

Utjecaj kemijske strukture na ionizaciju potencijalnih glikanskih fluorofora u negativnom MS modu

Mlinarić, Zvonimir

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:698806>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Zvonimir Mlinarić

**Utjecaj kemijske strukture na ionizaciju
potencijalnih glikanskih fluorofora za analizu u
negativnom MS modu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Tome Kesera.

Zahvaljujem se dr. sc. Tomi Keseru na povjerenju, mentorstvu tijekom izrade ovog rada, svim savjetima i pomoći, strpljenju i prenesenom znanju te ugodnim razgovorima tijekom čekanja analiza.

Hvala i svim članovima Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju na ugodnom vremenu provedenom u laboratoriju, a posebno Dinku Šoiću na nesebičnoj pomoći oko eksperimenata.

Zahvaljujem se i svojim farmaceutskim kemičarima s kojima sam napravio svoje prve znanstvene korake te svim nastavnicima i mentorima koji su na meni ostavili utjecaja.

Zahvaljujem se i svojim prijateljima koji su mi bili podrška tijekom cijelog studija i koji nikada nisu sumnjali u mene, čak i kada sam ja pomalo jesam.

Hvala mojoj Dori na svakodnevnoj ljubavi i pažnji koju mi pruža te podršci i osloncu koji mi značajno olakšavaju sve što u životu radim. Bez nje bi mi neke stvari bile značajno teže.

Od srca hvala mojim roditeljima, bratu i sestri kao i obitelji koji su kroz cijeli moj život imali ljubavi za mene i strpljenja za sve što radim te mi pomagali kako god su mogli.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. GLIKANI..... | 1 |
| 1.2. RAZNOLIKOST GLIKANA..... | 1 |
| 1.3. MASENA SPEKTROMETRIJA (MS)..... | 5 |
| 1.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VISOKE DJELOTVORNOSTI (UPLC).... | 9 |
| 1.5. ANALIZA GLIKANA..... | 9 |
| 1.6. KONSTANTA DISOCIJACIJE KISELINE I LIPOFILNOST..... | 12 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 3.1. UZORAK..... | 15 |
| 3.2. MATERIJALI..... | 15 |
| 3.2.1. ORGANSKE KEMIKALIJE..... | 15 |
| 3.2.2. ANORGANSKE KEMIKALIJE | 16 |
| 3.2.3. BIOLOŠKE KEMIKALIJE..... | 16 |
| 3.2.4. PUFERI I OTOPINE | 16 |
| 3.2.5. LABORATORIJSKA OPREMA I PRIBOR..... | 17 |
| 3.3. PRIPREMA UZORAKA | 17 |
| 3.3.1. DENATURACIJA PROTEINA | 18 |
| 3.3.2. DEGLIKOZILACIJA | 18 |
| 3.3.3. PRIPREMA OTOPINA ZA OBILJEŽAVANJE N-GLIKANA | 18 |
| 3.3.4. OBILJEŽAVANJE UZORAKA..... | 19 |
| 3.3.5. PREKONDICIONIRANJE GHP PLOČICE | 19 |
| 3.3.6. NANOŠENJE OBILJEŽENIH N-GLIKANA NA GHP PLOČICU..... | 20 |
| 3.3.7. PROČIŠĆAVANJE OBILJEŽENIH N-GLIKANA | 20 |
| 3.3.8. ELUACIJA OBILJEŽENIH N-GLIKANA | 20 |
| 3.4. ANALIZA UZORAKA | 21 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 23 |
| 5. ZAKLJUČAK | 36 |
| 6. LITERATURA | 37 |
| 7. SAŽETAK..... | 41 |
| 8. SUMMARY | 42 |
| 9. PRILOZI | 43 |

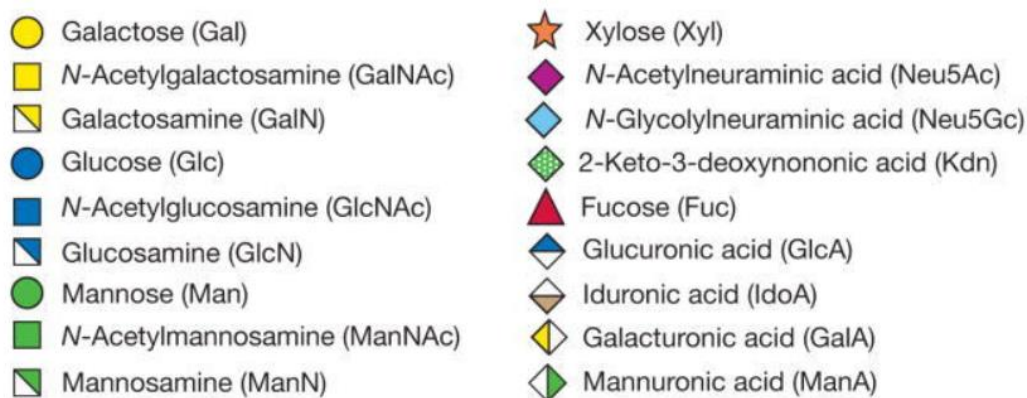
1. UVOD

1.1. GLIKANI

Glikani su molekule koje sadrže više monosaharida povezanih glikozidnim vezama. Te se molekule često povezuju s proteinima ili lipidima tvoreći tako različite glikokonjugate. Glikani, odnosno ugljikohidrati su uz proteine, nukleinske kiseline i lipide jedna od četiri glavne gradivne jedinice živog svijeta. Ugljikohidrati mogu biti jednostavne molekule koje mogu imati gradivnu ulogu, ulogu skladištenja energije ili zaštite organizma od kemijskih i fizikalnih agensa. Međutim, evolucijom su ugljikohidrati postajali sve kompleksniji te su počeli dobivati druge funkcionalne uloge ključne za složene organizme (Lauc i sur., 2014). Glikani su prisutni kod svih oblika života, ali najraznolikije uloge pokazuju kod eukariotskih oblika života te su kao takvi uključeni u gotovo sve stanične, a posebno međustanične interakcije. Nepravilna glikozilacija u podlozi je brojnih bolesti (Freeze, 2006), a recesivna delecija gena za GlcNAc-1-fosfotransferazu uzrokuje izostanak glikozilacije što je letalno je za embrij (Marek i sur., 1999). Za razliku od proteina i nukleinskih kiselina koje su najčešće linearne molekule te su monomerne jedinice povezane jednom vrstom veza – amidnom vezom u proteinima te 3'-5' fosfodieterskom vezom u nukleinskim kiselinama, glikani mogu biti vrlo razgranate strukture pri čemu monosaharidi mogu biti povezani različitim vrstama veza.

1.2. RAZNOLIKOST GLIKANA

Glikani su molekule obično sastavljene od desetak monosaharidnih jedinica. Oko 700 proteina sudjeluje u biosintezi oko 7 tisuća različitih glikana u sisavaca. Svi ti glikani građeni su od svega desetak različitih monosaharida: glukoza (Glc), galaktoza (Gal), fukoza (Fuc), *N*-acetilglukozamin (GlcNAc), *N*-acetilgalaktozamin (GalNAc), glukuronska kiselina (GlcA), iduronska kiselina (IdoA), manozna (Man), ksiloza (Xyl) i sialinske kiseline kao što su *N*-acetilneuraminska kiselina (NeuAc) te *N*-glikolilneuraminske kiseline (NeuGc) (Moremen i sur., 2012). Prilikom grafičkog prikazivanja glikana, često se koriste standardizirani simboli pri čemu svaki simbol predstavlja određeni monosaharid. Postoje različiti standardi koji se koriste, ali je Nomenklatura simbola za glikana (eng. *Symbol Nomenclature for Glycans*, SNFG) najčešće korištena (Slika 1).



Slika 1. Simboli za neke najčešće glikane prema SNFG (preuzeto i modificirano iz Varki i sur., 2009)

Raznolikost glikana moguća je zbog nelinearnog povezivanja monosaharida u glikan. Također, ti se monosaharidi mogu povezivati različitim glikozidnim vezama što dodatno doprinosi kompleksnosti i raznolikosti glikana. Posljedica toga je da glikani nisu određeni samo slijedom monosaharidnih jedinica već i pozicijom i stereokemijom glikozidne veze te mjestom i brojem grananja. U linearnim polimerima monomerne jedinice povezane su jednom vrstom veza – amidnom vezom u proteinima te 3'-5' fosfodieterskom vezom u nukleinskim kiselinama, dok u glikanima svaki monosaharid može na više svojih atoma vezati drugi monosaharid te svaka od tih veza može biti α - i β -glikozidna veza.

Tablica 1. Broj mogućih izomera glikana i peptida sastavljenih od različitog broja i vrste monomera (preuzeto i modificirano iz Lauc i Zoldoš, 2010).

| Oligomer | Glikan | Peptid |
|----------------|-----------|--------|
| Dimer AA | 11 | 1 |
| Dimer AB | 20 | 2 |
| Trimer AAA | 120 | 1 |
| Trimer ABC | 720 | 6 |
| Tetramer AAAA | 1424 | 1 |
| Tetramer ABCD | 34.560 | 24 |
| Pentamer AAAAA | 17.872 | 1 |
| Pentamer ABCDE | 2.144.640 | 120 |

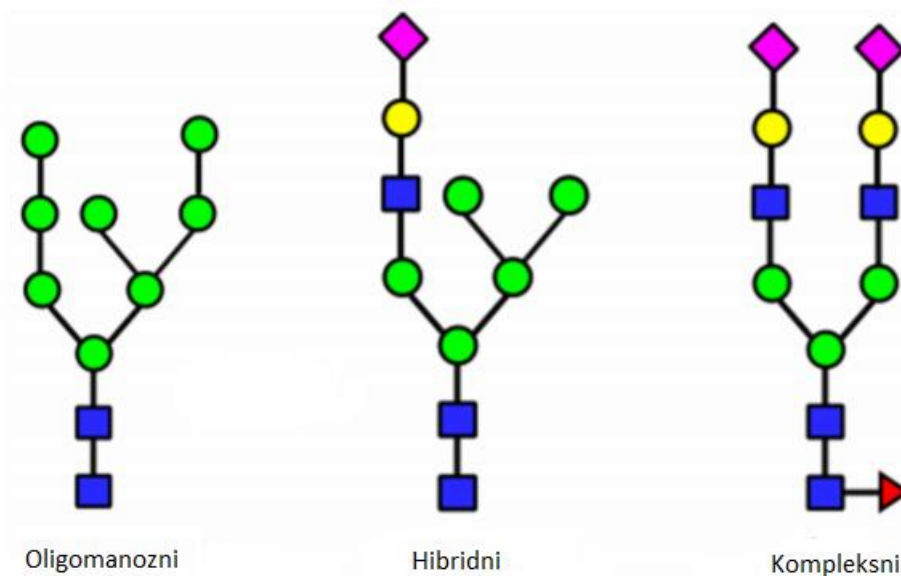
Primjerice, više od 30 različitih glikana se može vezati na Asn₂₉₇ u teškom lancu IgG. Budući da svaka IgG molekula sadrži dva teška lanca, moguće je postojanje 900 različitih IgG izomera zbog samo jednog glikozilacijskog mjesta (Lauc i Zoldoš, 2010).

Naravno, u prirodi ne postoje sve moguće glikanske strukture budući da je u biološkim sustavima teorijski broj struktura ograničen regulacijom biosinteze glikana, funkcionalnošću glikana te okolišnim čimbenicima.

Najčešća podjela glikana je prema vrsti aglikona te vrsti veze, odnosno atomu koji povezuje glikan i aglikon. Tako prema vrsti aglikona razlikujemo glikane u glikoproteinima ili glikolipidima, dok prema vrsti veze s aglikonom najčešće navodimo *N*-glikane, *O*-glikane i *C*-glikane. *C*-glikozilacija najmanje je značajan obrazac glikozilacije te najčešće podrazumijeva *C*-manozilaciju. U tom se slučaju stvara C-C veza između glikana i prvog triptofana u aminokiselinskom slijedu W-X-X-W, gdje W označava triptofan, a X bilo koju drugu aminokiselinu pri čemu je *C*-manozilacija češća ukoliko je druga aminokiselina polarna (Ihara i sur., 2014). *O*-glikozilacija podrazumijeva tvorbu C-O veze između glikana te hidroksilne skupine serina (Ser) ili treonina (Thr) u proteinu. *O*-glikozilacija kod eukariota odvija se u endoplazmatskom retikulumu, Golgijevom aparatu i citoplazmi, dok se kod prokariota odvija u citoplazmi (Van den Steen P i sur., 1998). U Golgijevom aparatu *N*-acetilgalaktozamin (GalNAc) dodaje se na serinske ili treoninske aminokiselinske ostatke membranskih proteina ili proteina koji trebaju biti izlučeni iz stanice. Membranski proteini često imaju *N*-acetilgalaktozaminske glikane u dijelu proteina koji je bliži staničnoj membrani te povećanjem rigidnosti tog dijela proteina udaljavaju, odnosno pružaju ostatak proteina dalje od stanične membrane. Primjerice, LDL receptor proteže se dalje od stanične membrane zahvaljujući rigidnosti dijela proteina koji je povezan sa staničnom membranom, a koju pružaju *O*-glikani (Hounsell i sur., 1996; Varki i sur., 2015). Postoji oko 20 različitih GalNAc glikoziltransferaza pri čemu različite stanice imaju različite glikoziltransferaze pa se tako strukture *O*-glikana razlikuju od stanice do stanice (Varki i sur., 2015). Za razliku od *N*-acetilgalaktozamina, *N*-acetilglukozamin se dodaje na serinske ili treoninske aminokiselinske ostatke citoplazmatskih i nuklearnih proteina koji ostaju u stanici (Yang i Qian, 2017). Također *O*-GlcNAc može se dodavati i uklanjati kompleksnim odnosom dvaju enzima – *O*-GlcNAc transferaze i *O*-GlcNAc hidrolaze. Ova posttranslacijska modifikacija podsjeća na fosforilaciju koja se također događa na serinskim i treoninskim aminokiselinskim ostacima. I zaista, fosforilacija i *O*-GlcNAc glikozilacija kompetitivni su procesi čiji regulirani odnos utječe na brojne funkcije proteina i stanice (Hart i sur., 2011; Varki i sur., 2015).

Također, *O*-glikozilacijom na serinske i treoninske aminokiselinske ostatke mogu se dodavati manoza, fukoza, galaktoza i glukoza. Ove su *O*-glikozilacije nužne za ispravnu funkciju bazalne membrane, kolagena, faktora koagulacije, Notch proteina i brojnih drugih bioloških procesa i struktura (Lommel i Strahl, 2009; Jürgensen i sur., 2011; Rana i Haltiwanger, 2011; Spiro, 2002). Nadalje, proteoglikani su proteini višestruko glikozilirani glikozaminoglikanima – dugim oligosaharidnim lančastim *O*-glikanima koji su povezani na serinske i treoninske aminokiselinske ostatke proteina. Proteoglikani se najčešće nalaze na površini stanice ili u izvanstaničnom matriksu gdje su ključni za čvrstoću i fleksibilnost tkivnih struktura. Nedostatak proteoglikana povezan je sa zatajenjem srca i pluća, defektima u razvoju koštanog i mišićnog sustava te povećanim tumorskim metastaziranjem (Pomin i Mulloy, 2018). Moguće su i *O*-glikozilacije lipida, posebice ceramida čime nastaju glikosfingolipidi (Varki i sur., 2015). Zabilježena je i rijetka *O*-glikozilacija tirozinskog aminokiselinskog ostatka proteina, a radi se o glikozilaciji glikogenina – glikoziltransferaze zadužene za konverziju glukoze u glikogen (Spiro, 2002).

Svakako najznačajnija i najučestalija glikozilacija proteina je *N*-glikozilacija. Ona najčešće podrazumijeva tvorbu C-N veze u β konfiguraciji između *N*-acetilglukozamina i amidnog dušika asparaginskog aminokiselinskog ostatka u glikoproteinu pri čemu asparagin najčešće mora biti unutar slijeda Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina (Pro) (Mellquist i sur., 1998). Time se postiže određena selektivnost budući da *N*-glikani ne mogu biti vezani na bilo koji asparagin u proteinu. Svim eukariotskim *N*-glikanima zajednička je pentasaharidna jezgra koju čine dva *N*-acetilglukozamina i tri manoze - $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$. *N*-glikani mogu se podijeliti u tri skupine ovisno o tome koji monosaharidi nastavljaju zajedničku pentasaharidnu jezgru. Tako postoji oligomanozni tip *N*-glikana u kojemu samo manoze produljuju zajedničku jezgru, kompleksni tip u kojemu dva *N*-acetilglukozamina produljuju zajedničku jezgru te hibridni tip u kojemu manoze produljuju $\text{Man}\alpha 1-6$ granu zajedničke jezgre, dok jedan ili dva *N*-acetilglukozamina produljuju $\text{Man}\alpha 1-3$ granu zajedničke jezgre (Slika 2.) (Varki i sur., 2015).



Slika 2. Tipovi N-glikana (preuzeto i modificirano iz Fisher i Ungar, 2016)

1.3. MASENA SPEKTROMETRIJA (MS)

Masena spektrometrija (MS) zasniva se na principu stvaranja nabijenih molekulskih iona ili molekulskih fragmenata u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaska u njega. Ti se ioni generiraju u plinovitoj fazi te se potom izlože magnetskom ili električnom polju. Time se može odrediti molekulska masa ionizirane molekule ili molekulskog fragmenta nastalog cijepanjem izvorne molekule. Spektar masa prikazuje relativnu zastupljenost ionskih vrsta u ovisnosti o omjeru njihove mase i naboja (m/z). Stoga se masena spektrometrija može podijeliti u dvije faze: stvaranje iona i razdvajanje iona (Watson, 2016).

Dvije najpopularnije metode za generaciju iona su ESI (eng. electrospray ionisation) i MALDI (eng. *matrix assisted laser desorption ionization*). U MALDI metodi uzorak mora biti otopljen u matriksu kako bi mogao ionizirati. Matriks mora biti kemijski spoj koji apsorbira u UV području oko valne duljine dušikovog lasera (oko 337 nm). Kao matriks najčešće se koristi 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina, ali i slični aromatski spojevi. Otopina uzorka pomiješa se s otopinom matriksa te ostavi na metalnoj pločici da se osuši prije analize. Potom se dušikovim laserom potakne ablacija i desorpcija uzorka i matriksa te se u plinovitom stanju analit protonira ili deprotonira nakon čega odlaze do masenog analizatora (Watson i sur., 2016; Hillenkamp i sur., 1991; Karas i Krüger, 2003).

Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) revolucionalizirala je primjenu masene spektrometrije kao analitičkog alata zbog svoje izvrsne kompatibilnosti s tekućinskim kromatografijama.

Ionizacija elektroraspršenjem izvodi se pod atmosferskim tlakom na način da analit iz tekućinske kromatografije visoke ili ultra visoke djelotvornosti prolazi kroz usku, metalnu ili kvarcnu kapilaru na koju se primijeni veliki električni potencijal od primjerice 4,5 kV. U slučaju da je primijenjen pozitivni električni potencijal, negativno nabijeni ioni u otopini su odbačeni na način da su privučeni na kapilaru. Analogno, u slučaju da je primijenjen negativni električni potencijal, pozitivno nabijeni ioni su odbačeni. Tako razlikujemo pozitivni i negativni MS mod ovisno o tome kojeg je predznaka električni potencijal koji je primijenjen na ESI kapilaru. Otopina koja prođe kroz kapilaru na njenom je kraju raspršena pod atmosferskim tlakom. Pod utjecajem koaksijalne struje dušika otapalo isparava te se kapljice zbog odbojnih elektrostatskih sila unutar same kapljice raspadaju na sve manje kapljice otopine. Na kraju su prisutni ioni analita u plinovitom stanju koji su privučeni u maseni spektrometar suprotnim nabojem od onog koji je primijenjen na ESI kapilaru. Maseni spektrometar radi pod visokim vakuumom koji se održava pumpama u dva dijela – prijelaznim vakuumom odmah nakon ESI kapilare te visokim vakuumom u dijelu za razdvajanje iona (Watson, 2016).

Prilikom korištenja pozitivnog ESI moda u spektru masa bit će uočeni m/z signali koji odgovaraju masi analita uvećanoj za masu protona budući da dolazi do protonacije analita. Protonaciju se čak i slabo bazični spojevi čak i u slabo kiselim mobilnim fazama u tekućinskoj kromatografiji. S druge strane, prilikom korištenja negativnog ESI moda u spektru masa bit će uočeni m/z signali koji odgovaraju masi analita umanjenoj za masu protona budući da dolazi do deprotonacije analita. Uz to, u negativnom ESI modu dolazi do učestalijeg stvaranja adukata nego u pozitivnom ESI modu (Watson, 2016).

U prošlosti je masena spektrometrija, odnosno analiza masa bila temeljena na magnetskom analizatoru, međutim danas je ta tehnika istisnuta preciznijim i učinkovitijim tehnikama kao što je kvadrupol ili TOF (eng. *time of flight*) analiza. Masena spektrometrija temeljena na magnetskom analizatoru podrazumijeva ubrzavanje iona u snažnom električnom polju (3-8 kV) na način da kroz polje prolaze ioni samo uskog raspona kinetičkih energija. Zatim ti ioni ulaze u polje kružnog magneta te se gibaju po putanji koja ovisi o omjeru njihove mase i naboja (m/z) prema sljedećem izrazu:

$$\frac{m}{z} = \frac{eB^2r^2}{2U}$$

pri čemu je m/z omjer mase i naboja, e elementarni naboj, B magnetska indukcija, odnosno gustoća magnetskog toka, r polumjer kružne putanje po kojoj se ion giba te U napon pod kojim su ioni ubrzani.

Iz formule je vidljivo da održavanjem napona ubrzavanja konstantnim te mijenjanjem magnetske indukcije samo ioni određenog omjera mase i naboja prolaze do detektora gdje mogu biti detektirani. Tako se brzim promjenama magnetske indukcije i detektiranjem količine iona koja stigne do detektora mogu odrediti relativni intenziteti iona po širokom rasponu omjera mase i naboja (Watson, 2016).

Kvadrupolni analizator masa jeftiniji je i osjetljiviji analizator masa od magnetskog. Izvodi na način da se u vakuumsku komoru postave četiri šipkaste elektrode na jednaku udaljenost od središnje osi. Na međusobno dijagonalne elektrode primjeni se napon jednakog polariteta, a različitog polariteta od susjednih elektroda. Takav kvadrupol inducirat će dva električna polja koja su međusobno pod pravim kutem. Jedno je električno polje uzrokovano istosmjernom strujom, dok je drugo električno polje uzrokovano visokofrekventnom izmjeničnom strujom. Na taj se način dobije rezultantno električno polje s oscilirajućom fazom koje će do detektora propustiti samo ione čija amplituda spiralnog gibanja kroz polje nije veća od radijusa samog polja. Drugim riječima, ioni koji nisu u rezonanciji s kvadrupolnim električnim poljem u nekom će trenutku pasti na neku elektrodu te neće doći do detektora. Mijenjanjem omjera iznosa istosmjernog napona i visokofrekventnog napona mijenja se i područje stabilnosti iona, odnosno mijenja se raspon omjera masa i naboja iona koji će proći do detektora. Mana jednog kvadrupolnog analizatora je slabija razlučivost pa se zbog toga često kombinira više kvadrupola, najčešće tri unutar istog masenog spektrometra ili se kvadrupol kombinira s nekim drugim masenim analizatorom. Primjerice, trostruki kvadrupol često je korišten maseni analizator u industrijama.

Analiza vremena leta (TOF) način je analize masa iona koji se temelji na tome da ioni manjih masa brže dolaze do detektora od iona većih masa na sljedeći način:

$$t = \frac{L}{\sqrt{2eU}} \sqrt{\frac{m}{z}}$$

pri čemu je t vrijeme leta iona, L duljina leta iona odnosno duljina između naponskog akceleratora i detektora, e elementarni naboj, U napon pod kojim se ioni ubrzavaju te m/z omjer mase i naboja iona. Dakle, ako se ioni sakupe sakupe te ubrzaju pod istim naponom, tada će ioni istog naboja imati jednaku kinetičku energiju, odnosno u slučaju različitih masa imat će različite brzine gibanja. Međutim, u prošlosti su analizatori vremena leta imali slabiju razlučivost zbog toga što nemaju svi ioni imali jednake kinetičke energije pri izlasku iz akceleratora već postoje male razlike (Watson i sur., 2016). Zato je u analizator vremena leta uveden reflektori koji koristeći statičko ili vremenski ovisno električno polje mijenja smjer iona.

Brži ioni dublje prodiru u reflektoru što uzrokuje zaostajanje za sporijim ionima jednakog omjera mase i naboja. Na taj se način svi ioni jednakog omjera mase i naboja fokusiraju prilikom izlaska iz reflektora. Također, uvođenje reflektora produljuje duljinu leta iona što dodatno povećava razlučivost. Postoje i W izvedbe analizatora vremena leta u kojima postoje dva reflektora što dodatno poboljšava razlučivost. (Watson i sur., 2016; Mamyrin i sur., 1973). Analizator vremena leta često se koristi s MALDI ionizatorom, ali i s ESI ionizatorima te se često kombinira s kvadrupolnim analizatorom masa i kolizijskom ćelijom u QTOF masenoj spektrometriji.

Ionska zamka još je jedan često korišteni maseni analizator. Izvodi se na način da se ioni iz ionizatora injektiraju u ionsku zamku koja se sastoji dvije elektrode na koje je primijenjen istosmjerni napon između kojih je treća prstenasta elektroda na koju se primijeni radiofrekventni napon. Ioni su zarobljeni u radiofrekventnom električnom polju te je ionska zamka ispunjena helijem koji „ugasi“ kinetičku energiju iona. Ioni tada mogu biti izbačeni iz ionske zamke promjenom iznosa radiofrekventnog napona pri čemu su ioni određene mase izbačeni iz orbitalne putanje okomito na ravninu prstenaste elektrode te odlaze do detektora ili primjenom dodatnog, pomoćnog, pobuđujućeg napona na krajnje elektrode te mijenjanjem radiofrekventnog napona pri čemu se ioni mogu dovoditi u rezonanciju s obzirom na njihov omjer mase i naboja. Također, ionska zamka može se isprazniti na način da u njoj ostane samo ion od interesa. Tada se mijenjanjem radiofrekventnog napona ion može pobuditi, kolidirati s atomima helija stvarajući fragmente. Ti se fragmenti tada mogu pustiti iz ionske zamke do detektora (Watson i sur., 2016).

Postoje i maseni spektrometri temeljeni na Fourierovoj transformaciji kao što je Orbitrap koji ima vrlo veliku razlučivost. Orbitrap koristi električno polje kako bi zadržao ione te ih potaknuo na orbitu oko središnje vretenaste elektrode. Ioni kružeći oko elektrode osciliraju naprijed i nazad pri čemu je frekvencija oscilacije ovisna o omjeru mase i naboja iona. Te se oscilacije bilježe kao električna struja koja se Fourierovim transformacijama prevodi u masu iona (Makarov, 2000; Hu i sur., 2005; Watson i sur., 2016).

1.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VIŠOKE DJELOTVORNOSTI (UPLC)

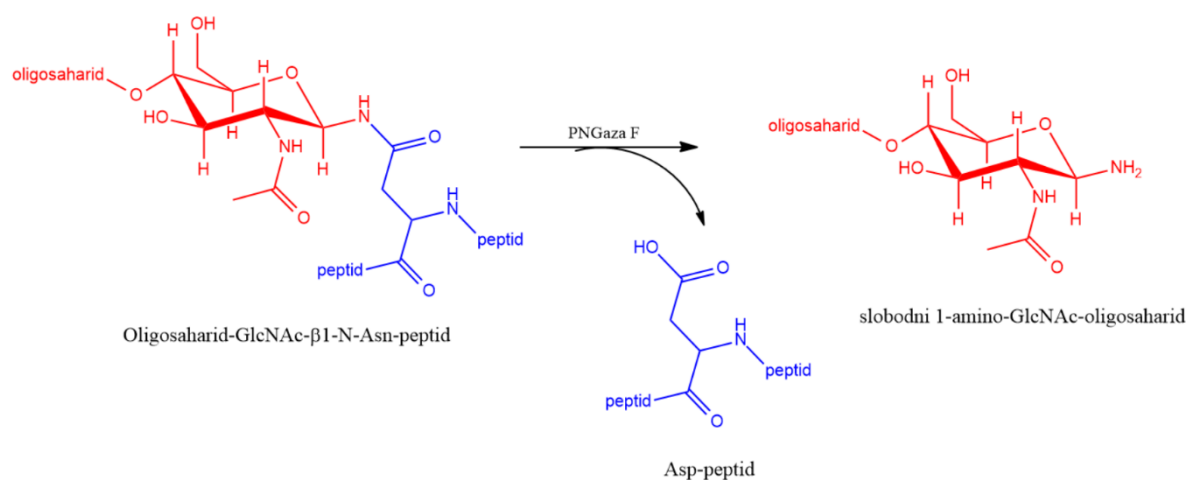
Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temelji se uvođenju mobilne faze s otopljenim analitima u kromatografsku kolonu sa stacionarnom fazom te odjeljivanje analita na temelju različitih vrsta i intenziteta interakcija sa stacionarnom fazom pri čemu se analiti detektiraju najčešće UV-Vis, odnosno DAD detektorom ili fluorescentnim detektorom. Fluorescentni detektor značajno je osjetljiviji te se stoga češće koristi u analizi glikana. Najčešće se kromatografske tehnike dijele na normalno faznu tekućinsku kromatografiju (NP-LC) i obrnuto faznu tekućinsku kromatografiju (RP-LC). U normalo faznoj tekućinskoj kromatografiji koriste se polarne stacionarne faze, dok se u obrnuto faznoj tekućinskoj kromatografiji koriste nepolarne stacionarne faze.

Za analizu glikana značajna je tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (HILIC). HILIC je izvedba normalno fazne tekućinske kromatografije, ali posjeduje i neka svojstva obrnuto faze tekućinske kromatografije i ionske kromatografije (Alpert, 1990). Konkretno, HILIC koristi polarnu stacionarnu fazu, ali mobilne faze karakteristične za obrnuto faznu tekućinsku kromatografiju – najčešće acetonitril i manju količinu vode. Također, obično se koriste ionski aditivi, najčešće amonijev acetat i amonijev formijat kako bi se regulirali pH i ionska jakost mobilne faze. Na HILIC koloni analiti se zadržavaju na temelju stvaranja vodikovih veza te ion-ion, ion-dipol i dipol-dipol interakcija. Stoga će se glikani zadržavati na HILIC koloni ovisno o njihovoj veličini i naboju pa čak i steričkim karakteristikama dok se kontaminanti u analizi glikana kao što su neglikozilirani peptidi neće zadržavati. Zbog kompatibilnosti mobilnih faza, moguća je i sprega HILIC-UPLC metoda s masenom spektrometrijom što čini ovu kromatografiju iznimno popularnom u analizi glikana (Wuhrer i sur., 2009; Ahn i sur., 2010).

1.5. ANALIZA GLIKANA

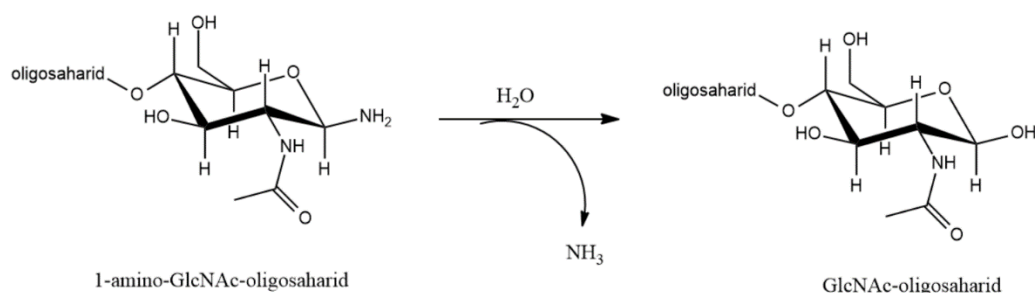
Analiza glikana može uključivati analizu glikoproteina, analizu glikopeptida dobivenih enzimatskom obradom glikoproteina, analizu glikana kemijski ili enzimatski oslobođenih od glikokonjugata te analizu monosaharida od kojih je glikan građen (Varki i sur., 2015; Keser, 2016). Analiza oslobođenih glikana najčešći je način analize glikana zbog toga što pruža najviše različitih informacija o glikanu te je pogodna za više različitih analitičkih tehnika.

Analitičke tehnike najčešće korištene u analizi oslobođenih glikana su tekućinska kromatografija (visoke djelotvornosti – HPLC ili ultra visoke djelotvornosti – UPLC), masena spektrometrija (MS) i kapilarna elektroforeza (CE). U većini slučajeva UPLC i CE analiza omogućuju relativnu kvantifikaciju glikana, ali razdvajanje glikana nije potpuno te su često kromatografski pikovi dobiveni doprinosom različitih glikana. S druge strane MS daje više strukturnih informacija o glikanu, ali je manje kvantitativna tehnika dijelom i zbog toga što različiti glikani imaju različite faktore odziva. (Huffman i sur., 2014; Keser, 2016). Kako bi se dobio slobodni glikan, potrebno ga je osloboditi s glikoproteina što se najčešće čini enzimatski ili kemijski. Enzimatsko cijepanje je selektivnije i manje agresivno od kemijskog cijepanja pa je metoda izbora u većini analiza. Enzimi koji se koriste mogu biti endoglikozidaze ili egzoglikozidaze, a najčešće korišteni enzim je peptid:*N*-glikozidaza F (PNGaza F) koja je endoglikozidaza iz klase peptid-*N*4-(*N*-acetil- β -glukozaminil)asparagin amidaza. PNGaza F hidrolizira amidnu vezu između unutarnjeg *N*-acetilglukozamina glikana i asparaginskog aminokiselinskog ostatka u glikoproteinu ili glikopeptidu. PNGaza F oslobodit će sve glikane povezane na asparaginski aminokiselinski ostatak osim ako je sržni *N*-acetilglukozamin α 1,3-fukoziliran što se najčešće opaža u biljakama i nekim insektima (Song i sur., 2011). Primjerice, sržna α 1,3-fukoza na *N*-glikanima fosfolipaze A₂ u pčelinjem venomu važan je epitop IgE kod pojedinaca alergičnih na pčelinji venom (Tretter i sur., 1993). Hidrolizom amidne veze PNGazom F nastaje slobodni 1-amino-GlcNAc-oligosaharid te se oslobodi peptidni dio pri čemu asparagin postane asparaginska kiselina (Slika 3.).



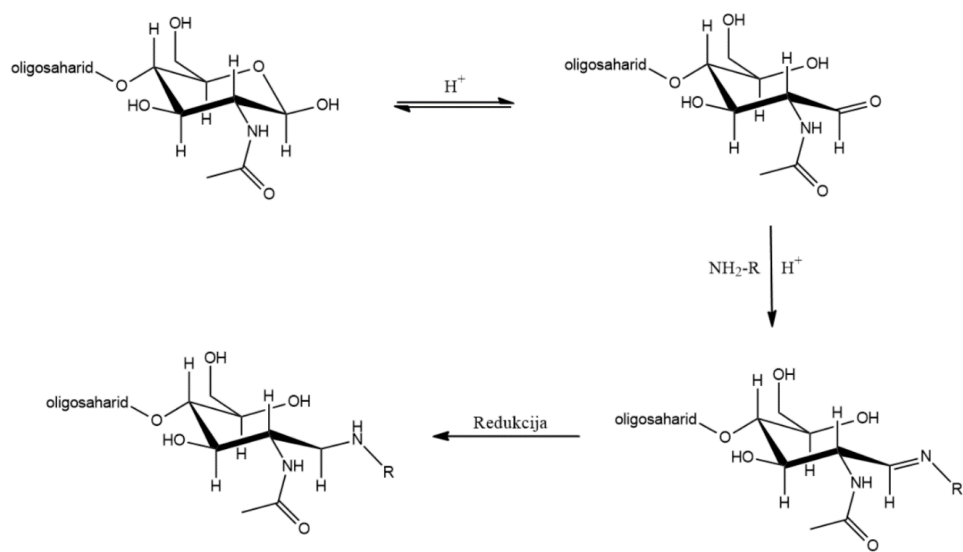
Slika 3. Hidroliza glikoproteina PNGazom F

Potom se 1-amino-GlcNAc-oligosaharid spontano neenzimatski hidrolizira pri čemu se oslobađa amonijak i nastaje GlcNAc-oligosaharid (Slika 4.).



Slika 4. Neenzimatska hidroliza 1-amino-GlcNAc-oligosaharida

Oslobodeni GlcNAc-oligosaharid kao i drugi glikani nema prirodni kromofor zbog čega glikani daju slabe intenzitete signala na većini detektora koji se koriste u UPLC metodama. Iz tog su razloga razvijene brojne metode derivatizacije glikana kako bi se omogućila ili olakšala njihova analiza. Jedna od najčešće korištenih metoda derivatizacije glikana je vezanje fluorofora na reaktivni kraj glikana reakcijom reduktivne aminacije. Takav fluorofor mora imati amino skupinu koja je po mogućnosti vezana na aromatski prsten. Potrebno je i razmišljati o funkcionalnim skupinama koje mogu ionizirati ovisno o tome koja tehnika masene spektrometrije će biti korištena. Reduktivni kraj glikana u ravnotežnoj je reakciji između poluacetalne i aldehidne forme. Aldehidna forma u kiselim uvjetima može reagirati s aminom pri čemu nastaje imin (Schiffova baza). Taj se imin može *in situ* reducirati s prethodno dodanim reducensom dajući sekundarni amin koji je stabilniji i prikladniji za analizu od Schiffove baze (Slika 5.).

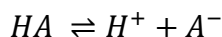


Slika 5. Obilježavanje glikana reakcijom reduktivne aminacije

Najčešće korišteni reducensi u ovoj reakciji su natrijev cijanoborhidrid i 2-pikolin boran. Najčešće korišteni fluorofori u ovoj metodi su 2-aminobenzojeva kiselina, 2-aminobenzamid, 2-aminopiridin i prokainamid, iako su u razvoju i brojni drugi. Glikan i fluorofor reagiraju isključivo u omjeru 1:1 što omogućuje kvantifikaciju glikana mjerenjem intenziteta fluorescencije (Ruhaak i sur., 2010; Anumula, 2006).

1.6. KONSTANTA DISOCIJACIJE KISELINE I LIPOFILNOST

Kiselost se najčešće opisuje kao sposobnost molekule da donira protone ili da tvori kovalentnu vezu svojim elektronskim parom. Postoje različiti načini kvantifikacije kiselosti neke molekule, ali najčešći je koristeći konstantu disocijacije kiseline, odnosno njenog negativnog logaritma pK_a . Primjerice, za reakciju disocijacije neke kiseline HA:



definira se se ravnotežna konstanta za tu reakciju kao:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$

odnosno pK_a kao:

$$pK_a = -\log K_a$$

Iz tih se izraza vidi da će jača kiselina imati veću K_a , odnosno manji pK_a .

