard I. Boysen, Jamil Chowdhury, Asif Alam, Milton T.W. Hearn, Analysis of peptides and protein digests by reversed phase high performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry using neutral pH elution conditions, Analytica Chimica Acta, Volume 872, 2015, 84-94, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.055>.
- [40] Parker CE, Warren MR, Mocanu V. Mass Spectrometry for Proteomics. V: Alzate O, editor. Neuroproteomics. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010. Chapter 5, PMID: 21882443.
- [41] Michal Holčapek - Mass Spectrometry Group, Hmotnostní spektrometrie [Online] [holcapek.upce.cz](http://holcapek.upce.cz) [Citace z 28. 4. 2021] Dostupné z: [https://holcapek.upce.cz/teaching/Mol\\_spek/Mol\\_spek\\_prednaska6\\_MS.pdf](https://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf)
- [42] Aebersold, R., Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature 422, 198–207 (2003). <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- [43] Mass Spectrometry and Protein Analysis Bruno Domon and Ruedi Aebersold Science 312 (5771), 212-217, DOI: 10.1126/science.1124619
- [44] Müller, M. and Völkel, W. (2012). The use of liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) in biological monitoring [Biomonitoring Methods, 2007]. In The MAK-Collection for Occupational Health and Safety (eds and ), <https://doi.org/10.1002/3527600418.bilcmsmonite0011>

- [45] LibreTexts, Mass Analyzers (Mass Spectrometry) (15. 8. 2020) [Online] [chem.libretexts.org](https://chem.libretexts.org) [Citace z 28. 4. 2021] Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical Chemistry/Supplemental Modules \(Analytical Chemistry\)/Instrumental Analysis/Mass Spectrometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry)
- [46] Shannon Eliuk and Alexander Makarov, Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2015. 8:61–80, DOI:10.1146/annurev-anchem-071114-040325
- [47] Guthals A, Bandeira N. Peptide identification by tandem mass spectrometry with alternate fragmentation modes. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(9):550-557. doi:10.1074/mcp.R112.018556
- [48] Molecular Dissociation Technology Overview [Online] [thermofisher.com](https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology-overview/dissociation-technique-technology-overview.html) [Citace z 18. 8. 2021] Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology-overview/dissociation-technique-technology-overview.html>
- [49] Hale, Oliver & Cooper, Helen. (2020). In situ mass spectrometry analysis of intact proteins and protein complexes from biological substrates. *Biochemical Society Transactions.* 48. 10.1042/BST20190793.
- [50] MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics.* 2010;26(7):966-968. doi:10.1093/bioinformatics/btq054
- [51] Kong, A., Lerepovost, F., Avtonomov, D. et al. MSFragger: ultrafast and comprehensive peptide identification in mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods* 14, 513–520 (2017). <https://doi.org/10.1038/nmeth.4256>
- [52] PEPTIDE CALCULATOR [Online] [bachem.com](https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/) [Citace z 15. 7. 2021] Dostupné z <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>

[53] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (1982). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers.