

# Analiza farmaceutskih peptida spektrometrijom masa

## Analysis of therapeutic peptides by mass spectrometry

Anita Horvatić, Mario Cindrić\*

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

Primljeno: 2. 9. 2008.

Prihvaćeno: 15. 11. 2008.

Adresa za dopisivanje:

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

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

**SAŽETAK.** Peptidi su aktivni regulatori i prenositelji informacija, što ih čini zanimljivim za farmaceutске svrhe. Mnogo je načina proizvodnje peptida za komercijalnu farmaceutsku upotrebu, ali je najčešće korišten način sinteze onaj na krutom nosaču, što u konačnici omogućava sigurnost proizvoda.

U farmaceutskoj industriji tekućinska kromatografija i spektrometrija masa primjenjuju se kao odvojene ili pak kao vezane tehnike za kvantitativne analize, karakterizaciju onečišćenja, u strukturnim analizama peptida te prilikom analize modifikacija proteina. MALDI i ESI su primarne ionizacijske metode za prevođenje nehlapljivih biomolekula poput, primjerice, peptida i proteina u plinovitu fazu. ESI se često koristi kao poveznica između tekućinske kromatografije ili kapilarne elektroforeze i spektrometrije masa (kontinuirana analiza). Što se tiče diskontinuirane analize, najčešće se koristi spektrometar masa MALDI-TOF. Navedena tehnika pogodna je za analizu peptida netopljivih u vodenim fazama. Tehnikom MALDI moguće je analizirati digestijom pocijepane i pročišćene uzorke proteina koji su prethodno razdvojeni metodom gel-elektroforeze ili uz pomoć kapilarne zonske elektroforeze.

**Ključne riječi:** ESI, MALDI, peptid, spektrometrija masa

**ABSTRACT.** Peptides are active regulators and information carriers in biological systems, which makes them interesting for pharmaceutical purposes. Pharmaceutical peptides can be manufactured in many ways but peptide production *via* solid phase peptide synthesis is commonly used because of final product safety.

Liquid chromatography and mass spectrometry have been successfully employed in pharmaceutical industry both as separated or hyphenated techniques for quantitative analysis, characterization of impurities, structure analysis of peptides, and for peptide/protein modification determination. Mass spectrometry ionization techniques MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) and ESI (Electrospray ionization) are primary ionization techniques for converting nonvolatile biomolecules like peptides or proteins, into a gas phase. ESI-MS is often coupled on-line with liquid chromatography or capillary electrophoresis while MALDI-TOF MS is used as off-line technique. Also, MALDI is suitable for analysis of water insoluble peptides. Additionally, it is possible to use MALDI in the off-line mode for analyzes of protein samples after protein digestion and purification which have been separated either by gel electrophoresis or capillary zone electrophoresis.

**Key words:** ESI, MALDI, mass spectrometry, peptide

## UVOD

Spektrometrija masa (MS) je analitička metoda kojom se nakon ionizacije kvalitativno i kvantitativno analiziraju nastali ioni. Spektrometrija masa koristi se za određivanje strukture organskih tvari, za određivanje slijeda aminokiselina peptida, oligopeptida, proteina<sup>1</sup>, kao i analizu poslijetranslacijskih modifikacija<sup>2</sup>. Također je važna za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju malih farmaceutskih molekula<sup>3</sup> i biopolimera, te njihovih metabolita i degradacijskih produkata<sup>4</sup>. Radi velike osjetljivosti spektrometara masa moguće je analizirati subpikomolarne količine peptida i proteina<sup>5</sup>, što omogućava analizu izrazito malih volumena uzorka<sup>6</sup>. Kontinuirane (tzv. *on-line*) vezane tehnike spektrometrije masa razvijene su sa svrhom analize uz izrazito malo gubitka uzorka. Spektrometrija masa kontinuirano je povezana s tekućinskom kromatografijom, kapilarnom zonskom elektroforezom ili mikročipovima. Iako su kontinuirane tehnike vremenski manje zahtjevne, u mnogo slučajeva potrebno je koristiti diskontinuirane (tzv. *off-line*) tehnike radi metodološkog ograničenja. Diskontinuiranim tehnikama smatraju se nanosprej-MS i MALDI (-PSD)-MS<sup>7</sup>.