S druge strane, za neku molekulu se može definirati lipofilnost kao svojstvo molekule da preferira razdiobu u nepolaro otapalo u odnosu na polarno, odnosno hidrofobnost kao svojstvo molekule da izbjegava vodu, odnosno polarna otapala te dva suprotna pojma – hidrofilitnost i lipofobnost. Ta se dva svojstva često koriste kao sinonimi, iako u stvarnosti nisu budući da postoje spojevi poput silikona i fluorougljika koji su hidrofobni, ali nisu lipofilni. Ipak, za većinu primjena, odnosno molekula, ta su dva pojma, odnosno njihove vrijednosti u značajnoj pozitivnoj korelaciji. Tako se za neku molekulu može definirati particijski koeficijent P , odnosno njegov logaritam $\text{Log}P$ kao omjer koncentracija neioniziranog analita u n -oktanolu i vodi:

$$\text{Log}P = \log \left(\frac{[\text{analit}]_{n\text{-oktanol}}^{\text{neionizirani}}}{[\text{analit}]_{\text{voda}}^{\text{neionizirani}}} \right)$$

Iz tog se izraza vidi da će lipofilnija molekula imati veću koncentraciju neioniziranog oblika u *n*-oktanolu od manje lipofilne molekule te će samim time imati veći LogP. LogP se može odrediti eksperimentalno određujući točne koncentracije neioniziranog analita u *n*-oktanolu i vodi, ali se danas može određivati i računalno koristeći brojne metode i baze poznatih LogP. Pokazano je kako je u masenoj spektrometriji, posebno ionizaciji elektroraspršenjem vrlo bitan odnos lipofilnosti i naboja molekule na ionizaciju molekule. Naime, uočeno je da lipofilnost povećava ionizaciju analita. Razlog tomu je činjenica da su prilikom ionizacije elektroraspršenjem lipofilni spojevi više orijentirani površini kapljice, nego hidrofilnom središtu kapljice. Samim time, prilikom desorpcije otapala, veća je vjerojatnost da će takvi spojevi biti sadržani u novoj, manjoj kapljici te u konačnici biti ionizirani i izbačeni kao ioni u plinovitoj fazi. Također, na površini kapljice je zbog elektrostatskih odbijanja višak, odnosno manjak naboja, ovisno o kojem se ESI modu radi. (Fenn, 1993). Ta je pojava opažena u analizi brojnih različitih molekula (Null i sur., 2003; Cech i sur., 2000). S druge strane, utjecaj pK_a analita, odnosno njegovog naboja pri nekom pH nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da je manji od lipofilnosti analita (Walker i sur., 2010). Naime, iako bi analit s funkcionalnom skupinom koja se lako deprotonira trebao lakše ionizirati, postojanje funkcionalne skupine koja lako deprotonira podrazumijeva smanjenje lipofilnosti, budući da takve kisele skupine često sadrže elektronegativne atome. Dakle, povećanje sklonosti ionizaciji zbog funkcionalne skupine koja se lako deprotonira, anulirano je posljedičnim smanjenjem lipofilnosti zbog čega je analit manje orijentiran površini kapljice, nego hidrofilnom središtu kapljice zbog čega je manja vjerojatnost da će takav analit biti sadržan u novoj, manjoj kapljici te u konačnici biti ioniziran i izbačen kao ion u plinovitoj fazi.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glikani se najčešće analiziraju koristeći tehnike tekućinske kromatografije, masene spektrometrije i kapilarne elektroforeze. Kombinacija ovih tehnika moćan je alat u određivanju glikanskih struktura, njihovoj asignaciji te kvantifikaciji. Kada se u analizi glikana koristi masena spektrometrija, najčešće se koristi pozitivni MS mod zbog mnogo razvijenih i uhodanih metoda u visokoprotočnoj glikomici. Bez obzira na naboj iona, glikani fragmentiraju na dva glavna načina: glikozidno cijepanje između monosaharidnih jedinica i cijepanje unutar monosaharidnog prstena. Glikozidno cijepanje daje informacije o slijedu monosaharidnih jedinica, dok cijepanje unutar monosaharidnog prstena daje informacije o načinu vezanja monosaharidnih jedinica te su oba ključna za određivanje točne glikanske strukture. Pozitivni MS mod pokazuje relativno manje cijepanja unutar monosaharidnog prstena od negativnog MS moda pa nerijetko zahtjeva permetilaciju glikana te asigniranje slobodnih hidroksilnih skupina u različitim fragmentima kako bi se dobila potpuna glikanska struktura (Harvey, 2019). Permetilacija unosi nečistoće i artefakte u spektar masa, a doprinosi i *O*-deacetilaciji acetilnih skupina koje se ponekad nalaze u sijalinskim kiselinama te ju je stoga poželjno izbjegavati ako nije nužna (Liu i Afonso, 2010).

Prilikom odabira fluorofora kojim će se obilježiti *N*-glikan, potrebno je razmišljati o njegovoj prikladnosti i svojstvima u metodi koju ćemo koristiti. Konkretno, kod HILIC-UPLC-FLR-ESI-MS metode, potrebno je razmišljati o fluorescenciji i ionizaciji fluorofora. Kako glikani sami nemaju prirodni kromofor, intenzitet fluorescencijskog signala dolazi od fluorofora. Samim time, ako fluorofor slabo fluorescira, tada se signali relativno manjih intenziteta neće dovoljno dobro izdignuti iznad bazne linije te analiza takvih glikana može biti otežana ili nemoguća. S druge strane, fluorofor značajno doprinosi ionizaciji glikana, pogotovo ako ima funkcionalne skupine koje se lako protoniraju, odnosno deprotoniraju, ovisno o kojem se MS modu radi.

Iz tog razloga, ukazuje se potreba za dizajnom fluorofora koji će više doprinositi fluorescenciji i ionizaciji glikana te potreba za kvantifikacijom tih doprinosa kako bi se unaprijedile metode analize glikana koje uključuju negativni MS mod budući da su te metode informativnije od metoda koje uključuju pozitivni MS mod (Walker i sur., 2010; Harvey, 2019).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. UZORAK

Kao uzorak korišten je imunoglobulin G izoliran iz krvne plazme velikog broja ispitanika iz prijašnje populacijske studije.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. ORGANSKE KEMIKALIJE

Tablica 2. Organske kemikalije

| Kemikalija | Proizvođač |
|--|-------------------------|
| 2-pikolin boran (2-PB) | Sigma-Aldrich |
| Dimetilsulfoksid (DMSO) | Fluka |
| Acetonitril (ACN) | Fluka |
| Etanol (C ₂ H ₅ OH) | Sigma-Aldrich |
| Ledena octena kiselina (CH ₃ COOH) | Merck |
| NP-40 Igepal CA630 (oktil-fenoksipolietoksi-etanol) detergent | Sigma |
| SDS (natrijev dodecil-sulfat) detergent | Sigma |
| Anilin | Institut Ruđer Bošković |
| 2-aminobenzojeva kiselina | Institut Ruđer Bošković |
| 3-aminobenzojeva kiselina | Institut Ruđer Bošković |
| 4-aminobenzojeva kiselina | Institut Ruđer Bošković |
| Benzokain | Sigma-Aldrich |
| 4-aminofenol | Sigma-Aldrich |
| 6-amino-2-naftojeva kiselina | Sigma-Aldrich |
| 3-amino-2-naftojeva kiselina | Sigma-Aldrich |
| 2-amino-1-naftalensulfonska kiselina | Sigma-Aldrich |
| 2-aminobenzamid | Sigma-Aldrich |

3.2.2. ANORGANSKE KEMIKALIJE

Tablica 3. Anorganske kemikalije

| Kemikalija | Proizvođač |
|---|---------------|
| Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) | Sigma-Aldrich |
| Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) | Sigma-Aldrich |
| Kalijev klorid (KCl) | Sigma-Aldrich |
| Klorovodična kiselina (HCl) | Sigma-Aldrich |
| Natrijev klorid (NaCl) | Kemika |
| Natrijev hidroksid (NaOH) | Sigma-Aldrich |

3.2.3. BIOLOŠKE KEMIKALIJE

Tablica 4. Biološke kemikalije

| Kemikalija | Proizvođač |
|------------|------------|
| PNGaza F | Prozyme |

3.2.4. PUFERI I OTOPINE

Tablica 5. Puferi i otopine

| Otopina | Proizvođač ili izrada |
|----------------------------|---|
| 2% SDS | 2 grama SDS-a otopiti u 98 grama vode |
| 5xPBS | Za 200 mL pufera: otopiti 8,00 grama NaCl, 1,38 grama Na_2HPO_4 , 0,29 g KH_2PO_4 , 0,19 grama KCl u 200 mL ultra čiste vode (miliQ H_2O), promiješati, otopinu filtrirati i prilagoditi pH s NaOH |
| 30% octena kiselina u DMSO | Za 250 μL otopine: u 175 μL dimetilsulfoksida (DMSO) dodati 75 μL octene kiseline |
| 96% acetonitril | Za 250 mL otopine: dodati 10 mL vode u 240 mL acetonitrila |
| Otopina za kalibraciju MS | Waters, Milford (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ otopine natrijevog jodida (NaI) u 50:50 izopropilnog alkohola i vode) |
| 70% etanol | Za 100 mL otopine: dodati 70 mL etanola u 30 mL vode. |

3.2.5. LABORATORIJSKA OPREMA I PRIBOR

Tablica 6. Laboratorijska oprema i pribor

| Oprema i pribor | Proizvođač |
|---|--------------------------|
| AcroPrep 96 GHP 0,2 µm filter pločica od 1 mL | Pall |
| Bio Vortex V1 | Biosan |
| Mikropipete različitih volumena | Ranin |
| Nastavci za mikropipete različitih volumena | Ranin |
| PCR pločice | Frame Star |
| Pločice za pročišćavanje glikana | Orochem |
| Pločice za skupljanje uzoraka; polipropilen; 1 mL zapremnine; za 96 uzoraka | Waters, Milford |
| Tresilica Schüttler MTS 4 | IKA |
| AB54-S, analitička vaga | Mettler Toledo |
| Vacuum manifold – vakuumska pumpa | Pall |
| Centrifuga | Centifuge 5804 Eppendorf |
| NanoAcquity UPLC analizator | Waters, Milford |
| Waters Acquity UPLC kromatograf | Waters, Milford |
| Kolona za kromatografiju ACQUITY UPLC®BEH Glycan 1.7 µm | Waters, Milford |
| Synapt G2-Si MS system | Waters, Milford |

3.3. PRIPREMA UZORAKA

Za pripremu uzorka korišten je imunoglobulin G koji je prije analize obrađen. Budući da se analiziraju glikani, potrebno je provesti deglikozilaciju imunoglobulina G, odnosno odvojiti glikane s glikoproteina što se čini PNGazom F, enzimom specifičnim za hidrolizu kovalentne veze između glikana i proteinskog dijela glikoproteina. Kako bi se povećala učinkovitost deglikozilacije, imunoglobulin G se prethodno denaturira što osigurava povoljan sterički položaj PNGaze F i glikoproteina. Slobodni glikani potom se obilježe fluorescentnim kromoforom kako bi se mogli detektirati fluorescentnim detektorom prilikom UPLC analize, budući da sami glikani ne daju signale dovoljnog intenziteta prilikom fluorescentne detekcije.

Obilježavanje glikana fluorescentnom bojom provodi se reakcijom reduktivne aminacije u kiseloj otopini octene kiseline u DMSO s fluorescentnim kromoforom i 2-pikolin boranom kao reducensom. Konačno, obilježeni glikani se pročiste od proteina te ostalih molekula u početnom uzorku.

3.3.1. DENATURACIJA PROTEINA

Prije denaturacije potrebno je 1,33% SDS, 5xPBS i 4% Igepal otopine zagrijati na sobnu temperaturu. Potom se u svaku jažicu s uzorkom mikropipetira po 30 μ L 1,33% SDS-a nastavkom od 250 μ L. Nakon dodatka SDS-a, mikropipetom se sadržaj svake jažice promiješa na način da se sadržaj nekoliko puta aspirira u nastavak mikropipete. Potom se pločica s uzorcima zatvori adhezivnom folijom te inkubira na 65 °C tijekom 10 minuta. Nakon inkubacije potrebno je pločicu ostaviti na sobnoj temperaturi 30 minuta kako bi se ohladila. Potom se nastavkom od 250 μ L mikropipetira po 10 μ L 4% Igepala u svaku jažicu. Igepal stupa u interakciju sa SDS-om čime se onemogućava denaturacija PNGaze F koja se dodaje u sljedećem koraku. Sadržaj svake jažice se promiješa na isti način kao nakon dodatka SDS-a te se pločica s uzorcima stavi na tresilicu tijekom 15 minuta.

3.3.2. DEGLIKOZILACIJA

Enzimski smjesa koja se koristi za deglikozilaciju dobiva se miješanjem 10 μ L 5xPBS i 0,12 μ L po uzorku. Nastavcima od 250 μ L pipetira se 10 μ L enzimske smjese za deglikozilaciju u svaku jažicu s uzorkom te se sadržaj svake jažice promiješa na način da se sadržaj nekoliko puta aspirira u nastavak mikropipete. Konačno, pločica s uzorcima se zatvori adhezivnom folijom te se inkubira na 37 °C tijekom 18 sati pri čemu dolazi do deglikozilacije.

3.3.3. PRIPREMA OTOPINA ZA OBILJEŽAVANJE N-GLIKANA

Otopina za obilježavanje N-glikana sastoji se od 25 μ L 30 %-tne octene kiseline u DMSO, 1,12 mg 2-pikolin borana te 3,53 μ mol fluorofora po uzorku (Tablica 7.). Prije pripreme otopine nužno je da 2-pikolin boran postigne sobnu temperaturu. Otopina za obilježavanje N-glikana priprema se u digestoru dodavanjem octene kiseline u DMSO kako bi se dobila 30 %-tna otopina. Dobivena otopina potom se doda u fluorofor, smjesa se vorteksira, a zatim doda u 2-pikolin boran te se vorteksira da potpunog otapanja.

Tablica 7. Mase odvage fluorofora za pripremu otopine za obilježavanje N-glikana

| Fluorofor | Masa odvage po uzorku |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Anilin | 0,329 mg |
| 2-aminobenzojeva kiselina | 0,484 mg |
| 3-aminobenzojeva kiselina | 0,484 mg |
| 4-aminobenzojeva kiselina | 0,484 mg |
| Benzokain | 0,583 mg |
| 4-aminofenol | 0,385 mg |
| 2-aminonaftalen | 0,505 mg |
| 6-amino-2-naftojeva kiselina | 0,661 mg |
| 3-amino-2-naftojeva kiselina | 0,661 mg |
| 2-amino-1-naftalensulfonska kiselina | 0,788 mg |
| 2-aminobenzamid | 0,480 mg |

3.3.4. OBILJEŽAVANJE UZORAKA

Koristeći nastavke od 250 µL u svaku se jažicu s uzorkom ispipetira po 25 µL otopine za obilježavanje N-glikana pri čemu se sadržaj svake jažice promiješa na način da se sadržaj nekoliko puta aspirira u nastavak mikropipete. Ukoliko se primijeti pjenjenje sadržaja u jažici ili pojava mjehurića u otopini, sadržaj je potrebno centrifugirati tijekom nekoliko sekundi na 1000 rpm. Potom se pločica s uzorcima zatvori adhezivnom folijom, stavi na tresilicu tijekom 10 minuta, a potom se inkubira na 65 °C tijekom dva sata. Nakon inkubacije potrebno je pločicu ostaviti na sobnoj temperaturi 30 minuta kako bi se ohladila. Uzorci se potom nanose na prethodno pripremljenu AcroPrep GHP 0,2 µm filter pločicu s hidrofilnom polipropilenskom membranom.

3.3.5. PREKONDICIONIRANJE GHP PLOČICE

Prekondicioniranje GHP pločice podrazumijeva osiguravanje prikladnih uvjeta prije samog nanošenja obilježenih N-glikana na pločicu. Prekondicioniranje GHP pločice vrši se ispiranjem pločice koristeći vakuumsku pumpu. Pri tome treba paziti da tlak pumpe ni u kojem trenutku ne prijeđe 2 inHg kako ne bi došlo do oštećenja polipropilenske membrane. Prvo se pločica ispire s 200 µL svježe pripremljenog 70% etanola, potom s 200 µL ultra čiste vode te konačno s 200 µL svježe pripremljenog 96% acetonitrila ohlađenog na 4 °C.

Pločica se u posljednjem koraku ispiri s acetonitrilom budući da se u daljnjem postupku on koristi kao otapalo. Nanošenje otopina s kojima se pločica ispiri izvodi se mikropipetom s nastavcima od 300 μ L.

3.3.6. NANOŠENJE OBILJEŽENIH N-GLIKANA NA GHP PLOČICU

U svaku jažicu s obilježenim *N*-glikanima ispipetira se po 700 μ L prethodno ohlađenog 100% acetonitrila pri čemu se sadržaj svake jažice promiješa na način da se sadržaj nekoliko puta aspirira u nastavak mikropipete. Nakon toga se koristeći nastavke od 1 mL sav sadržaj prenese na prekondicioniranu GHP pločicu. Otopina se inkubira tijekom dvije minute na GHP pločici kako bi se obilježeni *N*-glikani vezali za pločicu nakon čega se preostala otopina ukloni vakuumskom pumpom.

3.3.7. PROČIŠĆAVANJE OBILJEŽENIH N-GLIKANA

Pročišćavanje obilježenih *N*-glikana provodi se ispiranjem svake jažice na GHP pločici s uzorcima s 200 μ L svježe pripremljenog 96% acetonitrila ohlađenog na 4 °C. Ispiranje se ponovi još tri puta. Potom se GHP pločica postavi na pločicu za sakupljanje uzoraka na kojoj je svaka jažica volumena 1 mL. Zatim se u svaku jažicu pločice za sakupljanje uzoraka ispipetira po 200 μ L svježe pripremljenog 96% acetonitrila ohlađenog na 4 °C te se bez ispiranja pločica centrifugira tijekom 5 minuta na 1000 rpm.

3.3.8. ELUACIJA OBILJEŽENIH N-GLIKANA

GHP pločica s vezanim obilježenim *N*-glikanima postavi se na PCR pločicu za sakupljanje uzoraka. Koristeći nastavke od 300 μ L u svaku jažicu GHP pločice ispipetira se po 90 μ L ultra čiste vode te se pločica stavi na tresilicu tijekom 15 minuta. Potom s GHP pločica zajedno s PCR pločicom za sakupljanje uzoraka centrifugira tijekom 5 minuta na 1000 rpm pri čemu dolazi do eluacije prve frakcije obilježenih *N*-glikana u PCR pločicu za sakupljanje uzoraka. Ovaj se postupak još jednom ponovi te se provjeri je li sav sadržaj jažica na GHP pločici eluiran u PCR pločicu za sakupljanje uzoraka. Budući da su obilježeni *N*-glikani eluirani dva puta s po 90 μ L ultra čiste vode, ukupan volumen u PCR pločici za sakupljanje uzoraka treba biti 180 μ L po jažici. Konačno, PCR pločica za sakupljanje uzoraka zatvori se PCR poklopcem te se pohrani u zamrzivač gdje se čuva do analize.

3.4. ANALIZA UZORAKA

Nakon izolacije, obilježeni *N*-glikani analiziraju se HILIC-UPLC-FLR metodom na *Waters Acquity* UPLC instrumentu (Waters, Milford, MA, USA). Za razdvajanje glikana koristi se HILIC kolona *Waters BEH* dimenzija 100x2,1 mm te veličine čestica od 1,7 μm . Mobilnu fazu čini 50 mM otopina amonijeva formijata (pH = 4,4) kao otapalo A i acetonitril kao otapalo B. Temperatura kolone je 60 °C, dok je temperatura uzoraka 10 °C. Brzina protoka iznosi 0,400 mL/min te se u programu *Empower 3* zadaju uvjeti gradijente elucije (Tablica 8.).

Tablica 8. Promjena udjela otapala A i B u mobilnoj fazi tijekom gradijentne elucije

| Vrijeme/min | Protok/(mL/min) | % otapalo A | % otapalo B |
|-------------|-----------------|-------------|-------------|
| 0,00 | 0,400 | 25,0 | 75,0 |
| 25,00 | 0,400 | 38,0 | 62,0 |
| 26,00 | 0,400 | 100,0 | 0,0 |
| 28,00 | 0,400 | 100,0 | 0,0 |
| 29,00 | 0,400 | 25,0 | 75,0 |
| 34,00 | 0,400 | 25,0 | 75,0 |
| 35,00 | 0,400 | 0,0 | 100,0 |
| 45,00 | 0,000 | 0,0 | 100,0 |

Valne duljine ekscitacije i detekcije za svaki fluorofor određene su zaustavljanjem protoka u trenutku kad je obilježeni *N*-glikan u fluorescentnom detektoru te određivanjem 3D ekscitacijskog i emisijskog spektra te očitavanjem lokalnih maksimuma intenziteta (Tablica 9.). Tada su obilježeni *N*-glikani eksperimentalno analizirani UPLC metodom s fluorescentnim detektorom te je usporedbom intenziteta pikova prilikom analiza s različitim kombinacijama ekscitacijske i detekcijske valne duljine određena najbolja kombinacija ekscitacijske i detekcijske valne duljine koja je korištena u daljnim analizama.

Tablica 9. Ekscitacijske i detekcijske valne duljine za korištene fluorofore

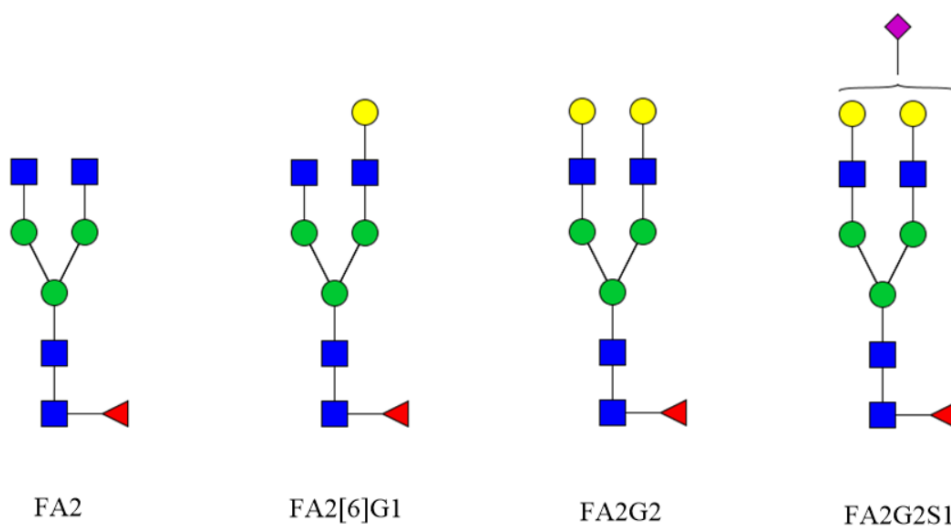
| Fluorofor | Ekscitacijska λ / nm | Detekcijska λ / nm |
|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Anilin | 245 | 335 |
| 2-aminobenzojeva kiselina | 365 | 434 |
| 3-aminobenzojeva kiselina | 310 | 405 |
| 4-aminobenzojeva kiselina | 310 | 365 |
| Benzokain | 310 | 365 |
| 4-aminofenol | 310 | 365 |
| 2-aminonaftalen | 310 | 434 |
| 6-amino-2-naftojeva kiselina | 365 | 434 |
| 3-amino-2-naftojeva kiselina | 272 | 495 |
| 2-amino-1-naftalensulfonska kiselina | 368 | 465 |
| 2-aminobenzamid | 250 | 428 |

UPLC instrument spregnut je sa *Synapt G2-Si* MS sustavom (Waters, Milford, MA, USA). Maseni spektrometar je pod kontrolom programa *Mass Lynx v. 4.1* (Waters, Milford, MA, USA). Uvjeti za MS bili su: negativni ionski mod, napon kapilare 3,5 kV, napon stošca za uzorkovanje 90 V, temperatura izvora 80°C, temperatura desolvacije 400°C, a protok plina 600 L/h. Spektar masa sniman je na frekvenciji 1 Hz u rasponu m/z od 500 do 3000. Analiza MS spektara provedena je uz pomoć programa *MassLynx v. 4.1*.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj kemijske strukture fluorofora kojim se obilježavaju *N*-glikani na ionizaciju obilježenih *N*-glikana prilikom analize masenim spektrometrom u negativnom modu. Priprema uzorka za analizu uključivala je denaturaciju glikoproteina radi učinkovitije deglikozilacije te oslobađanje *N*-glikana s denaturiranog glikoproteina djelovanjem PNGaze F. Potom su slobodni *N*-glikani obilježeni s 11 različitih fluorofora u pentaplikatima u reakciji reduktivne aminacije. Tako obilježeni *N*-glikani odijeljeni su tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti temeljene na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC) te analizirani masenom spektrometrijom kombinacijom kvadrupolnog i TOF masenog analizatora u negativnom ionskom modu (ESI-qTOF).

Strukture glikana sadržanih unutar četiri najintenzivnija pika u kromatogramu određene su na temelju MS/MS spektra korištenjem programa *GlycoMod* i *GlycoWorkbench* prilikom razvoja metode, a u ovom su radu identificirane na temelju retencijskog vremena. Tako su identificirane četiri glikanske strukture: FA2, FA2[6]G1, FA2G2, FA2G2S1 čije su strukture prikazane na Slici 6.



Slika 6. Strukture glikana sadržanih u četiri najintenzivnija kromatogramska pika

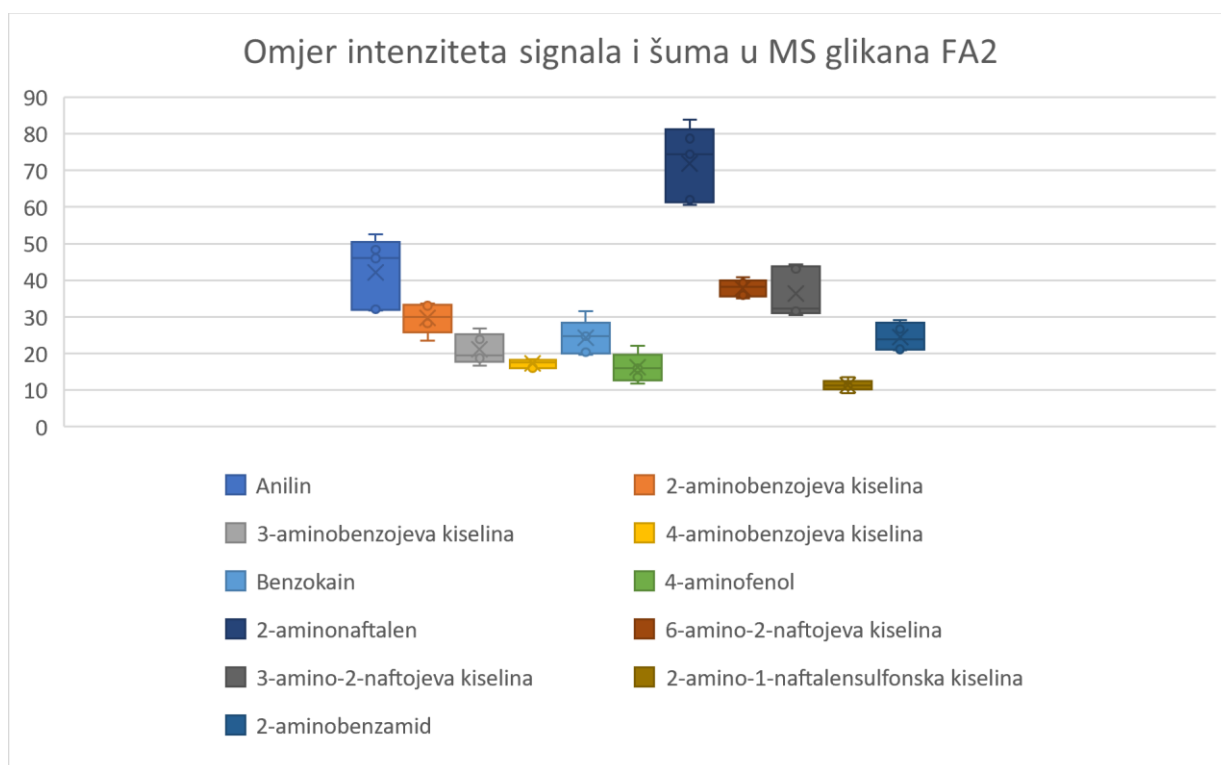
Zatim su izmjereni intenziteti signala i šuma u masenom spektru za svaki od ta četiri glikana te je izračunat omjer signala i šuma (Tablica 10-11., Prilog 1-11., Slika 7-10.).

Tablica 10. Omjer intenziteta signala i šuma u masenom spektru te retencijsko vrijeme FA2 i FA2[6]G1 glikana obilježenih fluoroforima kao srednja vrijednost pentaplikata

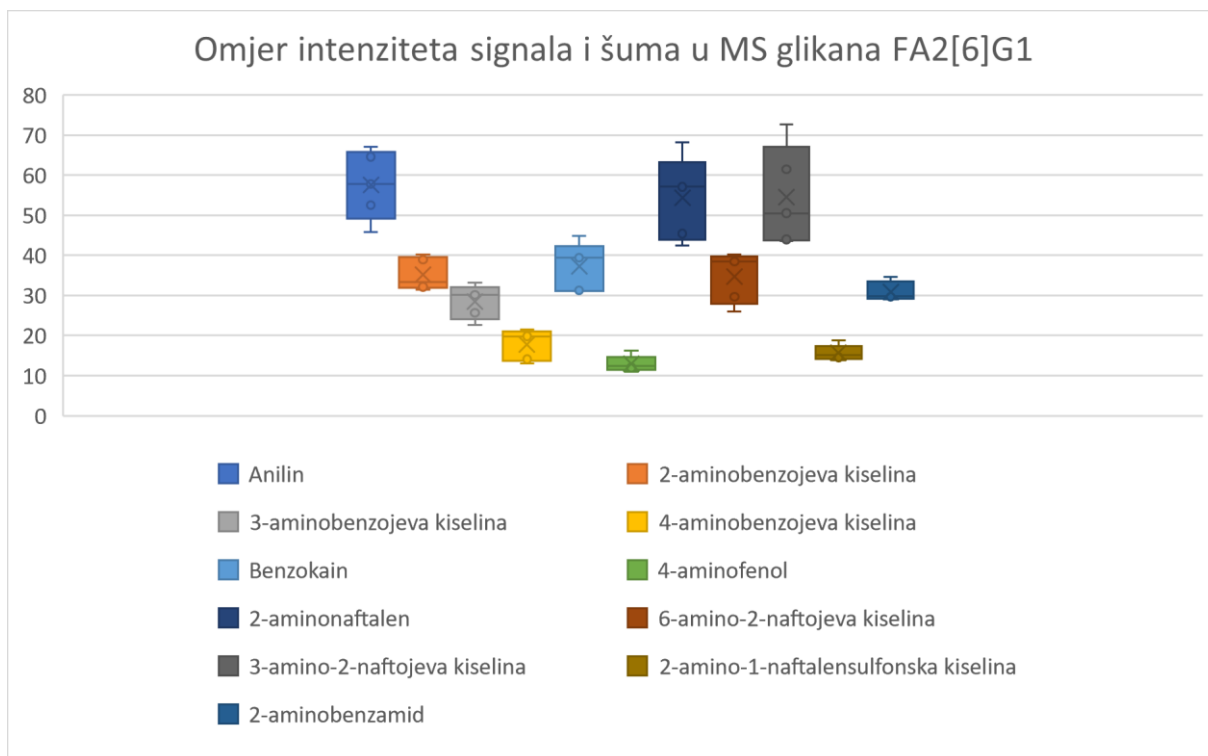
| Fluorofor | FA2 | | FA2[6]G1 | |
|--------------------------------------|----------|---------|----------|---------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| Anilin | 7,818 | 42,1337 | 10,499 | 57,5638 |
| 2-aminobenzojeva kiselina | 11,141 | 29,6566 | 14,053 | 35,2317 |
| 3-aminobenzojeva kiselina | 13,174 | 21,0939 | 16,146 | 28,5277 |
| 4-aminobenzojeva kiselina | 12,112 | 17,2201 | 15,074 | 17,8198 |
| Benzokain | 6,587 | 24,3211 | 8,9774 | 37,2573 |
| 4-aminofenol | 14,127 | 16,1727 | 17,333 | 12,9595 |
| 2-aminonaftalen | 6,445 | 71,9041 | 8,832 | 54,2928 |
| 6-amino-2-naftojeva kiselina | 11,541 | 37,8545 | 14,445 | 34,7483 |
| 3-amino-2-naftojeva kiselina | 9,944 | 36,3473 | 12,748 | 54,4684 |
| 2-amino-1-naftalensulfonska kiselina | 9,823 | 11,3251 | 12,677 | 15,6701 |
| 2-aminobenzamid | 10,102 | 24,4676 | 13,031 | 30,8166 |

Tablica 11. Omjer intenziteta signala i šuma u masenom spektru te retencijsko vrijeme FA2G2 i FA2G2S1 glikana obilježenih fluoroforima kao srednja vrijednost pentaplikata

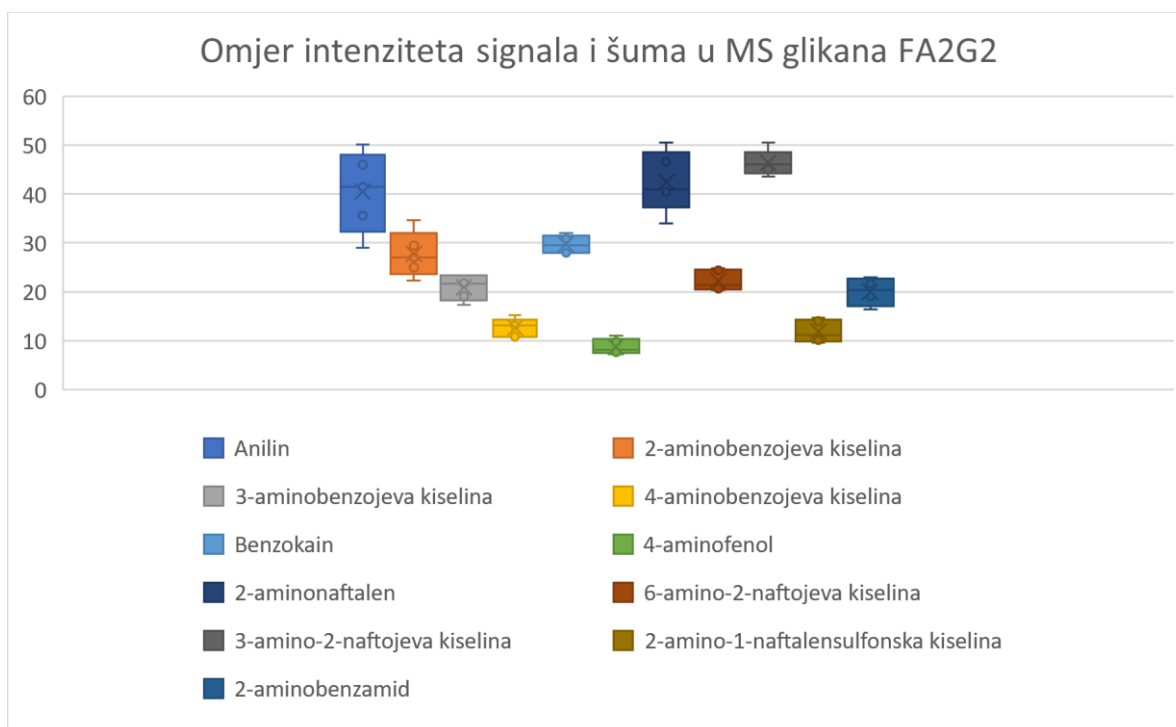
| Fluorofor | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|--------------------------------------|----------|---------|----------|---------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| Anilin | 13,836 | 40,4545 | 18,530 | 17,7170 |
| 2-aminobenzojeva kiselina | 17,424 | 27,7089 | 21,806 | 14,5603 |
| 3-aminobenzojeva kiselina | 19,477 | 20,9788 | 23,686 | 9,7092 |
| 4-aminobenzojeva kiselina | 18,449 | 12,6550 | 22,692 | 5,5792 |
| Benzokain | 12,098 | 29,6810 | 16,670 | 10,3620 |
| 4-aminofenol | 20,792 | 8,7424 | 24,528 | 5,6360 |
| 2-aminonaftalen | 11,930 | 42,5335 | 16,552 | 15,8351 |
| 6-amino-2-naftojeva kiselina | 17,752 | 22,3062 | 21,965 | 11,4708 |
| 3-amino-2-naftojeva kiselina | 16,071 | 46,3529 | 20,616 | 20,1821 |
| 2-amino-1-naftalensulfonska kiselina | 16,088 | 11,8768 | 20,883 | 6,3965 |
| 2-aminobenzamid | 16,471 | 20,0397 | 20,981 | 11,5650 |



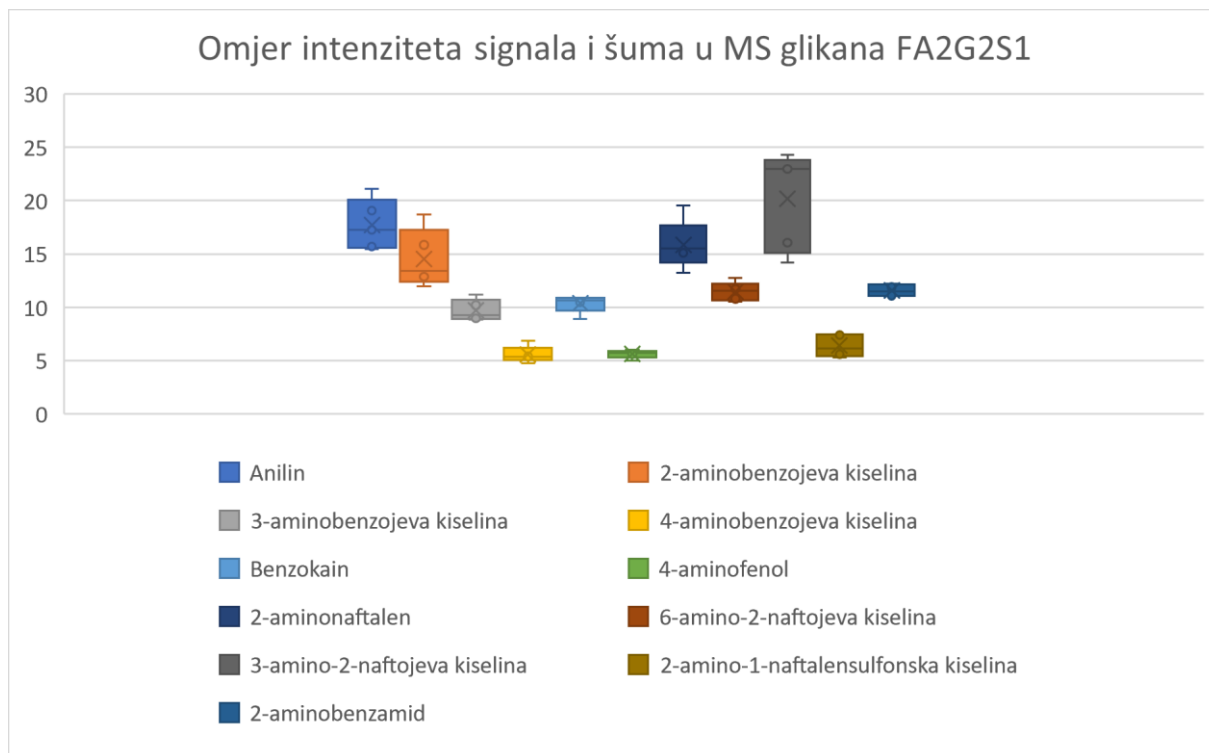
Slika 7. Omjer intenziteta signala i šuma u MS glikana FA2 dobiven pentaplikatom za svaki fluorofor



Slika 8. Omjer intenziteta signala i šuma u MS glikana FA2[6]G1 dobiven pentaplikatom za svaki fluorofor



Slika 9. Omjer intenziteta signala i šuma u MS glikana FA2G2 dobiven pentaplikatom za svaki fluorofor



Slika 10. Omjer intenziteta signala i šuma u MS glikana FA2G2S1 dobiven pentaplikatom za svaki fluorofor

Svim korištenim fluoroforima određeni su LogP koristeći SwissADME program (Daina i sur., 2017). SwissADME program određuje LogP koristeći pet različitih metoda: XLOGP3 – atomistička metoda koja uključuje korektivne faktore i knjižnice poznatih vrijednosti (Cheng i sur., 2007), WLOGP – potpuno atomistička metoda zasnovana na fragmentalnom sustavu (Wildman i Crippen, 1999), MLOGP – arhetip topološke metode zasnovane na linearnoj ovisnosti 13 molekulskih deskriptora (Moriguchi i sur., 1992; Moriguchi i sur., 1994), SILICOS-IT – hibridna metoda zasnovana na 27 fragmenata i 7 topoloških deskriptora i iLOGP – *in-house* metoda zasnovana na energijama solvatacije *n*-oktanola i vode izračunate GB/SA modelom (Daina i sur., 2014). Konsenzusni LogP je aritmetička sredina LogP dobivenih korištenjem pet gore navedenih metoda te je ta vrijednost korištena kao mjera lipofilnosti fluorofora (Tablica 12., Prilog 12.).