Vezani sustav tehnika tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS) predstavlja dodatnu mogućnost analize iona, s ciljem da se poboljša separacija ili dodatna fragmentacija iona, kako bi se na temelju dobivenih spektara masa odredila struktura analiziranog iona<sup>8</sup>.

Dvije ionizacijske tehnike koje se najčešće koriste za analizu peptida su ionizacija elektroraspršenjem (ESI) i matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI)<sup>1</sup>.

## PEPTIDI U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI

Peptid je kratki lanac aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. U osnovici građe peptida i proteina karboksilna skupina jedne aminokiseline kovalentno je vezana s amino-skupinom druge aminokiseline. Što se tiče duljine polipeptidnog lanca, klasifikacijska granica između peptida i proteina nije strogo određena<sup>9,10</sup>, premda se makromolekule molekularne mase veće od 6.000 Da smatraju proteinima<sup>9</sup>. Peptidi imaju važ-

nu ulogu u fiziološkim procesima koji se odvijaju u tijelu. Oni su aktivni regulatori i nositelji informacija što ih čini zanimljivim za farmaceutsku uporabu<sup>10</sup>. Prednosti i nedostaci korištenja peptidnih lijekova navedeni su u tablici 1.

Za proizvodnju peptida i proteina dostupne su različite tehnike: proizvodnja rekombinantnom tehnikom DNA<sup>11</sup>, proizvodnja u transgenim biljkama i životinjama<sup>12,13</sup>, te dobivanje kemijskom sintezom (najčešće sintezom na krutom nosaču)<sup>14</sup>. Automatizirana sinteza peptida na krutom nosaču (SPPS)

Spektrometrija masa (MS) je analitička metoda kojom se nakon ionizacije kvalitativno i kvantitativno analiziraju nastali ioni. Koristi se za određivanje strukture organskih tvari, za određivanje slijeda aminokiselina peptida, oligopeptida, proteina i analizu poslijetranslacijskih modifikacija. Važna je i za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju malih farmaceutskih molekula i biopolimera, te njihovih metabolita i degradacijskih produkata. Radi velike osjetljivosti spektrometara masa moguće je analizirati subpikomolarne količine peptida i proteina, što omogućava analizu izrazito malih volumena uzorka.

omogućava rutinsku sintezu peptida. Peptidi dobiveni sintezom na krutom nosaču nisu kontaminirani patogenim proteinskim dijelovima iz stanice domaćina niti sadrže molekule iz stanica domaćina koje bi mogle izazvati imunokemijske reakcije. Merrifieldovom sintezom moguće je rutinski sintetizirati peptide do 60 aminokiselina. Sinteza većih peptida moguća je zasebnom sinte-

**Tablica 1.** Prednosti i nedostaci korištenja peptidnih lijekova

**Table 1.** Advantages and disadvantages of peptide drugs

Prednosti	Nedostaci
Aktivnost	Smanjena stabilnost
Visoka specifičnost	Problem transporta kroz membrane
Mali udio nespecifičnog vezanja	Skupa sinteza (sinteza na krutom nosaču)
Minimizacija interakcije s drugim lijekovima	Topljivost
Mala akumulacija u tkivu	Imunogene reakcije
Smanjena toksičnost	Brzo nestaju iz tijela

zom pojedinih fragmenata peptida, te njihovom kemijskom ligacijom u vodenoj otopini pri neutralnom pH<sup>14</sup>. Tehnikom SPPS moguće je sintetizirati peptide koji sadrže "neprirodne" aminokiseline<sup>14</sup>, kao i cikličke peptide<sup>15</sup>. MALDI-TOF instrument najprikladniji je za analizu zaštićenih peptida. Ionizacija uzorka događa se direktno na uzorku u čvrstoj fazi, čime se zaobilazi slaba topljivost u vodenim puferima. TOF analiza idealna je za analizu intaktnih analita visoke molekulske mase (npr. 7.000 Da). Prisutnost soli u analitu najčešće ne ometa analizu MALDI, već se detektiraju adukti s ionima metala<sup>16</sup>.