Tablica 12. Izračunate vrijednosti LogP za korištene fluorofore

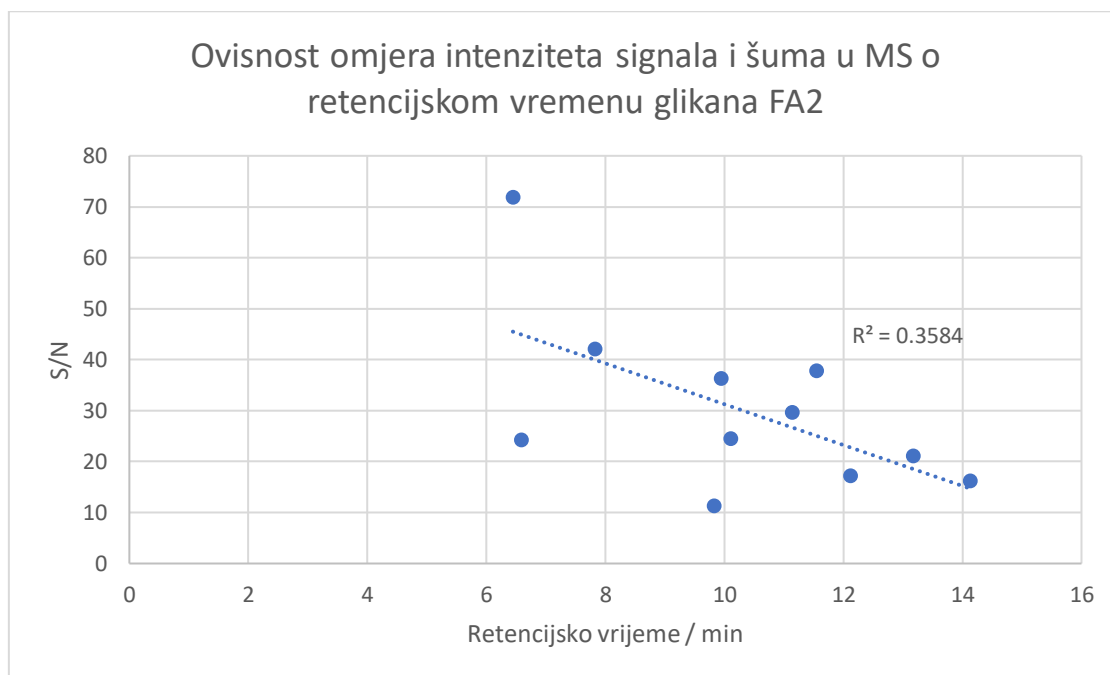
| Fluorofor | Konsenzusni LogP |
|--------------------------------------|------------------|
| Anilin | 1,22 |
| 2-aminobenzojeva kiselina | 0,72 |
| 3-aminobenzojeva kiselina | 0,58 |
| 4-aminobenzojeva kiselina | 0,60 |
| Benzokain | 1,63 |
| 4-aminofenol | 0,68 |
| 2-aminonaftalen | 2,23 |
| 6-amino-2-naftojeva kiselina | 1,92 |
| 3-amino-2-naftojeva kiselina | 1,72 |
| 2-amino-1-naftalensulfonska kiselina | 0,96 |
| 2-aminobenzamid | 0,51 |

Također, svim korištenim fluoroforima određen je pK_a koristeći Chemicalize program (ChemAxon, www.chemicalize.com) (Tablica 13., Prilog 13-23.). Anilin, benzokain, 2-aminonaftalen te 2-aminobenzamid nemaju funkcionalne skupine koje bi se deprotonirale, odnosno koje će biti negativno nabijene prilikom analize pa kod glikana obilježenih tim fluoroforima glikanski dio isključivi nosač negativnog naboja. Zbog toga ti fluorofori nisu uključeni u korelaciju intenziteta signala i šuma u masenoj spektrometriji i pK_a fluorofora.

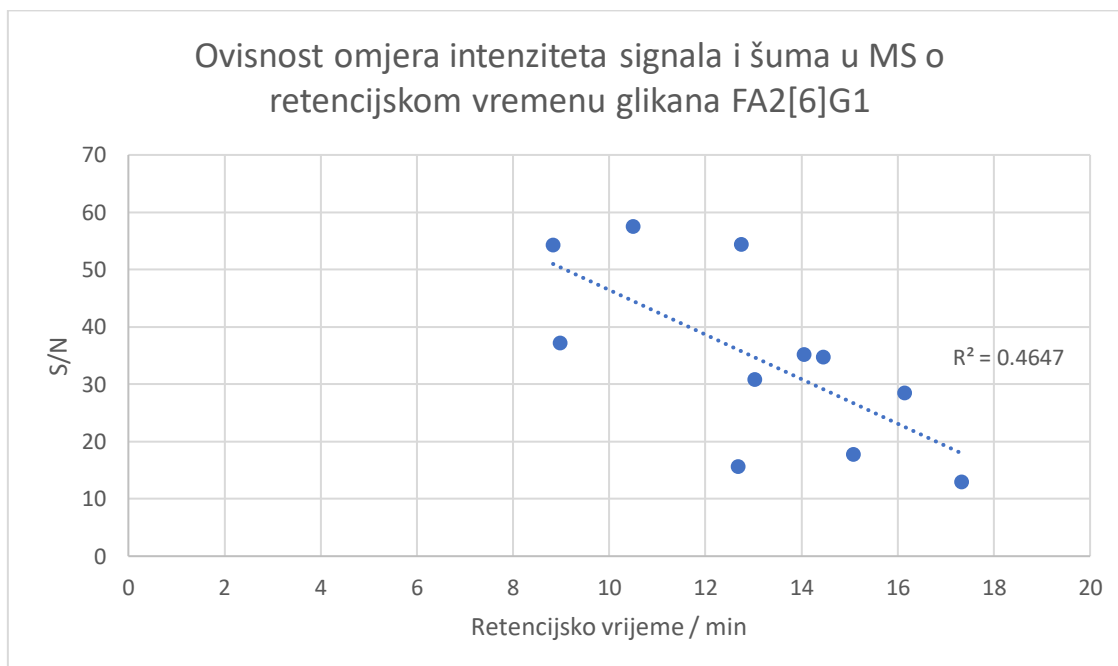
Tablica 13. Izračunate vrijednosti pK_a za korištene fluorofore

| Fluorofor | pK_a |
|--------------------------------------|--------|
| Anilin | - |
| 2-aminobenzojeva kiselina | 4,89 |
| 3-aminobenzojeva kiselina | 4,81 |
| 4-aminobenzojeva kiselina | 4,77 |
| Benzokain | - |
| 4-aminofenol | 10,4 |
| 2-aminonaftalen | - |
| 6-amino-2-naftojeva kiselina | 4,25 |
| 3-amino-2-naftojeva kiselina | 4,76 |
| 2-amino-1-naftalensulfonska kiselina | -3,21 |
| 2-aminobenzamid | - |

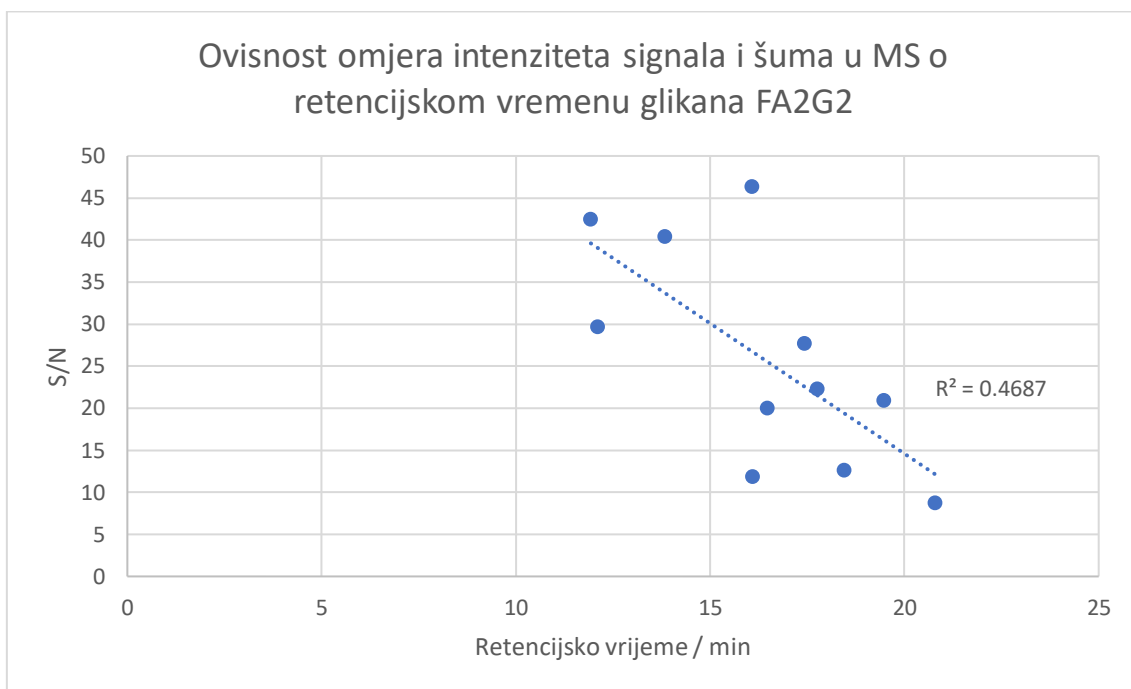
Zatim je određena i prikazana ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o retencijskom vremenu glikana FA2, FA2[6]G1, FA2G2 i FA2G2S1 (Slika 11-14.) te LogP fluorofora (Slika 15-18.) i pKa fluorofora (Slika 19-22.) kojim su obilježeni glikani FA2, FA2[6]G1, FA2G2 i FA2G2S1.



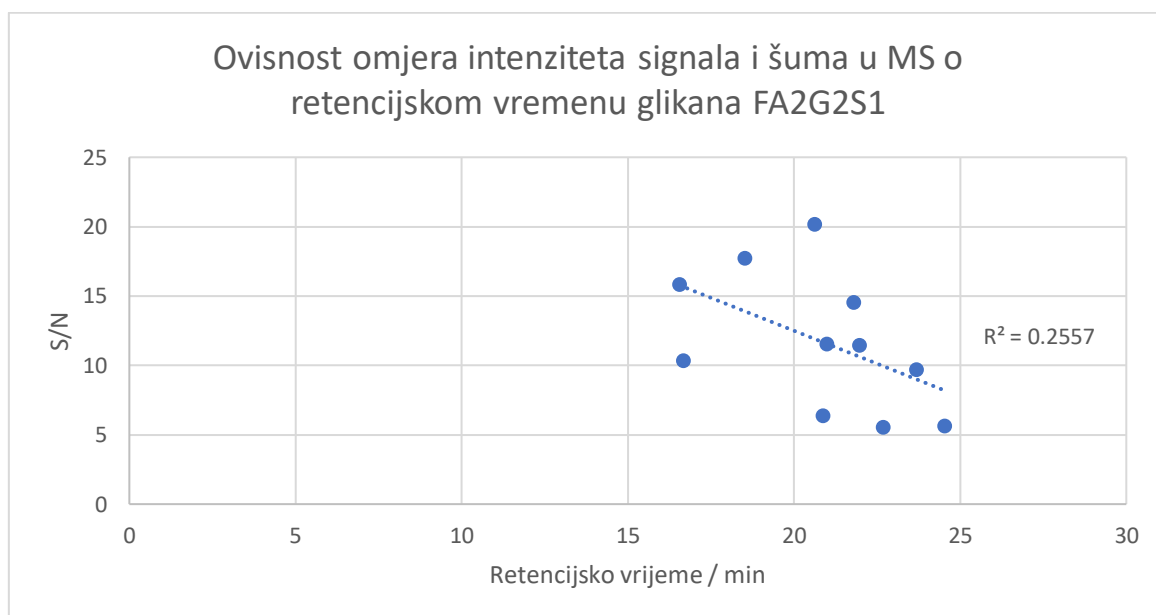
Slika 11. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o retencijskom vremenu glikana FA2



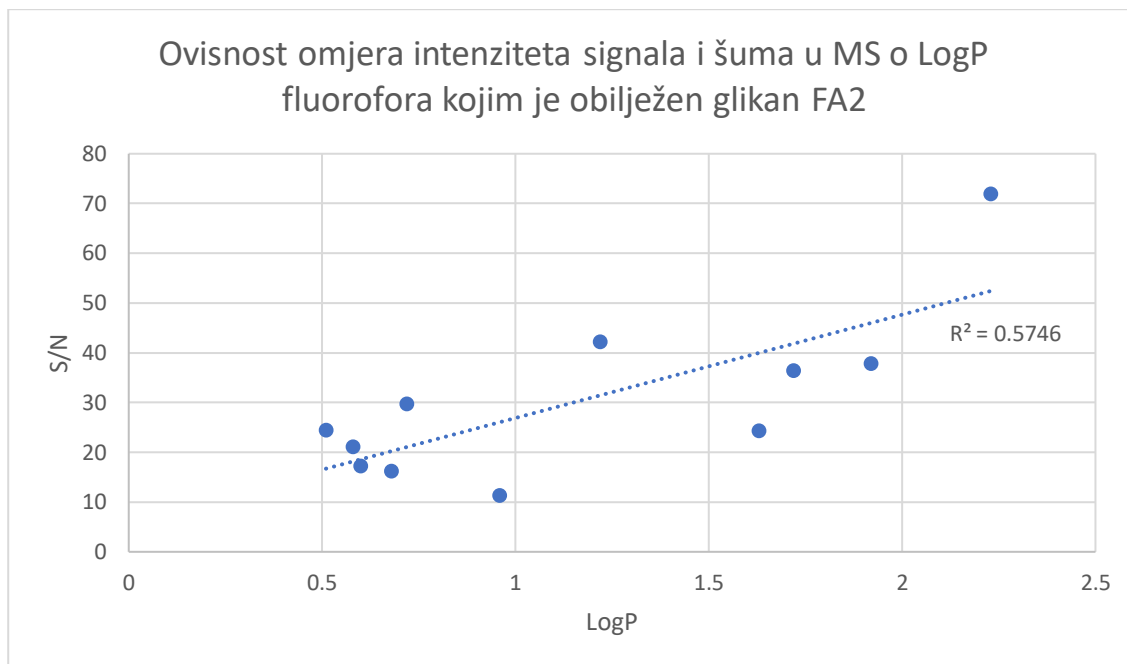
Slika 12. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o retencijskom vremenu glikana FA2[6]G1



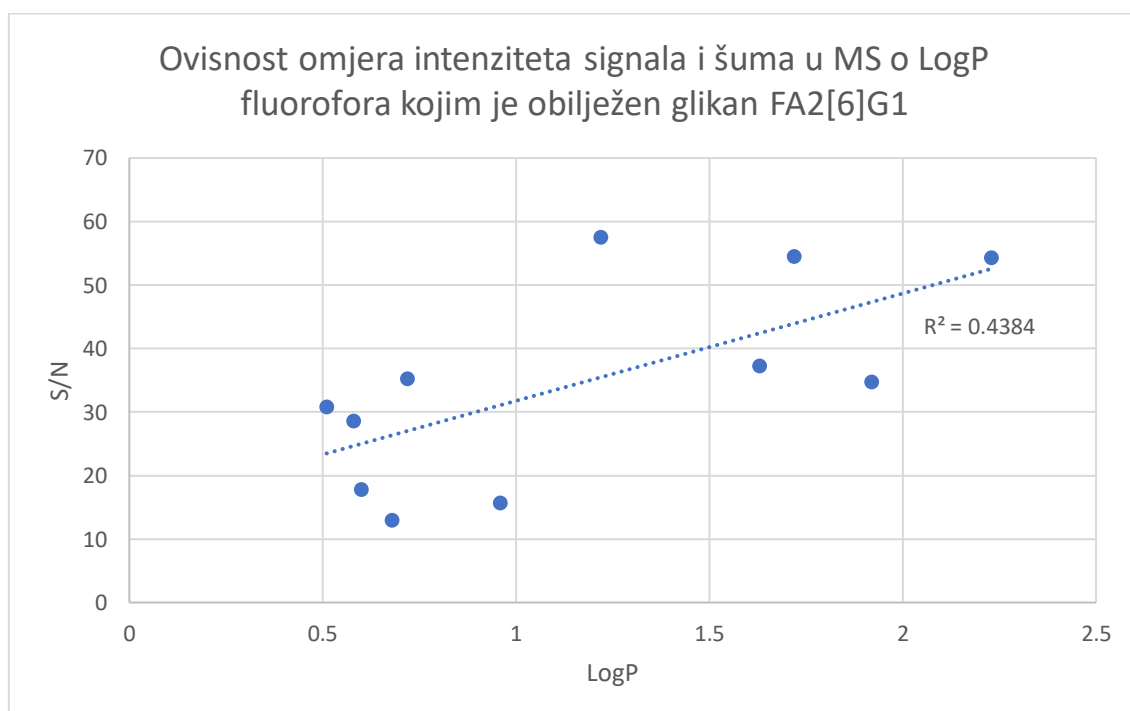
Slika 13. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o retencijskom vremenu glikana FA2G2



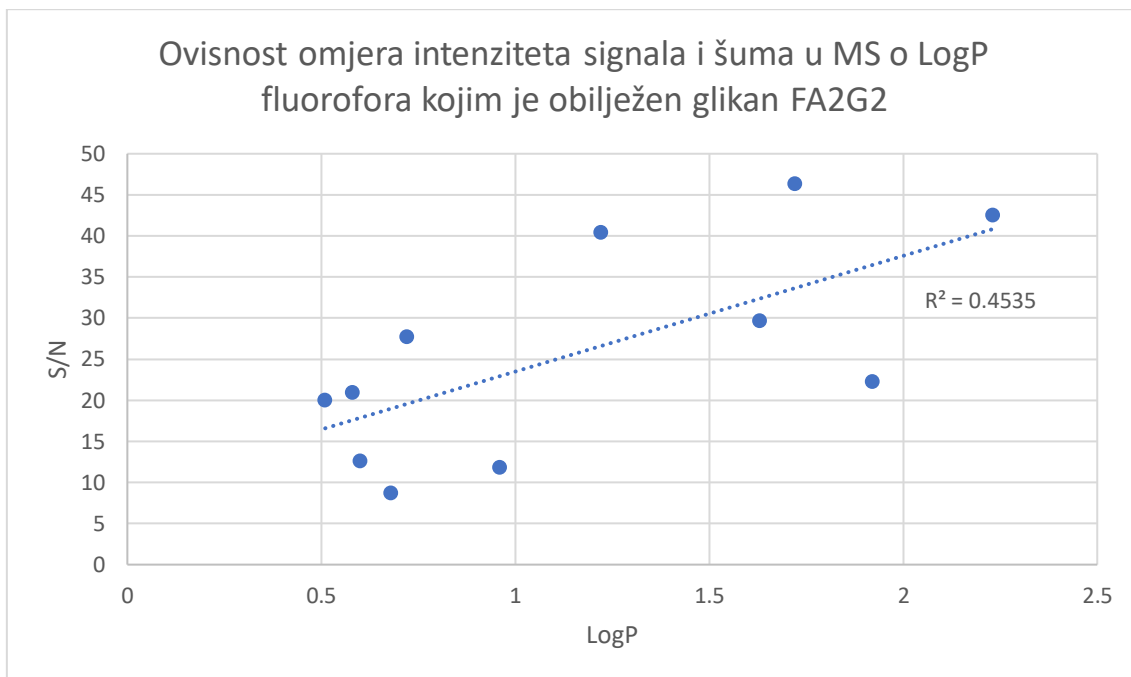
Slika 14. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o retencijskom vremenu glikana FA2G2S1



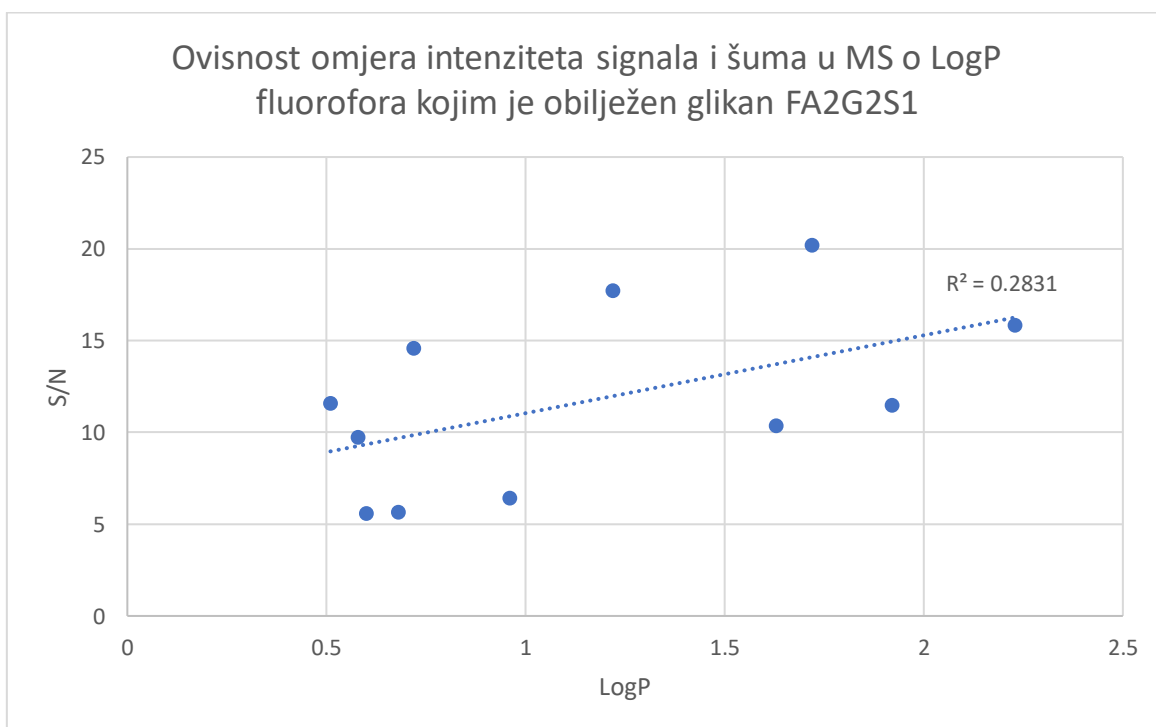
Slika 15. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o LogP fluorofora kojim je obilježen glikan FA2