#### PRIPREMA UZORAKA PEPTIDA ZA ANALIZU

Analiza peptida moguća je u sirovinama, gotovim proizvodima, kao i u kliničkim uzorcima poput seruma, plazme ili tkiva. Prvi korak u analizi peptidnih pripravaka je njihova izolacija iz bioloških uzoraka, odvajanje od matriksa i ukoncentriravanje. Najčešće se za pripremu uzoraka koriste precipitacija, ekstrakcija na čvrstoj fazi, imunoprecipitacija ili ultrafiltracija<sup>17,18</sup>. Upotreba tehnika MALDI ili ESI ovisi o prirodi uzoraka, načinu pripreme i čistoći uzoraka<sup>19</sup>. Tehnika analize MALDI zahtijeva najmanju količinu analita od svih tehnika analize peptida i proteina, pa su, primjerice, moguće analize femto molova proteina<sup>20</sup>.

#### PRIPREMA UZORKA ZA ANALIZU TEHNIKOM MALDI

MALDI je tehnika ionizacije analita koja uključuje desorpciju prije ionizacije. Uzorak se miješa s matriksom koja ima dvojaku ulogu; adsorbira energiju lasera i ionizira molekule najčešće služeći kao donor ili akceptor protona. Odabir matrice, kao i metode za depoziciju uzorka na MALDI pločicu važne su za uspješnu analizu<sup>21</sup>. Tehnikom MALDI uglavnom nastaju jednostruko nabijeni ioni. Budući da se radi o pulsnoj tehnici, najčešće se povezuje s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta (TOF), ali je moguće i povezivanje s analizatorima koji skladište ione, primjerice ionska stupica (IT)<sup>22</sup> i analizator ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju (FT ICR)<sup>23</sup>.

Matriks efekt (interferencija analize nehlapljivim puferima, solima, organskim otapalima, detergentima) kritičan je za pripremu uzoraka ovom

tehnikom. Detergenti su, kao i puferi, važni za topljivost, stabilnost, održavanje funkcije i stabilizaciju peptida, te su najčešće sastavni dio uzorka. Budući da navedena onečišćenja smanjuju intenzitet iona ali utječu na točnost i preciznost metode, uzorke je prije analize potrebno pročistiti nekom od kromatografskih tehnika (najčešće kromatografijom obrnutih faza)<sup>21,24</sup>. Kontinuirano povezivanje tekućinske kromatografije i tehnike MALDI nije moguće, već se nakon kromatografije eluat iskapava na MALDI pločicu. Osim tekućinske kromatografije, za pripremu uzoraka koji sadrže male količine analita koriste se ekstrakcija na čvrstoj fazi<sup>16,25</sup> ili na mikrokolonama<sup>26</sup> (tehnike Zip-Tip ili Spin Column) čiji je princip rada zasnovan na kromatografskom odjeljivanju.

#### PRIPREMA UZORKA ZA ANALIZU TEHNIKOM ESI

Elektroraspršenje je jedan od najzastupljenijih načina ionizacije u vezanom sustavu LC-MS i kompatibilno je sa svim analizatorima masa. Osim s tehnikom LC, ionizacija elektroraspršenjem kompatibilna je i s kapilarnom zonskom elektroforezom (CZE)<sup>27</sup>. Što se tiče otapala, za ESI je dozvoljena upotreba vodenih, kao i mnogih organskih otapala, te hlapljivih pufera. Tehnikom elektroraspršenja nastaju višestruko nabijeni ioni, što omogućuje njihovo detektiranje i spektrometrija masa malog mjernog područja  $m/z$  (npr.  $m/z$  100 – 1.800). Kao analizatori masa najprimjenjiviji su kvadrupolni analizator (jednostruki ili trostruki) i stupica iona<sup>28,29</sup>.

Elektroraspršenje je ionizacijska tehnika kojom je moguća analiza makromolekularnih kompleksa u plinovitoj fazi bez narušavanja njihovih međusobnih nekovalentnih interakcija. Za razliku od tehnike MALDI, ESI je tehnika osjetljivija na kontaminaciju uzorka solima, kaotropima i detergentima, koji mogu tvoriti klustere, adukte s molekulama analite ili jednostavno ometaju nastajanje stabilnog spreja<sup>30</sup>. Radi navedenih razloga prije ionizacije elektroraspršenjem uzorci se najčešće razdvajaju tekućinskom kromatografijom obrnutih faza (kontinuirana analiza), a potom detektiraju spektrometrijom masa. Kontinuirana analiza omogućava automatizaciju i rutinsku analizu više uzoraka uzastopno.

## PRIMJENA SPEKTROMETRIJE MASA U ANALIZI PEPTIDNIH LIJEKOVA

### KVANTIFIKACIJA

U farmaceutskim istraživanjima kvantitativno određivanje peptida važno je za stabilitetne studije. Ispitivanje stabilnosti peptida u biološkim uzorcima temelj je za shvaćanje metabolizma i enzimske kinetike. Analiza farmakokinetičkih podataka vezanih za resorpciju tvari, distribuciju, vezanje proteina i eliminaciju *in vivo* zahtijeva vremenski ovisno određivanje koncentracije peptida u plazmi. Određivanje čistoće uzorka za kontrolu kvalitete sinteze i proizvodnje peptida također zahtijeva kvantifikacijske metode<sup>30</sup>.

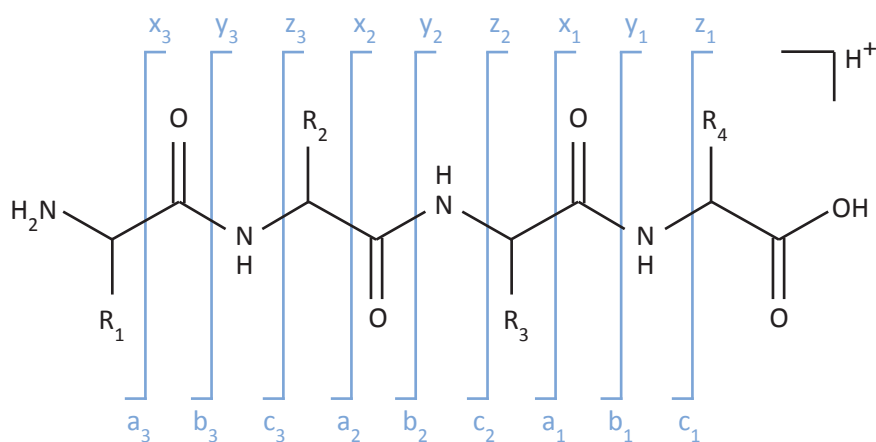
U svrhu kvantifikacije peptida najčešće se koristi vezana tehnika LC-MS za praćenje odabranih iona (engl. *Selective Ion Monitoring*, SIM)<sup>31</sup> ili višestrukih reakcija (engl. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM)<sup>32</sup>. Većina kvantitativnih analiza spektrometrijom masa uključuje ESI tehniku ionizacije. Ako se kao analizator koristi kvadrupol, SIM je najbolji izbor za kvantifikaciju. Najveća prednost SIM načina je povećanje omjera signala i šuma;  $s/n$ <sup>30</sup>.

MALDI se također može koristiti za kvantitativna mjerenja. Fluktuaciju intenziteta signala uzrokovanu nehomogenom distribucijom analita moguće je značajno reducirati izotopnim obilježavanjem molekula kemijski jednakih (ili sličnih) analitu. Ovako označene molekule koriste se kao interni standardi<sup>33</sup>.

### IDENTIFIKACIJA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA

Kontrola onečišćenja tijekom i nakon proizvodnje kritičan je parametar. Spektrometrijom masa moguće je pratiti neuklonjena procesna onečišćenja prisutna u vrlo malim količinama, kao i ona nastala degradacijom<sup>34,35</sup>.

Identifikacija peptidnih onečišćenja temelji se na sekvencioniranju peptida. Peptidna fragmentacija inducirana je kolizijom iona s atomima ili molekulama inertnih plinova. Budući da je najčešće za pucanje peptidne veze potrebna najmanja kolizijska energija, upravo je to reakcija koja se favorizirano događa u ionu prekursoru<sup>1</sup>. Ioni peptida nastali fragmentiranjem iona prekursora mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: na one koji su nastali cijepanjem jedne ili više veza okosnice peptidnog lanca i na one nastale cijepanjem okosnice peptidnog lanca i cijepanjem bočnog ogranka<sup>19</sup>. Prihvaćenu nomenklaturu nastalih fragmentnih iona predložili su Roepstorff i Fohlman<sup>36</sup>, a kasnije ju je modificirao Biemann<sup>37</sup>. Tip iona u MS/MS spektru ovisi o primarnoj sekvenci peptida, kao i o energiji potrebnoj za pucanje peptidne veze. Fragmentaciju je moguće detektirati ako nastanu najmanje jednostruko nabijeni ioni. Ukoliko je naboj zadržan na N-terminalnom kraju, nastaju ioni tipa a, b i c. Zadržavanje naboja na C-terminusu rezultira nastankom x, y i z iona (slika 1).