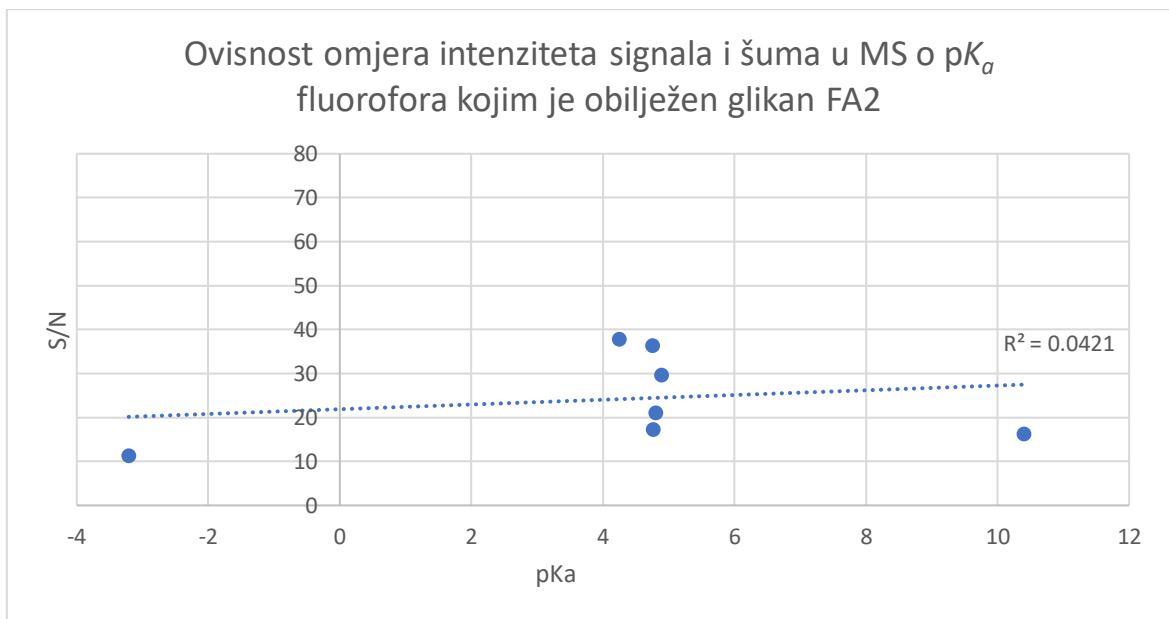
Slika 16. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o LogP fluorofora kojim je obilježen glikan FA2[6]G1



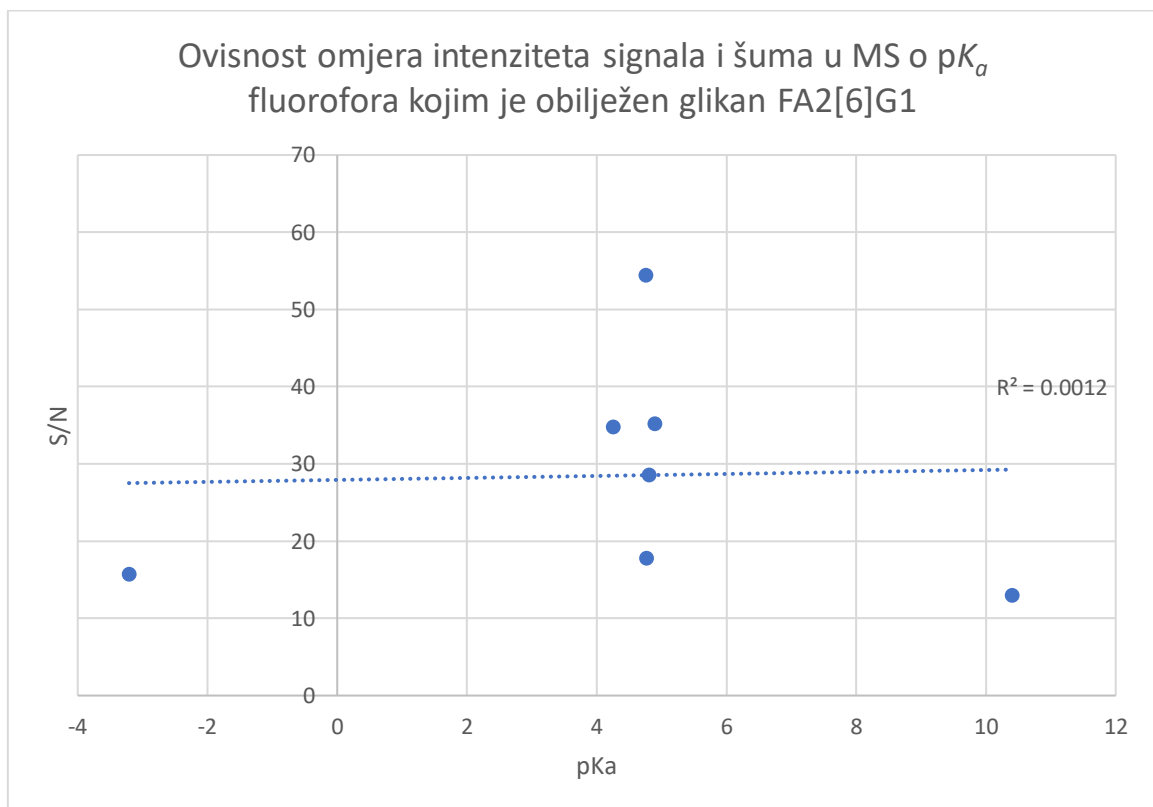
Slika 17. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o LogP fluorofora kojim je obilježen glikan FA2G2



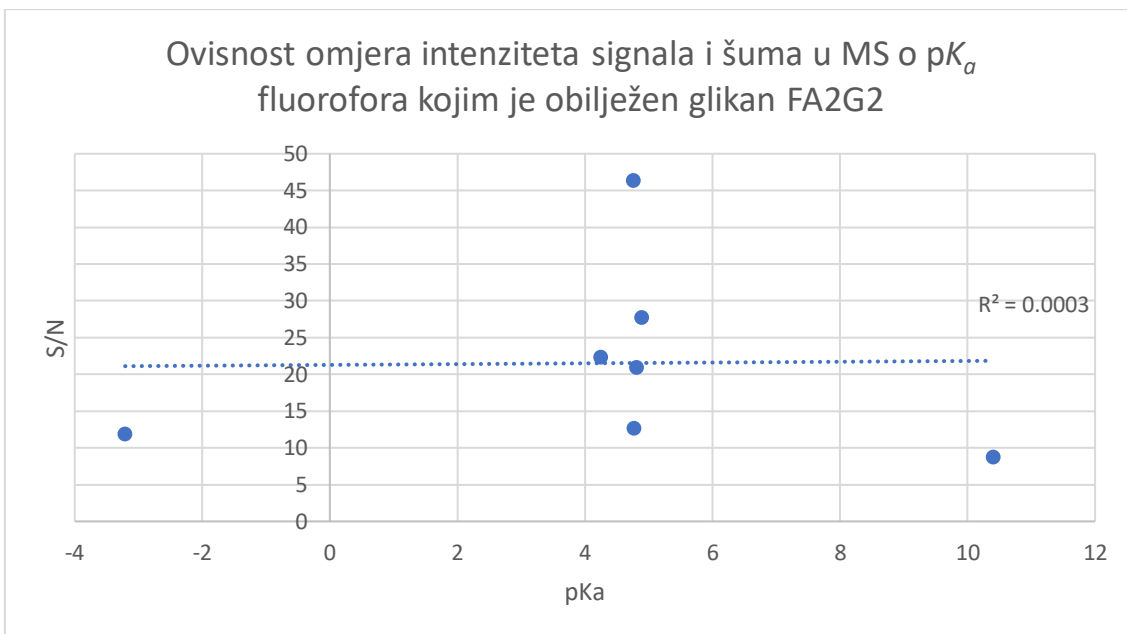
Slika 18. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o LogP fluorofora kojim je obilježen glikan FA2G2S1



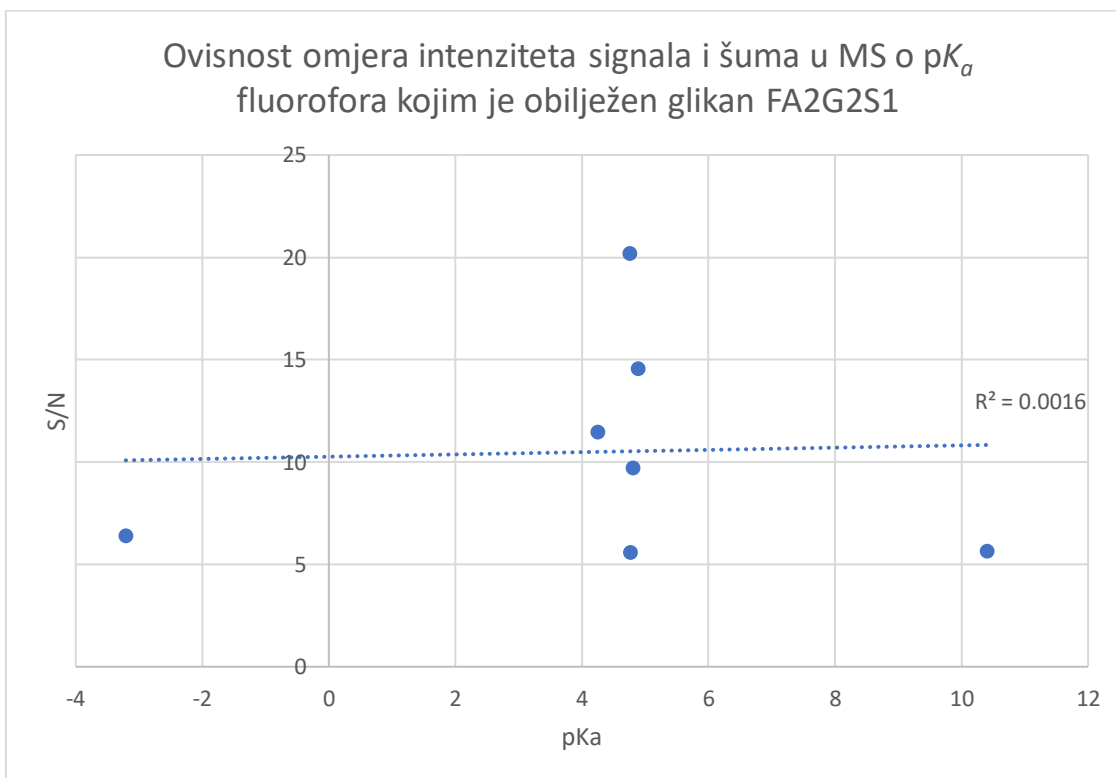
Slika 19. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o pK_a fluorofora kojim je obilježen glikan FA2



Slika 20. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o pK_a fluorofora kojim je obilježen glikan FA2[6]G1



Slika 21. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o pK_a fluorofora kojim je obilježen glikan FA2G2



Slika 22. Ovisnost omjera intenziteta signala i šuma u MS o pK_a fluorofora kojim je obilježen glikan FA2G2S1

Tablica 14. Vrijednosti r^2 i Pearsonovog koeficijenta korelacije r za korelacije omjera intenziteta signala i šuma u MS i retencijskog vremena, LogP i pK_a fluorofora kojim su obilježeni glikani FA2, FA2[6]G1, FA2G2 i FA2G2S1

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|--------|--------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|---------|
| | r^2 | r | r^2 | r | r^2 | r | r^2 | r |
| RT | 0,3584 | -0,5987 | 0,4647 | -0,6817 | 0,4687 | -0,6846 | 0,2557 | -0,5057 |
| LogP | 0,5746 | 0,7580 | 0,4384 | 0,6621 | 0,4535 | 0,6734 | 0,2831 | 0,5320 |
| pK_a | 0,0421 | 0,2052 | 0,0012 | 0,0346 | 0,0003 | 0,0173 | 0,0016 | 0,0400 |

Iz Tablice 14. vidi se kako ne postoji korelacija između omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru i pK_a fluorofora kojim su obilježeni glikani FA2[6]G1, FA2G2 i FA2G2S1 ($r = 0,0346, r = 0,0173, r = 0,0400$), dok postoji slaba korelacija između pK_a fluorofora kojim je obilježen glikan FA2 i omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru ($r = 0,2052$). Također, pokazana je srednje jaka korelacija retencijskog vremena obilježenog glikana i omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru za glikane FA2, FA2[6]G1, FA2G2 i FA2G2S1 ($r = -0,5987, r = -0,6817, r = -0,6846, r = -0,5057$) te srednje jaka korelacija LogP fluorofora kojim su obilježeni glikani FA2[6]G1, FA2G2, FA2G2S1 ($r = 0,6621, r = 0,6734, r = 0,5320$) i omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru. Konačno, pokazana je jaka korelacija LogP fluorofora kojim je obilježen glikan FA2 i omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru ($r = 0,7580$).

Općenito se uočava jača korelacija svojstava kemijske strukture fluorofora i omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru za glikan FA2, u odnosu na glikane FA2[6]G1 i FA2G2, a posebice FA2G2S1. Razlog tomu je to što je FA2 najmanji glikan od četiri analizirana te je tada doprinos fluorofora svojstvima obilježenog glikana kao molekule veći. U slučaju obilježenih glikana FA2[6]G1 i FA2G2, svojstva fluorofora kojim su obilježeni manje su izraženi zbog većeg glikanskog dijela. To je posebice izraženo kod glikana FA2G2S1 koji je najveći od četiri analizirana glikana te je kod njega i opažena najmanja korelacija svojstava fluorofora i omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru.

Konačno, rezultati pokazuju kako lipofilnost značajno više doprinosi omjeru intenziteta signala i šuma u masenom spektru od pK_a , odnosno negativnog naboja u slučaju negativnog MS moda.

5. ZAKLJUČAK

U ovom su radu *N*-glikani obilježeni s 11 različitih fluorofora, različitih kemijskih struktura, odnosno svojstava. Potom su obilježeni glikani analizirani tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama te masenom spektrometrijom u negativnom modu. Na temelju retencijskih vremena identificirana su četiri glikana te su zatim određeni omjeri intenziteta signala i šuma u masenom spektru. Korelacijskom analizom pokazano je kako:

1. Ne postoji korelacija između omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru i pK_a fluorofora kojim su obilježeni glikani FA2[6]G1, FA2G2 i FA2G2S1 ($r = 0,0346, r = 0,0173, r = 0,0400$).
2. Postoji slaba korelacija između pK_a fluorofora kojim je obilježen glikan FA2 i omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru ($r = 0,2052$).
3. Postoji srednje jaka korelacija retencijskog vremena obilježenog glikana i omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru za glikane FA2, FA2[6]G1, FA2G2 i FA2G2S1 ($r = -0,5987, r = -0,6817, r = -0,6846, r = -0,5057$) te srednje jaka korelacija LogP fluorofora kojim su obilježeni glikani FA2[6]G1, FA2G2, FA2G2S1 ($r = 0,6621, r = 0,6734, r = 0,5320$) i omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru.
4. Postoji jaka korelacija LogP fluorofora kojim je obilježen glikan FA2 i omjera intenziteta signala i šuma u masenom spektru ($r = 0,7580$).

Pokazano je kako lipofilnost značajno više doprinosi omjeru intenziteta signala i šuma u masenom spektru od pK_a , odnosno negativnog naboja u slučaju negativnog MS moda. S tim na umu, predlažu se daljnja istraživanja i razvoj fluorofora koji će biti pogodni za analizu glikana u negativnom MS modu.

6. LITERATURA

Ahn J, Bones J, Yu YQ, Rudd PM, Gilar M. Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 μm sorbent. *Journal of Chromatography B.*, 2010, 878 (3–4): 403–408

Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography*, 1990, 499: 177–196

Anumula KR. Advances in fluorescence derivatization methods for highperformance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Anal. Biochem*, 2006, 350, 1–23

Cech NB, Enke CG. Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides. *Anal Chem*, 2000, 72(13):2717-23

Cheng T, Zhao Y, Li X, Lin F, Xu Y, Zhang X, Li Y, Wang R, Lai L. Computation of Octanol–Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge. *J Chem Inf Model*, 2007, 47, 2140–2148.

Daina A, Michielin O, Zoete V. iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *J. Chem. Inf. Model*, 2014, 54, 3284–3301.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 2017, 7, 42717.

Fenn JB. Ion formation from charged droplets: Roles of geometry, energy, and time. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1993, 4(7):524-35

Fisher P, Ungar D. Bridging the Gap between Glycosylation and Vesicle Traffic. *Front. Cell Dev. Biol*, 2016, 4, 15.

Freeze, H. H. (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nature Reviews Genetics*, 7(7), 537–551

Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annual Review of Biochemistry*. 2011, 80 (1): 825–58

Harvey DJ. Negative ion mass spectrometry for the analysis of N-linked glycans. Wiley Online Library, 2019.

Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers". *Analytical Chemistry*, 1991, 63 (24): 1193A–1203A.

Hounsell EF, Davies MJ, Renouf DV (February 1996). "O-linked protein glycosylation structure and function". *Glycoconjugate Journal*. 13 (1): 19–26

Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman MH, Vučković F, Novokmet M, Krištić J, Borowiak M, Muth T, Polašek O, Razdorov G, Gornik O, Plomp R, Theodoratou E, Wright AF, Rudan I, Hayward C, Campbell H, Deelder AM, Reichl U, Aulchenko YS, Rapp E, Wuhler M, Lauc G. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research. *Mol. Cell. Proteomics*, 2014, 13, 1598–610.

Hu Q, Noll, RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 2005, 40 (4): 430–43

Ihara Y, Inai Y, Ikezaki M, Matsui ISL, Manabe S, Ito Y. C-Mannosylation: A Modification on Tryptophan in Cellular Proteins. *Glycoscience: Biology and Medicine*. 2014, 1-8.

Jürgensen HJ, Madsen DH, Ingvarsen S, Melander MC, Gårdsvoll H, Patthy L, Engelholm LH, Behrendt N. A novel functional role of collagen glycosylation: interaction with the endocytic collagen receptor uparap/ENDO180. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286 (37): 32736–48

Karas M, Krüger R. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chemical Reviews*, 2003, 103 (2): 427–440

Keser T. Influence of genetic and environmental factors on N-glycosylation of immunoglobulin g and total plasma proteins determined by twin study. *Doktorski rad*, 2016.

Lauc G, Krištić J, Zoldoš V. Glycans – the third revolution in evolution. *Frontiers in genetics*, 2014, 5

Lauc G, Zoldoš V. Protein glycosylation—an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol Biosyst*, 2010, 6, 2373-9.

Liu X, Afonso L. Is permethylation strategy always applicable to protein N-glycosylation study?: A case study on the O-acetylation of sialic acid in fish serum glycans. *Methods Molec Biol*, 2010, 600:259–268.

- Lommel M, Strahl S. Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology*, 2009, 19 (8): 816–28
- Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis". *Analytical Chemistry*, 2000, 72 (6): 1156–62
- Mamyrin BA, Karataev VI, Shmikk DV, Zagulin VA. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov. Phys. JETP*, 1973, 37: 45
- Marek, K. W., Vijay, I. K., and Marth, J. D. (1999). A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology* 9, 1263–1271.
- Mellquist JL, Kasturi L, Spitalnik SL, Shakin-Eshleman SH. The amino acid following an Asn–X–Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry*, 1998, 37 (19): 6833–7
- Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13, 448-462.
- Moriguchi I, Shuichi H, Liu Q, Nakagome I, Matsushita Y. Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *Chem. Pharm. Bull*, 1992, 40, 127–130.
- Moriguchi I, Shuichi H, Nakagome I, Hirano H. Comparison of reliability of log P values for Drugs calculated by several methods. *Chem. Pharm. Bull*, 1994, 42, 976–978.
- Null AP, Nepomuceno AI, Muddiman DC. Implications of hydrophobicity and free energy of solvation for characterization of nucleic acids by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2003, 15;75(6)
- Pomin VH, Mulloy B. Glycosaminoglycans and Proteoglycans. *Pharmaceuticals*, 2018, 11 (1): 17
- Rana NA, Haltiwanger RS. Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors. *Current Opinion in Structural Biology*, 2011, 21 (5): 583–9
- Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397, 3457-81.