**Slika 1.** Shematski prikaz fragmentacije peptida a, b, c, kao i x, y i z serije. Indeks označava broj aminokiselinskih ostataka u nastalom ionu.

**Figure 1.** Fragmentation of peptides of a,b,c, and x,y,z series. Index points the number of aminoacids in the newly formed ion.

## KEMIJSKE MODIFIKACIJE PEPTIDA I PROTEINA

Radi poboljšanja farmakoloških i farmakokinetičkih svojstava peptidnih ili proteinskih lijekova (povećanje topljivosti, dulje zadržavanje u krvotoku, stabilizacija proteina s obzirom na proteolitičku razgradnju, smanjenje imunogenosti i sl.) farmaceutski peptidi i proteini se kemijski modificiraju vezanjem polisaharida (npr. HES)<sup>38,39</sup>, polietera (npr. PEG)<sup>40</sup> ili biopolimera<sup>41</sup>.

Kvantitativno određivanje peptida važno je za stabilitetne studije u farmaceutskim istraživanjima. Ispitivanje stabilnosti peptida u biološkim uzorcima temelj je za shvaćanje metabolizma i enzimske kinetike. Analiza farmakokinetičkih podataka vezanih za resorpciju tvari, distribuciju, vezanje proteina i eliminaciju *in vivo* zahtijeva vremenski ovisno određivanje koncentracije peptida u plazmi. Određivanje čistoće uzorka za kontrolu kvalitete sinteze i proizvodnje peptida također zahtijeva kvantifikacijske metode.

HES (engl. *Hydroxyethyl starch*) je sintetski derivat amilopektina. Komercijalno je dostupan u različitim molekulskim masama i stupnjevima supstitucije, a za razliku od dekstrana smanjuje mogućnost anafilaktičke reakcije. Vezanjem navedene molekule na peptid omogućava se dulji poluživot peptidnog lijeka u krvotoku, te njegova sporija degradacija<sup>39</sup>. PEG (engl. *Polyethylene glycol*) je monodisperzan (vrlo uzak raspon molekulskih masa) ili polidisperzan (širok raspon molekulskih masa) polieter molekulske mase 300 – 10.000. Zbog multivalentnosti peptida i proteina poželjno je da se za konjugaciju koristi PEG koji sadrži samo jednu reaktivnu skupinu<sup>40</sup>. Tzv. PEGilacija, tj. vezanje jedne ili više molekula polietilenglikola, učinkovita je metoda za produljivanje cirkulacije peptida u krvotoku<sup>42</sup>, pri čemu se peptid štiti od degradacije enzimima<sup>40</sup>. Nasuprot vezanju šećera, škroba ili polietera, vezanje biopolimera (npr. humanog albumina iz seruma) na pojedini peptid ili protein omogućava komercijalnu proizvodnju fuzijskih peptida i proteina tehnikom rekombinantne DNA<sup>41</sup>.

Modifikacije peptida dodatno mogu podrazumijevati ciklizaciju, vezanje neprirodne aminokiseline ili signalne molekule. Komercijalno dostupni i

na ovaj način modificirani peptidi sintetizirani su tehnikom sinteze na krutom nosaču<sup>43</sup>.

Analiza kemijski modificiranih peptida svodi se na određivanje broja vezanih molekula, kao i vezno mjesto molekule, efikasnost vezanja, postrane nepoželjne reakcije kao i moguće promjene novonastale makromolekule u vremenu.

## ZAHVALA

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

## LITERATURA

1. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Mol Cell Biol* 2004;5:699-711.
2. Salazano AM, Crescenzi M. Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications. *Ann Ist Super Sanita* 2005;44:443-50.
3. Bocklaer J, Clauwaert KM, Lambert WE, Deforce DL, Eeckhout E, Leenheer A. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. *Mass Spec Rev* 2000;19:165-214.
4. Thevis M, Thomas A, Schaenzer W. Mass spectrometric determination of insulins and their degradation products in sports drug testing. *Mass Spec Rev* 2008;27:35-50.
5. Gevaer K, Demol H, Sklyarova T, Vandekerckhove J, Hout-haeve T. A peptide concentration and purification method for protein characterization in the subpicomole range using matrix assisted laser desorption/ionization-postsource decay (MALDI-PSD) sequencing. *Electrophoresis* 1998;19:909-17.
6. Zamfir AD, Lion N, Vukelic Z, Bindila L, Rossier J, Girault HH et al. Thin chip microsyringe system coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for glycoconjugate analysis. *Lab on a Chip – Miniaturisation for Chemistry and Biology*. 2005;5:298-307.
7. Kellner R, Lottspeich F, Meyer HE. *Microcharacterization of proteins*. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim: WILEY-VCH, 1999:213-30, 256-61.
8. Goudog C, Pramanik BN, Liu YH, Urooj AM. Application of LC/MS in structure identification of small molecules and proteins in drug discovery. *J Mass Spec* 2008;42:279-87.
9. Guzmán F, Barberis S, Illanes A. Peptide synthesis – chemical or enzymatic. *El J Biotech* 2007;10:2.
10. Marx V. Watching peptide drugs go up. *C&EN* 2005;83:17-24.
11. Wangenmayer F. Synthesis of peptide hormones using Recombinant DNA techniques, *Angew Chem Int Ed Engl* 2003;22:842-58.
12. Thomas BR, Van Deynze A, Bradford KJ. Production of the therapeutic proteins in Plants. *ANR Publ* 2002;8078:1-12.
13. Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Methods* 1999;137:147-57.
14. Overview of peptide synthesis, AnaSpec. Available at [http://www.anaspec.com/html/peptide\\_notes.html](http://www.anaspec.com/html/peptide_notes.html). Accessed May 21, 2009.
15. Clark TD, Sastry M, Brown C, Wagner G. Solid-phase synthesis of backbone-cyclized b-helical peptides. *Tetrahedron* 2006;62:9533-40.