Song W, Henquet MG, Mentink RA, van Dijk AJ, Cordewener JH, Bosch D, America AH, van der Krol AR. N-glycoproteomics in plants: perspectives and challenges. *J. Proteomics*, 2011, 74, 1463–74.

Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 2002, 12 (4): 43R–56R

Tretter V, Altmann F, Kubelka V, März L, Becker WM. Fucose α 1,3-Linked to the Core Region of Glycoprotein N-Glycans Creates an Important Epitope for IgE from Honeybee Venom Allergic Individuals. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1993, 102(3), 259–266.

Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (1998). "Concepts and principles of O-linked glycosylation". *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 33 (3): 151–208

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2009

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH. *Essentials of Glycobiology*, 3rd edition. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2015-2017

Walker SH, Papas BN, Comins DL, Muddiman DC. Interplay of Permanent Charge and Hydrophobicity in the Electrospray Ionization of Glycans. *Analytical Chemistry*, 2010, 82 (15), 6636-6642

Watson, David G. *Pharmaceutical analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, Elsevier, Oxford, 2016, str. 200-247

Wildman SA, Crippen GM. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *J. Chem. Inf. Model*, 1999, 39, 868–873.

Wuhrer M, de Boer AR, Deelder AM. Structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2009, 28, 192-206

Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2017 18 (7): 452–465

7. SAŽETAK

Glikani su molekule koje sadrže više monosaharida povezanih glikozidnim vezama te se često povezuju s proteinima ili lipidima tvoreći tako različite glikokonjugate. Glikani su evolucijom postajali sve kompleksniji te su počeli dobivati značajne funkcionalne uloge ključne za složene organizme. Iz tog je razloga ključno uključiti glikansku analizu prilikom određivanja fiziologije, patofiziologije, etiologije ili dijagnostike nekih bolesti.

Analiza glikana najčešće se izvodi derivatizacijom glikana pri čemu je najčešće korištena metoda vezanje fluorofora reakcijom reduktivne aminacije nakon čega se obilježeni glikani najčešće analiziraju UPLC-MS metodama. Prilikom odabira fluorofora kojim će se obilježiti *N*-glikan, potrebno je razmišljati o njegovoj prikladnosti i svojstvima u metodi koja će se koristiti. Konkretno, kod HILIC-UPLC-FLR-ESI-MS metode, potrebno je razmišljati o fluorescenciji i ionizaciji fluorofora. Kako glikani sami nemaju prirodni kromofor, intenzitet fluorescencijskog signala dolazi od fluorofora. Samim time, ako fluorofor slabo fluorescira, tada se signali relativno manjih intenziteta neće dovoljno dobro izdignuti iznad bazne linije te analiza takvih glikana može biti otežana ili nemoguća. S druge strane, fluorofor značajno doprinosi ionizaciji glikana, pogotovo ako ima funkcionalne skupine koje se lako protoniraju, odnosno deprotoniraju, ovisno o kojem se MS modu radi.

Iz tog razloga, ukazuje se potreba za dizajnom fluorofora koji će više doprinositi fluorescenciji i ionizaciji glikana te potreba za kvantifikacijom tih doprinosa kako bi se unaprijedile metode analize glikana koje uključuju negativni MS mod budući da su te metode informativnije od metoda koje uključuju pozitivni MS mod.

U tu je svrhu provedena analiza *N*-glikana obilježenih s 11 različitih fluorofora. Potom je određena korelacija LogP i pK_a različitih fluorofora i omjera intenziteta signala i šuma u negativnom MS modu. Na taj je način pokazano kako lipofilnost značajno više doprinosi omjeru intenziteta signala i šuma u masenom spektru od pK_a, odnosno negativnog naboja u slučaju negativnog MS moda. S tim na umu, predlažu se daljnja istraživanja i razvoj fluorofora koji će biti pogodni za analizu glikana u negativnom MS modu.

8. SUMMARY

Glycans are molecules that contain multiple monosaccharides linked by glycosidic bonds and often bind to proteins or lipids to form various glycoconjugates. Glycans became more and more complex with evolution and began to acquire significant functional roles crucial for complex organisms. For this reason, it is crucial to include glycan analysis when determining the physiology, pathophysiology, etiology, or diagnosis of some diseases.

Glycan analysis is most often performed by glycan derivatization, where the most commonly used method is the binding of fluorophores by a reductive amination reaction, after which the labeled glycans are most often analyzed by UPLC-MS methods. When choosing a fluorophore to label an *N*-glycan, it is necessary to think about its suitability and properties in the method which will be used. In particular, with the HILIC-UPLC-FLR-ESI-MS method, fluorescence and ionization of fluorophores need to be considered. As glycans themselves do not have a natural chromophore, the intensity of the fluorescence signal comes from the fluorophore. Thus, if the fluorophore fluoresces poorly, then signals of relatively lower intensities will not rise well enough above the baseline and analysis of such glycans may be difficult or impossible. On the other hand, fluorophore significantly contributes to the ionization of glycans, especially if it has functional groups that are easily protonated or deprotonated, depending on the MS mode.

For this reason, there is a need to design fluorophores that will contribute more to the fluorescence and ionization of glycans and the need to quantify these contributions to improve glycan analysis methods involving negative MS mode as these methods are more informative than methods involving positive MS mode.

For this purpose, an analysis of *N*-glycans labeled with 11 different fluorophores was performed. The correlation of LogP and pK_a of different fluorophores and signal-to-noise intensity ratios in the negative MS mode was then determined. In this way, it was shown that lipophilicity significantly contributes more to signal-to-noise intensity ratios in the mass spectrum than pK_a, ie negative charge in the case of negative MS mode. With this in mind, further research and development of fluorophores that will be suitable for glycan analysis in the negative MS mode are proposed.

9. PRILOZI

Prilog 1. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih anilinom

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|--------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 7,726 | 31,6977 | 10,381 | 52,5511 | 13,677 | 41,4571 | 18,361 | 15,6891 |
| n ₂ | 7,726 | 32,0824 | 10,364 | 45,7639 | 13,728 | 29,0326 | 18,344 | 15,4620 |
| n ₃ | 7,879 | 52,5257 | 10,601 | 67,1323 | 13,914 | 50,2036 | 18,648 | 19,0614 |
| n ₄ | 7,828 | 46,0162 | 10,533 | 57,7913 | 13,880 | 35,5472 | 18,547 | 17,2658 |
| n ₅ | 7,929 | 48,3466 | 10,617 | 64,5805 | 13,982 | 46,0318 | 18,749 | 21,1068 |
| n _{avg} | 7,818 | 42,1337 | 10,499 | 57,5638 | 13,836 | 40,4545 | 18,523 | 17,7170 |
| σ | | 9,6385 | | 8,7351 | | 8,3919 | | 2,3822 |

Prilog 2. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih 2-aminobenzojevom kiselinom

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 11,006 | 23,4519 | 13,948 | 31,5007 | 17,228 | 22,3363 | 21,623 | 11,9611 |
| n ₂ | 11,023 | 28,2621 | 13,948 | 40,2222 | 17,312 | 24,9913 | 21,674 | 12,8823 |
| n ₃ | 11,175 | 33,0122 | 14,066 | 32,1801 | 17,431 | 34,7053 | 21,843 | 18,6809 |
| n ₄ | 11,209 | 29,9308 | 14,117 | 33,3342 | 17,515 | 27,0707 | 21,877 | 15,8488 |
| n ₅ | 11,294 | 33,6256 | 14,185 | 38,9213 | 17,634 | 29,4408 | 22,012 | 13,4286 |
| n _{avg} | 11,141 | 29,6566 | 14,053 | 35,2317 | 17,424 | 27,7089 | 21,806 | 14,5603 |
| σ | | 4,1089 | | 4,0420 | | 4,7065 | | 2,7153 |

Prilog 3. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih 3-aminobenzojevom kiselinom

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 13,001 | 18,6862 | 16,010 | 30,1533 | 19,324 | 21,6880 | 23,517 | 8,9796 |
| n ₂ | 13,069 | 19,4174 | 16,028 | 25,7062 | 19,359 | 19,1179 | 23,511 | 9,2844 |
| n ₃ | 13,187 | 23,8822 | 16,163 | 33,2134 | 19,510 | 23,3251 | 23,703 | 11,2215 |
| n ₄ | 13,255 | 16,6737 | 16,213 | 22,5875 | 19,578 | 17,3391 | 23,787 | 10,2202 |
| n ₅ | 13,356 | 26,8102 | 16,315 | 30,9782 | 19,612 | 23,4240 | 23,872 | 8,8405 |
| n _{avg} | 13,174 | 21,0939 | 16,146 | 28,5277 | 19,477 | 20,9788 | 23,686 | 9,7092 |
| σ | | 4,1411 | | 4,2968 | | 2,6785 | | 1,0019 |

Prilog 4. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih 4-aminobenzojevom kiselinom

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 11,970 | 16,0401 | 14,962 | 21,4813 | 18,242 | 13,4485 | 22,469 | 5,3851 |
| n ₂ | 11,987 | 17,6481 | 14,912 | 13,1118 | 18,293 | 10,7189 | 22,536 | 5,3859 |
| n ₃ | 12,139 | 18,4192 | 15,115 | 20,5689 | 18,496 | 15,1818 | 22,757 | 4,7506 |
| n ₄ | 12,207 | 17,9521 | 15,165 | 19,8243 | 18,547 | 10,8396 | 22,841 | 5,4776 |
| n ₅ | 12,257 | 16,0409 | 15,216 | 14,1126 | 18,665 | 13,0863 | 22,858 | 6,8970 |
| n _{avg} | 12,112 | 17,2201 | 15,074 | 17,8198 | 18,449 | 12,6550 | 22,692 | 5,5792 |
| σ | | 1,1112 | | 3,9017 | | 1,8871 | | 0,7919 |

Prilog 5. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih benzokainom

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|--------------|----------------|--------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 6,492 | 19,5876 | 8,825 | 31,2676 | 11,970 | 27,9519 | 16,518 | 10,8472 |
| n ₂ | 6,475 | 20,3876 | 8,859 | 31,0484 | 11,919 | 27,9868 | 16,450 | 8,9153 |
| n ₃ | 6,627 | 25,2717 | 9,045 | 44,8947 | 12,173 | 29,5246 | 16,737 | 10,9253 |
| n ₄ | 6,644 | 31,6067 | 9,079 | 39,6303 | 12,190 | 32,0678 | 16,805 | 10,4878 |
| n ₅ | 6,695 | 24,7519 | 9,079 | 39,4453 | 12,240 | 30,8741 | 16,839 | 10,6344 |
| n _{avg} | 6,587 | 24,3211 | 8,977 | 37,2573 | 12,098 | 29,6810 | 16,670 | 10,3620 |
| σ | | 4,7971 | | 5,9828 | | 1,8031 | | 0,8270 |

Prilog 6. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih 4-aminofenolom

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 14,033 | 15,9478 | 17,228 | 16,3199 | 20,711 | 10,9698 | 24,379 | 5,7948 |
| n ₂ | 13,931 | 17,3018 | 17,093 | 13,1158 | 20,558 | 9,7534 | 24,295 | 5,5982 |
| n ₃ | 14,168 | 22,1902 | 17,363 | 12,3952 | 20,812 | 7,6087 | 24,599 | 6,0374 |
| n ₄ | 14,269 | 11,8440 | 17,482 | 11,9720 | 20,897 | 7,2665 | 24,677 | 5,0241 |
| n ₅ | 14,236 | 13,5796 | 17,498 | 10,9947 | 20,981 | 8,1129 | 24,701 | 5,7254 |
| n _{avg} | 14,127 | 16,1727 | 17,333 | 12,9595 | 20,792 | 8,7424 | 24,528 | 5,6360 |
| σ | | 3,9686 | | 2,0292 | | 1,5688 | | 0,3775 |

Prilog 7. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih 2-aminonaftalenom

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|--------------|----------------|--------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 6,340 | 83,8341 | 8,707 | 68,1167 | 11,784 | 50,5553 | 16,366 | 19,5756 |
| n ₂ | 6,391 | 74,3925 | 8,758 | 57,1044 | 11,852 | 34,0362 | 16,467 | 15,7455 |
| n ₃ | 6,492 | 62,0324 | 8,893 | 58,3372 | 11,987 | 41,0048 | 16,636 | 15,5056 |
| n ₄ | 6,492 | 78,7342 | 8,876 | 42,4754 | 12,004 | 40,4389 | 16,636 | 15,0971 |
| n ₅ | 6,509 | 60,5272 | 8,927 | 45,4252 | 12,021 | 46,6322 | 16,653 | 13,2515 |
| n _{avg} | 6,445 | 71,9041 | 8,832 | 54,2918 | 11,930 | 42,5335 | 16,552 | 15,8351 |
| σ | | 10,2720 | | 10,4121 | | 6,3261 | | 2,3091 |

Prilog 8. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih 6-amino-2-naftojevom kiselinom

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 11,395 | 35,0658 | 14,252 | 29,7014 | 17,583 | 20,6636 | 21,742 | 11,7448 |
| n ₂ | 11,361 | 39,2926 | 14,235 | 26,0436 | 17,515 | 21,3599 | 21,725 | 10,5382 |
| n ₃ | 11,548 | 38,1470 | 14,489 | 38,4543 | 17,820 | 24,4360 | 22,063 | 10,7939 |
| n ₄ | 11,717 | 35,9699 | 14,642 | 40,2353 | 17,939 | 20,3249 | 22,148 | 11,5368 |
| n ₅ | 11,683 | 40,7974 | 14,608 | 39,3071 | 17,905 | 24,7468 | 22,148 | 12,7404 |
| n _{avg} | 11,541 | 37,8645 | 14,445 | 34,7483 | 17,752 | 22,3062 | 21,965 | 11,4708 |
| σ | | 2,3528 | | 6,4395 | | 2,1220 | | 0,8688 |

Prilog 9. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih 3-amino-2-naftojevom kiselinom

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|--------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 9,806 | 30,4888 | 12,612 | 43,6364 | 15,892 | 46,5535 | 20,406 | 16,0531 |
| n ₂ | 9,772 | 31,5613 | 12,545 | 43,9593 | 15,841 | 45,0092 | 20,389 | 14,1895 |
| n ₃ | 10,009 | 43,1047 | 12,765 | 50,5091 | 16,129 | 43,5701 | 20,694 | 24,2845 |
| n ₄ | 10,076 | 32,2089 | 12,917 | 61,5062 | 16,247 | 46,1039 | 20,795 | 23,3953 |
| n ₅ | 10,059 | 44,3727 | 12,900 | 72,7310 | 16,247 | 50,5273 | 20,795 | 22,9879 |
| n _{avg} | 9,944 | 36,3473 | 12,748 | 54,4684 | 16,071 | 46,3529 | 20,616 | 20,1821 |
| σ | | 6,7902 | | 12,5150 | | 2,6017 | | 4,6900 |

Prilog 10. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih 2-amino-1-naftalensulfonskom kiselinom

| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|--------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 9,688 | 9,2157 | 12,528 | 14,5315 | 15,875 | 10,1032 | 20,677 | 5,6184 |
| n ₂ | 9,654 | 11,5409 | 12,494 | 13,8524 | 15,892 | 14,6366 | 20,694 | 7,4007 |
| n ₃ | 9,840 | 11,0966 | 12,765 | 15,9493 | 16,146 | 11,0885 | 20,964 | 5,2940 |
| n ₄ | 9,975 | 13,5523 | 12,849 | 18,8510 | 16,298 | 9,5978 | 21,066 | 6,1770 |
| n ₅ | 9,958 | 11,2200 | 12,748 | 15,1662 | 16,230 | 13,9576 | 21,015 | 7,4924 |
| n _{avg} | 9,823 | 11,3251 | 12,677 | 15,6701 | 16,088 | 11,8768 | 20,883 | 6,3965 |
| σ | | 1,5427 | | 1,9398 | | 2,2862 | | 1,0098 |

Prilog 11. Retencijsko vrijeme te omjer intenziteta signala i šuma glikana obilježenih 2-aminobenzamidom

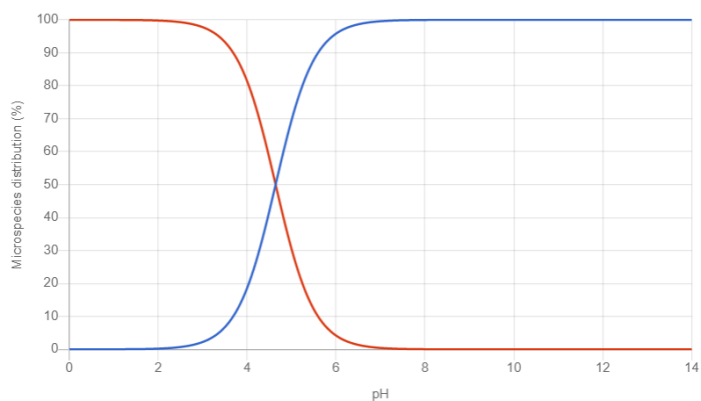
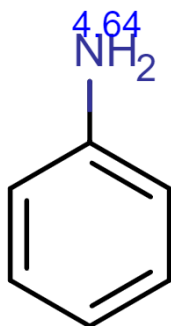
| | FA2 | | FA2[6]G1 | | FA2G2 | | FA2G2S1 | |
|------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N | RT / min | S/N |
| n ₁ | 9,975 | 29,0685 | 12,866 | 29,6928 | 16,298 | 19,0573 | 20,829 | 11,8741 |
| n ₂ | 10,009 | 26,6771 | 12,934 | 34,6154 | 16,332 | 21,6872 | 20,829 | 11,0617 |
| n ₃ | 10,178 | 21,1717 | 13,120 | 20,0417 | 16,585 | 16,4288 | 21,049 | 11,0936 |
| n ₄ | 10,246 | 20,9532 | 13,204 | 29,9166 | 16,670 | 22,9855 | 21,218 | 12,2305 |
| n _{avg} | 10,102 | 24,4676 | 13,031 | 30,8166 | 16,471 | 20,0397 | 20,981 | 11,5650 |
| σ | | 4,0523 | | 2,5596 | | 2,9095 | | 0,5813 |

Prilog 12. Izračunate vrijednosti LogP fluorofora koristeći SwissADME program

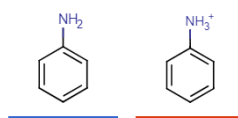
| Fluorofor | XLOGP3 | WLOGP | MLOGP | SILICOS-IT | iLOGP | Konsenzusni LogP |
|--------------------------------------|--------|-------|--------|------------|-------|------------------|
| Anilin | 0,90 | 1,28 | 1,45 | 1,26 | 1,20 | 1,22 |
| 2-aminobenzojeva kiselina | 1,21 | 0,98 | - 0,12 | 0,50 | 1,04 | 0,72 |
| 3-aminobenzojeva kiselina | 0,65 | 0,98 | - 0,12 | 0,50 | 0,88 | 0,58 |
| 4-aminobenzojeva kiselina | 0,83 | 0,98 | - 0,12 | 0,50 | 0,82 | 0,60 |
| Benzokain | 1,86 | 1,45 | 1,64 | 1,31 | 1,89 | 1,63 |
| 4-aminofenol | 0,04 | 0,98 | 0,79 | 0,70 | 0,86 | 0,68 |
| 2-aminonaftalen | 2,28 | 2,43 | 2,54 | 2,31 | 1,61 | 2,23 |
| 6-amino-2-naftojeva kiselina | 2,60 | 2,13 | 2,02 | 1,61 | 1,26 | 1,92 |
| 3-amino-2-naftojeva kiselina | 2,72 | 2,13 | 0,92 | 1,61 | 1,24 | 1,72 |
| 2-amino-1-naftalensulfonska kiselina | - 1,16 | 2,76 | 1,62 | 0,53 | 1,08 | 0,96 |
| 2-aminobenzamid | 0,35 | 0,38 | 0,58 | 0,26 | 0,96 | 0,51 |