16. Schiabberger A, Moss J. Optimized sample preparation for MALDI mass spectrometry analysis of protected synthetic peptides. *J Am Soc Mass Spec* 2008;19:614-9.
17. Harald J, Walden M, Schaefer S, Genz S, Forssmann W. Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2004;378:883-97.
18. van den Broek I, Sparidans RW, Schellens JMH, Beijnen HJ. Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry. *J Chrom B* 2008;872:1-22.
19. Galić N, Cindrić M. Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kem Ind* 2008;57:231-43.
20. Devaert K, Demol H, Puype M, Broekaert B, De Boeck S, Houthaev T et al. Peptides adsorbed on reverse-phase chromatographic beads as targets for femtomole sequencing by post-source decay matrix assisted laser desorption ionization-reflectron time of flight mass spectrometry (MALDI-RETOF-MS). *Electrophoresis* 2005;18:2590-960.
21. Bodzon-Kulakowska A, Bierzynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M et al. Methods for sample preparation in proteomic research. *J Chrom B* 2007;849:1-31.
22. Laiko V, Moyer SC, Cotter RJ. Atmospheric Pressure MALDI/Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2000;72:5239-43.
23. Dodds ED, German JB, Lebrilla CB. Enabling MALDI-FTICR-MS/MS for high-performance proteomics through combination of infrared and collisional activation. *Anal Chem* 2007;79:9547-56.
24. Cañas B, Piñero C, Calvo E, López-Ferrer D, Gallardo JM. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *J Chrom A* 2007;1153:235-58.
25. Venn RF, Merson J, Cole S, Macrae S. 96-well solid extraction: a brief history of its development. *J Chrom B* 2005;817:77-80.
26. Palmblad M, Vogel JS. Quantitation of binding, recovery and desalting efficiency of peptides and proteins in solid phase extraction micropipette tips. *J Chrom B* 2005;814:309-13.
27. Rechthaler J, Rizzi A, Allmaier G. A one-way hydrophobic surface foil as sample support for MALDI and off-line CZE/MALDI mass spectrometry: An alternative for low and high molecular mass compounds. *Int J Mass Spec* 2007;268:131-8.
28. van Platenik CJ, Janssen HGM, Horsten R, Haverkamp J. Quantification of ACE inhibiting peptides in human plasma using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chrom B* 2006;830:151-7.
29. Jonscher KR, Yates JR. The Whys and Wherefores of Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. Available at <http://www.abrf.org/ABRFNews/1996/September1996/sep96iontrap.html>. Accessed May 21, 2009.
30. Tamvakopoulos C. Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids. *Mass Spec Rev* 2007;26:389-402.
31. McIntosh MP, Carlson BJ, Schorno KS, Rajewski RA. Single quadrupole mass spectrometry for pre-clinical pharmacokinetic analysis: Quantitation of carvedilol in dog plasma. *J Chrom B* 2007;852:665-8.
32. Biesenthal T, Gamble T, Pace N, Impey G. Impurity and degradation product analysis: High sensitivity quantitative and qualitative analysis using a hybrid triple-quadrupole-linear ion trap mass spectrometer. 51st American Society for Mass Spectrometry Conference on Mass Spectrometry. Montreal, QC, Canada.
33. Amini A, Nilsson E. Quantitative analysis of polypeptide pharmaceuticals by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2008;46:411-7.
34. Wang R, Feder D, Hsieh F. Characterization of eptifibatid during drug formulation stability assays. *J Pharm Biomed Anal* 2003;33:1181-7.
35. Sanz-Nebot V, Toro I, Barbosa J. Fractionation and characterization of crude peptide mixtures from the synthesis of eledosin by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chrom A* 1999;846:25-38.
36. Roepstroff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in **mass spectra** of peptides. *J Biomed Mass Spectrom* 1984;11:601.
37. Biemann K. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol* 1990;193:886-7.
38. Sommermeyer K, Zander N, Eichner W, Conradt H, Schimmel M, Hackett F et al. Conjugates of hydroxyalkyl starch and a protein. Available at <http://www.faq.org/patents/app/20090047251>. Accessed May 21, 2009.
39. Orlando M. Modification of proteins and low molecular weight substances with HES. Giessen, Justus Liebig Universität, 2003;30-58, PhD thesis. Available at [http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=96981545x&dok\\_var=d1&dok\\_ext=pdf&filename=96981545x.pdf](http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=96981545x&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=96981545x.pdf). Accessed May 21, 2009.
40. Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 2005;10:1451-8.
41. Platis D, Labrou NE. Chemical and genetic engineering strategies to improve the potency of pharmaceutical proteins and enzymes. *Curr Med Chem* 2008;15:1940-55.
42. Beibei H, Shirong L, Xiaohui L, Zhilong X. Design, preparation and in vitro bioactivity of mono-PEGylated recombinant hirudin. *Chin J Chem Eng* 2007;15:775-80.
43. Synthesis biology. Available at [http://www.synthesisbiology.com/peptide\\_modifications.html](http://www.synthesisbiology.com/peptide_modifications.html). Accessed May 21, 2009.

## POPIS KRATICA

CZE	Kapilarna zonska elektroforeza / <i>Capillary zone electrophoresis</i>
ESI	Ionizacija elektroraspršenjem / <i>Electrospray ionization</i>
FT ICR	Analizator ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju / <i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
HES	Hidroksietil – škrob / <i>Hydroxyethyl starch</i>
IT	Ionska stupica / <i>Ion trap</i>
LC	Tekućinska kromatografija / <i>Liquid chromatography</i>
MALDI	Matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem / <i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MRM	Praćenje višestrukih reakcija / <i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Spektrometrija masa / <i>Mass spectrometry</i>
PEG	Polietilenglikol / <i>Polyethylene glycol</i>
PSD	Poslijeionizacijska fragmentacija / <i>Post source decay</i>
SIM	Praćenje određenih iona / <i>Selective ion monitoring</i>
SPPS	Sinteza peptida na krutom nosaču / <i>Solid phase peptide synthesis</i>
TOF	Analizator koji mjeri vrijeme leta / <i>Time of flight</i>