Prilog 13. Izračunata pK_a vrijednost anilina

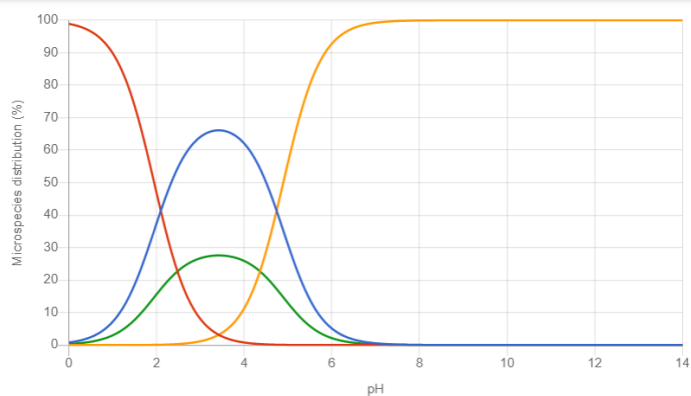
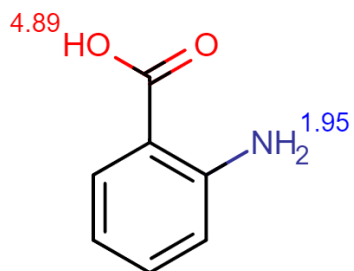
pKa



Strongest basic pKa: 4.64

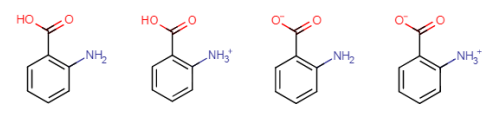


Prilog 14. Izračunata pK_a vrijednost 2-aminobenzojeve kiseline



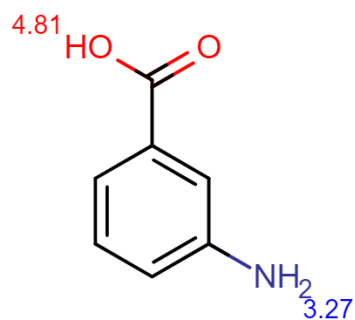
Strongest acidic pKa: 4.89

Strongest basic pKa: 1.95



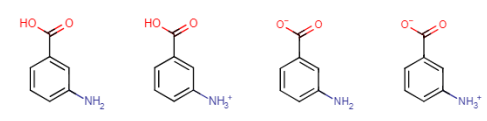
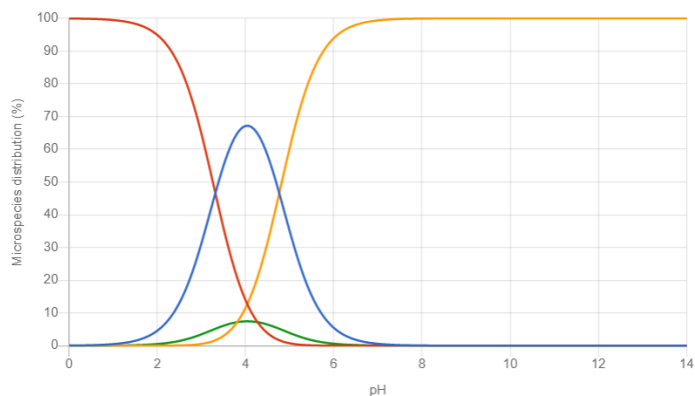
Prilog 15. Izračunata pK_a vrijednost 3-aminobenzojeve kiseline

pKa



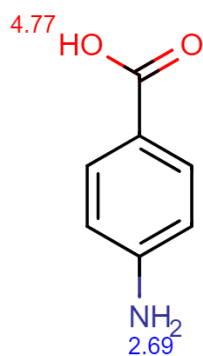
Strongest acidic pKa: 4.81

Strongest basic pKa: 3.27



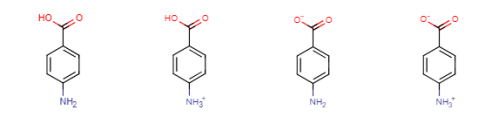
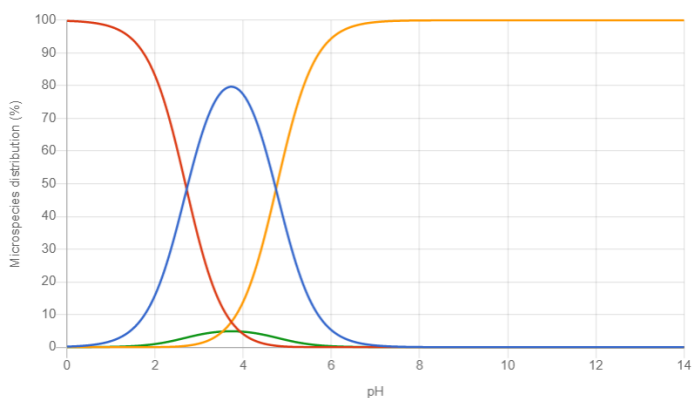
Prilog 16. Izračunata pK_a vrijednost 4-aminobenzojeve kiseline

pKa



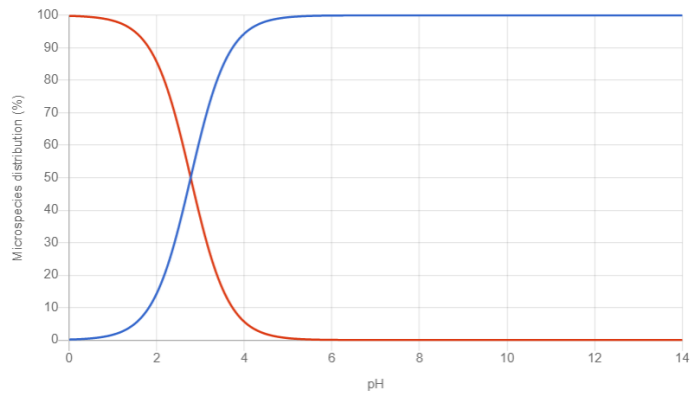
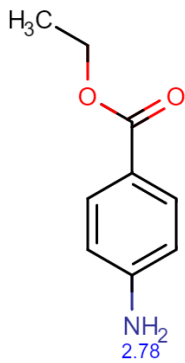
Strongest acidic pKa: 4.77

Strongest basic pKa: 2.69

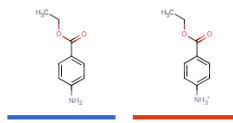


Prilog 17. Izračunata pK_a vrijednost benzokaina

pKa

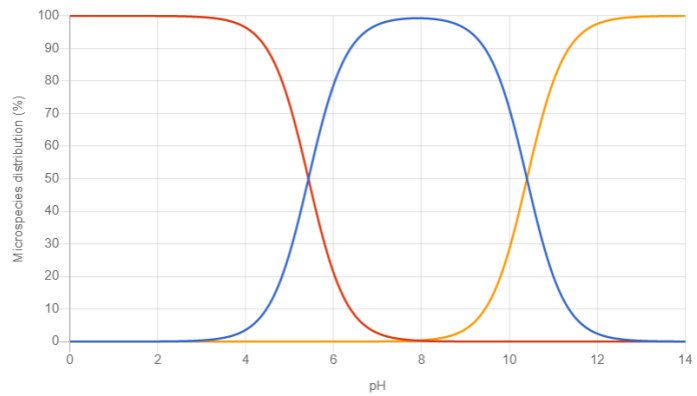
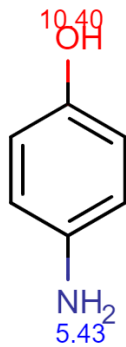


Strongest basic pKa: 2.78



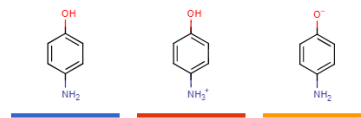
Prilog 18. Izračunata pK_a vrijednost 4-aminofenola

pKa



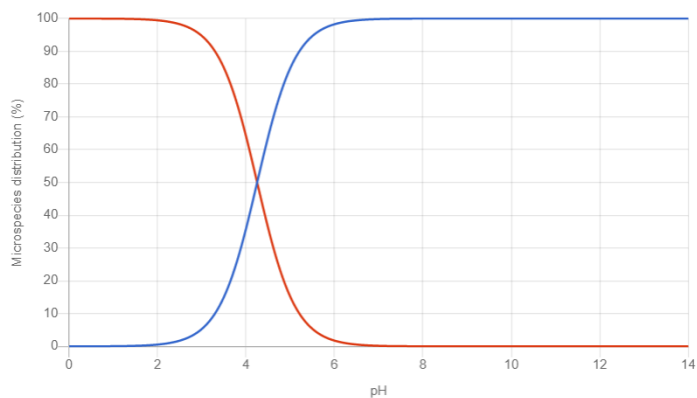
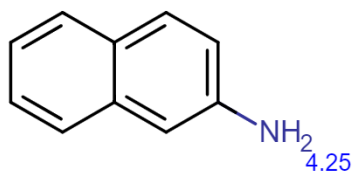
Strongest acidic pKa: 10.4

Strongest basic pKa: 5.43

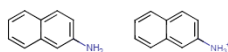


Prilog 19. Izračunata pK_a vrijednost 2-aminonaftalena

pKa

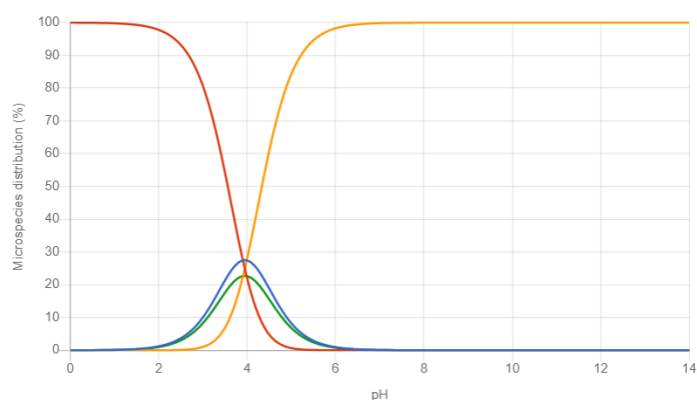
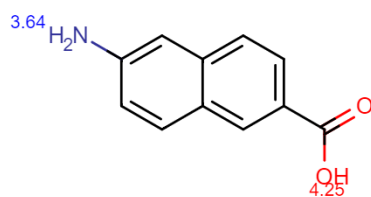


Strongest basic pKa: 4.25



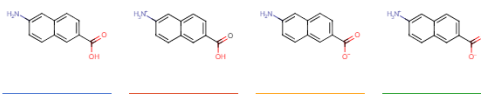
Prilog 20. Izračunata pK_a vrijednost 6-amino-2-naftojeve kiseline

pKa



Strongest acidic pKa: 4.25

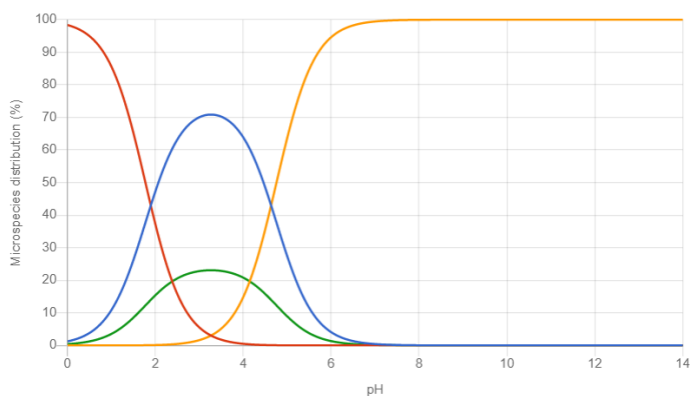
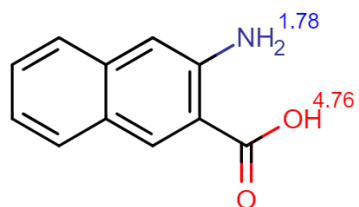
Strongest basic pKa: 3.64



Prilog 21. Izračunata pK_a vrijednost 3-amino-2-naftojeve kiseline

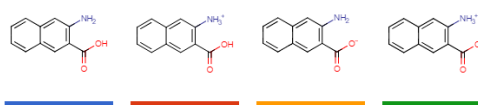
pKa

?



Strongest acidic pKa: 4.76

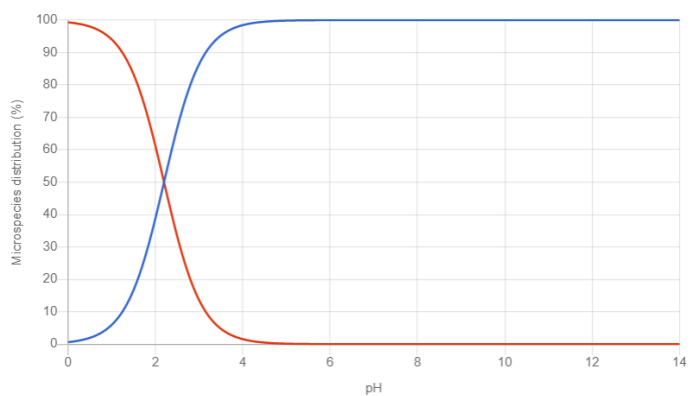
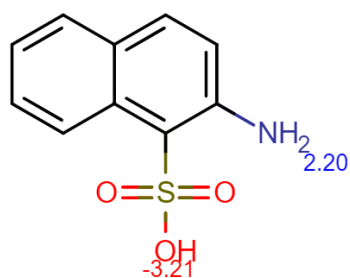
Strongest basic pKa: 1.78



Prilog 22. Izračunata pK_a vrijednost 2-amino-1-naftalensulfonske kiseline

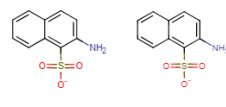
pKa

?



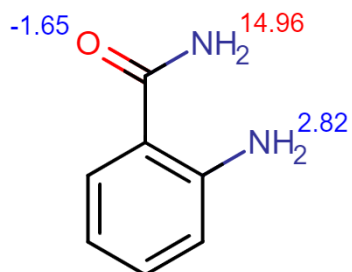
Strongest acidic pKa: -3.21

Strongest basic pKa: 2.2



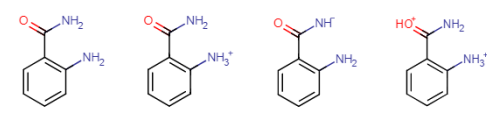
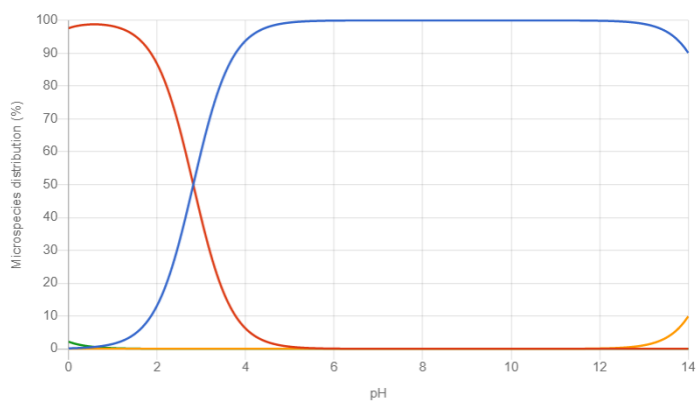
Prilog 23. Izračunata pK_a vrijednost 2-aminobenzamida

pKa



Strongest acidic pK_a : 14.96

Strongest basic pK_a : 2.82



Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj kemijske strukture na ionizaciju potencijalnih glikanskih fluorofora za analizu u negativnom MS modu

Zvonimir Mlinarić

SAŽETAK

Glikani su molekule koje sadrže više monosaharida povezanih glikozidnim vezama te se često povezuju s proteinima ili lipidima tvoreći tako različite glikokonjugate. Glikani su evolucijom postajali sve kompleksniji te su počeli dobivati značajne funkcionalne uloge ključne za složene organizme. Iz tog je razloga ključno uključiti glikansku analizu prilikom određivanja fiziologije, patofiziologije, etiologije ili dijagnostike nekih bolesti.

Analiza glikana najčešće se izvodi derivatizacijom glikana pri čemu je najčešće korištena metoda vezanje fluorofora reakcijom reduktivne aminacije nakon čega se obilježeni glikani najčešće analiziraju UPLC-MS metodama. Prilikom odabira fluorofora kojim će se obilježiti *N*-glikan, potrebno je razmišljati o njegovoj prikladnosti i svojstvima u metodi koja će se koristiti. Konkretno, kod HILIC-UPLC-FLR-ESI-MS metode, potrebno je razmišljati o fluorescenciji i ionizaciji fluorofora. Kako glikani sami nemaju prirodni kromofor, intenzitet fluorescencijskog signala dolazi od fluorofora. Samim time, ako fluorofor slabo fluorescira, tada se signali relativno manjih intenziteta neće dovoljno dobro izdignuti iznad bazne linije te analiza takvih glikana može biti otežana ili nemoguća. S druge strane, fluorofor značajno doprinosi ionizaciji glikana, pogotovo ako ima funkcionalne skupine koje se lako protoniraju, odnosno deprotoniraju, ovisno o kojem se MS modu radi.

Iz tog razloga, ukazuje se potreba za dizajnom fluorofora koji će više doprinositi fluorescenciji i ionizaciji glikana te potreba za kvantifikacijom tih doprinosa kako bi se unaprijedile metode analize glikana koje uključuju negativni MS mod budući da su te metode informativnije od metoda koje uključuju pozitivni MS mod.

U tu je svrhu provedena analiza *N*-glikana obilježenih s 11 različitih fluorofora. Potom je određena korelacija LogP i pKa različitih fluorofora i omjera intenziteta signala i šuma u negativnom MS modu. Na taj je način pokazano kako lipofilnost značajno više doprinosi omjeru intenziteta signala i šuma u masenom spektru od pKa, odnosno negativnog naboja u slučaju negativnog MS moda. S tim na umu, predlažu se daljnja istraživanja i razvoj fluorofora koji će biti pogodni za analizu glikana u negativnom MS modu.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 54 stranica, 22 grafičkih prikaza, 14 tablica, 23 priloga i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Analiza glikana, UPLC, MS, fluorofor

Mentor: **Dr. sc. Toma Keser**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Toma Keser**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Olga Gornik Kljaić, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ivana Perković, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Influence of chemical structure on ionization of potential glycan fluorophores for analysis in negative MS mode

Zvonimir Mlinarić

SUMMARY

Glycans are molecules that contain multiple monosaccharides linked by glycosidic bonds and often bind to proteins or lipids to form various glycoconjugates. Glycans became more and more complex with evolution and began to acquire significant functional roles crucial for complex organisms. For this reason, it is crucial to include glycan analysis when determining the physiology, pathophysiology, etiology, or diagnosis of some diseases.

Glycan analysis is most often performed by glycan derivatization, where the most commonly used method is the binding of fluorophores by a reductive amination reaction, after which the labeled glycans are most often analyzed by UPLC-MS methods. When choosing a fluorophore to label an *N*-glycan, it is necessary to think about its suitability and properties in the method which will be used. In particular, with the HILIC-UPLC-FLR-ESI-MS method, fluorescence and ionization of fluorophores need to be considered. As glycans themselves do not have a natural chromophore, the intensity of the fluorescence signal comes from the fluorophore. Thus, if the fluorophore fluoresces poorly, then signals of relatively lower intensities will not rise well enough above the baseline and analysis of such glycans may be difficult or impossible. On the other hand, fluorophore significantly contributes to the ionization of glycans, especially if it has functional groups that are easily protonated or deprotonated, depending on the MS mode.

For this reason, there is a need to design fluorophores that will contribute more to the fluorescence and ionization of glycans and the need to quantify these contributions to improve glycan analysis methods involving negative MS mode as these methods are more informative than methods involving positive MS mode.

For this purpose, an analysis of *N*-glycans labeled with 11 different fluorophores was performed. The correlation of LogP and pK_a of different fluorophores and signal-to-noise intensity ratios in the negative MS mode was then determined. In this way, it was shown that lipophilicity significantly contributes more to signal-to-noise intensity ratios in the mass spectrum than pK_a, ie negative charge in the case of negative MS mode. With this in mind, further research and development of fluorophores that will be suitable for glycan analysis in the negative MS mode are proposed.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 22 figures, 14 tables, 23 supplements and 46 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Glycan analysis, UPLC, MS, fluorophore

Mentor: **Toma Keser, Ph.D.**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Toma Keser, Ph.D.**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Olga Gornik Kljaić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivana Perković, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2021.